

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PERFIL DE ISOTIPOS ANTI-*TOXOPLASMA*  
*GONDII* POR ELISA E CITOMETRIA DE FLUXO EM INDIVÍDUOS  
PORTADORES DE UVEÍTES TOXOPLÁSMICAS

**Lívia Mattos Martins**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**  
**Campos dos Goytacazes, RJ**  
**Setembro 2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PERFIL DE ISOTIPOS ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* POR ELISA E CITOMETRIA DE FLUXO EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE UVEÍTES TOXOPLÁSMICAS

**Lívia Mattos Martins**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Lílian Maria Garcia Bahia de Oliveira

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**  
**Campos dos Goytacazes, RJ**  
**Setembro 2009**

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PERFIL DE ISOTIPOS ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* POR ELISA E CITOMETRIA DE FLUXO EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE UVEÍTES TOXOPLÁSMICAS

**Lívia Mattos Martins**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Lílian Maria Garcia Bahia de Oliveira

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**  
**Campos dos Goytacazes, RJ**  
**Setembro 2009**



**A minha mãe e minhas irmãs Lara e Laiza: pelo amor incondicional e por serem os motivos de eu querer melhorar sempre.**  
**Ao meu cunhado Fernando: minha eterna gratidão.**  
**A todos meus amigos: sem eles a vida não teria graça nem sentido.**

## **Agradecimentos**

Acho que não é exagerado dizer que um trabalho (seja ele de qualquer tipo) nunca é realizado por uma única pessoa. Não tenho palavras pra agradecer a todas pessoas que trabalharam junto comigo (direta ou indiretamente) e tornaram essa realização possível :

À professora Lílian Bahia, primeiro por ter aceitado me orientar, dadas as circunstâncias. E tenho muito mais a agradecer por tudo que veio depois: toda ajuda, atenção, aprendizado e oportunidades que recebi! Por ser uma verdadeira ORIENTADORA! Muito obrigada mesmo!

À Alba por ter me aberto as portas do mundo da toxoplasmose, me apoiado desde o início e por toda ajuda ao longo do projeto. E mais ainda pela amizade de todos os dias!

À Bianca, Marcela e Liliane por terem colocado a mão na massa junto comigo! O que seria de mim se não fosse a Marcela lendo aquelas placas no citômetro enquanto eu marcava as outras? E a Bianca que ficou três dias com dor nas costas de tanto lavar placas de ELISA? E nossas centenas de camundongos Lili, como eu cuidaria deles sozinha? Obrigada mesmo! Não só pelo ajuda no trabalho, mas principalmente por toda amizade que temos construído trabalhando juntas!

À Flavia, Beatriz, Ricardo e Fabrício por sempre estarem disponíveis e ajudando de uma forma ou de outra, tornando a rotina sempre mais agradável. Um agradecimento especial à Flavinha por ser minha companheira para as sessões de cinema!

A todos os funcionários, alunos e professores do LBR! Obrigada pela atenção, carinho e ajuda que tenho recebido de vocês desde que vim para a UENF.

A professora Elenice Lemos por ter me recebido em seu laboratório no Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, e à sua aluna de mestrado Priscila Silva que me ensinou toda técnica de identificação de isotipos por citometria de fluxo! Muito obrigada mesmo!

Ao Fábio, técnico responsável pelo infectório do LBCT, por toda ajuda e por sempre tentar arrumar mais camundongos pra mim!

Aos professores Milton, Michele e Elenice pela gentileza de terem aceitado participar da minha banca avaliadora. E ainda à Alba por ter revisado essa tese!

Tenho que agradecer também àquelas pessoas que muitas vezes nem sabiam o que eu estava fazendo, mas mesmo assim me deram seu apoio e amor incondicional: minha família e meus amigos.

À minha mãe, por ser amiga, pai e mãe, o que não deve ser fácil, mas ela cumpre todos estes papéis perfeitamente.

Às minhas irmãs: à Lara por ser uma pessoa maravilhosa que me ensinou a aproveitar um pouco mais a vida e à Laiza por ser minha irmãzinha, por me ajudar sempre e por ter me dado a sobrinha mais linda desse mundo!

Ao meu cunhado Fernando por toda ajuda quando vim pra Campos. Se não fosse por ele esse sonho não estaria sendo realizado hoje! Muito obrigada mesmo!

À toda grande e louca família Mattos: tios, primos e agregados! Obrigada pelo apoio e incentivo!

Ao Ediniz Júnior. Como não saberia listar todas as coisas pelas quais eu teria que te agradecer: MUITO OBRIGADA POR TUDO!

À Milene por ser minha amiga desde sempre e por tudo que me ajudou nos meus primeiros tempos aqui em Campos!

A todos meus amigos: os que moram perto e os que moram longe, os que vejo todo dia e os que não vejo a séculos, os que eu conheço a pouco tempo e os que eu convivo a desde que nasci! Não vou cair na besteira de citar nomes aqui, porque todos são muito importantes e não quero deixar ninguém de fora... Muito obrigada por todas as coisas maravilhosas que vocês me proporcionam todos os dias! A vida não teria a menor graça sem vocês!

## ÍNDICE

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
<b>I- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1- Aspectos Gerais .....	1
1.2- O <i>Toxoplasma gondii</i> .....	1
1.2.1- Taquizoítas.....	2
1.2.2- Cistos e bradizoítas.....	2
1.2.3- Oocistos.....	3
1.3- Ciclo Biológico.....	3
1.3.1- Fase sexuada.....	3
1.3.2- Fase assexuada.....	4
1.4- Formas de transmissão.....	5
1.5- A toxoplasmose.....	6
1.6- Toxoplasmose ocular.....	8
1.7 – Classificação de uveítes.....	9
2 – Resposta imune ao <i>Toxoplasma gondii</i> .....	12
2.1- Resposta Imune celular.....	12
2.2 - Resposta imune intraocular.....	15
2.3 – Imunoglobulinas: estrutura e função.....	16
2.3.1 – Resposta imune humoral ao <i>T. gondii</i> .....	16
3 – Diagnóstico.....	18
<b>II- JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>21</b>
<b>III- OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>IV- POPULAÇÃO ESTUDADA, MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1- População Estudada .....	23
4.2 - Adsorção de soros com Proteína A.....	24
4.3- Manutenção dos Parasitas e Preparação do Antígeno Solúvel de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	25
4.4- Detecção de Anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em Amostras de Soros de Pacientes por meio de ELISA.....	26
4.5- Preparação de Antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i> para citometria de fluxo.....	27
4.6- Citometria de fluxo para detecção de antígenos na superfície de formas taquizoítas.....	28

4.7- Análises estatísticas.....	30
<b>V- RESULTADOS</b> .....	33
5.1- Detecção de Anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em Amostras de Soros de Pacientes por ELISA.....	33
5.1.1 – Detecção de IgA e IgE .....	33
5.1.2 - Detecção de IgG total e suas subclasses 1, 3 e 4.....	34
5.2 – Detecção de imunoglobulinas em Amostras de Soros de Pacientes por Citometria de Fluxo.....	37
5.2.1 – Detecção de IgA, IgM e IgE.....	40
5.2.2 – Detecção de IgG Total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.....	42
5.3 – Cálculo de Especificidade e Sensibilidade e aplicação de curvas ROC para os testes ELISA e Citometria de Fluxo.....	47
5.4 - Construção de curva ROC e estabelecimento de ponto de corte para os testes de IgM e IgG total por citometria de fluxo e IgG <sub>3</sub> por ELISA.....	51
<b>VI- DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>VII- CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64
<b>ANEXOS</b>	
<b>Anexo 1:</b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80
<b>Anexo 2:</b> Parecer do CONEP referente ao Projeto.....	83
<b>Anexo 3:</b> Soluções.....	84

## Resumo

A toxoplasmose ocular é uma uveíte posterior e apresenta ampla variação em suas manifestações clínicas. A influência da resposta imunológica no desenvolvimento de lesões oculares vem sendo estudada nas últimas décadas, porém a participação de imunoglobulinas nesse processo tem sido pouco investigada. O estudo do papel das imunoglobulinas nesse contexto pode trazer avanços tanto para o entendimento da relação entre resposta imunológica e o surgimento de doença ocular quanto subsidiar o desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais precisas. Testes baseados na técnica de ELISA e suas variações são os mais comumente utilizados na rotina de diagnóstico de toxoplasmose, e ainda a citometria de fluxo não é uma técnica consolidada para essa finalidade. Com intuito de avaliar o perfil das imunoglobulinas A, E, M e G total, bem como suas sub-classes IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, e sua relação com a presença de lesões oculares o soro de 87 indivíduos foi avaliado por meio de citometria de fluxo e ELISA. Os resultados obtidos indicaram que testes realizados por citometria de fluxo apresentaram melhor desempenho para todas as imunoglobulinas analisadas, exceto IgE. O que sugere que esta metodologia poderá se tornar importante, principalmente para o diagnóstico da toxoplasmose. Foi observado ainda que pacientes sem lesões oculares apresentam níveis elevados de IgG<sub>3</sub> quando comparados a pacientes portadores de lesão ocular. Pacientes com lesão ocular apresentaram níveis significativamente elevados de IgG total, IgG<sub>1</sub> e IgM. Pacientes soronegativos com lesão ocular apresentaram níveis significativamente mais elevados de IgM, mesmo se comparados a indivíduos soropositivos sem acometimento ocular. A partir dessa informação IgM foi testada como marcador para uveítes toxoplásmicas. Observou-se que a presença de IgM em indivíduos com toxoplasmose crônica identifica portadores de lesão ocular com uma especificidade igual a 100% e sensibilidade igual a 83%. Assim, destaca-se o importante papel de IgM como marcador para toxoplasmose ocular na fase crônica da infecção.

**Palavras chave:** Toxoplasmose ocular, imunoglobulinas, citometria de fluxo.

## **ABSTRACT**

The ocular toxoplasmosis is a posterior uveitis and presents a wide variation in their clinical manifestations. The influence of immune response in the development of ocular lesions has been studied in recent decades, but the involvement of immunoglobulins in this process has been poorly investigated. The study of the role of immunoglobulins in this context can bring much progress in understanding the relationship between immune response and the onset of eye disease and support the development of more accurate diagnostic techniques. Tests on the ELISA and its variations are the most commonly used in routine diagnosis of toxoplasmosis, and flow cytometry is a not consolidated technique for this purpose. In order to evaluate the profile of immunoglobulins A, E, F and G total and its sub-classes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, and its relation to the presence of severe eye serum from 87 individuals was assessed by flow cytometry and ELISA. The results indicated that tests performed by flow cytometry showed better performance for all tested immunoglobulins except IgE. This suggests that this approach may become important, especially for the diagnosis of toxoplasmosis. Further it was observed that patients without ocular lesions show high levels of IgG3 compared to patients with eye injury. Patients with eye injury had significantly higher levels of total IgG, IgG1 and IgM. Seronegative patients with ocular disease had significantly higher levels of IgM, even when compared to seropositive individuals without ocular disease. From this information IgM was tested as a marker for toxoplasmic uveitis. It was observed that the presence of IgM in individuals with chronic toxoplasmosis identifies patients with ocular injury with a specificity of 100% and sensitivity equal to 83%. Thus, we highlight the important role of IgM as a marker for ocular toxoplasmosis in the chronic phase of infection.

**Keywords:** Ocular toxoplasmosis, immunoglobulins, flow cytometry.

## ABREVIATURAS

APC	<i>Antigen presenting cell</i> - Célula apresentadora de antígeno
AUC	<i>Area under the curve</i> - área sob a curva
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Albumina Sérica Bovina
D.O.	Densidade ótica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> - Ensaio Enzimático de Imunoadsorção
E <sub>s</sub>	Especificidade
FITC	Fluoresceína isotiocianato
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da imunodeficiência Humana
HRP	Horseradish <i>peroxidase</i>
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG <sub>1</sub>	Imunoglobulina G <sub>1</sub>
IgG <sub>2</sub>	Imunoglobulina G <sub>2</sub>
IgG <sub>3</sub>	Imunoglobulina G <sub>3</sub>
IgG <sub>4</sub>	Imunoglobulina G <sub>4</sub>
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
Kda	KilloDalton

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> - Complexo Principal de Histocompatibilidade
NO	<i>Nitric oxide</i> - Óxido nítrico
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> - Salina Fosfatada Tamponada
PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
PPFP	Percentual de parasitas fluorescentes positivos
ROC	Receiver operator curve
RV	Razão de Verossimilhança
SAG1	<i>Surface Antigen -1</i> – Antígeno de Superfície 1
SAPE	Estreptavidina Ficoeritrina
S <sub>e</sub>	Sensibilidade
STAg	<i>Soluble Toxoplasma Antigen</i> - Antígeno Solúvel de <i>Toxoplasma</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> - Fator Transformante de Crescimento
Th	<i>T helper lymphocytes</i> - Linfócitos T auxiliares
TLR	<i>Toll-Like receptors</i> - Receptores Toll-like
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - Fator de Necrose Tumoral

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Principais vias de transmissão do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	6
<b>Figura 2:</b> Classificação das lesões oculares decorrentes da infecção pelo <i>Toxoplasma gondii</i> .....	11
<b>Figura 3:</b> Gráficos representativos utilizados para determinar a Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos (PPFP).....	30
<b>Figura 4:</b> Detecção de IgA E IgE por ELISA. IgA nos indivíduos de acordo com a presença ou não de lesão ocular e sorologia.....	34
<b>Figura 5:</b> Detecção IgG total por ELISA. IgG Total nos indivíduos de acordo com a presença ou não de lesão ocular e sorologia.....	35
<b>Figura 6:</b> Detecção de IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>3</sub> IgG <sub>4</sub> por ELISA. IgG <sub>1</sub> nos indivíduos de acordo com a presença ou não de lesão ocular e sorologia.....	36
<b>Figura 7:</b> Diluições de soros de indivíduos soropositivos com ou sem acometimento ocular e indivíduos soronegativos com lesão ocular e soronegativos sem lesão ocular....	38
<b>Figura 8:</b> Médias das diluições de soros de indivíduos soropositivos com ou sem acometimento ocular e indivíduos soronegativos com lesão ocular e soronegativos sem lesão ocular.....	39
<b>Figura 9:</b> Detecção de IgA por Citometria de Fluxo.....	40
<b>Figura 10:</b> Detecção de IgM por Citometria de Fluxo.....	41
<b>Figura 11:</b> Detecção de IgE por Citometria de Fluxo.....	42
<b>Figura 12:</b> Detecção de IgG total por Citometria de Fluxo.....	43
<b>Figura 13:</b> Detecção de IgG <sub>1</sub> por Citometria de Fluxo.....	44
<b>Figura 14:</b> Detecção de IgG <sub>2</sub> por Citometria de Fluxo.....	45
<b>Figura 15:</b> Detecção de IgG <sub>3</sub> por meio de Citometria de Fluxo.....	46
<b>Figura 16:</b> Detecção de IgG <sub>4</sub> por meio de Citometria de Fluxo.....	47
<b>Figura 17:</b> Curvas ROC aplicadas aos testes ELISA.....	49
<b>Figura 18:</b> Curvas ROC aplicadas aos testes de Citometria de fluxo.....	50
<b>Figura 19:</b> Avaliação de IgM como marcador para uveítes toxoplásmicas.....	51
<b>Figura 20:</b> Avaliação de IgG Total como marcador para uveítes toxoplásmicas.....	52

<b>Figura 21: Avaliação de IgG<sub>3</sub> como marcador para uveítes toxoplásmicas.....</b>	<b>53</b>
--	-----------

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes participantes, participantes di estudo agrupados segundo exames sorológicos e de fundo de olho.....	24
<b>Tabela 2:</b> Diluição de anticorpos conjugados a peroxidase ou biotina e desoros utilizados no ensaio de ELISA.....	27
<b>Tabela 3:</b> Diluições de anticorpos conjugados a FITC ou a Biotina e de soros usados para citometria de fluxo. ....	29
<b>Tabela 4:</b> Valores de Sensibilidade, Especificidade e Razão de Verossimilhança para os testes realizados .....	48

## I - INTRODUÇÃO

### 1.1- Aspectos gerais

O *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, é um parasita intracelular obrigatório e infecta ao menos um terço da população mundial (Montoya and Liesenfeld, 2004). Pode ser transmitido ao homem, a outros mamíferos e aves. A transmissão se dá, basicamente, por meio de alimentos ou água contaminada, pela ingestão de carne crua ou mal cozida ou ainda de forma congênita. Geralmente a infecção por *T. gondii* é assintomática, porém, patologias poderão se desenvolver, entre elas a toxoplasmose ocular (Hill and Dubey, 2002).

### 1.2 - O *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário pertencente a classe Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystiidae. Foi descrito em 1908 simultaneamente por Splendore no Brasil e por Nicolle e Manceaux na Tunísia (Splendore, 2009a; Splendore, 2009b, Nicolle and Manceaux, 2009). Porém, a infecção em humanos só foi conhecida em 1923, quando o parasita foi isolado de cistos oculares (Janku, 1923).

Dependendo do estágio evolutivo, o parasita apresentará morfologias típicas, tais como: taquizoíta, bradizoíta e a oocística. Porém, em quaisquer destes estágios o parasito apresentará organelas características do filo Apicomplexa, como conóide, anel polar, microtúbulos subpeliculares, róptrias, micronemas e grânulos densos, que formam o complexo apical (Revisado por Ferguson, 2009).

Tradicionalmente são reconhecidas três principais linhagens filogenéticas, denominadas tipo I, II e III (Darde, et al., 1988, Howe e Sibley, 1995, Sibley e Boothroyd, 1992, Tibayrenc, et al., 1991). Estes estudos utilizaram basicamente amostras provenientes dos Estados Unidos e Europa, e a grande maioria dos isolados disponíveis se enquadravam em uma destas linhagens. Entretanto, estudos posteriores utilizando amostras de outras regiões do globo terrestre demonstraram que *T. gondii* apresentava complexa estrutura populacional (Ajzenberg, et al., 2004). A relação entre as linhagens I, II e III e a virulência foi descrita em modelos murinos. A linhagem tipo I é considerada altamente virulenta, enquanto as linhagens tipo II e III são consideradas de menor virulência (Grigg e Boothroyd, 2001). Entre as linhagens isoladas no Brasil

observou-se que a linhagem BrI é altamente virulenta, BrIII não é virulenta, enquanto BrII e BrIV apresentam níveis intermediários de virulência (Pena, et al., 2008).

### **1.2.1- Taquizoítas.**

Taquizoítas, do grego *Tachos* (velocidade), são formas de proliferação rápida. Medem cerca de 2-4  $\mu\text{M}$  de largura e 4-8  $\mu\text{M}$  de comprimento e seu formato se assemelha a um arco. São capazes de invadir todas as células nucleadas onde formam um vacúolo citoplasmático. A replicação dos taquizoítos leva a morte celular e rápida invasão das células vizinhas. Conseqüentemente, taquizoítos induzem respostas inflamatórias e manifestações clínicas da toxoplasmose na fase aguda da infecção (Dobrowolski e Sibley, 1996).

A divisão dos taquizoítos ocorre por meio da endodiogenia, processo no qual duas células filhas são geradas dentro da membrana da célula mãe. Após a duplicação do DNA no núcleo, inicia-se a divisão celular pela duplicação da região do conóide, segue para as róptrias, aparelho de Golgi, núcleo e então são geradas as duas células-filhas (Dubey, et al., 1977).

Após sua disseminação, taquizoítas podem se diferenciar em bradizoítas. Mecanismos que levam a essa transformação ainda não foram esclarecidos. Sabe-se, porém, que esta conversão se dá em resposta a situações de estresse, tais como o aumento de temperatura, presença de agentes oxidantes, e outros mecanismos de defesa do organismo hospedeiro (Weiss e Kim, 2000; Vonlaufen et al., 2008).

### **1.2.2- Cistos e bradizoítas**

Bradizoítas são muito semelhantes aos taquizoítos, porém se multiplicam lentamente, expressam moléculas estágio específicas e possuem função diferente. Outra diferença marcante é o fato de bradizoítos resistirem às enzimas digestivas, enquanto os taquizoítas não (Dubey, 1998).

Um cisto pode conter centenas ou milhares de bradizoítas e são encontrados principalmente no cérebro e musculatura esquelética e cardíaca. Pode apresentar formas e tamanhos variáveis de acordo com o tecido, mas geralmente são redondos, medindo entre 20 e 200  $\mu\text{m}$  (Dubey, 1998). Admite-se que o cisto não permite a penetração de agentes medicamentosos ativos ou a atuação de anticorpos, e, por outro

lado, impedem a saída de produtos metabólicos desencadeadores de inflamação local (Ambroise-Thomas, 2000).

Bradizoítas podem transformar-se em taquizoítos e causar o aparecimento de sintomas e reagudização em pacientes imunocomprometidos (Dubey, et al., 1998).

### **1.2.3- Oocistos**

Oocisto é a forma infectante resultante da reprodução sexuada, que acontece somente no intestino de felídeos.

Em condições ambientais adequadas de temperatura e umidade, ocorre a esporulação do oocisto e então são formados dois esporocistos e, dentro de cada um deles, haverá quatro esporozoítas semelhantes ao taquizoíta, exceto por apresentar, nos esporozoítas, um número maior de micronemas e róprias (Dubey, 1998, Frenkel, 1988).

Essa forma é extremamente resistente à agentes desinfectantes e pode permanecer no meio ambiente com capacidade de infecção por até um ano ou mais. Porém, ao ser ingerido pelo hospedeiro, o oocisto entra em contato com os sucos digestivos, e rapidamente libera esporozoítas, que invadirão células e, conseqüentemente, haverá o estabelecimento da infecção (Frenkel, 1988).

## **1.3- Ciclo Biológico**

### **1.3.1- Fase sexuada**

Espécies do gênero *Felis* sp. (felídeos) são os únicos hospedeiros nos quais o *T. gondii* pode completar todo o seu complexo ciclo de vida, por isso são considerados hospedeiros definitivos. Os demais mamíferos e as aves não podem manter senão as fases assexuadas do ciclo biológico e, portanto, desempenham o papel de hospedeiros intermediários, transmitindo a infecção apenas quando sua carne serve para a alimentação de outros animais, ou via congênita (Dubey, 1998).

O gato se infecta ao ingerir qualquer uma das formas evolutivas do *T. gondii*, principalmente cistos teciduais. As paredes dos cistos são dissolvidas pelos sucos digestivos no estômago e intestino delgado. Os bradizoítos liberados penetram nas células epiteliais do intestino delgado e iniciam uma série de gerações sexuadas determinadas pelo gênero (Dubey, 1998). Cinco estágios morfológicos distintos são

identificados no epitélio intestinal dos gatos durante a gametogênese (Dubey *et al.*, 1995).

A multiplicação assexuada se dá por esquizogonia. Logo após ocorre a liberação de merozoítas que invadirão novas células e darão origem aos macro e microgametas (móveis e com dois flagelos), gametas femininos e masculinos respectivamente. Os gametas se fundirão e originarão o zigoto, que se transformará em oocisto (Dubey, 1998).

Após o gameta masculino fertilizar o gameta feminino, uma parede é formada ao redor do gameta feminino (zigoto), formando o oocisto. A célula epitelial, em alguns dias, sofrerá rompimento, liberando o oocisto imaturo. Milhões de oocistos podem ser liberados por dia. Essa eliminação apresenta um pico, geralmente entre cinco e dez dias após a infecção inicial, durando apenas algumas semanas (Dubey, 1998).

Os oocistos não estão esporulados quando eliminados nas fezes e, portanto, não são infectantes. Após a exposição ao ar, eles esporulam, num processo que demora, em média, três dias, dependendo das condições ambientais. O oocisto, em condições favoráveis de umidade, temperatura e local sombreado, é capaz de manter-se infectante por cerca de 12 a 18 meses (Dubey, et al. 1998).

### **1.3.2- Fase assexuada**

Após serem ingeridos pelos hospedeiros, as paredes externas dos cistos ou dos oocistos são rompidas por degradação enzimática. As formas infectantes (bradizoítas e esporozoítas, respectivamente) são liberadas no intestino e, rapidamente, invadem as células, formando um vacúolo citoplasmático, onde sofrerão divisões sucessivas por endodiogenia, tornando-se taquizoítas. A seguir, a disseminação dos taquizoítas do *T. gondii* ocorre pelo rompimento das células infectadas, seguido da invasão de células vizinhas. Eles invadem o tecido linfóide associado ao intestino e se disseminam pelos sistemas linfáticos e sanguíneos, e também por meio de macrófagos infectados, para praticamente todos os órgãos. Essa série de eventos caracteriza o chamado ciclo extraintestinal ou sistêmico (Dubey, 1998).

Em aproximadamente duas semanas, o hospedeiro começa a desenvolver imunidade específica ao *T. gondii*, que faz com que a taxa de multiplicação do parasita diminua. Os organismos com lenta taxa de multiplicação, agora chamados de bradizoítos, confinam-se num cisto de parede elástica, no citoplasma das células

infectadas. A resposta imune do hospedeiro destrói os taquizoítos, mas os bradizoítos ficam protegidos pelo cisto intracelular e permanecem viáveis, por muitos anos em estado latente (Dubey, et al. 1998).

#### **1.4- Formas de transmissão**

O homem pode adquirir a toxoplasmose basicamente por três vias de importância epidemiológica: Ingestão de oocistos, ingestão de carne crua ou mal cozida que contenha cistos e infecção transplacentária (congênita ou vertical).

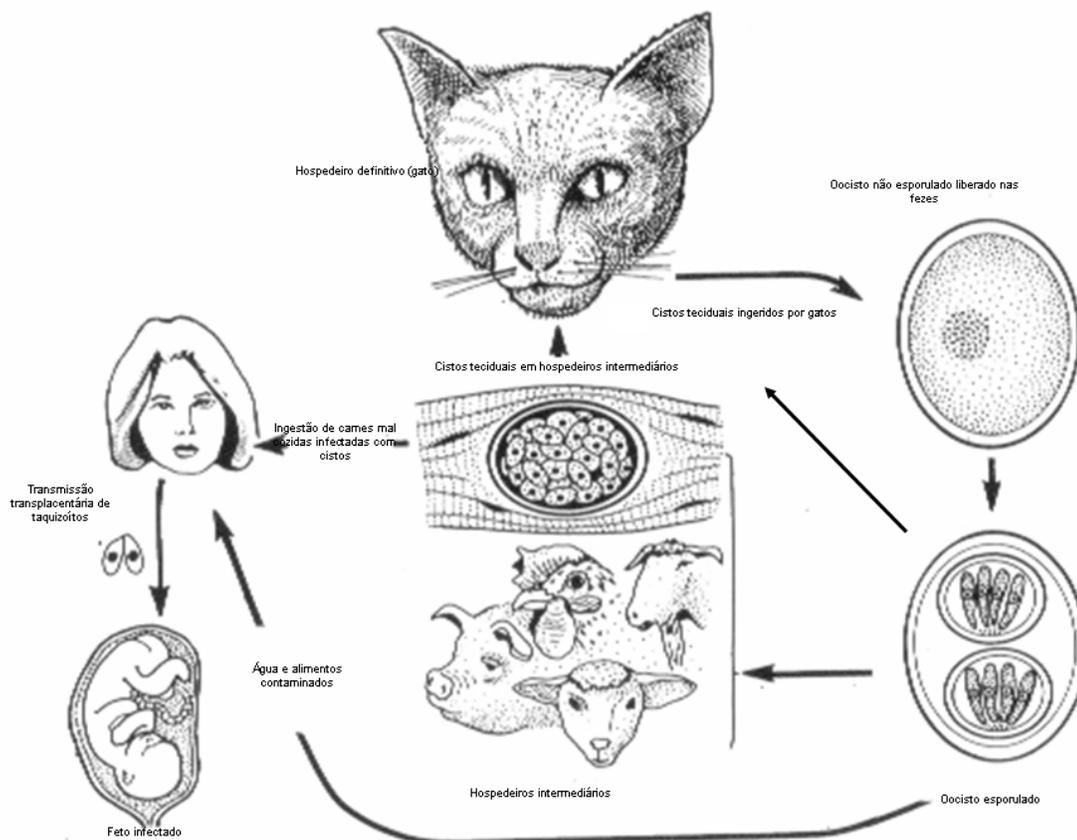
Os oocistos são distribuídos no ambiente a partir de quaisquer lugares onde gatos possam defecar. Contribuem para sua disseminação a chuva, vento e a água. Alimentos colhidos no solo e reservatórios de água também são importantes fontes de contaminação (Oréfica e Bahia-Oliveira, 2005). A disseminação por animais invertebrados, tais como moscas, baratas e minhocas também têm sido demonstrada (Dubey, 1998). A importância epidemiológica da água na disseminação de oocistos tem sido evidenciada como uma importante forma de transmissão da doença, principalmente em contingentes populacionais menos favorecidos (Bahia-Oliveira, et al., 2003).

A ingestão de cistos presentes em carne crua ou mal passada era considerada, até a década de 60, a única via de transmissão, além da congênita. Após trabalhos de elucidação do ciclo biológico do *T. gondii* percebeu-se a importância dos oocistos na transmissão da doença em humanos (Hutchison, 1965). Hoje sabe-se que ambas formas de contaminação são muito importantes na manutenção do ciclo biológico e respondem pela prevalência da doença em diferentes regiões do globo terrestre.

Os cistos sobrevivem por semanas refrigerados entre 1 e 4°C e por até uma semana congelados a temperaturas entre -1 e -8°C, porém a maioria dos cistos morre a temperaturas iguais ou menores que -12°C. O aquecimento a 60°C por 4 min. é suficiente para matar todos os cistos teciduais (Dubey, 1998).

A infecção transplacentária ocorre basicamente quando a mãe adquire a doença durante a gravidez, sob estas condições cerca de 40% dos fetos são infectados (Frenkel, 1988). A infecção congênita adquirida no primeiro trimestre de gravidez é mais grave que aquelas adquiridas em períodos posteriores da gestação (Remington *et al.*, 2001), porém mais de 60% das mulheres que adquirem toxoplasmose no último trimestre de gravidez a transmitem para seus filhos (Dunn, et al., 1999).

Outras formas de transmissão de menor importância epidemiológica podem ser citadas, tais como: transplante de órgãos, transfusão de sangue e acidentes de laboratório (Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005). A inalação de oocistos presentes no ar ou em perdigotos, bem como a ingestão de ovos, colostro ou leite contaminados por taquizoítos podem levar a contaminação caso o parasita penetre a mucosa oral ou faríngea (McLeold e Remington, 1994).



**Figura 1:** Principais vias de transmissão do *Toxoplasma gondii* (extraído e modificado de Dubey *et al.*, 1998).

### 1.5- A toxoplasmose

A infecção primária na população adulta e imunocompetente é geralmente assintomática. Cerca de 10% da população desenvolve sintomas brandos, incluindo febre e linfadenopatia, que raramente precisam de tratamento. Entretanto, em raros casos podem desenvolver-se sintomas graves e até mesmo fatais, com o desenvolvimento de miocardites, pneumonias, hepatites, polimiositoses e encefalites (Montoya and Liesenfeld, 2004).

Nos casos de infecção congênita verifica-se ampla variedade de manifestações da toxoplasmose, que podem incluir aborto ou morte após o nascimento. Os bebês que sobrevivem podem desenvolver os sinais clássicos da toxoplasmose congênita, tais como: hidrocefalia, microcefalia, calcificações cerebrais, retinocoroidites e comprometimento do Sistema Nervoso Central (McAuley, et al., 1994, McLeod, et al., 2006). Muitas crianças são normais ao nascer, porém desenvolvem os sintomas, que incluem manifestações oculares e/ou neurológicas, ao longo da vida (Guerina, et al., 1994, McLeod, et al., 2006).

Indivíduos imunossuprimidos e/ou imunocomprometidos geralmente desenvolvem encefalites devido à reativação de lesões pré-existentes. Estes indivíduos apresentam sintomas como dores de cabeça, confusão, fraqueza motora, febre e na ausência de tratamento o quadro pode evoluir para convulsões e coma (Luft et al., 1983; Wong et al., 1984). Pneumonias, outras doenças sistêmicas e/ou retinocoroidites também são observadas, porém são menos comuns que a encefalite em indivíduos infectados pelo HIV.

No âmbito mundial, a prevalência da toxoplasmose geralmente está compreendida entre 50 a 80% (Tenter et al., 2000). No Brasil Glasner e colaboradores encontraram prevalência de 88% no município de Erechin, RS. Outro estudo epidemiológico realizado em Campos dos Goytacazes, RJ, apontou altas prevalências em boa parte da população, principalmente nos indivíduos de baixa renda e que vivem sob condições de vida precárias (Bahia-Oliveira, et al., 2003). A toxoplasmose em Campos dos Goytacazes é prevalente em 84% da população de baixa renda enquanto que nas populações de médio/baixo e médio/alto poder aquisitivo as prevalências são de 62% e 23% respectivamente (Bahia-Oliveira, et al., 2003). Os principais fatores de risco para a infecção na população de baixa renda bem como para a de médio/baixo poder aquisitivo foram: a ingestão de água não filtrada assim como também água de poço ou ainda de rios ou lagoas. As curvas de prevalências mostram que na população de baixa, bem como de media/baixa renda na faixa de 0 a 9 anos o percentual de positividade está em torno de 60%.

O desenvolvimento de toxoplasmose ocular em adultos imunocompetentes ocorre em cerca de 2% dos casos nos Estados Unidos (Holland, 2003). No Brasil este percentual sobe para de 8 a 14% em estudo realizado em Campos dos Goytacazes

(Bahia-Oliveira *et al.*, 2001) e 17.7% em estudo realizado no sul do país (Glasner, et al., 1992).

### **1.6- Toxoplasmose ocular**

A toxoplasmose é responsável por entre 28 e 50% dos casos de uveítes posteriores no mundo (Holland, 2004). No Brasil estima-se que este percentual seja de até 80% (Melamed, 2009). Pensava-se que a toxoplasmose ocular fosse uma manifestação típica da doença congênita e seu acometimento nos casos de infecção pós-natal significava apenas 1 a 3% dos casos. Porém, estudos posteriores mostraram que a infecção adquirida pode ser responsável por aproximadamente dois terços dos casos de toxoplasmose ocular (Silveira et al., 1988, Glasner et al., 1992, Gilbert e Stanford, 2000).

Após a ingestão, o parasita pode se disseminar pelo corpo e chegar ao tecido ocular de duas formas: livremente no plasma ou dentro de leucócitos circulantes. Essa hipótese é corroborada por estudos histopatológicos que demonstram que tanto os focos de necrose quanto parasitas vivos estão adjacentes aos vasos sanguíneos (Nicholson and Wolchok, 1976). Também se tem sugerido que o *T. gondii* pode chegar ao olho a partir do cérebro por meio do nervo óptico (Meets *et al.*, 1996).

Taquizoítas podem claramente causar destruição tecidual devido a replicação e conseqüente lise de células infectadas. As lesões retinocoroidais ativas podem, por sua vez, elevar rapidamente a resposta imune local, necessária para o controle da proliferação do parasita. E, estudos têm demonstrado que grande parte da destruição tecidual e necrose é devida à resposta imune agressiva (Lu, et al., 2004). Esta destruição inicial dará origem à lesões isoladas, necrotizantes, chamadas lesões primárias ativas. Em indivíduos imunocompetentes este tipo de lesão é curada, com ou sem tratamento dentro de 6 a 8 semanas, levando à formação de cicatrizes (Gilbert et al., 1999, Rhotova, 1993).

Cerca de 60% dos pacientes apresentam lesões recorrentes, porém, os fatores que levam à recorrência ainda são pouco compreendidos. Tem-se demonstrado que a ruptura de cistos e a replicação dos parasitas são fatores importantes nesse processo. Em humanos observa-se que a maioria de lesões recorrentes ocorre em regiões adjacentes a cicatrizes retinocoroidais prévias. Em modelos animais, observou-se que a maioria dos cistos presentes no olho também estão localizados nestas regiões (Pavesio

and Lightman, 1996). Muitos fatores podem levar à ruptura dos cistos, entre eles podemos citar: ruptura mecânica devida a multiplicação de *T. gondii*, reações mediadas por células de defesa do organismo hospedeiro, efeitos hormonais e devido a produtos de reações inflamatórias (Pavesio and Lightman, 1996). Assim, a ruptura dos cistos levaria a re-infecção das células da retina e sua conseqüente destruição.

Tem se demonstrado ainda, que organismos vivos são encontrados em lesões clinicamente inativas em humanos portadores de infecção congênita muitos anos após o nascimento (Hogan, et al., 1958). Estudo utilizando primatas corroborou a importância da invasão tecidual e replicação de parasitas vivos. Nesse modelo *T. gondii* foi inoculado intraocularmente e observou-se a recorrência da retinocoroidite necrotizante. Porém, ao serem inoculados parasitas mortos não foi observado o surgimento de doença ocular ativa, mesmo em animais previamente imunizados (Webb *et al.*, 1984). Outros fatores também podem estar relacionados à recorrência, tais como hipersensibilidade à antígenos de *T. gondii* liberados do cisto, auto-imunidade contra antígenos retinianos (Abrahams and Gregerson, 1983; Nussenblatt, et al., 1989; Whittle, et al., 1998), re-infecção, especialmente por cepas diferentes (Araújo *et al.*, 1997).

### **1.7 – Classificação de uveítes**

A úvea, também conhecida como trato uveal, é uma estrutura vascularizada, localizada entre a esclera e a retina, composta pela coróide, corpos ciliares e íris. Uveíte é uma denominação geral para inflamações no trato uveal, e abrange, tanto inflamações com origem em células retinianas e vasos relacionados, quanto originadas na esclera (Herbot, 1996). Uveítes podem estar relacionadas à diversas infecções, bem como a doenças auto-imunes (Banares et al., 1997).

As uveítes são classificadas de acordo com sua localização anatômica, evolução clínica e lateralidade. Bloch-Michel e Nussenblatt (1987) propuseram um critério de classificação baseado nas características anatômicas da lesão. Segundo este critério as uveítes são divididas em anterior, intermediária, posterior e panuveíte. Na uveíte anterior há o acometimento da íris e dos corpos ciliares. Uveítes intermediárias se apresentam no vítreo, na retina periférica, e na parte posterior dos corpos ciliares. Uveítes posteriores apresentam envolvimento da coróide e retina. São consideradas panuveítes quando dois ou mais destes segmentos são afetados.

As uveítes podem ser classificadas em granulomatosas e não-granulomatosas. Uveíte granulomatosa apresenta precipitados de células inflamatórias, formando nódulos inflamatórios no endotélio da superfície da cornea, denominados nódulos de Koeppe, levando ao espessamento ou atrofia da íris. Uveíte não-granulomatosa apresenta a formação de fibrina entre a íris e o cristalino, esta manifestação está relacionada à presença do HLA-B27 (Herbort, 1996).

De acordo com a lateralidade, as uveítes podem ser classificadas como unilaterais e bilaterais. Nas uveítes unilaterais há o acometimento de apenas um dos olhos, ou em caso de recorrência, quando o outro olho é acometido, porém não simultaneamente (Banares et al., 1996).

A lesão ocular devida à infecção por *T. gondii* é uma retinocoroidite focal, portanto uma uveíte posterior, com ou sem cicatrizes coroidianas prévias (Banares et al., 1996). Entretanto, a retinocoroidite toxoplásmica apresenta variações em suas manifestações clínicas. Glasner e colaboradores classificaram as retinocoroidites de acordo com a probabilidade destas terem sido causadas por *T. gondii*, usando uma escala que varia de 1 a 5, onde 1 significa toxoplasmose ocular e 5 não se enquadrando em toxoplasmose ocular. Este critério de classificação é subjetivo e pautado na experiência prévia do observador em categorizar as lesões de acordo com sua aparência morfológica (Glasner, et al., 1992).

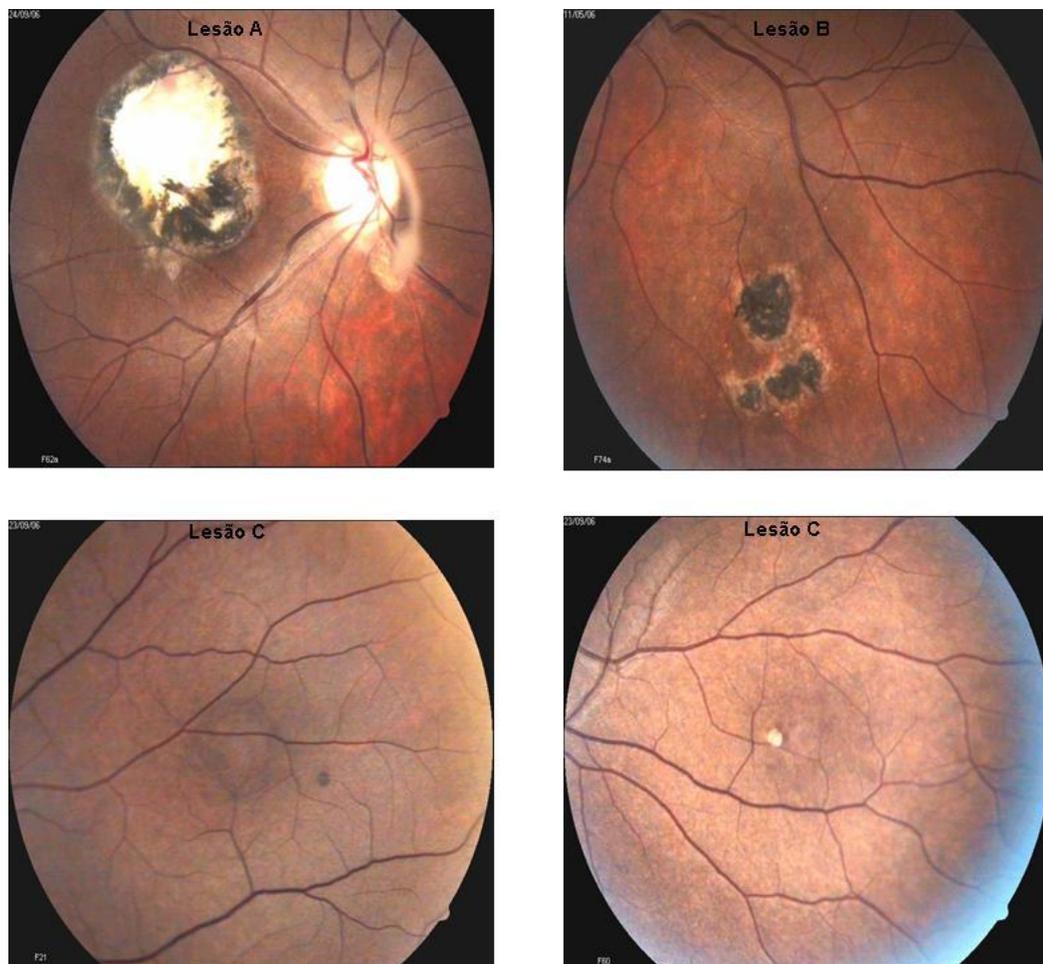
A incerteza quanto a natureza etiológica das retinocoroidites observadas em estudos epidemiológicos é uma realidade. A dificuldade na precisão do diagnóstico pode tanto subestimar como superestimar as infecções causadas por *T. gondii*. A inexistência de classificação universal para as diversas manifestações clínicas observadas na população contribui para aumentar o grau de dificuldade em se determinar com maior precisão a real prevalência da retinocoroidite toxoplásmica em estudos epidemiológicos.

Nesse sentido foi proposta por Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005, uma classificação baseada em critérios morfológicos, mas que refletem o grau de destruição da retina. As lesões retinianas/retinocoroidianas compatíveis com lesões causadas por *T. gondii* foram classificadas como tipo A, B e C. As lesões tipo A geralmente apresentam limites bem demarcados, sendo circundadas por um halo pigmentado e com uma região central com pouca ou nenhuma pigmentação devido a destruição da retina e coróide. Esse tipo de lesão inclui a cicatriz macular característica da toxoplasmose congênita,

conhecida como “roda de carroça”. As lesões tipo B são circundadas por um halo hipopigmentado com uma região central hiperpigmentada e com menor grau de destruição tecidual que as lesões do tipo A. Lesões do tipo C são definidas como áreas de hiperplasia ou atrofia do epitélio da retina, com um menor grau de destruição tecidual que nas lesões tipo A ou B, podendo ser tanto hipo quanto hiperpigmentada. Este tipo de lesão é o que apresenta maior incerteza etiológica.

É importante notar que localização e tamanho não foram critérios para classificação, porém lesões tipo C são geralmente menores e situam-se na periferia da retina. As lesões tipo A e B atendem aos critérios para serem consideradas como causadas por infecção por *T. gondii*. As lesões tipo C não preenchem estes requisitos e são de etiologia incerta do ponto de vista imunológico (Figura 2).

Os pacientes podem apresentar lesões únicas ou múltiplas. Nesse último caso, as lesões podem ser todas do mesmo tipo ou até mesmo dos três tipos citados.



**Figura 2:** Classificação das lesões oculares decorrentes da infecção pelo *Toxoplasma gondii* (Extraído de Peixoto-Rangel, 2008).

## 2 – Resposta imune ao *Toxoplasma gondii*

### 2.1- Resposta Imune celular

Em hospedeiros imunocompetentes a resposta imune à infecção por *Toxoplasma gondii* é basicamente mediada por células e criticamente dependente de IFN- $\gamma$  (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Em geral, o início da resposta imune é dependente de uma classe de receptores de superfície altamente conservados, os *Toll-like receptors* (TLR's). Os TLR's são expressos na superfície de monócitos e macrófagos e são capazes de reconhecer padrões moleculares altamente conservados presentes na superfície de organismos infecciosos. Na resposta contra o *T. gondii* há a ativação principalmente do TLR 11, por meio da ligação da profilina, proteína que se liga à actina, presente no parasita (Yarovinsky, 2008). Essa ligação leva à ativação de uma cascata de sinais intracelulares, mediada pela molécula adaptadora MyD88, que irá ativar a produção de citocinas inflamatórias, entre elas a IL-12 (Revisado por Akira, 2001).

O TLR 2 também possui papel importante na infecção por *T. gondii*. Demonstrou-se que camundongos deficientes para este receptor são susceptíveis quando inoculados com altas doses de parasitas, porém sobrevivem se inoculados com poucos parasitas. É provável que esta proteção seja devida ao papel regulador na produção de óxido nítrico (NO) (Mun *et al.*, 2003).

As células dendríticas são importantes na resposta imune inicial ao *T. gondii*, visto que elas são a primeira fonte de IL-12 após a infecção (Reis e Souza, *et al.* 1997). A IL-12 é responsável pela ativação da produção de IFN- $\gamma$  por células NK, células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Hunter, *et al.*, 1995), se comportando como uma citocina chave na ativação da resposta imune.

Os macrófagos e células NK são fundamentais no combate à infecção aguda. Os macrófagos podem atuar tanto como células efectoras quanto como células apresentadoras de antígeno (APC's), que induzem proteção contra à infecção. Eles podem ativar tanto células B como células T, além de produzir citocinas protetoras, tais como, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , além do NO. A produção destas citocinas leva à estimulação de células NK, que por sua vez também se tornam produtoras de IFN- $\gamma$ , o que leva a ativação de macrófagos não infectados também para a produção de IFN- $\gamma$  (Revisado por Filisetii e Candolfi, 2004).

A destruição do *T. gondii* é resultado de vários mecanismos efetores, tanto oxidativos quanto não oxidativos. Os mecanismos não oxidativos envolvem a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ . O NO também está envolvido no controle da doença em sua fase crônica pois inibe a proliferação intracerebral do parasita (Filisetti e Candolfi, 2004). Outro mecanismo não oxidativo toxoplasmicida é a indução, por INF- $\gamma$  e de indoleamina 2,3 dioxigenase, proteína que degrada o triptofano, aminoácido indispensável para uma gama de atividades metabólicas do parasita (Pferfferkom, 1986).

Por estar implicada no combate inicial ao parasita e continuar sendo fundamental no controle da fase crônica da infecção, o IFN- $\gamma$  é uma citocina chave na resistência ao *T. gondii*. Tal fato se deve às suas inúmeras atividades biológicas, tais como: ativação de macrófagos e células NK, inibição de resposta tipo Th2 e indução da expressão de MHC de classe II (Filisetti e Candolfi, 2004).

Granulócitos também estão envolvidos na resposta imune inata ao *T. gondii*, sendo capazes de promover uma intensa resposta inflamatória (Denkers and Marshall, 1998). Foi demonstrado que há um influxo de neutrófilos no peritônio de animais infectados intraperitonealmente, exibindo altos níveis de produção de IL-12 e níveis mais baixos, porém significantes, de TNF- $\alpha$  (Bliss, et al., 1999).

Plaquetas também podem exercer um papel na defesa contra o *T. gondii*. Na ausência de anticorpos elas são citotóxicas para taquizoítas. Esta citotoxicidade coincide com o aumento de metabólitos derivados do ácido araquidônico (Yong, et al., 1991).

Células T $\gamma\delta$  são reconhecidas como um elo entre a imunidade inata e a adquirida. Embora sejam raras em tecidos linfóides, células T $\gamma\delta$ , são abundantes em tecidos epiteliais, especialmente no epitélio intestinal (Hayday et al., 2001), sendo importantes para o desenvolvimento da resposta imune que ocorre após a infecção via oral, principal forma de contaminação entre humanos (Lepage, et al., 1998). Células T $\gamma\delta$  sistêmicas também participam da resposta imune ao *T. gondii*. Já foi demonstrado que este grupo de células se expande em resposta a infecção por *T. gondii* tanto em modelos murinos (Hisaeda et al., 1995, Kasper et al., 1996) quanto na infecção em humanos (De Paoli et al., 1992, Subauste et al., 1995, Hara et al., 1996). Estas células também são capazes de secretar INF- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , além de exibir atividade

citotóxica independente de MHC quando incubadas com células infectadas por *T. gondii* (Subauste *et al.*, 1995).

Células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são os tipos celulares fundamentais para o controle da infecção por *T. gondii*. Estas exercem suas funções através de atividades citotóxicas e/ou secreção de citocinas envolvidas na regulação da resposta imune (Hunter *et al.*, 1994).

Células T CD4<sup>+</sup> podem ser divididas em pelo menos duas sub-populações, Th1 e Th2, de acordo com o perfil de citocinas por elas secretadas. Células Th1 são caracterizadas principalmente pela secreção de citocinas como IL-2 e IFN- $\gamma$ . Células Th2 secretam principalmente IL-4, IL-5, e IL-10 (Mosmann, *et al.*, 1986). A resistência à infecção por *T. gondii* está intimamente relacionado a uma resposta tipo Th1, que leva a produção de IFN- $\gamma$  e, conseqüente, ativação de macrófagos, células NK e T CD8<sup>+</sup> citotóxicas. Assim, o controle eficaz da infecção se dá pela ação sinérgica entre células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Nagasawa *et al.*, 1991).

Células T CD4<sup>+</sup> tipo Th2 também são necessárias para o controle eficaz da infecção, pois são fonte de IL-4, citocina necessária para a ativação de células B (Filisetti e Candolfi, 2004). Porém, se a resposta à infecção por *T. gondii* se desenvolver em vigência da predominância da resposta imune Th2, a replicação do parasita será detida com mais dificuldade e poderão surgir problemas clínicos devido à destruição tecidual.

Células TCD 8<sup>+</sup> são essenciais na fase aguda da infecção, exercendo atividade citotóxica contra taquizoítas ou células infectadas por *T. gondii* (Yano *et al.*, 1989). Células T CD8<sup>+</sup> lisam células infectadas e expõem os parasitas previamente protegidos a mecanismos e elementos imunológicos tais como: imunoglobulinas, sistema complemento, macrófagos e células NK (Hegab and Al-Mutawa, 2003).

Após a fase aguda, é necessário que a intensa resposta inflamatória montada seja controlada. Células T reguladoras, produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$ , são responsáveis por modular a resposta imune, diminuindo a resposta pró-inflamatória, que muitas vezes é a principal responsável pelas patologias identificadas em indivíduos portadores de *T. gondii* (Nguyen *et al.*, 1998; Dawson *et al.*, 2005).

## 2.2 - Resposta imune intraocular

O olho é um sítio imunologicamente privilegiado, assim a resposta imune local é diferente em muitos aspectos da resposta sistêmica. Para manter este *status* diversos mecanismos, anatômicos e moleculares, se fazem presentes. Entre os mecanismos anatômicos podemos citar: a existência de uma barreira para entrada de sangue capaz de inibir a entrada de anticorpos, moléculas do sistema complemento e células – macrófagos, linfócitos T e B, células NK, entre outras. Os olhos também possuem deficiência em vasos linfáticos e apresenta antígenos derivados da medula óssea (Revisado por Streilein, 1999).

O ambiente intraocular possui grande capacidade imunossupressora. O TGF- $\beta$  é uma peça fundamental nesse contexto. Esta citocina é um potente inibidor da ativação de células T, inibindo tanto sua proliferação quanto a produção de citocinas. O TGF- $\beta$  também é capaz de inibir a atividade de células NK e de células apresentadoras de antígeno. A IL-10 também pode ser encontrada no humor aquoso (Revisado por Streilein, 1999). O humor aquoso também contém quantidades significantes de cortisol (knisely *et al.*, 1994). Esta molécula possui um reconhecido papel anti-inflamatório, e ainda induz a secreção de IL-10, em detrimento da IL-12, por APCs (Streilein *et al.*, 2002).

Outro fator importante para a manutenção do privilégio imune no olho é a expressão constitutiva do ligante de Fas (Fas-L), também conhecido como CD95, nas células do parênquima ocular (Griffith *et al.*, 1995). Linfócitos T ativos expressam Fas, e a ligação entre Fas e Fas-L promove a morte destas células por apoptose. A expressão de moléculas MHC, tanto de classe I quanto de classe II é suprimida nos tecidos oculares (Treseler *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1987).

A infecção por *T. gondii* induz a produção de fatores capazes de inibir o privilégio imune, como por exemplo o IFN- $\gamma$ . Esta citocina pode atuar como antagonista de TGF- $\beta$ . O IFN- $\gamma$  também promove o aumento da expressão de MHC de classe II em células de Muller, da íris e do epitélio ciliar (Streilein, 1999).

A resposta imune intraocular mediada por anticorpos ainda é pouco estudada. A presença de IgM, IgA e IgG foi demonstrada, e alguns estudos foram capazes de mostrar que estes anticorpos eram produzidos no próprio olho (Turunen *et al.*, 1983; Riss *et al.*, 1995; Klaren *et al.*, 1998).

Casos de pacientes que não apresentam anticorpos no ambiente intraocular, porém são soropositivos para *T. gondii* a nível sérico, sem o acometimento ocular, foram relatados. Esse fato é devido à dificuldade encontrada pelos anticorpos em transpor a barreira sangue-olho (Garweg *et al.*, 2000). Uma transposição lenta desta barreira, com a migração de IgA, IgM e IgG, foi demonstrada em casos de toxoplasmose ocular (Garweg *et al.*, 2004).

### **2.3 – Imunoglobulinas: estrutura e função**

As imunoglobulinas formam um grupo de glicoproteínas intimamente relacionadas, compostas basicamente por cerca de 82 a 96% de aminoácidos e de 4 a 18% de carboidratos. Uma molécula de imunoglobulina possui quatro cadeias de peptídeos, sendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Estes polipeptídeos estão ligados entre si por pontes dissulfeto, responsáveis pela formação do domínio Ig típico da molécula. As porções aminoterminais das cadeias leves e pesadas são caracterizadas por composição altamente variável de aminoácidos e são identificadas como regiões  $V_H$  e  $V_L$ , respectivamente. Funcionalmente as regiões variáveis (V) estão envolvidas na ligação de antígenos. As regiões constantes (C) interagem para manter a estabilidade da molécula, além de possuírem inúmeras atividades biológicas, como: ligação com moléculas do sistema complemento, ligações em membranas biológicas e passagem placentária (Abbas, 2005).

A imunoglobulina G (IgG) é a mais abundante molécula efetora da imunidade humoral em humanos. Esta classe de glicoproteína representa cerca de 75% do total das imunoglobulinas no plasma de indivíduos saudáveis. As imunoglobulinas das outras quatro categorias, IgM, IgA, IgE e IgD, constituem os outros 25% e possuem propriedades características e funções específicas. As cinco classes de imunoglobulinas podem ser distinguidas entre si com base em sua composição de aminoácidos nas porções constantes da cadeia pesada. Esta também é a base para as diferenças antigênicas entre estas moléculas e em seu reconhecimento específico (Abbas, 2005).

#### **2.3.1 – Resposta imune humoral ao *T. gondii***

A resposta imune humoral é basicamente dirigida às formas taquizoítas que são liberadas após a lise das células hospedeiras. Anticorpos específicos também são

capazes de inibir a fixação do parasita às células hospedeiras, controlando a infecção. Sabe-se ainda que hospedeiros cronicamente infectados geralmente são resistentes à infecção por novos organismos. Isso provavelmente seja devido à presença de anticorpos circulantes, numa situação chamada de imunidade concomitante. Porém, uma infecção por novos organismos pode ocorrer ocasionalmente (Hegab e Al-Mutawa, 2003).

A primeira classe de anticorpo a ser detectada após infecção por *T. gondii* é IgM (Davidson *et al.*, 1993). A presença de IgM é sinal de infecção recente e nos casos de infecção por *T. gondii* essa imunoglobulina pode ser detectada de 3 a 10 dias após a infecção e atinge seu título máximo cerca de 1 a 2 meses após a infecção decaindo após 8 meses (Karim e Ludlam, 1975). No entanto, para alguns pacientes, os anticorpos IgM podem ser detectáveis entre 7 a 12 anos após a infecção aguda (Bertozi, *et al.*, 1999; Bobic, *et al.*, 1991). A IgM é potente ativador do sistema complemento. Devido a sua estrutura é excelente agente aglutinador e possui alto nível de citotoxicidade. Os maiores alvos para estas imunoglobulinas são proteínas presentes na superfície do parasita (Filisetti e Candolfi, 2004). Por não ser capaz de transpor a placenta, IgM é uma ótima ferramenta diagnóstica para a toxoplasmose congênita em neonatos.

A produção de IgM é seguida por IgA. A produção dessa imunoglobulina é estimulada por citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (Defrance *et al.* 1992). Anticorpos IgA são detectados sob duas formas: IgA sérico, também conhecido como IgA 1 e IgA de mucosa (IgA 2). Ambas as formas são encontradas durante a infecção por *T. gondii*. Na infecção adquirida IgA é produzida durante a fase digestiva do parasita por linfócitos presentes na lâmina própria do trato gastrointestinal (Smolin e Thoft, 1994; Husband e Gowan, 1978). Durante a fase aguda da infecção pode-se detectar IgA no soro até 9 meses após a infecção (Foudrinier *et al.*, 1995). Também podemos identificar IgA em sítios ativos de infecção. Alguns autores têm proposto que tal fato pode ser devido à presença de TGF- $\beta$  um potente fator de conversão para IgA (Ronday *et al.*, 1999; Labalette *et al.*, 2002; Stavnezer, 1995).

Linfócitos da lâmina própria previamente sensibilizados podem migrar para novas áreas, entre as quais a retina. Nesse local podem voltar a produzir IgA quando expostos a antígenos de *T. gondii* (Husband e Gowan, 1978). Tal fato poderia explicar a produção local de IgA intraocular, na fase aguda ou recorrente (Decoster *et al.*, 1988).

IgG é considerada a principal classe de imunoglobulina envolvida na resistência ao *T. gondii* (Ronday et al., 1999). As imunoglobulinas G podem ser detectadas no soro de indivíduos contaminados depois de 8 a 12 dias de infecção (Kawazoe, 1995), com um pico de titulação após 1 ou 2 meses, a partir de então começam a declinar para um ponto estável, mas continuarão positivos indefinidamente, durante toda a fase crônica da toxoplasmose (Karim e Ludlam, 1975). As quatro subclasses de IgG apresentam proporções desiguais durante a infecção. Sendo IgG1, IgG2 e IgG3 predominantes. As IgGs são capazes de produzir citotoxicidade mediada por anticorpos ou opsonização graças à receptores Fc presentes na superfície de macrófagos e outras células. Eles também são capazes de proteger o feto graças a sua capacidade de atravessar a placenta (Filisetti e Candolfi, 2004).

Muito pouco se sabe sobre a ação de IgEs durante a infecção por *T. gondii*. A detecção desse anticorpo durante a toxoplasmose aguda ou congênita é randômica, porém eles não são detectados na fase crônica. Sua presença está associada com complicações, tais como adenopatias, retinocoroidites e reativação do parasita em indivíduos imunocomprometidos (Villena et al., 1999).

Muitos estudos, principalmente em modelos experimentais, tem demonstrado a importância da resposta imune humoral no contexto da toxoplasmose ocular, principalmente para o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas para os diversos tipos de uveítes (Garweg e Boehnke, 2006; Liekfeld *et al.*, 2006). Entretanto, não existem estudos conclusivos sobre a relação entre a resposta imune humoral e o desenvolvimento de retinocoroidites toxoplásmicas em humanos. Onde se conclui que trabalhos adicionais que possam contribuir para um melhor entendimento do papel da resposta imune humoral na toxoplasmose ocular bem como para o avanço do diagnóstico para toxoplasmose ocular em humanos sejam necessários.

### **3 – Diagnóstico**

O diagnóstico laboratorial para toxoplasmose pode ser realizado por meio de métodos diretos ou indiretos. Os métodos de identificação direta são muito úteis principalmente em indivíduos imunocomprometidos ou imunodeprimidos (Montoya e Liesenfeld, 2004). O isolamento do parasita diretamente de tecidos e fluídos (sangue, líquido cérebro-espinhal, leite, humor vítreo e aquoso, entre outros) pode ser realizada principalmente durante a fase aguda da infecção ou na reativação da fase crônica

(Montoya, 2002, Hitt e Filice, 1992). Os testes de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tem se demonstrado importantes para o diagnóstico pré-natal de toxoplasmose congênita, por identificar a infecção precocemente, evitando procedimentos invasivos para o feto (Hohlfeld *et al.* 1994, Montoya, 2002), e em casos de toxoplasmose ocular atípica (Montoya *et al.*, 1999, Fardeau *et al.*, 2002). Entretanto, estes métodos não são empregados como rotina para o diagnóstico da toxoplasmose.

Os testes sorológicos por sua vez, são amplamente utilizados. A identificação de anticorpos, bem como a determinação da classe de imunoglobulina predominante no soro de indivíduos contaminados pode trazer informações sobre a fase evolutiva da doença (Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005).

O teste de Sabin & Feldman, também conhecido como “*Dye test*”, é considerado o teste padrão ouro para toxoplasmose. Este teste detecta a infecção precocemente, com alta sensibilidade e especificidade (Sabin e Feldman, 1948). Porém, devido à dificuldades em sua execução, este método não é utilizado rotineiramente, sendo executado apenas em centros de pesquisa, principalmente como referência para padronização de outros métodos.

A metodologia mais comum para o diagnóstico de toxoplasmose é a detecção de IgG total por meio de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). A utilização de IgG total, ou suas subclasses, é útil, visto que, como dito anteriormente, esta classe de imunoglobulina aparece de uma a duas semanas após a infecção e permanece durante toda vida do indivíduo (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Os testes que identificam IgM são valiosos no diagnóstico da fase aguda da infecção. Testes para detecção de IgA, são indicados para diagnóstico de fetos e recém-nascidos, por serem mais sensíveis que os testes para detecção de IgM (Stepick-Biek *et al.*, 1990, Decoster *et al.*, 1991). Entretanto, IgA pode ser detectado durante anos em adultos, não tendo portanto, valor diagnóstico para a fase aguda da infecção, isoladamente. O uso de IgE como ferramenta diagnóstica só é recomendado em combinação com outros testes sorológicos (Wong *et al.* 1993, Pinon *et al.* 1990).

Outros testes indiretos também podem ser utilizados, tais como: reação de fixação do complemento (RFC), reação de imunofluorescência indireta (RIF), reação de hemoaglutinação indireta (RHI), *Western Blotting*, entre outros.

Recentemente a citometria de fluxo tem sido proposta como mais uma opção de diagnóstico sorológico para infecção causadas por *Leishmania* sp. e *Trypanosoma*

*cruzi*. O citometro de fluxo é um aparelho que utiliza luz (laser) para discriminar células individualmente. Tais células são identificadas pelo seu tamanho e granulosidade, e também por marcação por meio de anticorpos específicos para moléculas alvo. Para utilização no diagnóstico sorológico de protozoários (vivos ou não), estes são utilizados como células alvo para imunoglobulinas presentes no soro a ser testado. Adiciona-se anticorpos anti-imunoglobulinas humanas marcados com fluorocromo que, após receber estímulo irá emitir luz em um único comprimento de onda a ser identificado pelo aparelho. Os parasitas serão identificados de acordo com seu tamanho e granulosidade e também pelo seu reconhecimento por imunoglobulinas específicas. Neste último caso, se o anticorpo conjugado ao fluorocromo reconhecer os anticorpos do soro que reconhecem o parasito, o paciente será considerado soropositivo.

Esta técnica vem sendo empregada para diagnóstico diferencial para doença de Chagas e leishmaniose (Martins-Filho *et al.* 1995, Cordeiro *et al.*, 2001, Martins-Filho, *et al.* 2002, Rocha *et al.*, 2006, Vitelli-Avelar *et al.*, 2007, Lemos *et al.*, 2007, Pissinate *et al.*, 2008). Entretanto, a citometria de fluxo não tem sido utilizada para análise do perfil sorológico de pacientes infectados por *Toxoplasma gondii*. O uso dessa nova abordagem pode, portanto, contribuir para o diagnóstico sorológico vinculado à classificação da toxoplasmose ocular, bem como lançar luz sobre o papel da resposta imune humoral no desenvolvimento de retinocoroidites toxoplásmicas.

## **II – Justificativa**

Dados epidemiológicos sobre a toxoplasmose em Campos dos Goytacazes evidenciam que a prevalência da doença ocular varia entre 6 a 14% e está associada à condição sócio-econômica da população (Bahia-Oliveira et al., 2001). O fato de se estar em região de alta prevalência para a população em geral com diversidade de apresentação clínica da doença eleger Campos como um local privilegiado para se conduzir tal investigação.

A resposta imune está envolvida no desenvolvimento de patologias oculares devido à infecção por *Toxoplasma gondii* (Lu, et al., 2004). Entretanto, a abordagem sobre o papel dos anticorpos em pacientes portadores de toxoplasmose ocular tem sido pouco investigada. Os poucos trabalhos publicados enfatizam principalmente aspectos diagnósticos, sem correlação com outros parâmetros da resposta imune. É sabido que o perfil dos isotipos de imunoglobulinas produzidos em resposta a patógenos tem vinculação com o perfil da resposta celular, principalmente pela produção de citocinas.

Esse estudo propõe investigar o perfil de produção de anticorpos de paciente portadores de toxoplasmose ocular, soropositivos sem o acometimento ocular, soronegativos acometidos ocularmente e indivíduos soronegativos, por meio de duas técnicas distintas. A citometria de fluxo contribuirá prioritariamente para a descrição do perfil de anticorpos antiproteínas de membrana. Enquanto por meio de ELISA avaliaremos a produção de anticorpos antiproteínas totais.

A citometria de fluxo não é uma técnica consolidada em ensaios clínicos e diagnósticos para toxoplasmose, mas resultados importantes têm sido obtidos no diagnóstico sorológico de Leishmaniose tegumentar ativa e de cura para doença de Chagas (Martins-Filho et al. 1995, Martins-Filho, et al. 2002, Cordeiro et al., 2001, Rocha et al., 2006, Vitelli-Avelar et al., 2006, Lemos et al., 2007, Pissinate et al., 2008), o que justifica o estudo aqui proposto.

A expectativa é que se pudesse utilizar os níveis séricos das classes de imunoglobulinas, e subclasses de IgG, como ferramenta de diagnóstico e classificação das lesões oculares, dando subsídios à classificação morfológica, proposta por Oréfice e Bahia-Oliveira, em 2005.

### III - OBJETIVOS

#### 3.1- Objetivo geral

Investigar o perfil de reconhecimento por anticorpos IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> presentes em soros de indivíduos soropositivos e soronegativos expostos a alto risco de contaminação pelo parasita *Toxoplasma gondii* e correlacioná-lo com a ausência ou presença de cicatriz retino-coroidal em indivíduos agrupados segundo as três diferentes categorias conforme proposto por Oréfice & Bahia-Oliveira 2005.

#### 3.2 – Objetivos específicos

- I. Determinar o perfil de anticorpos IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> anti-*T. gondii* por meio de ELISA.
- II. Determinar o perfil de anticorpos IgM, IgA, IgE, IgG total, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> contra antígenos de *T. gondii* na superfície de formas taquizoítas por meio de citometria de fluxo.
- III. Avaliar o perfil de reconhecimento pelas duas metodologias, ELISA e Citometria de Fluxo, considerando os grupos de pacientes de acordo com o tipo de lesão apresentada conforme proposto por Oréfice & Bahia-Oliveira 2005, visando estabelecer a correlação entre o perfil de reconhecimento por anticorpos e a classificação das lesões retinocoroidais.
- IV. Avaliar a utilização da citometria de fluxo como metodologia para diagnóstico de *Toxoplasma gondii*.

## **IV - População Estudada, Material e Métodos**

### **4.1 - População Estudada**

Os soros dos indivíduos participantes desse estudo são provenientes de uma soroteca organizada a partir de estudos epidemiológicos prévios ocorridos no município de Campos dos Goytacazes, RJ. Os indivíduos foram agrupados com base na presença ou não de infecção por *T. gondii* e manifestação de doença ocular.

Os participantes foram selecionados considerando-se como critério: 1) sorologia para toxoplasmose, utilizando o Kit Toxonostika IgG II (BioMérieux); 2) fundoscopia para verificação de lesões oculares decorrentes da infecção pelo *T. gondii*, e classificação das mesmas de acordo com suas características morfológicas; 3) sexo e idade. Como critério de exclusão utilizou-se o estado imunológico, de modo a não incluir indivíduos que por ventura apresentassem imunodepressão (por uso de drogas imunossupressoras, neoplasias, etc) e/ou debilitados no seu estado geral de saúde.

Todos os indivíduos que participaram do estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e, somente após o esclarecimento sobre sua forma de participação e leitura do termo de consentimento pelo indivíduo, é que se procedeu à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Este estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP), sob o parecer de nº 013/2007 (Anexo 2).

Foram avaliados 87 soros de indivíduos residentes em comunidades carentes do município, sendo 58 mulheres e 29 homens. A média de idade é 30,7 anos e varia entre 6 e 80 anos. Os indivíduos foram divididos em grupos de acordo com a sorologia e a presença ou ausência de lesão ocular, bem como de acordo com a classificação da lesão ocular: 53 indivíduos soropositivos com lesão ocular (PL), 20 indivíduos soropositivos sem o acometimento ocular (PSL), 5 indivíduos soronegativos com o acometimento ocular (SNL) e 9 soronegativos (SN) (Tabela 1).

Aproximadamente 15ml de sangue dos indivíduos selecionados foram coletados por venopunção utilizando-se sistema de tubos à vácuo (Vacuette – Greiner Bio One) na ausência de anticoagulante e foram processados para obtenção do soro.

**Tabela 1:** Indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes participantes do estudo agrupados segundo exames sorológicos e de fundo de olho

Sorologia	Fundoscopia		
	Perfil Clínico	Número de Indivíduos	Tipo de Lesão
Negativa	Sem Lesão	9	-
	Com Lesão	2	B
		1	BC
		2	C
Positiva	Sem Lesão	20	-
	Com Lesão	4	A
		4	AB
		7	ABC
		2	AC
		11	B
		6	BC
		19	C
<b>Total</b>		87	

#### 4.2 - Adsorção de soros com Proteína A

Os títulos de IgG anti *T. gondii* são muito elevados quando comparados às outras classes de imunoglobulinas. Como conseqüência, os sítios de ligação para as imunoglobulinas são preenchidos de forma majoritária por IgG, dificultando a ligação de outras classes de imunoglobulinas. Assim, para maior acurácia na identificação de imunoglobulinas A, E e M uma alíquota do soro de cada indivíduo foi adsorvida com Proteína A agarose (Sigma-Aldrich).

Em 100 µl de Proteína A agarose, em solução A (descrita pelo fabricante – Anexo 3) foram adicionados 100 µl de soro dos indivíduos participantes, em tubos cônicos com capacidade para 500 µl. Os tubos foram agitados gentilmente por 1 hora. Após um repouso de 30 minutos, 100 µl do sobrenadante foram cuidadosamente retirados, para que não houvesse mistura entre a proteína A decantada e o soro adsorvido. Os soros adsorvidos foram congelados a -20°C até seu uso.

Para as análises de IgA, IgE e IgM foram utilizados tanto o soro adsorvido com proteína A, quanto o soro sem adsorção, entretanto só serão apresentados resultados referentes aos soros adsorvidos com proteína A agarose.

#### **4.3 - Manutenção dos Parasitas e Preparação do Antígeno Solúvel de *Toxoplasma gondii***

Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH foram mantidos por meio de passagens sucessivas em camundongos CF1 fêmeas de quatro semanas de idade.

A lavagem peritoneal dos animais foi feita com 5ml de salina tamponada fosfatada (PBS - 0,15M; pH 7,2) contendo 0,2% de heparina, no segundo ou terceiro dia de infecção. O material coletado foi centrifugado a 100g, por 5 minutos, a 4º C. O sobrenadante foi selecionado e centrifugado novamente a 913g por 30 min. a 4º C, descartado e o sedimento imediatamente congelado.

Para preparação do antígeno, o sedimento foi ressuspensionado em aproximadamente 2 ml de água destilada. A suspensão foi centrifugada a 913g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em água destilada. Uma alíquota foi diluída na proporção 1:100 para a contagem do número de taquizoítas em câmara de Neubauer. O volume foi ajustado para aproximadamente  $2,5 \times 10^8$  parasitas por ml. Foram feitas alíquotas de aproximadamente 10 ml por tubo.

Os parasitas foram submetidos a cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho de água a 37°C. Após a lise por ciclos de congelamento e descongelamento os parasitas passaram por um processo de sonicação. A sonda do aparelho de ultrassom (Sonifer 150, BRANSA) foi introduzida no tubo sem entrar em contato com as paredes do mesmo. Acionou-se o aparelho por 6 pulsos de 30 segundos, no modo 5. Durante a sonicação foi essencial que os tubos estivessem mantidos no gelo, fazendo um pequeno intervalo entre os pulsos para que a suspensão não fosse aquecida. Terminado os seis pulsos centrifugou-se a preparação à 900xg por 20 minutos. O sobrenadante foi alíquotado em tubos de 1,5 ml para microcentrífuga e centrifugado à 10.000xg por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

#### **4.4 - Detecção de Anticorpos anti-*T. gondii* em Amostras de Soros de Pacientes por meio de ELISA**

Amostras de soros de todos os pacientes foram analisadas quanto à presença de anticorpos IgA, IgE e IgG total, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> específicos no reconhecimento de *T. gondii*.

Placas de ELISA (Nunc-Immuno, MAxisorp) foram sensibilizadas com extrato antigênico de *Toxoplasma gondii*, preparado conforme descrito acima, na concentração de 10µg/ml. Os antígenos foram diluídos em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0.1M (pH 9.6) e incubados durante 18-20 horas, a 4°C. Após o período de sensibilização, as placas foram lavadas por 3 vezes com 200µl de PBS adicionado de 0,05% Tween 20. Após a lavagem as placas foram bloqueadas com solução de PBS suplementado com 1% de Albumina Sérica Bovina (*Bovine Serum Albumin* – BSA) por um período de 30 min. à 37°C. A solução de bloqueio foi descartada, e as placas foram lavadas conforme descrito.

Posteriormente, foram adicionados os soros de pacientes e controles conforme diluição descrita na Tabela 2. Os soros foram incubados por 1 hora a 37°C. Após uma nova etapa de lavagem, os anticorpos anti-imunoglobulinas A, E, G e M, já conjugados à peroxidase foram adicionados nas diluições sugeridas pelo fabricante (Tabela 2). Seguiu-se uma nova etapa de incubação por 60 min. a 37°C. Para marcação das subclasses de IgG foram utilizados anticorpos biotinilados, como conseqüência foi necessária uma etapa adicional, onde, adicionou-se estreptoavidina marcada com Peroxidase (Southern Biotech) na diluição de 1:6000. Seguiu-se uma nova incubação por 30 min. Após esse período os poços foram novamente lavados como descrito. Em seqüência foi adicionada a solução substrato para revelação (Anexo 3).

As placas foram mantidas no escuro por aproximadamente 30 minutos até a leitura no leitor de ELISA (DYNATECH MR5000), utilizando filtro de 450 nm.

**Tabela 2:** Diluição de anticorpos conjugados a peroxidase ou biotina e de soros utilizados no ensaio de ELISA.

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Estreptovidina-HRP</b>	<b>Diluição - soro</b>
IgA (Southern)*	1:5.000	-	1:100
IgE (Southern)*	1:1.500	-	1:100
IgG total (Southern)*	1:15.000	-	1:1.000
IgG <sub>1</sub> (Sigma)**	1:1.000	1:600	1:500
IgG <sub>3</sub> (Sigma)**	1:4.000	1:6.000	1:100
IgG <sub>4</sub> (Sigma)**	1:15.000	1:6.000	1:100

\* Anticorpos conjugados à peroxidase

\*\* Anticorpos conjugados à Biotina

#### **4.5 - Preparação de Antígenos de *Toxoplasma gondii* para citometria de fluxo**

Taquizoítas de *T. gondii*, cepa RH, foram mantidos por meio de passagens sucessivas em camundongos BALB/c fêmeas de quatro semanas de idade.

Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e presos à placa de cortiça em decúbito dorsal com auxílio de agulhas. Foram injetados 5 ml de PBS estéril e gelado sob o peritônio previamente exposto. O peritônio foi massageado e o líquido peritoneal contendo os taquizoítas foi recolhido através de punção com seringa. Para manutenção da cepa, foram inoculados intraperitonealmente de 0,3 - 0,5 ml de material recolhido do lavado peritonial, por camundongo.

Para a preparação de parasitas fixados para Citometria de Fluxo, a lavagem peritoneal dos camundongos foi feita com 5ml de meio RPMI, geralmente após 3 dias de infecção. O material coletado foi centrifugado a 700g, a 4<sup>o</sup> C por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em aproximadamente 30 ml de PBS e centrifugado a 900g por 10 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi ressuspensionado em aproximadamente 40 ml de solução fixadora (1:1 PBS - Max Facs Fix) e mantido em repouso *overnight* a 4<sup>o</sup>C.

Após esse período os parasitas foram centrifugados a 900g e ressuspensionados em 10 ml de PBS. Foi retirada uma pequena alíquota para contagem em câmara de Neubauer. O volume foi ajustado com PBS para uma concentração final de 5,0 x 10<sup>6</sup> parasitas/ml.

#### **4.6 - Citometria de fluxo para detecção de marcação de antígenos na superfície de formas taquizoítas.**

Os soros dos pacientes e controles foram diluídos em PBS suplementado com 3% de Soro Fetal Bovino (SFB) de acordo com a tabela 3. Volume equivalente a 50 µl, em quatro diferentes diluições, foram dispensados em placas de 96 poços e fundo em U. Sobre os soros foram adicionados 50µl de solução contendo formas taquizoítas de parasitas fixados, contendo aproximadamente  $5 \times 10^6$  parasitas por ml. As placas foram mantidas a 37°C por 30 min. Após a incubação as placas foram lavadas 2 vezes com 200µl PBS suplementado com 3% de SFB, por centrifugação a 1000g por 10 min.

Os anticorpos anti-imunoglobulinas humanas, IgM, IgA, IgG total, conjugados a FITC (Southern Biotech), bem como as subclasses de IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> e IgE conjugados a biotina (Sigma), diluídos, de acordo com a Tabela 3, em PBS suplementado com 3% de SFB, foram adicionados em cada poço e incubados a 37° C por 60 min. Como controle para as ligações não específicas, anticorpos foram adicionados a formas taquizoítas do parasita na ausência de soro humano. Após a incubação foi feita nova etapa de lavagem conforme descrito. Nas marcações para as subclasses de IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>), bem como para IgE se fez necessária uma etapa adicional, pois estes estavam conjugados à biotina. Nestes casos adicionou-se Estreptoavidina marcada com Ficoeritrina (SAPE) (Southern Biotech) na diluição de 1:400. Seguiu-se um novo período de incubação de 30min a 37° C.

Após a etapa de incubação com anticorpos conjugados a FITC ou com SAPE foi efetuada uma nova etapa de lavagem, como descrito. Ao final, os parasitas foram ressuspensos em 200µl de solução fixadora Max Facs Fix e armazenados por até 24h a 4°C, ao abrigo da luz, para posterior análise em citometro de fluxo.

**Tabela 3:** Diluições de anticorpos conjugados a FITC ou a Biotina e de soros usados para citometria de fluxo.

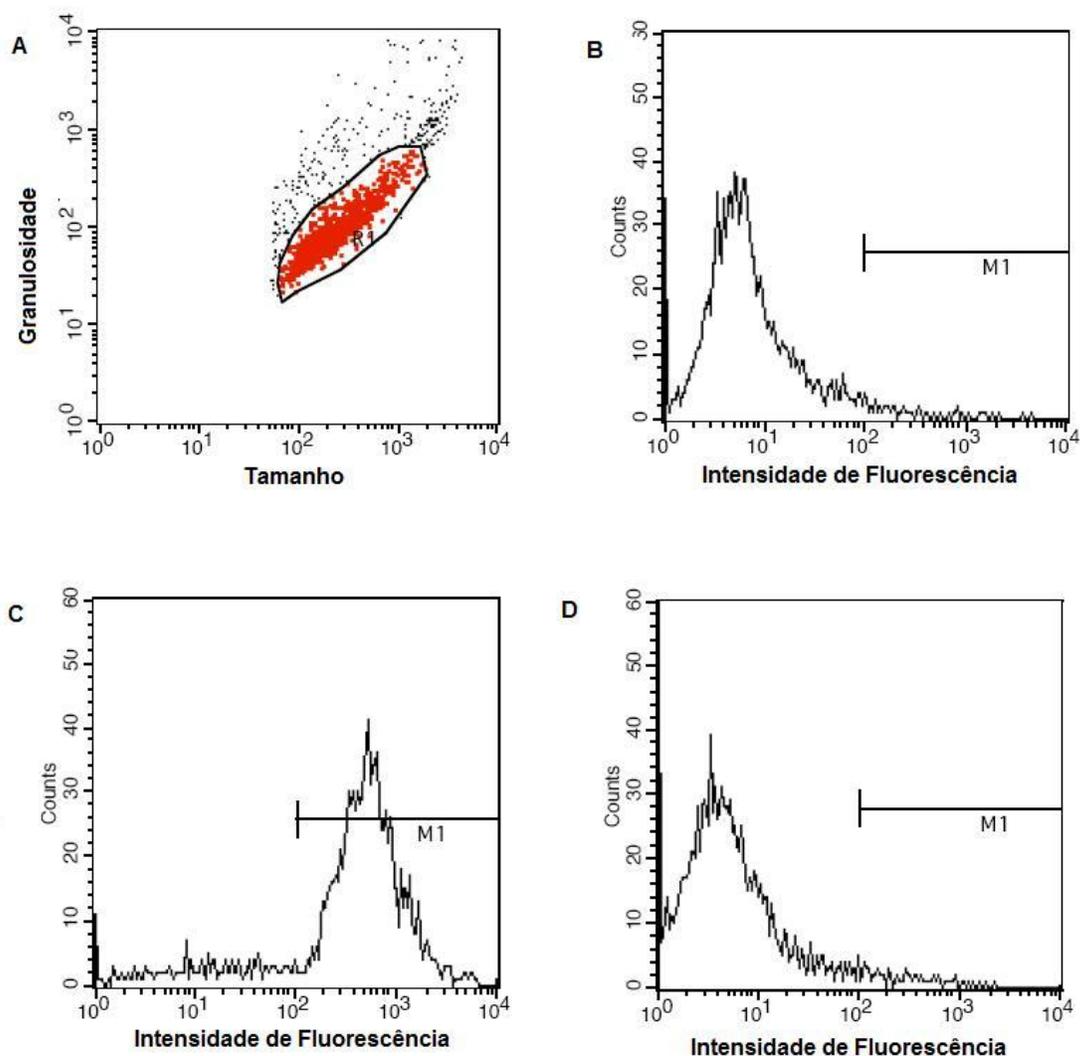
Aticorpos			Soros de pacientes e indivíduos controles			
Classe/ subclasse	Diluição	SAPE	Diluição 1	Diluição 2	Diluição 3	Diluição 4
IgA*	1:200	-	1:100	1:400	1:1600	1:6.400
IgE**	1:100	1:400	1:100	1:400	1:1600	1:6.400
IgG total*	1:2.000	-	1:1000	1:4.000	1:16.000	1:64.000
IgG <sub>1</sub> **	1:20.000	1:400	1:4.000	1:16.000	1:64.000	1:256.000
IgG <sub>2</sub> **	1:1.000	1:400	1:50	1:200	1:800	1:3.200
IgG <sub>3</sub> **	1:1.000	1:400	1:50	1:200	1:800	1:3.200
IgG <sub>4</sub> **	1:1.000	1:400	1:100	1:400	1:1600	1:6.400
IgM*	1:200	-	1:100	1:400	1:1600	1:6.400

\* Anticorpos conjugados a FITC

\*\* Anticorpos conjugados a Biotina

As análises foram feitas em citômetro Becton Dickinson FacsCan (nas análises de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub>), no Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo. As demais imunoglobulinas foram analisadas no Becton Dickinson Facs Calibur, no Laboratório de Biologia do Reconhecer, da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Para cada amostra individual foram adquiridas informações relativas aos parâmetros tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e intensidade relativa de fluorescência de 5.000 parasitas. A figura 3A mostra a distribuição característica que as formas taquizoítas de *T. gondii* apresentam em gráficos de tamanho versus granulosidade, o que permite o posicionamento de um marcador sobre a região correspondente à população de interesse (R1). Esse perfil foi obtido ajustando-se os ganhos de tamanho e granulosidade, em escala log, com valores E00 e 300, respectivamente.

Utilizando histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitas, foi feita a análise da intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada. Para cada experimento foi estabelecido um limiar de positividade de no máximo 2%, em função da curva de fluorescência do tubo controle de ligação inespecífica do anticorpo secundário (Figura 3B). Em seguida, o mesmo marcador foi empregado para obtenção do percentual de parasitas fluorescentes positivos (PPFP) para cada amostra individual (Figura 3C e D).



**Figura 3:** Gráficos representativos utilizados para determinar a Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos (PPFP). Seleção da população de parasitas florescentes positivos, gráfico de tamanho versus granulosidade (A); Controle interno da reação (parasitas incubados apenas com conjugado) (B); paciente soropositivo para toxoplasmose (C); paciente soronegativo para toxoplasmose (D). O posicionamento do marcador 1 (M1) segue o critério de se obter no máximo 2% de parasitas florescentes positivos, para o controle interno da reação.

#### **4.7 – Análises estatísticas**

Os níveis séricos de anticorpos foram comparados considerando a análise tanto intragrupos quanto intergrupos, por meio dos testes: Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunns. Foi considerada significativa qualquer diferença que reproduzisse pelo

menos  $p < 0.05$ , ao nível de 95% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

Testes diagnósticos que produzem resultados em variáveis contínuas necessitam do estabelecimento de um ponto de corte (*cut off*), onde indivíduos que apresentarem valores menores ou iguais ao ponto de corte são considerados negativos e indivíduos que apresentarem valores maiores que o ponto de corte são considerados positivos. Assim, para cada um dos diferentes pontos de corte, dentro da amplitude de valores que o teste produz, podemos estimar a sensibilidade e a especificidade. Uma curva ROC (*Receiver Operator Curve*) é uma função contínua da Sensibilidade ( $S_e$ ) versus 1- Especificidade ( $1-E_s$ ), para os diversos pontos de corte obtidos dentro do espaço amostral (Martinez et al., 2003). Foram construídas curvas ROC para cada teste realizado.

A área sob a curva (AUC) ROC é uma medida resumo usual do desempenho de um teste, já que ela é estimada levando-se em consideração todas as sensibilidades e as especificidades de um teste. Essa medida é interpretada como a probabilidade de um indivíduo positivo ter um resultado de maior magnitude que um indivíduo negativo (Begg, 1991). Um teste totalmente incapaz de discriminar indivíduos negativos e positivos possui AUC igual a 0,5. Quanto maior a capacidade do teste em discriminar os indivíduos em positivos e negativos, mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do gráfico e a AUC seria próxima de 1 (Martinez et al., 2003).

Após a construção da curva ROC foi possível estabelecer um ponto de corte (*cut off*). A escolha do *cut off* baseou-se em um ponto onde a especificidade e a sensibilidade estivessem com seus valores elevados, isto é, de forma que nenhum destes parâmetros fossem privilegiados. Após o estabelecimento do *cut off* foi possível calcular a razão de verossimilhança (RV). A RV expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes.

Foram calculadas as Razões de Verossimilhança para cada teste. A razão de Verossimilhança é definida como:

$$RV = \frac{\text{Positivos verdadeiros}}{\text{Positivos verdadeiros} + \text{Falsos negativos}} \div \frac{\text{Falsos positivos}}{\text{Falsos positivos} + \text{Negativos verdadeiros}}$$

Tomou-se como:

- 1- Positivos verdadeiros: Indivíduos que foram considerados soropositivos segundo o teste Toxonostika II (BioMerieux).
- 2- Negativos verdadeiros: Indivíduos que foram considerados soronegativos segundo o teste Toxonostika II (BioMerieux).
- 3- Falsos positivos: Indivíduos soronegativos segundo o teste Toxonostika II (BioMerieux) que apresentaram valores acima da linha de corte estabelecida para os testes de ELISA e citometria de fluxo.
- 4- Falsos negativos: Indivíduos soropositivos segundo o teste Toxonostika II (BioMerieux) que apresentaram valores abaixo da linha de corte estabelecida para os testes de ELISA e citometria de fluxo.

## **V – Resultados**

### **5.1 – Detecção de Anticorpos anti-*T. gondii* em Amostras de Soros de Pacientes por ELISA**

A investigação sobre a presença de imunoglobulinas A, E, M e G e as subclasses de G (1, 2, 3 e 4) foi realizada por ELISA. Para a dosagem de IgA e IgE o soro foi previamente adsorvido com proteína A em agarose. Os resultados estão expressos em valores de densidade ótica (D.O.) obtidos para cada indivíduo participante do estudo.

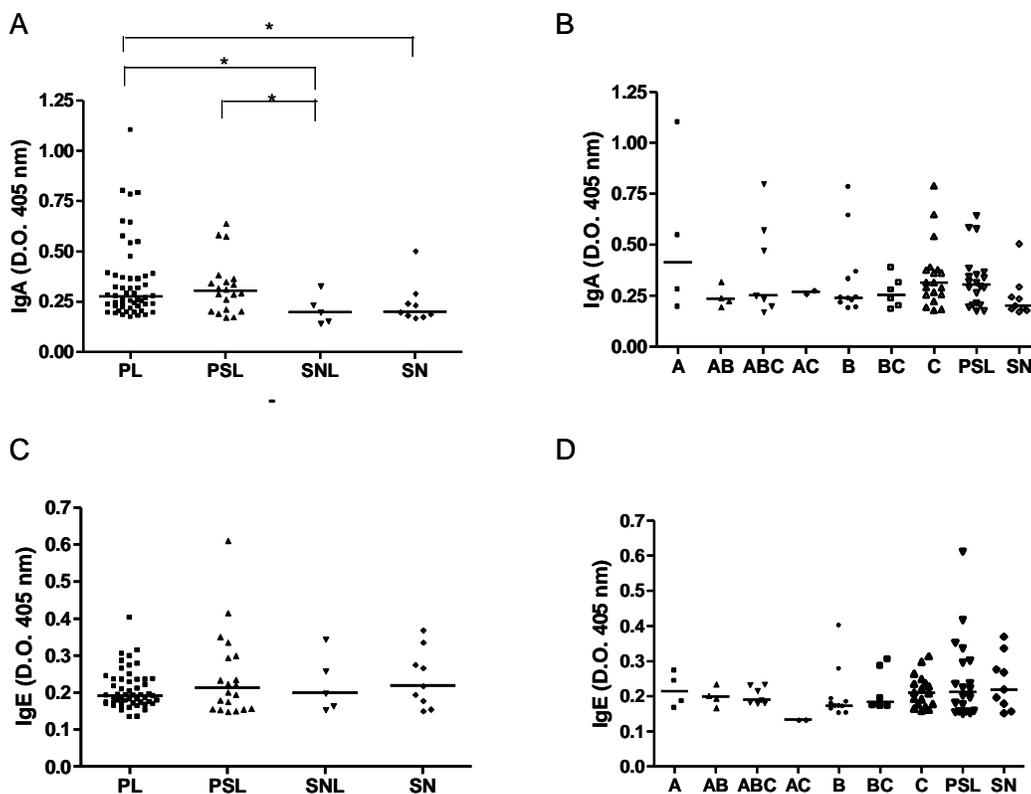
Os resultados referentes à IgM e IgG<sub>2</sub> não serão apresentados visto que não foi obtido êxito na padronização.

As denominações dos grupos de pacientes serão abreviadas ao longo da descrição dos resultados como descrito na seção Materiais e Métodos e como se segue: indivíduos soropositivos com lesão ocular (PL); indivíduos soropositivos sem o acometimento ocular (PSL), soronegativos portadores de lesão ocular (SNL) e soronegativos sem lesão ocular (SN).

#### **5.1.1 – Detecção de IgA e IgE**

Para a dosagem de IgA pode-se observar que o grupo PL apresentou maior D.O., quando comparado a SNL e SN, no entanto, esta diferença não foi significativa em relação a PSL. Sendo assim, os níveis de IgA são mais elevados no grupo PSL, em relação a SN (Figura 4A). Quanto a produção de IgE não foram observadas diferenças entre os grupos, de modo que todos os grupos apresentaram valores de D.O. semelhantes ao grupo SN (Figura 4C).

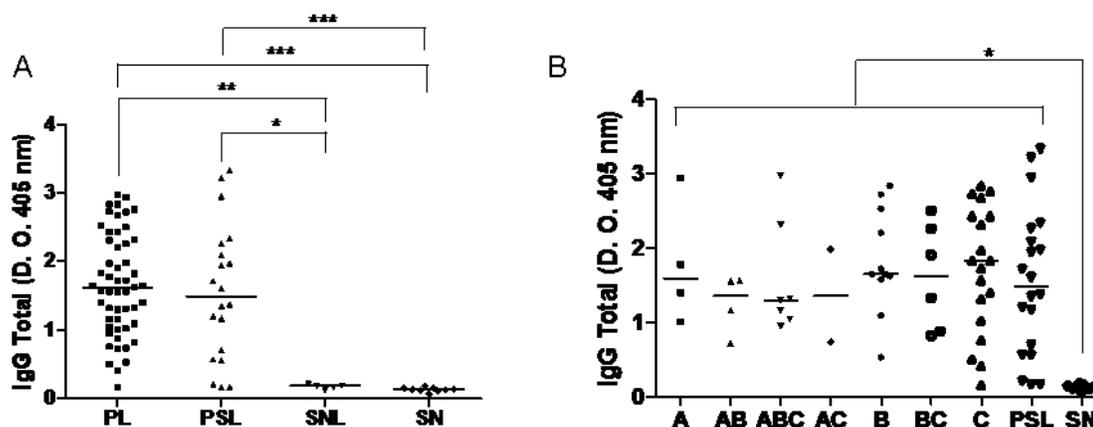
Quando os indivíduos foram agrupados de acordo com o tipo de lesão ocular não foram detectadas diferenças significantes entre os mesmo, tanto para IgA quanto para IgE (Figura 4 B e D). No entanto, é possível notar que pacientes com lesão tipo C e pacientes sem o acometimento ocular apresentam níveis de IgA ligeiramente mais altos quando comparados aos demais grupos de pacientes soropositivos, com exceção do grupo de pacientes que apresentam apenas lesão tipo A (Figura 4B).



**Figura 4:** Detecção de IgA e IgE por ELISA. IgA nos indivíduos de acordo com a presença ou não de lesão ocular e sorologia. (A) e de acordo com o tipo de lesão ocular (B). Investigação de IgE em função da presença ou não de lesão ocular e sorologia (C) e de acordo com o tipo de lesão ocular (D). Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. Diluição do soro 1:100. \* Significa  $P < 0,05$ .

### 5.1.2 - Detecção de IgG total e suas subclasses 1, 3 e 4

Utilizando a técnica ELISA foi possível observar diferença significativa nos níveis de IgG total entre indivíduos soropositivos e soronegativos. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos de indivíduos portadores e os não portadores de lesão ocular (figura 5 A). Quando analisados de acordo com o tipo de lesão ocular, todos grupos de pacientes soropositivos com lesão ocular apresentaram valores de D.O. significativamente mais altos que os indivíduos soronegativos (Figura 5B). Foi possível observar que indivíduos portadores de lesão tipo C apresentam níveis de IgG ligeiramente mais altos, em relação aos demais grupos. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos portadores das diferentes lesões oculares.



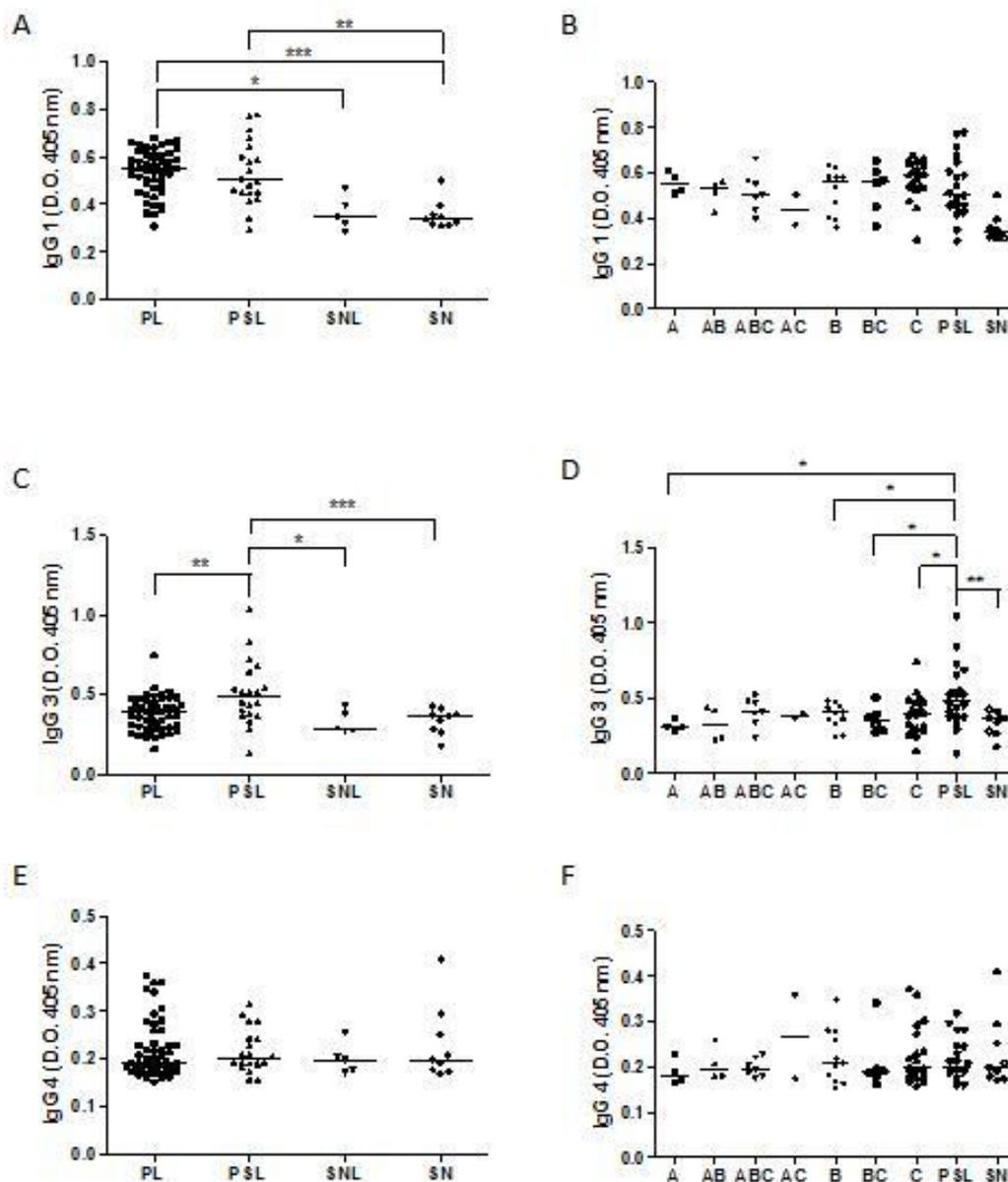
**Figura 5:** Detecção de IgG total por ELISA. IgG total nos indivíduos de acordo com a presença ou não de lesão ocular e sorologia (A) e de acordo com o tipo de lesão ocular (B). Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. Diluição do soro 1:1000. \* Significa  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Os níveis de IgG<sub>1</sub> são significativamente maiores entre os grupos soropositivos (PL e PSL), quando comparados ao grupo SN. O grupo PL apresentou níveis de D.O. com significância estatística maior que SNL. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos PL e PSL (Figura 6A). Todos os grupos soropositivos, agrupados de acordo com a presença e o tipo de lesão ocular, apresentaram níveis de D.O. significativamente mais altos, quando comparados à SN. No entanto, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos de indivíduos portadores das diferentes lesões (Figura 6B).

Os níveis de IgG<sub>3</sub> foram mais elevados e com significância estatística entre pacientes soropositivos que não apresentam lesão ocular, quando comparados com os demais grupos. Pacientes soropositivos portadores de lesão ocular não apresentam níveis de IgG<sub>3</sub> significativamente maiores que pacientes soronegativos (Figura 6 C). Ao serem divididos de acordo com a presença e classificações das lesões oculares pode-se observar que os indivíduos acometidos com lesões dos tipos A, B, BC e C apresentam níveis de IgG<sub>3</sub> significativamente menores que os apresentados por indivíduos soropositivos sem acometimento ocular. Nenhum grupo de pacientes com lesão ocular apresentou produção de IgG<sub>3</sub> significativamente maior que indivíduos soronegativos (Figura 6 d).

Não foram observadas diferenças entre os níveis de IgG<sub>4</sub> produzidos por indivíduos soropositivos, acometidos ocularmente ou não, e indivíduos soronegativos

(Figura 6 E). Mesmo quando divididos em grupos de acordo com o acometimento ocular, não foram observadas diferenças (Figura 6 F). De fato, os níveis de IgG<sub>4</sub> se mostraram baixos em todos os grupos, sendo indistinguíveis do grupo soronegativo.



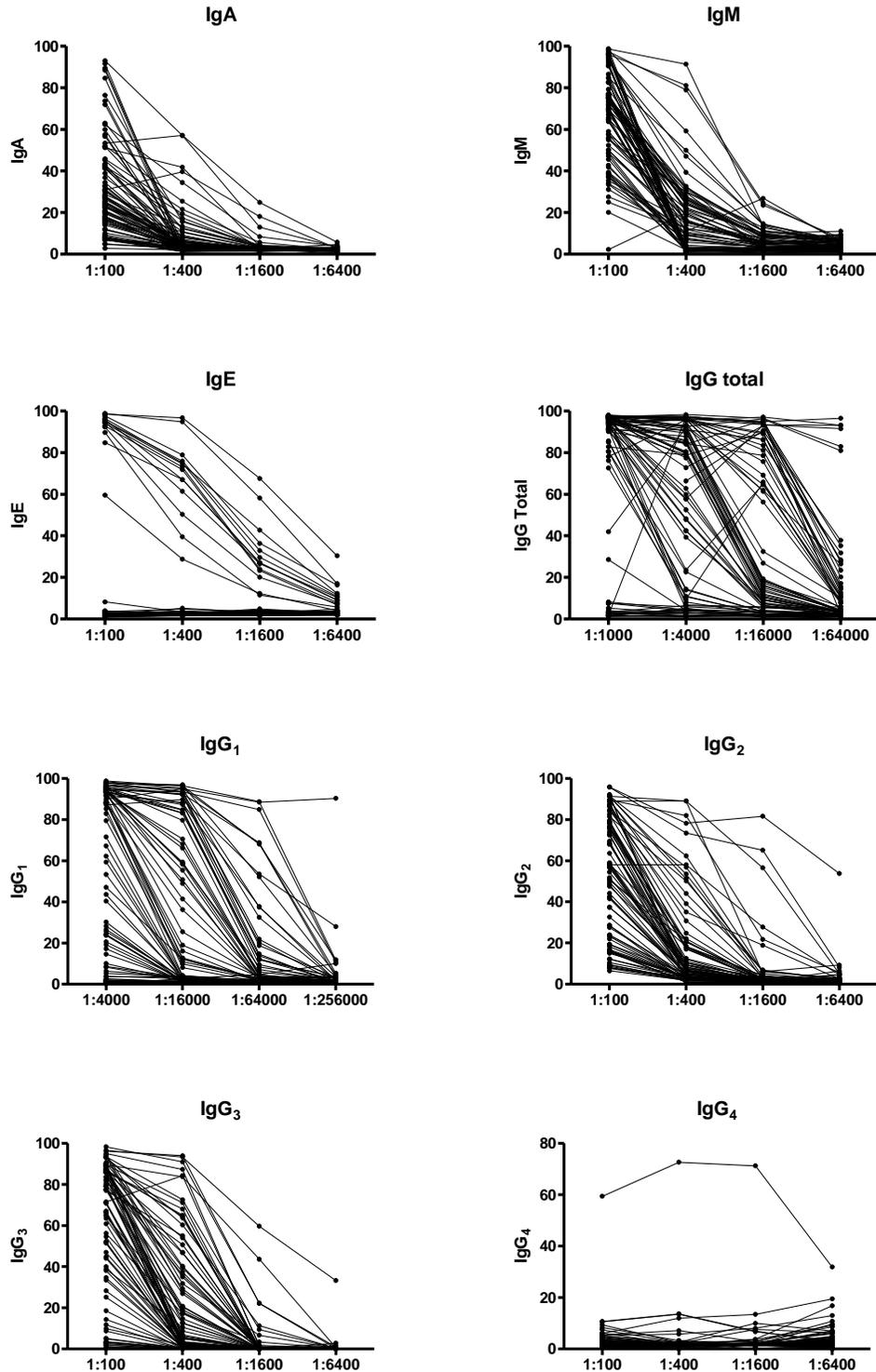
**Figura 6:** Detecção de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> por ELISA. IgG<sub>1</sub> nos indivíduos de acordo com a presença ou não de lesão ocular e sorologia (A) e de acordo com o tipo de lesão ocular (B). IgG<sub>3</sub> em função da presença ou não de lesão ocular e sorologia (C) e de acordo com o tipo de lesão ocular (D). IgG<sub>4</sub> em função da presença ou não de lesão ocular e sorologia (E) e de acordo com o tipo de lesão ocular. Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. Diluição do soro: A e B 1:500; C, D, E e F: 1:100. \* Significa P < 0,05. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

## **5.2 – Detecção de imunoglobulinas em Amostras de Soros de Pacientes por Citometria de Fluxo.**

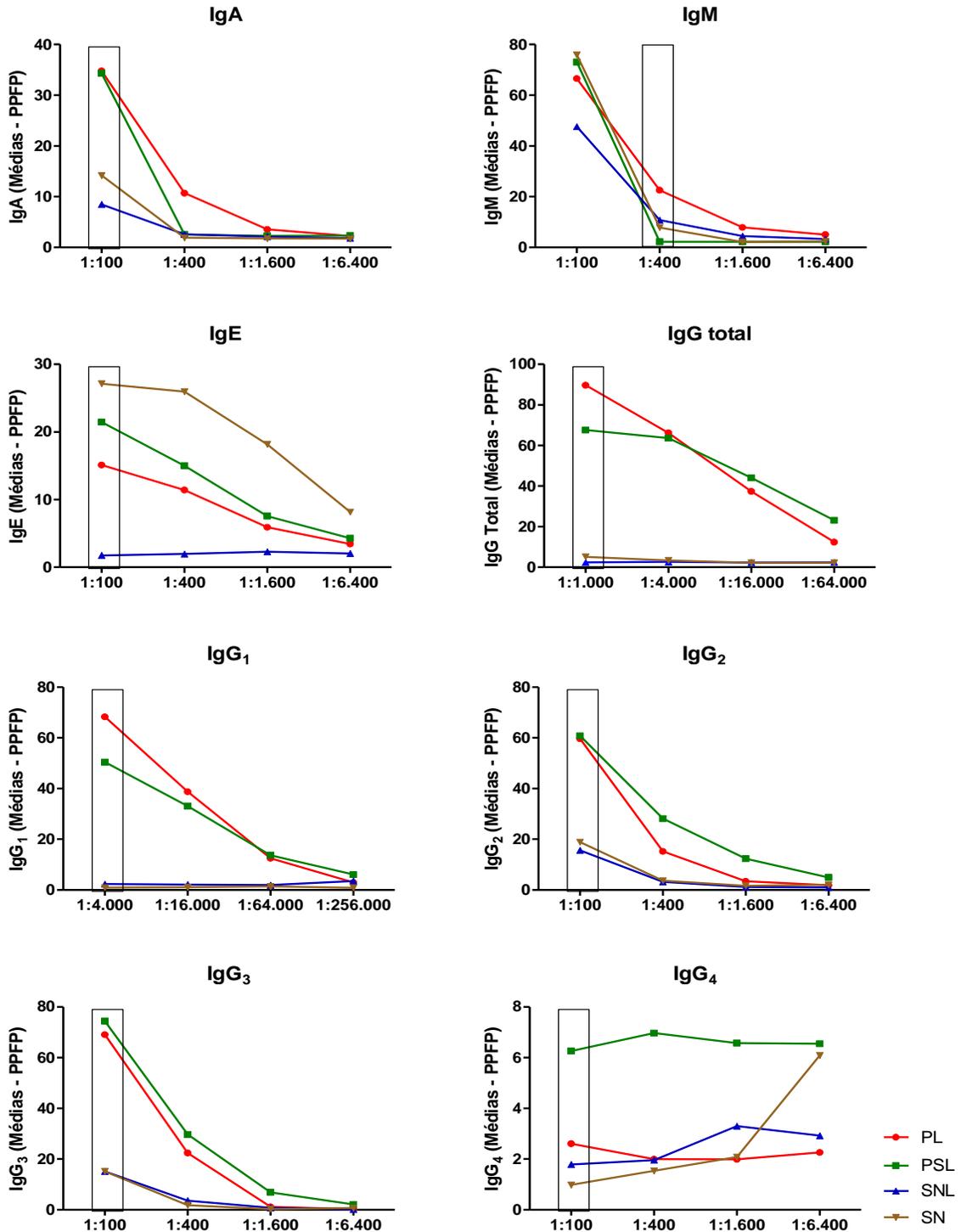
A detecção de imunoglobulinas séricas por citometria de fluxo foi realizada para IgA, IgE, IgM, IgG e suas subclasses IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. Para a detecção de IgA, IgE e IgM os soros foram previamente adsorvidos com proteína A.

Cada imunoglobulina foi analisada tendo-se diluído o soro em quatro diluições diferentes para cada paciente (Figura 7). Os dados são expressos em Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos (PPFP), isto é, porcentagem de parasitas dentro do marcador M1 para cada paciente participante do estudo.

Para as análises dos dados apenas os resultados referentes a uma das diluições foi utilizado. Para tanto, foi feita média dos PPFP's obtidos em cada grupo (PL, PSL, SNL e SN). A diluição em que as médias apresentaram maior segregação entre os grupos foi selecionada para as análises de cada imunoglobulina estudada (Figura 8). Em todos casos, exceto para a IgM a menor diluição foi utilizada. No caso da avaliação de IgM, na diluição 1:100 mesmo indivíduos soronegativos apresentam altos níveis dessa imunoglobulina, por isso a diluição 1:400 foi escolhida (Figuras 7B e 8B).



**Figura 7:** Diluições de soros de indivíduos soropositivos com ou sem acometimento ocular e indivíduos soronegativos com lesão ocular e soronegativos sem lesão ocular. Os resultados estão expressos como valores individuais de PFP em cada diluição, para cada participante do estudo: PFP para IgA (A), IgM (B), IgE (C), IgG Total (D), IgG<sub>1</sub> (E), IgG<sub>2</sub> (F), IgG<sub>3</sub> (G) e IgG<sub>4</sub> (H).

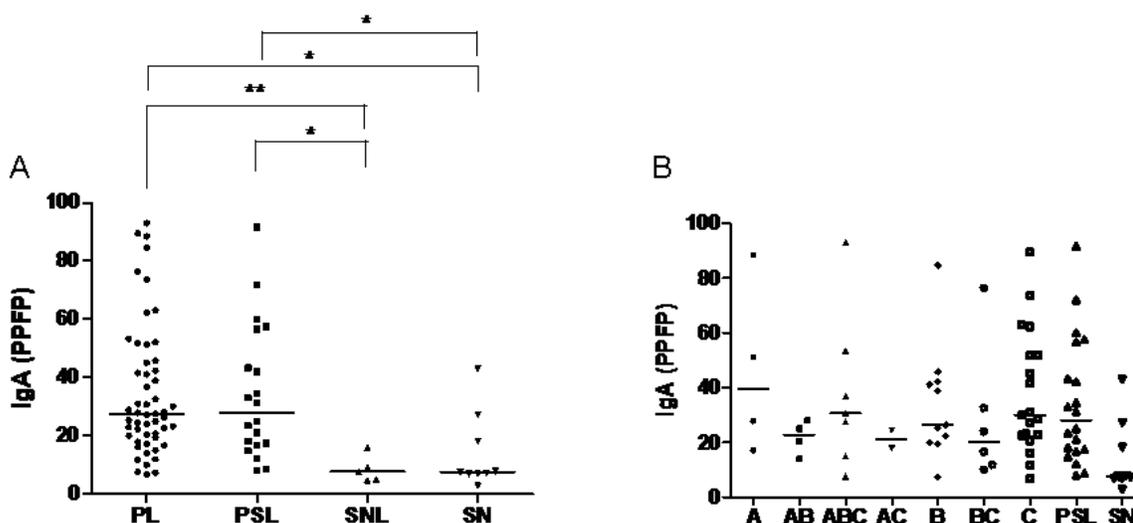


**Figura 8:** Médias das diluições de soros de indivíduos soropositivos com ou sem acometimento ocular e indivíduos soronegativos com lesão ocular e soronegativos sem lesão ocular. Os resultados estão expressos como médias de valores individuais de PPF em cada diluição, para cada participante do estudo de cada um dos grupos: PL, PSL, SNL e SN. PPF para IgA (A), IgM (B), IgE (C), IgG Total (D), IgG<sub>1</sub> (E), IgG<sub>2</sub> (F), IgG<sub>3</sub> (G) e IgG<sub>4</sub> (H).

### 5.2.1 – Detecção de IgA, IgM e IgE

Por meio de citometria de fluxo foi possível verificar diferença significativa na produção de IgA entre os grupos soropositivos, PL e PSL, e os grupos soronegativos, SNL e SN. Entretanto não foram observadas diferenças entre os grupos PL e PSL, demonstrando que por meio de citometria de fluxo, assim como observado por ELISA, não foi detectada diferença na produção de IgA, relacionada à presença de lesão ocular (Figura 9 A).

Quando os pacientes foram agrupados de acordo com o tipo de lesão ocular não foram observadas diferenças com significância estatística. Entretanto, pôde-se observar que paciente com lesão tipo A e C e pacientes soropositivos sem lesão ocular apresentaram níveis de IgA ligeiramente mais altos que os demais grupos (Figura 9 B).

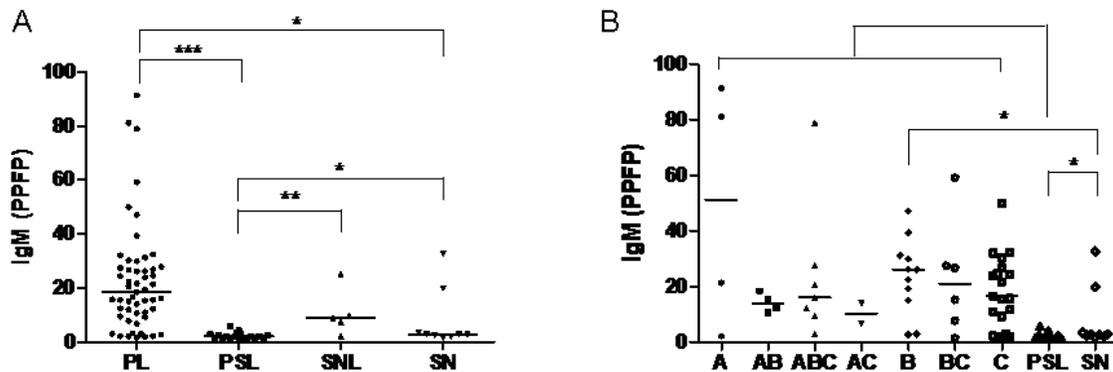


**Figura 9:** Detecção de IgA por Citometria de Fluxo. Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos marcados para IgA entre os grupos PL, PSL, SNL e SN (A) e entre os grupos com diferentes tipos de lesão ocular (B). Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. Diluição do soro: 1:100. \* Significa  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$ .

Na avaliação dos níveis séricos de IgM observou-se que o grupo PL apresenta níveis significativamente mais altos que PSL. O grupo PL apresentou produção mais elevada de IgM quando comparado ao grupo SN, mais não em relação à SNL (Figura 10A). Tais dados indicam relação entre a produção de IgM e o acometimento ocular.

Dois indivíduos soronegativos, segundo o teste Toxonostika IgG II, apresentaram altos níveis de IgM, semelhantes aos detectado em indivíduos soropositivos.

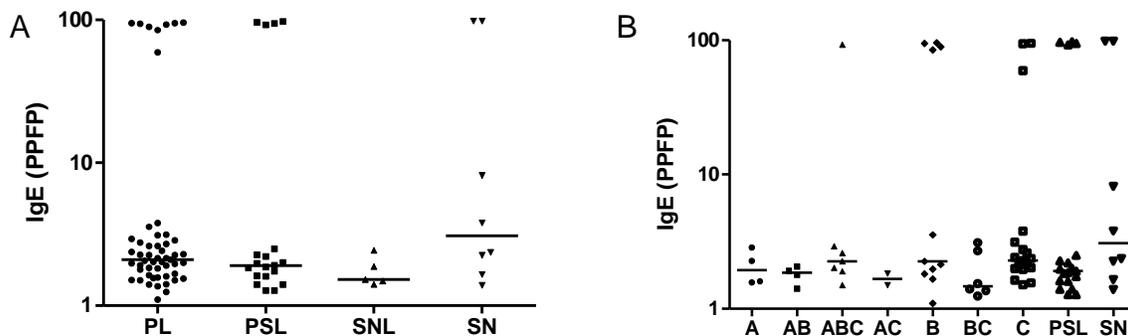
Quando analisados os grupos de acordo com o tipo de lesão ocular foram observadas diferenças significantes. Todos os grupos de pacientes soropositivos com lesão ocular apresentaram valores PFP para IgM significantemente maiores que PSL (com uma significância de no mínimo  $p < 0,05$ ). Foi possível observar que pacientes com lesão tipo B apresentam níveis significantemente maiores de IgM quando comparados à indivíduos soronegativos. Ainda, pacientes soropositivos sem lesão ocular apresentam PFP significantemente menores que indivíduos soronegativos (Figura 10B).



**Figura 10:** Detecção de IgM por Citometria de Fluxo. Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos marcados para IgM entre os grupos PL, PSL, SNL e SN (A) e entre os diferentes tipos de lesão ocular (B). Barras representam a mediana da dosagem obtida de cada indivíduo. Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. Diluição do soro:1:400. \* Significa  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Quando analisados os níveis de IgE não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos (Figura 11 A). Porém, pôde-se observar que em cada grupo, existem indivíduos alto produtores de IgE, inclusive entre os indivíduos soronegativos, segundo o Kit Toxonostika II.

Quando comparados os grupos de acordo com o tipo de lesão ocular não foram detectadas diferenças entre os grupos. Nessa análise, foi possível observar que os indivíduos alto produtores de IgE, portadores de lesão ocular, estavam distribuídos entre os grupos que apresentam lesões tipo ABC, B e C (Figura 11 B).

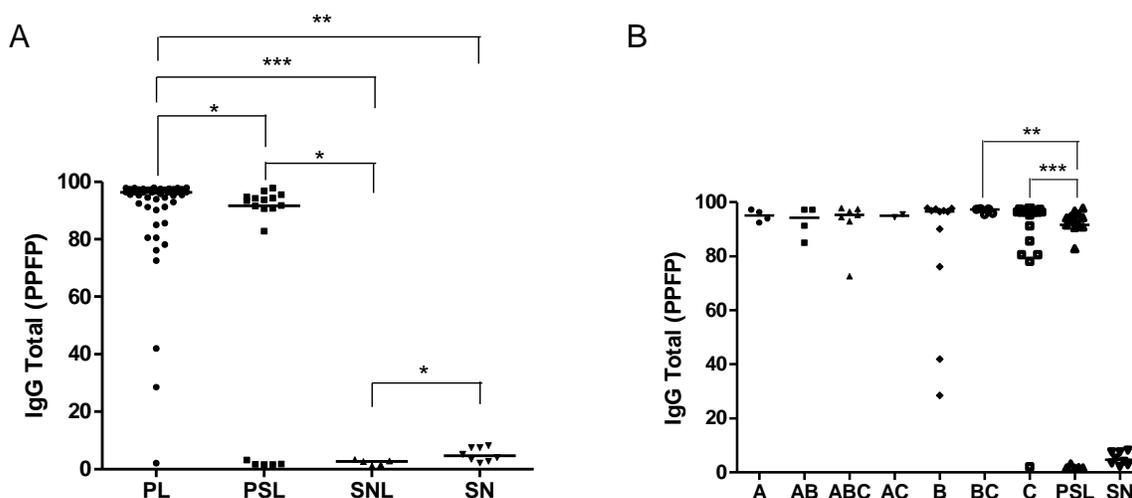


**Figura 11:** Detecção de IgE por Citometria de Fluxo. Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos marcados para IgE entre os grupos PL, PSL, SNL e SN (A) e entre os diferentes tipos de lesão ocular (B). Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. Resultados representados em log de base 10. Diluição do soro: 1:100.

### 5.2.2 – Detecção de IgG Total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4

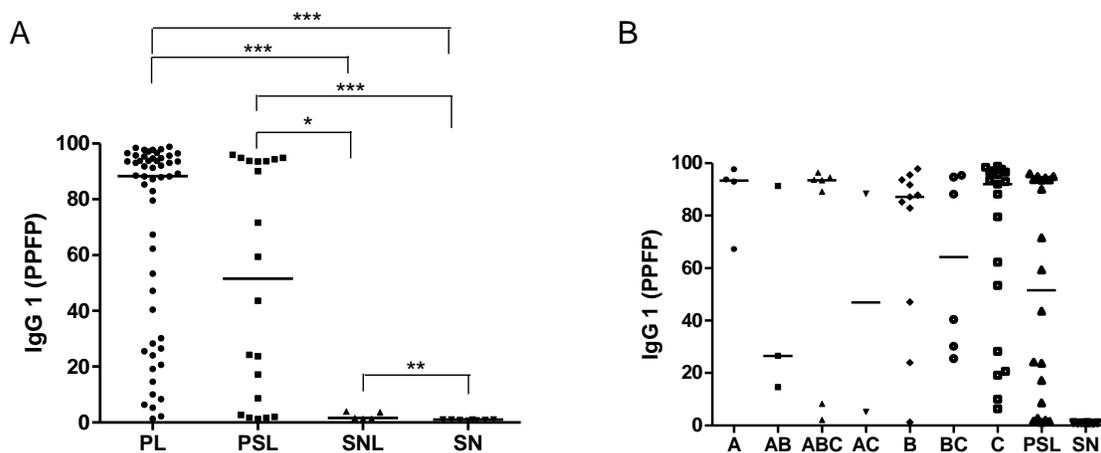
Os níveis de anticorpos IgG foram maiores entre os indivíduos soropositivos pelo teste Toxonostika II. Entretanto, essa diferença não foi significativa entre o grupo PSL e SN. Houve ainda diferença significativa nos níveis de IgG entre os indivíduos portadores de lesão ocular e os indivíduos soropositivos sem o acometimento ocular. É importante notar que indivíduos SNL possuem níveis mais baixos de IgG, quando comparados aos outros grupos. (Figura 12 A). Tais fatos indicam que indivíduos portadores de lesão ocular apresentam níveis mais elevados de IgG total nesse tipo de ensaio. É importante notar que para um indivíduo soropositivo com lesão tipo C e quatro indivíduos soropositivos sem lesão ocular, segundo o Kit comercial Toxonostika II, não foi possível detectar IgG por meio de Citometria de Fluxo.

Entre os diferentes subgrupos de indivíduos portadores de lesão ocular foi possível detectar diferença significativa,  $p < 0,05$  ou menor, nos níveis de IgG total entre todos os grupos em relação aos indivíduos soronegativos. Os indivíduos portadores de lesão tipo BC e C apresentam níveis de IgG significativamente mais elevados que indivíduos soropositivos sem lesão ocular (Figura 12 B).



**Figura 12:** Detecção de IgG Total por Citometria de Fluxo. Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos marcados para IgG entre os grupos PL, PSL, SNL e SN (A) e entre os grupos portadores de diferentes tipos de lesão ocular (B). Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. Diluição do soro: 1:1000. \* Significa  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

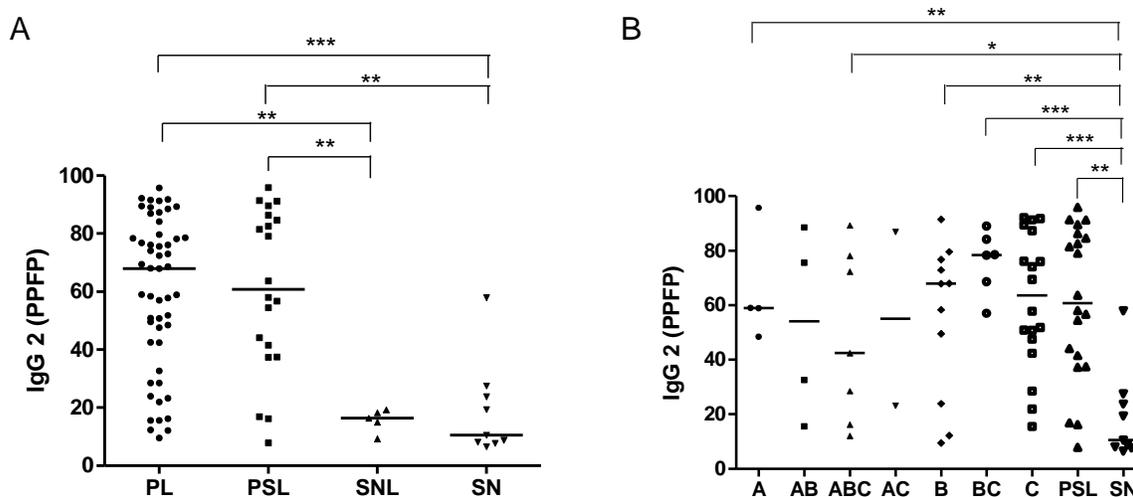
Os níveis de IgG<sub>1</sub> foram significativamente maiores nos grupos soropositivos quando comparados aos soronegativos, porém não houve diferença entre os grupos PL e o PSL. O grupo SNL apresentou níveis significativamente mais elevados IgG<sub>1</sub> quando comparado ao grupo SN (Figura 13 A). Quando divididos em grupos de acordo com o tipo de lesão ocular, há produção significativamente maior ( $p < 0,05$ , no mínimo) de IgG<sub>1</sub> entre todos os grupos positivos, portadores ou não de lesão ocular quando comparados a indivíduos SN. Entretanto, indivíduos portadores de lesão tipo C apresentaram os maiores valores de PPFP, embora esse dado seja não significativo. O grupo de indivíduos soropositivos sem o acometimento ocular também apresenta produção significativamente elevada deste isotipo, quando comparado ao grupo soronegativo (Figura 13 B).



**Figura 13:** Detecção de IgG<sub>1</sub> por Citometria de Fluxo. Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos marcados para IgG<sub>1</sub> entre os grupos PL, PSL, SNL e SN (A) e entre os grupos portadores de diferentes tipos de lesão ocular (B). Diluição do soro: 1:4.000. Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. \* Significa P < 0,05. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

Os níveis de IgG<sub>2</sub> foram mais elevados entre os indivíduos soropositivos, embora alguns indivíduos em ambos os grupos apresentem baixos índices de PFP para IgG<sub>2</sub>. Um paciente soronegativo para o teste Toxonostika II apresentou nível elevado de IgG<sub>2</sub>, compatível com os de indivíduos soropositivos (Figura 14 A).

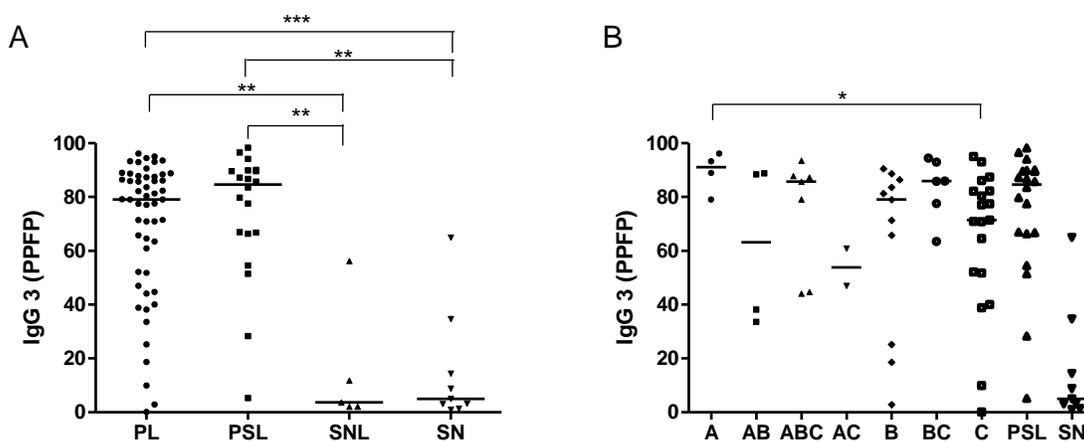
Quando os indivíduos foram agrupados de acordo com o tipo de lesão ocular foi observado que indivíduos com lesão tipo A, ABC, B, BC e C apresentaram níveis significativamente mais altos de IgG<sub>2</sub> quando comparados aos indivíduos soronegativos. Os indivíduos soropositivos sem lesão ocular também apresentam níveis significativamente mais altos de IgG<sub>2</sub>, quando comparados aos soronegativos (Figura 14 B).



**Figura 14:** Detecção de IgG<sub>2</sub> por Citometria de Fluxo. Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos marcados para IgG<sub>2</sub> entre os grupos PL, PSL, SNL e SN (A) e entre os grupos portadores de diferentes tipos de lesão ocular (B). Diluição do soro: 1:1.000. Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. \* Significa P < 0,05. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

Os níveis de IgG<sub>3</sub> foram significativamente maiores entre os grupos soropositivos. No entanto, o grupo PSL apresenta níveis de PPFP ligeiramente maiores que o grupo de indivíduos com lesão ocular. Entre os indivíduos do grupo SN, dois apresentaram níveis elevados de PPFP. É importante notar que um destes indivíduos também apresentou nível elevado de IgG<sub>2</sub> (Figura 15 A).

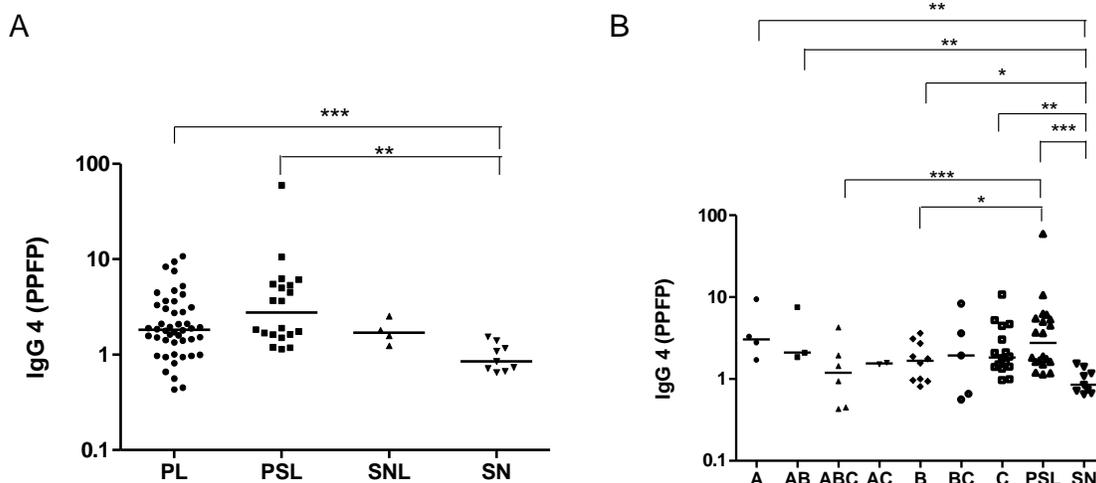
Quando os indivíduos foram divididos em grupos de acordo com o tipo de lesão ocular foi observado que indivíduos com lesão tipo A apresentam níveis de IgG<sub>3</sub> significativamente maiores que indivíduos portadores de lesão tipo C. Todos os grupos de pacientes soropositivos apresentaram valores de PPFP significativamente maiores (p < 0,05 no mínimo) que indivíduos soronegativos (Figura 15 B).



**Figura 15:** Detecção de IgG<sub>3</sub> por meio de Citometria de Fluxo. Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos marcados para IgG<sub>3</sub> entre os grupos PL, PSL, SNL e SN (A) e entre os grupos portadores de diferentes tipos de lesão ocular (B). Diluição do soro: 1:100. Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. \* Significa  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Níveis de IgG<sub>4</sub> se mostraram muito abaixo das demais subclasses de IgG. Os grupos de indivíduos soropositivos, PL e PSL, apresentaram maior produção de IgG<sub>4</sub> quando comparado ao SN, mas não se observou diferenças significantes entre tais grupos e SNL. É importante notar que indivíduos PSL apresentam níveis mais elevados de IgG<sub>4</sub> quando comparados a PL, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa (Figura 16 A).

Quando os indivíduos foram divididos de acordo com o tipo de lesão ocular observou-se que indivíduos portadores de lesão tipo A, AB, B e C, bem como PSL, apresentaram níveis significativamente mais elevados de IgG<sub>4</sub>, quando comprados a indivíduos SN. Indivíduos com lesão ABC e B apresentaram níveis significativamente menores que indivíduos soropositivos sem lesão ocular (Figura 16 B).



**Figura 16:** Detecção de IgG<sub>4</sub> por meio de Citometria de Fluxo. Porcentagem de Parasitas Fluorescentes Positivos marcados para IgG<sub>4</sub> entre os grupos PL, PSL, SNL e SN (A) e entre os grupos portadores de diferentes tipos de lesão ocular (B). Diluição do soro 1:100. Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. Os dados estão apresentados em logarítmico de base 10. \* Significa P < 0,05. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

### 5.3 – Cálculo de Especificidade e Sensibilidade e aplicação de curvas ROC para os testes ELISA e Citometria de Fluxo.

Curvas ROC foram construídas para cada um dos testes realizados. A partir de tais curvas foi possível calcular a área sob a curva (AUC) para cada teste. AUC é um parâmetro que demonstra o desempenho geral de um teste. Quanto mais próximo a 1 mais sensível e específico é o teste em questão. Foi possível observar que a curva ROC para IgG total apresentou maior AUC, quando comparado aos ELISAs que detectavam outras imunoglobulinas. Observou-se ainda que IgG<sub>4</sub> apresentou a menor AUC, seguido de IgE (Figura 17). Nos testes de Citometria de Fluxo foi possível observar que IgG<sub>1</sub> apresentou a maior AUC. Enquanto IgE e IgM apresentaram valores de AUC próximos a 0,5, menor valor possível para este tipo de teste (Figura 18).

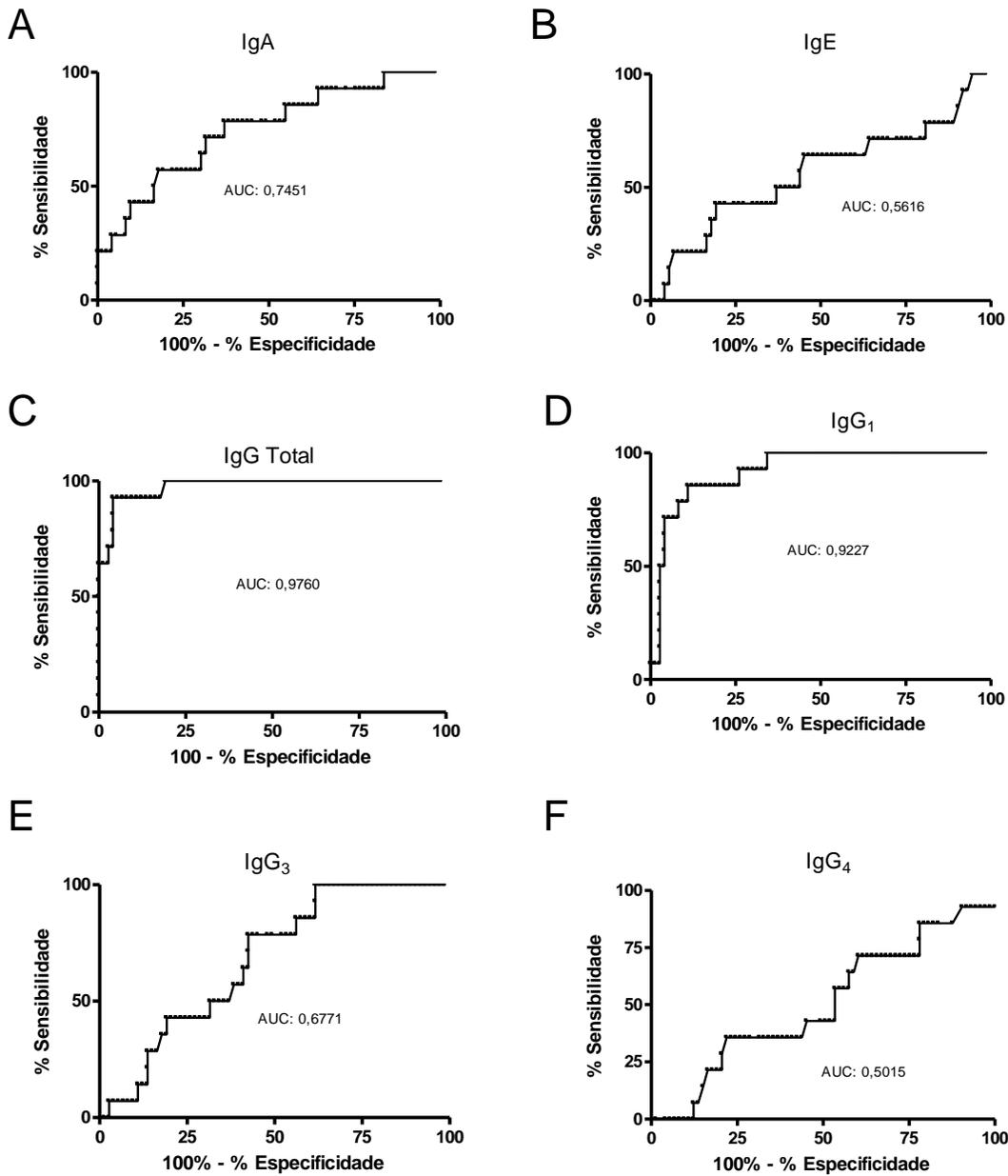
A construção das curvas ROC possibilitou ainda a definição de pontos de corte para cada teste. O estabelecimento de cada ponto de corte baseou-se na escolha de pontos onde tanto a sensibilidade quanto a especificidade estivessem altas (Tabela 4). Após a definição dos pontos de corte foi possível calcular a Razão de Verossimilhança (RV) para cada teste. A RV indica quantas vezes é mais provável que um indivíduo

realmente positivo seja indicado como positivo pelo teste quando comparado a indivíduos negativos. Observou-se que as maiores RV's foram obtidas nos testes que utilizaram IgG total, tanto por ELISA quanto por citometria de fluxo. No entanto exceto para IgE os teste realizados por citometria de fluxo apresentaram valores mais elevados de RV.

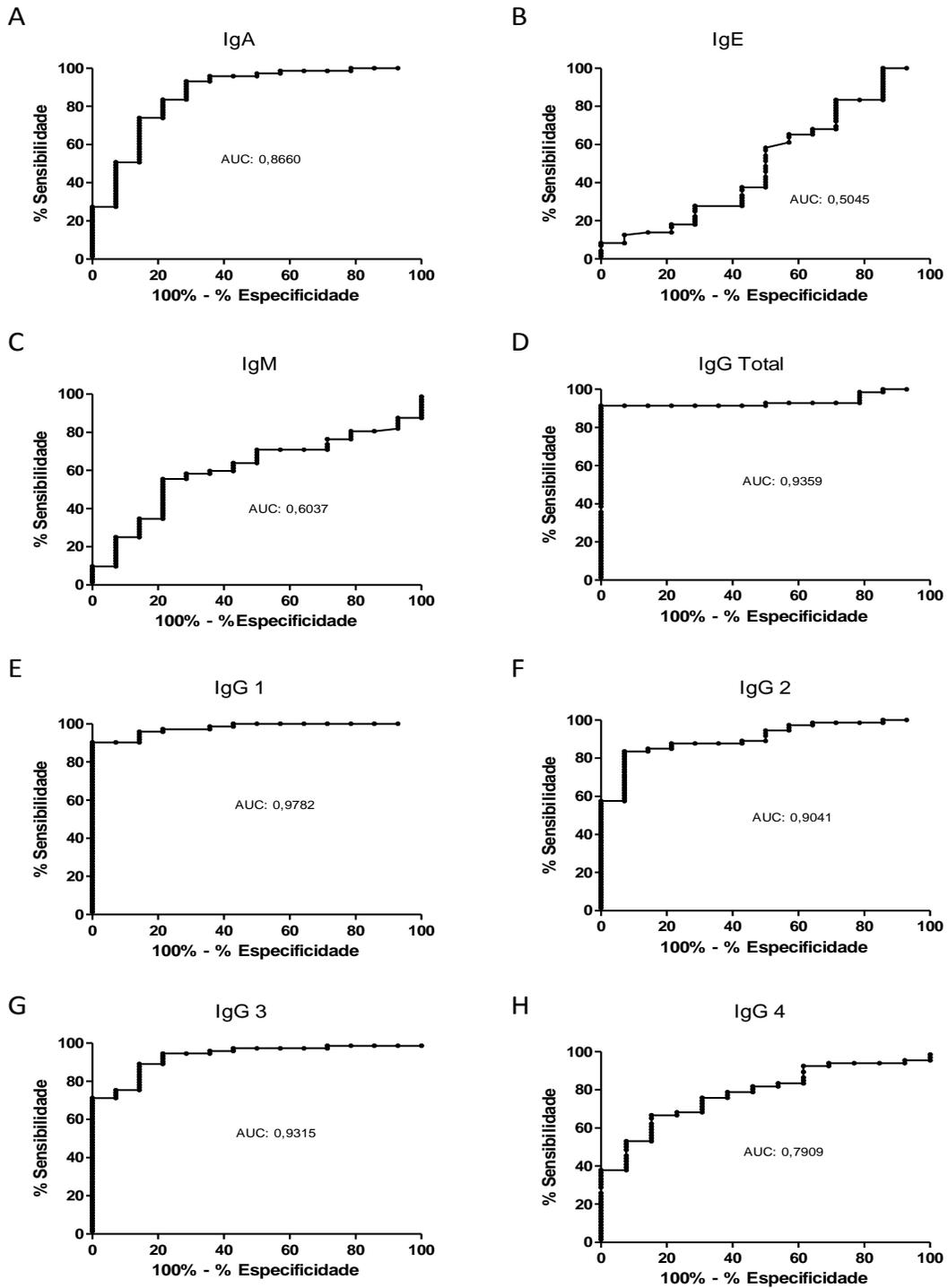
**Tabela 4:** Valores de Sensibilidade, Especificidade e Razão de Verossimilhança para os testes realizados

	<b>ELISA</b>				<b>Citometria de Fluxo</b>			
	<b>Cut off</b>	<b>S<sub>e</sub></b>	<b>E<sub>s</sub></b>	<b>RV</b>	<b>Cut off</b>	<b>S<sub>e</sub></b>	<b>E<sub>s</sub></b>	<b>RV</b>
<b>IgA</b>	0,25	63,01	78,57	4,4	16,04	83,56	78,57	4,8
<b>IgM</b>	*	*	*	*	3,8	63,89	57,14	2,21
<b>IgE</b>	0,2	54,8	69,3	1,92	2,115	54,14	50,00	1,9
<b>IgG Total</b>	0,2	95,8	92,8	14,4	18,4	91,4	100	**
<b>IgG<sub>1</sub></b>	0,4	89,04	85,7	7,2	4,6	90,28	100	**
<b>IgG<sub>2</sub></b>	*	*	*	*	28	83,56	92,86	12,8
<b>IgG<sub>3</sub></b>	0,38	57,53	78,57	3,97	36,5	89,04	85,71	7,2
<b>IgG<sub>4</sub></b>	0,18	78,08	35,71	2,09	1,4	75,76	69,23	2,89

Sensibilidade (S<sub>e</sub>), Especificidade (E<sub>s</sub>) e Razão de Verossimilhança (RV). \* Testes não realizados. \*\* Não é possível calcular RV em teste cuja E<sub>s</sub> é igual a 100.



**Figura 17:** Curvas ROC aplicadas aos testes ELISA. Curva ROC para IgA (A), IgE (B), IgG total (C), IgG<sub>1</sub> (D), gG<sub>3</sub> (E), IgG<sub>4</sub> (F).

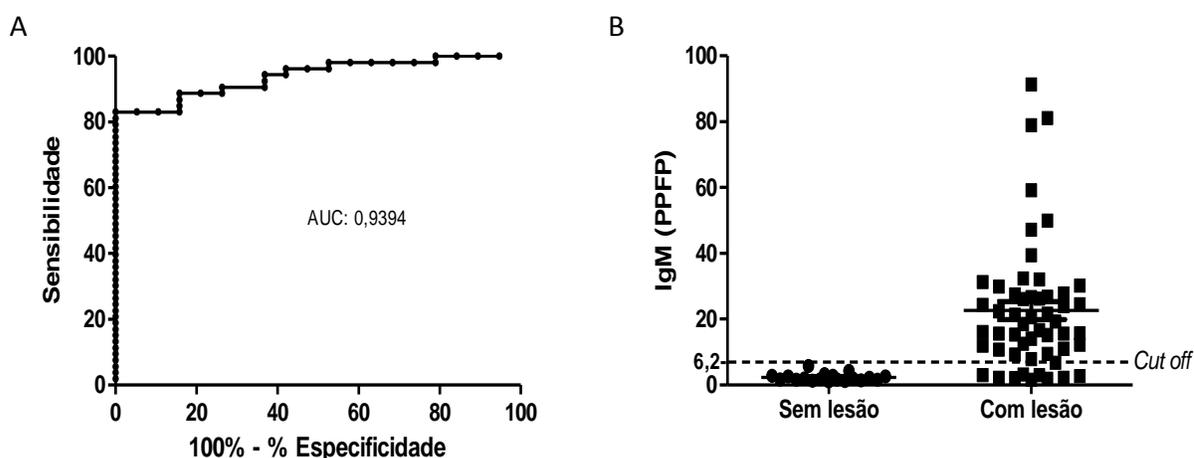


**Figura 18:** Curvas ROC aplicadas aos testes de Citometria de fluxo. Curva ROC para IgA (A), IgE (B), IgM (C), IgG total (D), IgG<sub>1</sub> (E), IgG<sub>2</sub> (F), IgG<sub>3</sub> (G), IgG<sub>4</sub> (H).

#### 5.4 - Construção de curva ROC e estabelecimento de ponto de corte para os testes de IgM e IgG total por citometria de fluxo e IgG<sub>3</sub> por ELISA.

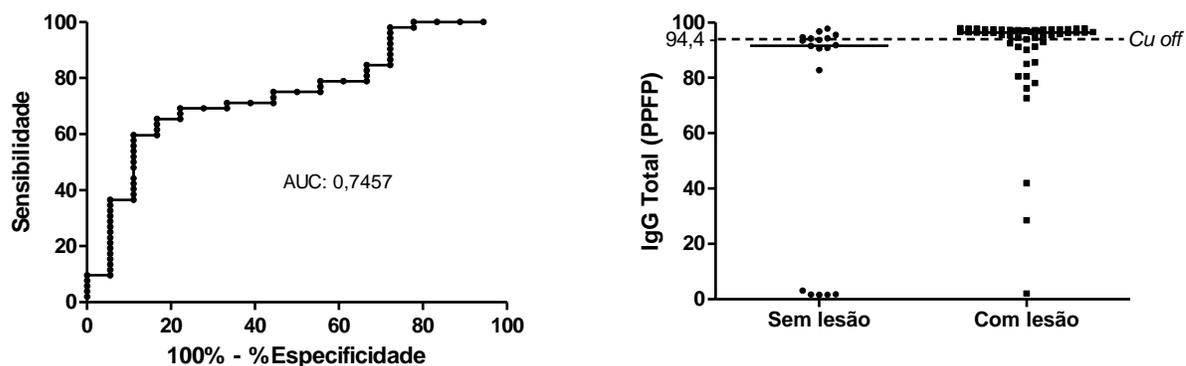
Três testes, IgM e IgG total por citometria de fluxo e IgG<sub>3</sub> por ELISA, apresentaram diferenças significativas entre os níveis de anticorpos anti-*T. gondii* observados em pacientes soropositivos portadores de lesão ocular e soropositivos sem lesão ocular. Com a finalidade de investigar a possibilidade de utilização destas classes e sub-classe de imunoglobulinas como marcadores para a presença ou ausência de toxoplasmose ocular foram construídas curvas ROC e estabelecidos pontos de corte para que fossem avaliadas a sensibilidade e especificidade de cada teste. Tais curvas foram construídas utilizando apenas os dados de pacientes soropositivos portadores ou não de lesão ocular.

A curva ROC construída com os resultados obtidos para IgM por meio de Citometria de fluxo Apresentou AUC igual a 0,9394. Com base nessa curva foi estabelecido em ponto de corte (*cut off*) capaz de discriminar pacientes acometidos por lesão ocular ou não (figura 19a). O ponto de corte foi estabelecido em 6,2, valor em PFP (figura 19b). Para este ponto de corte o teste apresentou sensibilidade igual a 83% e especificidade igual a 100%. Estes dados demonstram a importância de IgM como marcador para toxoplasmose ocular em pacientes que apresentam toxoplasmose em fase crônica.



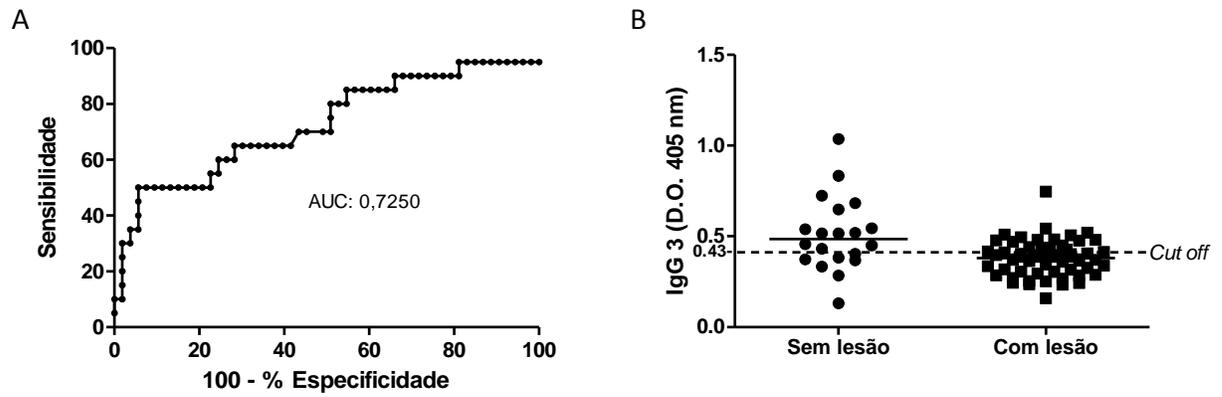
**Figura 19:** Avaliação de IgM como marcador para uveítes toxoplásmicas. (A) Curva ROC aplicada aos níveis séricos de IgM de pacientes soropositivos para toxoplasmoses portadores e não portadores de lesão ocular. (B) Estabelecimento de cut off para discriminar entre pacientes portadores ou não de lesão ocular.

Para os resultados obtidos na avaliação de IgG total por citometria de fluxo a curva ROC obtida apresentou AUC igual a 0,7457 (figura 20a). Foi estabelecido um ponto de corte em 94,4 (valor em PFP). Para este ponto de corte o teste apresenta uma sensibilidade igual a 69,23% e uma especificidade igual a 77,78 (figura 20b).



**Figura 20:** Avaliação de IgG Total como marcador para uveítes toxoplásmicas. (A) Curva ROC aplicada aos níveis séricos de IgG total de pacientes soropositivos para toxoplasmose portadores e não portadores de lesão ocular. (B) Estabelecimento de cut off para discriminar entre pacientes portadores ou não de lesão ocular.

IgG<sub>3</sub> foi avaliado como marcador para a ausência de lesão ocular. Para isso foi construída uma curva ROC com os resultados obtidos por ELISA. Tal curva apresentou AUC igual a 0,7250 (figura 21a). Com base na curva obtida foi estabelecido um ponto de corte em 0,43 (valor em D.O.). Para este ponto de corte o teste apresenta especificidade igual a 71,7% e sensibilidade igual a 65% (figura 21b). Tanto IgG<sub>3</sub> por ELISA, quanto IgG total por citometria de fluxo apresentaram AUC, sensibilidade e especificidade baixas quando comparadas àquela apresentada por IgM. Demonstrando mais uma vez a importância de IgM como marcador para toxoplasmose ocular.



**Figura 21:** Avaliação de IgG<sub>3</sub> como marcador para uveítes toxoplásmicas. (A) Curva ROC aplicada aos níveis séricos de IgG<sub>3</sub> de pacientes soropositivos para toxoplasmoses portadores e não portadores de lesão ocular. (B) Estabelecimento de cut off para discriminar entre pacientes portadores ou não de lesão ocular.

## VI - Discussão

Em Campos dos Goytacazes a prevalência da toxoplasmose varia de acordo com a condição sócio-econômica da população, sendo de 23, 62 e 84%, nas populações de baixo, médio e alto poder aquisitivo (Bahia-Oliveira, et al., 2003). Nesta mesma população a prevalência geral da toxoplasmose ocular dentre o total dos indivíduos soropositivos, variou de 8 a 14% (Bahia-Oliveira et al., 2001). A alta prevalência sorológica da toxoplasmose em Campos dos Goytacazes é similar àquela descrita em Erechim-RS (Glasner et al., 1992), mas parece ser de menor impacto no que diz respeito às formas oculares da infecção uma vez que em Erechim estima-se que de 17,7% da população apresente lesões compatíveis com aquelas provocadas pela infecção toxoplásmica.

Uveítes toxoplásmicas correspondem a aproximadamente 80% das uveítes posteriores na população brasileira (Melamed, 2009). Porém, a incerteza no diagnóstico de lesões que não são tão características é uma realidade tanto em estudos epidemiológicos quanto na prática clínica. Acreditamos que a caracterização do perfil sorológico de indivíduos portadores de toxoplasmose ocular e a possível associação de tal perfil à características clínicas específicas podem auxiliar no diagnóstico de toxoplasmose ocular, o que será um ganho tanto do ponto de vista de manejo clínico-terapêutico quanto do ponto de vista epidemiológico para dimensionar o impacto da infecção em determinadas áreas.

Considerando que estamos apresentando resultados referentes a uma nova metodologia (citometria de fluxo) para o estudo do perfil sorológico de pacientes portadores de toxoplasmose ocular, discutiremos em separado os resultados encontrados nesse trabalho conforme se segue: 1- Sobre as suas potencialidades enquanto ferramenta para auxiliar na discriminação dos diferentes grupos clínicos aqui apresentados; 2- Sobre o seu possível significado no contexto da resposta imune específica contra o *T. gondii* em cada grupo clínico considerado nesse estudo.

O diagnóstico de certeza para toxoplasmose é motivo de constantes pesquisas. Tal fato é evidenciado no contexto da toxoplasmose congênita, onde a cinética de produção de imunoglobulinas é utilizada para identificar infecções recentes ou não em mulheres grávidas (Montoya, 2002). Assim, a busca por novas ferramentas que visem avaliar a produção de anticorpos em pacientes com toxoplasmose pode ser de grande utilidade. O uso de citometria de fluxo tem apontado resultados promissores no diagnóstico diferencial de doença de Chagas e Leishmaniose (Cordeiro, et al., 2001, Lemos, et al., 2007, Pissinate, et al., 2008).

Porém, de acordo com revisão de literatura, não há registros de trabalhos que utilizem a citometria de fluxo para o diagnóstico de toxoplasmose.

Testes baseados na técnica de ELISA e suas variações são os mais comumente utilizados na rotina de diagnóstico de toxoplasmose (Montoya, 2002). No presente estudo investigamos a utilização da citometria para diagnóstico de toxoplasmose. Pudemos concluir que neste trabalho, esta ferramenta apresentou melhor desempenho no estudo da maioria das classes e sub-classes de anticorpos aqui estudadas, quando comparado ao teste de ELISA.

Recorremos ao emprego de Curvas ROC para interpretar o desempenho geral do teste de Citometria de Fluxo. Para que sejam comparadas é necessário reduzir as Curvas ROC a valores escalares. O método mais utilizado para tal redução é o cálculo da área embaixo da curva - AUC (de *Area Under the Curve*) (Begg, 1991). Um teste cuja curva se aproxime do canto superior esquerdo do gráfico apresenta AUC próxima a 1. Tal teste possui alta sensibilidade ( $S_e$ ) e alta especificidade ( $E_s$ ), sendo capaz de distinguir entre indivíduos positivos e negativos. Um teste que apresente AUC igual a 0,5 é totalmente incapaz de distinguir indivíduos positivos e negativos (Martinez et al, 2003). Ao observarmos as curvas ROC geradas para todos os testes realizados foi possível notar que a utilização de citometria de fluxo gerou testes com AUC mais elevados que os testes de ELISA, exceto para IgG total e IgE, demonstrando que de modo geral a citometria de fluxo possui um poder discriminatório maior que o método de ELISA empregado nesse estudo.

Outra forma de avaliar testes diagnósticos é por meio da investigação de  $S_e$  e  $E_s$  de cada teste. A sensibilidade é definida como a porcentagem de indivíduos positivos que serão indicados como positivos pelo teste; e especificidade é definida como a porcentagem de indivíduos negativos que serão indicados como negativos pelo teste. Para que seja estabelecido um valor de sensibilidade e especificidade é necessário estabelecer um ponto de corte (*cut off*), que irá discriminar entre indivíduos positivos e negativos. Geralmente são escolhidos pontos de corte onde a  $S_e$  e  $E_s$  são altos. Porém, quando isto não é possível a escolha do ponto de corte estará relacionada à finalidade do teste. No entanto em alguns casos onde a falta de diagnóstico pode trazer prejuízos muito graves para o paciente, como no diagnóstico de câncer a  $S_e$  é privilegiada. A  $E_s$  geralmente é privilegiada em casos onde o tratamento de indivíduos não doentes pode trazer conseqüências mais graves que os sintomas da doença (Martinez et al., 2003). Em nosso estudo o *cut off* foi

escolhido com base em pontos onde a sensibilidade e a especificidade eram altos, não privilegiando nenhuma destas variáveis. De forma semelhante ao resultado encontrado para AUC, a maioria dos testes por citometria de fluxo, exceto IgE, apresentaram maiores  $S_e$  e  $E_s$ , IgG total, que apresentou uma AUC um pouco maior por meio de ELISA, por citometria de fluxo apresentou uma  $E_s$  igual a 100 e uma alta  $S_e$  (91,4).

Como forma adicional de verificar a atuação de cada teste foi calculada a razão de verossimilhança (RV). Esse teste mostra quantas vezes é mais provável que um indivíduo positivo seja indicado como positivo em comparação com um indivíduo negativo. Por este parâmetro também foi possível observar um melhor desempenho entre os testes realizados por citometria de fluxo, onde novamente IgE foi exceção. É importante notar que para IgG total e IgG 1, que apresentaram  $S_e$  igual a 100, não é possível calcular RV, isto por que em testes específicos não há chance de indivíduos negativos serem diagnosticados como positivos.

A avaliação do desempenho dos testes, tanto por citometria de fluxo, quanto por ELISA, para as imunoglobulinas A, M e E, principalmente, pode não ter sido a ideal. Isso porque, nesse estudo foi considerado como padrão o Kit Toxonostika II, da BioMerieux, que avalia a presença de IgG<sub>2</sub>. No entanto, a avaliação comparativa permanece válida, visto que o mesmo grupo de pacientes foi utilizado, assim a detecção ou não de cada classe de imunoglobulina dependeu do próprio desempenho do teste, não sendo influenciada por uma variação intrínseca das amostras.

As análises pelo método ELISA para os diferentes isotipos foram padronizados utilizando-se como antígeno as proteínas solúveis do extrato protéico de taquizoítas (STAg). Para obtenção do extrato protéico, formas taquizoítas são lisadas e os antígenos obtidos ao final do processo são derivados de proteínas tanto intra quanto extracelulares. Por outro lado a citometria de fluxo utiliza formas taquizoítas fixadas. Embora no processo de fixação algumas proteínas intracelulares possam ser incorporadas à membrana, majoritariamente os antígenos que serão reconhecidos pelos isotipos por essa técnica são proteínas típicas da superfície celular. Assim, os alvos para reconhecimento por isotipos são diferentes para as duas técnicas.

Um dos principais alvos para a produção de anticorpos durante as fases aguda e crônica da infecção em seres humanos é a proteína conhecida como p30 (por possuir peso molecular entre 25 e 32 Kda) ou SAG1 (*Surface Antigen -1*). SAG1

é uma das cinco proteínas de superfície de membrana ancoradas na camada lipídica - glicofosfatidilinositol (GPI) (Mineo et al, 1980, Handman e Remington, 1980). É importante notar que essa proteína está presente também em STAg, sendo alvo para reconhecimento em ambas metodologias utilizadas no presente trabalho.

Os níveis de IgA dos indivíduos participantes do estudo foram testados pelo Kit Platelia Toxo IgA, BioRad. Este Kit foi desenvolvido para a identificação de pacientes em fase aguda. No entanto os resultados não foram compatíveis com os obtidos no ELISA padronizado para este estudo (dados não mostrados). É notável que o ELISA “*in house*”, bem como o teste para IgA por citometria de fluxo foram mais sensíveis que o Kit comercial para detecção de IgA.

Há, portanto, indicação que a avaliação dos níveis de anticorpos presentes no soro por meio de citometria de fluxo possa se tornar uma ferramenta importante no diagnóstico diferencial de toxoplasmose, especialmente nos casos onde os níveis de IgA e IgM são requeridos, como no diagnóstico de gestantes, bem como no uso de IgM para toxoplasmose ocular, como foi indicado neste trabalho.

Todos os indivíduos soropositivos participantes deste estudo apresentavam toxoplasmose na fase crônica. Essa fase é tradicionalmente caracterizada pela presença de IgG específico e ausência de IgM, IgA e IgE (Suzuki, et al., 2001). Pode-se observar, tanto por ELISA quanto por citometria de fluxo, que estas quatro classes de anticorpos foram encontradas em pacientes com toxoplasmose em fase crônica, corroborando com outros trabalhos, onde também foram identificados IgA, IgE e IgM em pacientes na fase crônica da toxoplasmose (Revisado por Montoya, 2002). No entanto não há registros de trabalhos que associem a presença ou ausência de isotipos específicos com uveítes toxoplásmicas.

A IgM é frequentemente associada a fase aguda da toxoplasmose, entretanto, muitos autores reportaram a presença desta imunoglobulina em pacientes crônicos (Ades et.al, 1991; Bertozzi, et al., 1999; Bobic, et al., 1991), e a relacionam ao desenvolvimetro de linfadenopatia (Del Bono et al, 1989) e toxoplasmose ocular ativa (Gomez-Marin, et al., 2000). No entanto, não há registro de associação entre a presença de IgM e a presença de cicatrizes retinianas causadas por toxoplasmose ocular. No presente estudo os níveis de IgM foram investigados apenas pela técnica de citometria de fluxo. Foi observado que em pacientes que não apresentaram lesão ocular, não foi detectada a presença de níveis elevados de IgM anti-*T. gondii*. Em contrapartida, a presença de IgM específica contra o parasita foi frequente entre pacientes portadores de lesões oculares. A partir destas observações IgM foi

indicada como potencial marcador para toxoplasmose ocular em indivíduos com toxoplasmose crônica. Para embasar esta hipótese foi contruída uma curva ROC e estabelecido um ponto de corte. Com especificidade igual a 100% e sensibilidade igual a 83% a utilização destas ferramentas mostrou que indivíduos com PFP igual ou superior a 6,2 apresentam lesões oculares. Tais dados apontam IgM como marcador, podendo se tornar importante ferramenta auxiliar no diagnóstico de toxoplasmose ocular.

O papel de IgM como molécula efetora do sistema imune no contexto das uveítes toxoplásmicas permanece não estabelecido. A IgM é considerada potente ativadora da via clássica do sistema complemento, protomotora de inflamação (Henry and Jerne, 1968, Kaneko, et al., 2004) e potencializadora da resposta mediada por anticorpos (Heyman, et al., 1988). Como a presença de IgM pode ser detectada no ambiente intraocular (Garweg, et al., 2004, Klaren, et al., 1998), esta imunoglobulina poderia ser um fator potencializador da resposta imune local, contribuindo para o aparecimento do dano tecidual. Sua presença em vigência de toxoplasmose sabidamente crônica pode vir a ser um marcador importante de doença ocular.

Outra classe de imunoglobulina produzida em maiores níveis por pacientes portadores de lesões oculares, quando comparados a pacientes soropositivos sem lesão ocular, foi IgG total. As imunoglobulinas G são os mais importantes componentes da imunidade mediada por anticorpos no soro, correspondendo por cerca de 75% dos anticorpos presentes nesse compartimento (Bradley, 1974). Digno de nota é que a detecção de IgG total pode representar o que seria o somatório das quatro sub-classes de imunoglobulinas G, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>, as quais possuem atividades biológicas distintas.

IgG<sub>1</sub> corresponde a até 70% das imunoglobulinas G (Bradley, 1974). Pacientes com lesões oculares apresentaram tendência a produzir níveis de IgG<sub>1</sub> mais elevados quando comparados a indivíduos sem lesões oculares, de forma semelhante ao perfil observado para IgG total. Esta tendência foi observada de forma acentuada por citometria de fluxo, e de forma mais discreta por ELISA. A ativação de IgG<sub>1</sub> está relacionada à presença de IL-2 e IFN- $\gamma$ , e a manutenção de sua produção é estimulada por IL-10 (Esser, 1990). Essa subclasse de imunoglobulina é geralmente a primeira IgG a ser produzida, visto que IL-2 é uma das primeiras citocinas produzidas em resposta à infecção por agentes patogênicos, e ainda possui grande capacidade de estimular a produção das demais classes de

imunoglobulinas e a ativação de células T CD4<sup>+</sup> (Hjelm et al., 2006). Níveis elevados de IgG1 foram relacionados à casos mais graves de hanseníase e tuberculose (Hussian *et al.*, 1995, Sousa et al., 1998), doença de Lyme (Widhe, et al., 1998) e Leishmaniose (Rodriguez, et al., 1996).

Em humanos existem indícios de que, ao menos em parte, a presença de lesões oculares pode ser devida a resposta inflamatória local (Brezin et al., 200) e a participação de anticorpos nesse contexto foi demonstrada em camundongos experimentalmente infectados por *T. gondii* (Lu et al., 2004). Anticorpos com função opsonizante e de fixação de complemento, como IgG<sub>1</sub> e IgM, podem estar ligados a inflamação exacerbada por promoverem a produção de anafilotoxinas, TNF- $\alpha$  e NO<sup>-</sup> (Correa et al., 2007).

Outra possível causa de dano tecidual é a presença de autoanticorpos contra antígenos retinianos. É sabido que soros de pacientes que desenvolveram toxoplasmose ocular podem apresentar anticorpos com atividade contra o tecido retiniano humano, sendo que os níveis de anticorpos antifotoreceptores são significativamente mais altos nestes indivíduos. Não foi demonstrado, no entanto, quais classes de anticorpos estão envolvidas nesse processo (Whittle, et al., 1998). Especula-se que IgM possa estar envolvida nesse processo já que a detecção de altos níveis desta imunoglobulina foi relatada no contexto de reações cruzadas ou na presença de auto-antígenos (Correa, et al., 2007).

Por compartilharem mecanismos de ação e dependerem das mesmas citocinas para ativação e manutenção, de um modo geral são atribuídos a IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> o mesmo papel na resposta imune e muitas vezes assume-se que tais imunoglobulinas atuem de modo sinérgico. Essa sinergia foi observada, por exemplo, em pacientes portadores de hanseníase (Hussian *et al.*, 1995), tuberculose (Sousa et al., 1998), e em resposta a *Pseudomonas* (Lagace *et al.*, 1995). Naqueles casos, os níveis elevados daquelas imunoglobulinas foram associados às formas mais graves da doença. No entanto, no contexto da toxoplasmose ocular estudada nesse trabalho, observou-se que estas imunoglobulinas possuem atividades distintas. Enquanto pacientes portadores de lesões oculares produziram níveis elevados de IgG<sub>1</sub>, pacientes que não apresentam lesões oculares apresentaram níveis mais elevados de IgG<sub>3</sub>. Assim, contrariando dados referentes à outras patologias, pôde-se perceber que a presença de IgG<sub>3</sub> pode estar relacionada à proteção contra a presença de lesões oculares. Tal observação vai de encontro ao

estudo realizado na população de Erechim-RS, onde a presença de níveis elevados de IgG<sub>3</sub> foi relacionada com pacientes com toxoplasmose ocular (Tsukuda, 2007).

Níveis elevados de IgG<sub>3</sub> foram observados em indivíduos portadores de lesão tipo A quando comparados a pacientes com lesão C. Lesões tipo A são as mais severas, freqüentemente associadas à toxoplasmose congênita e geralmente estão associadas a outros tipos de lesões (lesões múltiplas). Dentre os 53 indivíduos portadores de lesão ocular analisados, 13 possuíam lesões múltiplas que incluíam o tipo A, 4 com lesões AB, 7 com lesões ABC e dois com lesões AC e apenas quatro apresentavam exclusivamente essa forma de lesão. Essas observações podem corroborar o papel protetor de IgG<sub>3</sub>, visto que os pacientes portadores de lesões A apenas podem ter desenvolvido lesão ocular em decorrência de toxoplasmose congênita e os níveis elevados de IgG<sub>3</sub> poderiam ter contribuído para o não aparecimento de novas lesões.

Outras classes de imunoglobulinas parecem estar implicadas de forma mais discreta no contexto da toxoplasmose ocular, como a IgA, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub>. IgA é normalmente associada à fase aguda da doença (Decoster, et al., 1988, Foudrinier, et al., 1995, Gross, et al., 1992, Hajeer, et al., 1994). Entretanto, os dados aqui apresentados, tanto por meio de ELISA, quanto por Citometria de fluxo, corroboram os achados de outros autores (Gorgievski-Hrisoho et al, 1996, (Gomez-Marin, et al., 2000), mostrando que IgA pode ser encontrada em grande parte dos pacientes na fase crônica da doença. É interessante notar que quando os pacientes são agrupados de acordo com o tipo de lesão, IgA pode estar associada tanto à presença de lesões tipo C (que são as lesões mais brandas) quanto à ausência de lesões. Essa tendência foi observada tanto por ELISA quanto por Citometria de fluxo. A produção de IgA está diretamente relacionada com a presença de TGF- $\beta$  e IL-10 (Defrance, et al., 1992), enquanto a resistência ao aparecimento de lesões oculares é normalmente associada a produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 (Vallochi, et al., 2002). No entanto, para o mesmo grupo de indivíduos analisados neste trabalho, níveis elevados de IFN- $\gamma$  estavam relacionados à presença de lesões oculares (Peixoto-Rangel, 2008). Assim, a presença de níveis elevados de IgA entre indivíduos sem lesões oculares e portadores de lesão tipo C poderia estar relacionada aos possíveis menores níveis de IFN- $\gamma$  presentes no soro desses indivíduos.

A produção de IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> está associada à presença de citocinas do perfil Th2, no entanto, essas imunoglobulinas atuam de forma diversa na resposta imune

(Correa et al., 2007). A produção de IgG<sub>2</sub> é estimulada por IL-2 e sua manutenção está diretamente relacionada à IL-6. (Stavnezer, 1996). Observou-se que há tendência discreta à maior produção de IgG<sub>2</sub> entre pacientes portadores de lesão ocular. IgG<sub>4</sub>, por sua vez, é estimulada por IL-4 e IL-13, e a sua manutenção se dá pela presença de IL-6 e IL-13 (Stavnezer, 1996) e exposição crônica ao antígeno (Aalberse et al., 1983). Pode-se observar que os níveis de IgG<sub>4</sub> foram muito menores quando comparados as demais subclasses de IgG. Ainda assim, foi observada tendência à maior produção de IgG<sub>4</sub> por pacientes que não apresentaram lesão ocular. Quando pacientes foram agrupados de acordo com a classificação das lesões oculares observou-se que não há relação entre o tipo de lesão apresentada e a presença de IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub>. Assim, o envolvimento de tais sub-classes de imunoglobulinas no desenvolvimento da toxoplasmose ocular permanece indefinido.

Imunoglobulinas E também são relacionadas ao perfil Th2 da resposta imunológica. Sua produção é estimulada por IL-4 e IL-13 e são capazes de ativar vias patológicas e bloquear vias protetoras promovidas por resposta Th1 (Correa, et al., 2007). De fato, a presença de IgE em pacientes com toxoplasmose crônica vem sendo relacionada principalmente à toxoplasmose grave e linfadenopatia (Foudrinier, et al., 2003, Pinon, et al., 1990). No entanto, nesse trabalho observamos por meio de ensaios de citometria de fluxo a presença de IgE em pacientes com ou sem lesão ocular e ainda em indivíduos soronegativos. É notável que todos indivíduos positivos para IgE apresentam altos níveis dessa imunoglobulina. Os pacientes com lesões oculares e altos níveis de IgE apresentam lesões múltiplas ABC, lesões B e lesões C, o que dificultou nesse trabalho a correlação desta imunoglobulina com algum tipo específico de lesão ocular ou com a severidade das lesões.

Lesões tipo C são as mais freqüente entre os indivíduos participantes deste estudo: 19 indivíduos apresentavam unicamente lesão tipo C e outros 15 apresentavam lesões múltiplas que incluíam lesões tipo C, em um universo de 53 indivíduos, representando, no seu conjunto, 60,4% dos pacientes portadores de lesão. Os resultados deste trabalho e de outros que utilizaram o mesmo grupo de pacientes (Peixoto-Rangel, 2008 e Bastos-Boechat, 2008) indicam que pacientes com lesão tipo C apresentam padrão de resposta imune muito próximo àquele apresentado por pacientes soropositivos sem lesão ocular. Assim, a presença de lesões C, sejam elas únicas ou associadas à outros tipos de lesões, poderia

dificultar as análises a respeito da resposta imune no contexto da toxoplasmose ocular.

Quando analisados os tipos de lesões de forma individual não foi possível encontrar uma associação direta entre um tipo específico de lesão e uma classe de imunoglobulina, no entanto foi possível observar uma estreita relação entre a presença de lesão ocular e IgM. Observamos ainda que o grupo de pacientes soronegativos portadores de lesão (SNL) ocular possui perfil de anticorpos muito semelhante ao dos pacientes soronegativos sem lesões oculares, exceto para IgG total. Nesse caso o grupo SNL apresentou níveis significativamente menores de IgG quando comparado a SN. É notável que o grupo SNL apresentou nível de IgM significativamente mais elevado que pacientes soropositivos sem lesão ocular. Tal fato reforça o importante papel de IgM no contexto da toxoplasmose ocular, sugerindo esta classe de imunoglobulina como uma possível ferramenta de auxílio no diagnóstico de toxoplasmose ocular.

Em suma, nesse trabalho observou-se que o estudo do perfil de imunoglobulinas é importante na toxoplasmose ocular. Os resultados sugerem que os isotipos IgM e IgG<sub>1</sub> se relacionam ao desenvolvimento de patologia ocular, enquanto IgG<sub>3</sub> está associada à proteção contra o desenvolvimento de uveítes. Observou-se, ainda, que a avaliação dos níveis de anticorpos presentes no soro por meio de citometria de fluxo poderia se tornar uma ferramenta importante no diagnóstico diferencial de toxoplasmose, especialmente nos casos onde os níveis de IgA e IgM são requeridos, como no diagnóstico de gestantes. Esses resultados sugerem ainda que isotipos, especialmente IgM, podem se tornar importantes ferramentas no diagnóstico da toxoplasmose ocular detectada na fase crônica.

## **VII – Conclusões**

- Pacientes portadores de lesão ocular apresentaram níveis significativamente elevados de IgM e IgG total por meio de citometria de fluxo.
- Os níveis de IgM são significativamente maiores entre pacientes soronegativos com lesão ocular quando comparados a pacientes soropositivos sem lesão ocular.
- Níveis elevados de IgM na fase crônica da toxoplasmose pelo ensaio de Citometria de Fluxo, estão fortemente associados à presença de lesão ocular. Estabelecendo um ponto de corte em PFP igual a 6,2 pela utilização de curva ROC, a presença de IgM identifica indivíduos portadores de lesão ocular com sensibilidade igual a 83% e especificidade igual a 100%. Assim, destaca-se o importante papel de IgM como marcador para toxoplasmose ocular na fase crônica da infecção.
- Pacientes que não desenvolveram lesões oculares apresentaram níveis significativamente elevados de IgG<sub>3</sub> quando comparados a pacientes com lesões oculares, por meio de ELISA. Por citometria de fluxo, foi observada uma tendência à maior produção de IgG<sub>3</sub> por indivíduos do grupo PSL quando comparados à PL.
- Os níveis de IgG<sub>4</sub> são menores quando comparados a outras sub-classes de IgG. Ainda assim, pode-se observar uma tendência a níveis elevados dessa imunoglobulina entre pacientes PSL, quando comparados a pacientes PL.
- Alta produção de IgE foi observada nos grupos, PL, PSL e SN, mas não em indivíduos SNL.
- Testes realizados por citometria de fluxo, no geral, apresentaram maior especificidade e sensibilidade que testes realizados por ELISA, sugerindo que esta metodologia poderá se tornar importante, principalmente para o diagnóstico diferencial da toxoplasmose.

**VII – Referencias bibliográficas**

- AALBERSE, R. C., VAN DER GAAG, R. VAN LEEUWEN, J. Serological aspects of IgG<sub>4</sub> restricted response. *Journal of Immunology* **Vol.** 130, 722–726, 1983.
- ABBAS, A. K., LICHTTMAN, A. H. *Imunologia celular e molecular* . 5. ed. Rio de Janeiro, Ed. Elsevier, 2005.
- ABRAHAMS, I. W., GREGERSON, D. S. Longitudinal-Study of Serum Antibody-Responses to Bovine Retinal S-Antigen in Endogenous Granulomatous Uveitis, *British Journal of Ophthalmology* **Vol. 67, No. 10**, 681-684, 1983.
- AJZENBERG, D., BANULS, A. L. , SU, C. , DUMETRE, A., DEMAR, M., CARME, B., DARDE, D M. L.. Genetic Diversity, Clonality and Sexuality in *Toxoplasma gondii*, *International Journal for Parasitology* **Vol. 34, No. 10**, 1185-1196, 2004.
- AKIRA S., TAKEDA K., KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* **Vol. 2**, 675–680. 2001.
- AMBROISE-THOMAS, P. Emerging Parasite Zoonoses: The Role of Host-Parasite Relationship, *International Journal for Parasitology* **Vol. 30, No. 12-13**, 1361-1367, 2000.
- ARAUJO, F., SLIFER T., KIM, S. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not prevent acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. *Journal of Parasitology* **Vol. 83**, 521–522. 1997.
- BAHIA-OLIVEIRA L. M. G., WILKEN DE ABREU A. M., AZEVEDO-SILVA J. AND ORÉFICE F. Toxoplasmosis in southeastern Brazil an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. In: Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. E. Petersen, A. Pollak, and I. Reiter-Owona (Invited Review). *International Journal for Parasitology*. **Vol. 31**, 115 - 144, 2001.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., JONES, J. L. AZEVEDO-SILVA, J., ALVES, C. C. F. OREFICE, F., ADDISS, D. G. Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio De Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* **Vol. 9, No. 1**, 55-62, 2003.
- BANARES, A., JOVER J. A., FERNANDEZ-GUTIERREZ B., DELCASTILLO J. M. B., GARCIA J., VARGAS E., HERNANDEZ-GARCIA C. Patterns of uveitis as a guide in making rheumatologic and immunologic diagnoses. *Arthritis and Rheumatism*, **Vol. 40**, 358-370. 1997.

- BASTOS-BOECHAT, M. S. Perfil de Quimiocinas em Indivíduos Portadores de Lesão Ocular Decorrente da Infecção pelo *Toxoplasma gondii*. Tese de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Biologia do Reconhecer. Maio de 2008.
- BEGG, C. B. Advances in statistical methodology for diagnostic medicine in the 1980's. *Statistics in Medicine*, Vol. 10, No. 12, 1887-1895. 1991.
- BERTOZZI L. C., SUZUKI L. A., ROSSI C.L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibodies response to *Toxoplasma gondii*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **Vol.41**, 175-177, 1999.
- BLISS, S. K., ZHANG Y., DENKERS E. Y. Murine Neutrophil Stimulation by *Toxoplasma gondii* Antigen Drives High Level Production of IFN-Gamma-Independent IL-12, *Journal of Immunology* **Vol. 163**, **No. 4**, 2081-2088, 1999.
- BLOCHMICHEL, E., NUSSENBLATT, R. B. International Uveitis Study Group Recommendations for the evaluation of intraocular inflammatory disease. *American Journal of Ophthalmology*, **Vol.103**, 234-235. 1987.
- BOBIC, B., SIBALIC, D., DJURKOVIC-DJAKOVIC , O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. **Vol. 31**, 182–184, 1991.
- BRADLEY, J. Immunoglobulins, *Journal of Medical Genetics* **Vol. 11**, **No. 1**, 80-90, 1974.
- BREZIN, A. P., THULLIEZ P., COUVREUR J., NOBRE R., MCLEOD R., METS M. B. Ophthalmic Outcomes after Prenatal and Postnatal Treatment of Congenital Toxoplasmosis, *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 135**, **No. 6**, 779-784, 2003.
- CORDEIRO, F. D., MARTINS-FILHO O. A., ROCHA M. O. D., ADAD S. J., CORREA-OLIVEIRA R., ROMANHA A. J. Anti-*Trypanosoma cruzi* Immunoglobulin G1 Can Be a Useful Tool for Diagnosis and Prognosis of Human Chagas' Disease, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **Vol. 8**, **No. 1**, 112-118, 2001.
- CORREA, D., CANEDO-SOLARES I., ORTIZ-ALEGRIA L. B., CABALLERO-ORTEGA H., RICO-TORRES C. P. Congenital and Acquired Toxoplasmosis: Diversity and Role of Antibodies in Different Compartments of the Host, *Parasite Immunology* **Vol. 29**, **No. 12**, 651-660, 2007.

- DARDE, M. L., BOUTEILLE, B., PESTREALEXANDRE M.. Isoenzymic Characterization of 7 Strains of *Toxoplasma gondii* by Isoelectrofocusing in Polyacrylamide Gels, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **Vol. 39, No. 6**, 551-558, 1988.
- DAVIDSON, M. G., LAPPIN M. R., ENGLISH R. V., TOMPKINS M. B. A Feline Model of Ocular Toxoplasmosis, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **Vol. 34, No. 13**, 3653-3660, 1993.
- DAWSON, H. D., BESHAH E., NISHI S., SOLANO-AGUILAR G., MORIMOTO M., ZHAO A. P., MADDEN K. B., LEDBETTER T. K., DUBEY J. P., SHEA-DONOHUE T., LUNNEY J. K., URBAN J. F. Localized Multigene Expression Patterns Support an Evolving Th1/Th2-Like Paradigm in Response to Infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris Suum*, *Infection and Immunity* **Vol. 73, No. 2**, 1116-1128, 2005.
- De PAOLI P., BASAGLIA G., GENNARI D., CROVATTO M., MODOLO M. L., SANTINI G. Phenotypic profile and functional characteristics of human gamma and delta T cells during acute toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 30**, 729-73. 1992.
- DECOSTER A., SLIZEWICZ B., SIMON J., BAZIN C., DARCY C. F., VITTU G., BOULANGER C., CHAMPEAU Y., DEMORY J. L., DUHAMEL M., CAPRON A. Platelia-Toxo Iga, a New Kit for Early Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Detection of Anti-P-30 Immunoglobulin-a Antibodies, *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 29, No. 10**, 2291-2295, 1991.
- DECOSTER, A., CARON A., DARCY F., CAPRON A. Iga Antibodies against P-30 as Markers of Congenital and Acute Toxoplasmosis, *Lancet* **Vol. 2, No. 8620**, 1104-1107, 1988.
- DEFRANCE, T., VANBERVLIET B., BRIERE F., DURAND I., ROUSSET F., BANCHEREAU J. Interleukin-10 and Transforming Growth-Factor-Beta Cooperate to Induce Anti-Cd40 Activated Naive Human B-Cells to Secrete Immunoglobulin-A, *Journal of Experimental Medicine* **Vol. 175, No. 3**, 671-682, 1992.
- DEL BONO V., CANESSA A., BRUZZI P., FIORELLI M. A., TERRAGNA A. Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Journaul of Clinical Microbiology* **Vol. 27**, 2133–2135. 1989.

- DENKERS, E. Y., MARSHALL A. J. Neutrophils as a Source of Immunoregulatory Cytokines During Microbial Infection, *Immunologist* **Vol. 6, No. 3**, 116-120, 1998.
- DOBROWOLSKI, J. M., SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* **Vol. 84**, 933–939. 1996.
- DUBEY, J. P. Advances in the Life Cycle of *Toxoplasma Gondii*, *International Journal for Parasitology* **Vol. 28, No. 7**, 1019-1024, 1998.
- DUBEY, J. P., CHRISTIE, E., PAPPAS, P. W. Characterization of *Toxoplasma gondii* from Feces of Naturally Infected Cats, *Journal of Infectious Diseases* **Vol. 136, No. 3**, 432-435, 1977.
- DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma Gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts, *Clinical Microbiology Reviews* **Vol. 11, No. 2**, 267, 1998.
- DUBEY, J.P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *Journal for Parasitology* **Vol. 82**, 957-960. 1996.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D. S., SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 267-299, 1998.
- DUNN, D., WALLON, M., PEYRON, F., PETERSEN, E., PECKHAM, C., GILBERT, R. Mother-to-Child Transmission of Toxoplasmosis: Risk Estimates for Clinical Counselling, *Lancet* **Vol. 353, No. 9167**, 1829-1833, 1999.
- ESSER, C., RADBRUCH A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annual Review of Immunology* **Vol. 8**, 717–735. 1990.
- FARDEAU, C., ROMAND S., RAO N. A., CASSOUX N., BETTEMBOURG O., THULLIEZ P., LEHOANG P. Diagnosis of Toxoplasmic Retinochoroiditis with Atypical Clinical Features, *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 134, No. 2**, 196-203, 2002.
- FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, Homage to Nicolle, Manceaux and Splendore, *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **Vol. 104, No. 2**, 132-147, 2009.
- FILISSETTI D, CANDOLFI E. Immune Response to *Toxoplasma gondii*. *Istituto Superiore di Sanità*, **Vol. 40 No. 1**, 71-80, 2004.
- FOUDRINIER, F., MARXCHEMLA C., AUBERT D., BONHOMME A., PINON J. M. Value of Specific Immunoglobulin-A Detection by 2 Immunocapture Assays in

- the Diagnosis of Toxoplasmosis, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **Vol. 14, No. 7**, 585-590, 1995.
- FOUDRINIER, F., VILLENA I., JAUSSAUD R., AUBERT D., CHEMLA C., MARTINOT F., PINON J. M. Clinical Value of Specific Immunoglobulin E Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Cases of Acquired and Congenital Toxoplasmosis, *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 41, No. 4**, 1681-1686, 2003.
- FRENKEL, J. K. Patho-Physiology of Toxoplasmosis, *Parasitology Today* **Vol. 4, No. 10**, 273-278, 1988.
- FRENKEL, J. K. Patho-Physiology of Toxoplasmosis, *Parasitology Today* **Vol. 4, No. 10**, 273-278, 1988.
- GARWEG, J. G., BOEHNKE M. The Antibody Response in Experimental Ocular Toxoplasmosis, *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **Vol. 244, No. 12**, 1668-1679, 2006.
- GARWEG, J. G., GARWEG S. D. L., FLUECKIGER F., JACQUIER P., BOEHNKE M. Aqueous Humor and Serum Immunoblotting for Immunoglobulin Types G, A, M, and E in Cases of Human Ocular Toxoplasmosis, *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 42, No. 10**, 4593-4598, 2004.
- GARWEG, J. G., JACQUIER P., BOEHNKE M. Early Aqueous Humor Analysis in Patients with Human Ocular Toxoplasmosis, *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 38, No. 3**, 996-1001, 2000.
- GAZZINELLI R.T., WYSOCKA M., HIENY S., SCHARTON-KERSTEN T., CHEEVER A., KUHN R., MULLER W., TRINCHIERI G., SHER A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ . *Journal of Immunology* **Vol. 157**, 798-805, 1996.
- GILBERT R.E., STANFORD M.R. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Brazilian Journal of Ophthalmology* **Vol. 84**, 224-226. 2000.
- GILBERT, R. E., DUNN D. D. T., LIGHTMAN S., MURRAY P. I., PAVESIO C. E., GORMLEY P. D., MASTERS J., PARKER S. P., STANFORD, M. R. Incidence of Symptomatic Toxoplasma Eye Disease: Aetiology and Public Health Implications, *Epidemiology and Infection* **Vol. 123, No. 2**, 283-289, 1999.

- GLASNER, P. D., SILVEIRA C., KRUSZONMORAN D., MARTINS M. C., BURNIER M., SILVEIRA S., CAMARGO M. E., NUSSENBLATT R. B., KASLOW R. A., BELFORT R. An Unusually High Prevalence of Ocular Toxoplasmosis in Southern Brazil, *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 114, No. 2**, 136-144, 1992.
- GOMEZ-MARIN, J. E., MONTOYA-DE-LONDONO M. T., CASTANO-OSORIO J. C., HEINE F. A., DUQUE A. M., CHEMLA C., AUBERT D., BONHOMME A., PINON J. M. Frequency of Specific Anti-Toxoplasma Gondii IgM, IgMand IgE in Colombian Patients with Acute and Chronic Ocular Toxoplasmosis, *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **Vol. 95, No. 1**, 89-94, 2000.
- GORGIEVSKI-HRISOHO M., GERMANN D., MATTER L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii* . *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 34**: 1506–1511. 1996.
- GRIFFITH, T. S., BRUNNER T., FLETCHER S. M., GREEN D. R., FERGUSON T. A. Fas Ligand-Induced Apoptosis as a Mechanism of Immune Privilege, *Science* **Vol. 270, No. 5239**, 1189-1192, 1995.
- GRIGG, M. E., BOOTHROYD, J. C. Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the B1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*. **39**:398-400, 2001.
- GROSS, U., ROOS T., APPOLDT D., HEESEMANN J. Improved Serological Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection by Detection of Immunoglobulin-A (IgA) and Igm Antibodies against P-30 by Using the Immunoblot Technique, *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 30, No. 6**, 1436-1441, 1992.
- GUERINA, N. G., HSU, H. W., MEISSNER, H. C., MAGUIRE, J. H., LYNFIELD, R., STECHENBERG, B., ABROMS, I., PASTERNAK, M. S., HOFF, R., EATON, R. B., GRADY, G. F., CHEESEMAN, S. H., MCINTOSH, K., MEDEARIS, D. N., ROBB, R., WEIBLEN, B. J. Neonatal Serologic Screening and Early Treatment for Congenital *Toxoplasma gondii* Infection, *New England Journal of Medicine* **Vol. 330, No. 26**, 1858-1863, 1994.
- HAJEER, A. H., BALFOUR A. H., MOSTRATOS A., CROSSE B. *Toxoplasma gondii* - Detection of Antibodies in Human Saliva and Serum, *Parasite Immunology* **Vol. 16, No. 1**, 43-50, 1994.
- HARA T., OHASHI S., YAMASHITA Y., ABE T., HISAEDA H., HIMENO K., GOOD R. A., TAKESHITA K. Human V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-cell tolerance to foreign antigens of

- Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **Vol. 93**, 5136-5140. 1996.
- HAYDAY, A., THEODORIDIS, E., RAMSBURG E., SHIRES J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the third way in immunology. *Nature Immunology*, **Vol. 2**, 997-1003. 2001.
- HEGAB, S. M., AL-MUTAWA S. A. Immunopathogenesis of Toxoplasmosis, *Clinical and Experimental Medicine* **Vol. 3, No. 2**, 84-105, 2003.
- HENRY, C., JERNE N. K. Competition of 19s and 7s Antigen Receptors in Regulation of Primary Immune Response, *Journal of Experimental Medicine* **Vol. 128, No. 1**, 133-&, 1968.
- HERBORT, C. P. Classification et diagnostic différentiel des uvéites'. *Revue médicale de la Suisse romande*, **Vol. 116, No. 1**, 5-15, 1996.
- HEYMAN, B., PILSTROM L., SHULMAN M. J. Complement Activation Is Required for IgM-Mediated Enhancement of the Antibody-Response, *Journal of Experimental Medicine* **Vol. 167, No. 6**, 1999-2004, 1988.
- HILL, D., DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: Transmission, Diagnosis and Prevention, *Clinical Microbiology and Infection* **Vol. 8, No. 10**, 634-640, 2002.
- HISAEDA, H., NAGASAWA H., MAEDA K., MAEKAWA Y., ISHIKAWA H., ITO Y., GOOD R. A., HIMENO K. Gamma-Delta T-Cells Play an Important Role in Hsp65 Expression and in Acquiring Protective Immune-Responses against Infection with *Toxoplasma gondii*, *Journal of Immunology* **Vol. 155, No. 1**, 244-251, 1995.
- HITT, J. A., FILICE G. A. Detection of *Toxoplasma gondii* Parasitemia by Gene Amplification, Cell-Culture, and Mouse Inoculation, *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 30, No. 12**, 3181-3184, 1992.
- HJELM F., CARLSSON F., GETAHUN A., HEYMAN B. Antibody-mediated regulation of the immune response. *Scandinavian Journal of Immunology*. **Vol. 64**, 17, 2006.
- HOGAN, M. J., ZWEIGART P. A., LEWIS, A. Recovery of *Toxoplasma* from a Human Eye, *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 45, No. 1**, 115-115, 1958.
- HOHLFELD, P., DAFFOS F., COSTA J. M., THULLIEZ P., FORESTIER F., VIDAUD M. Prenatal-Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis with a Polymerase-Chain-Reaction Test on Amniotic-Fluid, *New England Journal of Medicine* **Vol. 331, No. 11**, 695-699, 1994.

- HOLLAND, G. N. Lx Edward Jackson Memorial Lecture - Ocular Toxoplasmosis: A Global Reassessment - Part II: Disease Manifestations and Management, *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 137, No. 1**, 1-17, 2004.
- HOWE, D. K., SIBLEY L. D. *Toxoplasma gondii* Comprises 3 Clonal Lineages - Correlation of Parasite Genotype with Human-Disease, *Journal of Infectious Diseases* **Vol. 172, No. 6**, 1561-1566, 1995.
- HUNTER, C. A., CANDOLFI E., SUBAUSTE C., VANCLEAVE V., REMINGTON J. S. Studies on the Role of Interleukin-12 in Acute Murine Toxoplasmosis, *Immunology* **Vol. 84, No. 1**, 16-20, 1995.
- HUNTER, C. A., SUBAUSTE C. S., REMINGTON J. S. The Role of Cytokines in Toxoplasmosis, *Biotherapy* **Vol. 7, No. 3-4**, 237-247, 1994.
- HUSBAND H. J., GOWAN J. G. The origin and antigen dependent distribution of Ig-A containing cells in the intestine. *Journal of Experimental Medicine*. **Vol. 148**, 1146. 1978.
- HUSSAIN R., KIFAYET A., CHIANG T.J. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. *Infection and Immunity* **Vol. 63**, 410–415, 1995.
- HUTCHISON, W.M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* **Vol. 206**, 962. 1965.
- JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lutea in eye of normal dimensions and in microphthalmic eye, with parasites in retina. *Casopis Lekarů Ceskych*. **Vol. 62**: 1021-1027, 1923.
- KANEKO, Y., TAKASHIMA Y., XUAUN X., IGARASHI I., NAGASAWA H., MIKAMI T., OTSUKA H. Natural IgM Antibodies in Sera from Various Animals but Not the Cat Kill *Toxoplasma gondii* by Activating the Classical Complement Pathway, *Parasitology* **Vol. 128**, 123-129, 2004.
- KARIM A., LUDLAM G. B. The relationship and significance of antibody titres as determined by various serological methods in glandular and ocular toxoplasmosis. *Journal of Clinical Pathology* **Vol. 28**:42–49. 1975.
- KARIM, K. A., LUDLAM G. B. Relationship and Significance of Antibody Titers as Determined by Various Serological Methods in Glandular and Ocular Toxoplasmosis, *Journal of Clinical Pathology* **Vol. 28, No. 1**, 42-49, 1975.
- KASPER, L. H., MATSUURA T., FONSEKA S., ARRUDA J., CHANNON J. Y., KHAN I. A. Induction of Gamma Delta T Cells During Acute Murine Infection with

- Toxoplasma gondii*, *Journal of Immunology* **Vol. 157**, **No. 12**, 5521-5527, 1996.
- KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P. *Parasitologia Médica*. 9. ed. São Paulo: Atheneu. p.174-187, 1995.
- KLAREN, V. N. A., VAN DOORNIK C. E. M., ONGKOSUWITO J. V., FERON E. J., KIJLSTRA A. Differences between Intraocular and Serum Antibody Responses in Patients with Ocular Toxoplasmosis, *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 126**, **No. 5**, 698-706, 1998.
- KNISELY, T. L., HOSOI J., NAZARENO R., GRANSTEIN R. D. The Presence of Biologically Significant Concentrations of Glucocorticoids but Little or No Cortisol Binding Globulin within Aqueous-Humor - Relevance to Immune Privilege in the Anterior-Chamber of the Eye, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **Vol. 35**, **No. 10**, 3711-3723, 1994.
- LABALETTE, P., DELHAES L., MARGARON F., FORTIER B., ROULAND J. F. Ocular Toxoplasmosis after the Fifth Decade, *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 133**, **No. 4**, 506-515, 2002.
- LAGACE J., PELOQUIN L., KERMANI P., MONTIE T. C. IgG subclass responses to *Pseudomonas aeruginosa* a- and b-type flagellins in patients with cystic fibrosis: a prospective study. *Journal of Medical Microbiology* **Vol. 43**, 270–276, 1995.
- LEMOS, E. M., GOMES I. T., CARVALHO S. F. G., ROCHA R. D. R., PISSINATE J. F., MARTINS O. A., DIETZE R. Detection of Anti-Leishmania (Leishmania) Chagasi Immunoglobulin G by Flow Cytometry for Cure Assessment Following Chemotherapeutic Treatment of American Visceral Leishmaniasis, *Clinical and Vaccine Immunology* **Vol. 14**, **No. 5**, 569-576, 2007.
- LIEKFELD, A., SCHWEIG F., JAECKEL C., WERNECKE K. D., HARTMANN C., Pleyer U. Intraocular Antibody Production in Intraocular Inflammation, *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **Vol. 238**, **No. 3**, 222-227, 2000.
- LOWRY O. H., ROSEMBROUGH J. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. Protein measurement with the fenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **Vol. 193**, 265-275, 1951.
- LU, F. L., HUANG S. G., KASPER L. H. Cd4(+) T Cells in the Pathogenesis of Murine Ocular Toxoplasmosis, *Infection and Immunity* **Vol. 72**, **No. 9**, 4966-4972, 2004.

- LUFT B.J., CONLEY F., REMINGTON J.S., LAVERDIERE M., LEVINE J.F., STRANDBERG D.A., WAGNER K. F., CRAVEN P. C., FILE T., TICE N., CARPENTIER F. M. Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in western Europe and North America. *New England Journal of Medicine* **Vol. 1**, 781-783. 1983.
- MARTINEZ, E. Z., LOUZADA-NETO, F., PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. *Caderno de Saúde Coletiva*, **Vol. 11, No. 1**, 7-31, 2003.
- MARTINS-FILHO, O. A., ELOI-SANTOS S. M., CARVALHO A. T., OLIVEIRA R. C., RASSI A., LUQUETTI A. O., RASSI G. G., BRENER Z. Double-Blind Study to Evaluate Flow Cytometry Analysis of Anti-Live Trypomastigote Antibodies for Monitoring Treatment Efficacy in Cases of Human Chagas Disease, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **Vol. 9, No. 5**, 1107-1113, 2002.
- MARTINS-FILHO, O. A., PEREIRA M. E. S., CARVALHO J. F., CANCADO J. R., BRENER Z. Flow-Cytometry, a New Approach to Detect Anti-Live Trypomastigote Antibodies and Monitor the Efficacy of Specific Treatment in Human Chagas-Disease, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **Vol. 2, No. 5**, 569-573, 1995.
- MCAULEY, J., BOYER, K. M., PATEL, D. , METS, M., SWISHER, C., ROIZEN, N., WOLTERS, C., STEIN, L., STEIN, M., SCHEY, W., REMINGTON, J., MEIER, P., JOHNSON, D., HEYDEMAN, P., HOLFELS, E., WITHERS, S., MACK, D., BROWN, C., PATTON, D., MCLEOD, R. Early and Longitudinal Evaluations of Treated Infants and Children and Untreated Historical Patients with Congenital Toxoplasmosis - the Chicago Collaborative Treatment Trial, *Clinical Infectious Diseases* **Vol. 18, No. 1**, 38-72, 1994.
- McLEOD R. AND REMINGTON J. S. *Toxoplasma gondii*. In *Tratado de Pediatria*, 2ªed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p: 779-786, 1994.
- MCLEOD, R., BOYER, K. M. , REMINGTON, J. S. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Mothers of Infants with Congenital Toxoplasmosis: Implications for Prenatal Management and Screening - Reply, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **Vol. 194, No. 2**, 590-590, 2006.
- MELAMED, J. Contributions to the history of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **Vol.104 No. 2**. p 358-363. 2009.
- METS M. B., HOLFELS E., BOYER K. M., SWISHER C. N., ROIZEN N., STEIN L., STEIN M., HOPKINS J., WITHERS S., MACK D., LUCIANO R., PATEL D.,

- REMYINGTON J. S., MEIER P., MCLEOD R. Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology* **Vol.122**, 309–324. 1996.
- MONTOYA, J. G. Laboratory Diagnosis of Toxoplasma Gondii Infection and Toxoplasmosis, *Journal of Infectious Diseases* **Vol. 185**, S73-S82, 2002.
- MONTOYA, J. G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *Lancet* **Vol. 363, No. 9425**, 1965-1976, 2004.
- MONTOYA, J. G., PARMLEY S., LIESENFELD O., JAFFE G. J., REMINGTON J. S. Use of the Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis, *Ophthalmology* **Vol. 106, No. 8**, 1554-1563, 1999.
- MOSMANN, T. R., CHERWINSKI H., BOND M. W., GIEDLIN M. A., COFFMAN R. L. 2 Types of Murine Helper T-Cell Clone .1. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins, *Journal of Immunology* **Vol. 136, No. 7**, 2348-2357, 1986.
- MUN, H. S., AOSAI, F., NOROSE, K., CHEN, M., PIAO, L. X., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., ISHIKURA, H., YANO, A. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *International Immunology* **Vol. 15**,1081-1087. 2003.
- NAGASAWA, H., MANABE T., MAEKAWA Y., OKA M., HIMENO K. Role of L3t4+ and Lyt-2+ T-Cell Subsets in Protective Immune-Responses of Mice against Infection with a Low or High Virulent-Strain of *Toxoplasma gondii*, *Microbiology and Immunology* **Vol. 35, No. 3**, 215-222, 1991.
- NGUYEN, T. D., BIGAIGNON G., VAN BROECK J., VERCAMMEN M., NGUYEN T. N., DELMEE M., TURNEER M., WOLF S. F., COUTELIER J. P. Acute and Chronic Phases of *Toxoplasma gondii* Infection in Mice Modulate the Host Immune Responses, *Infection and Immunity* **Vol. 66, No. 6**, 2991-2995, 1998.
- NICHOLSON, D. H., WOLCHOK, E. B. Ocular Toxoplasmosis in an Adult Receiving Long-Term Corticosteroid-Therapy' *Archives of Ophthalmology* **Vol. 94, No. 2**, 248-254, 1976.
- NICOLLE, M. C, MANCEAUX, L. On a new protozoan in gundis (*Toxoplasma* N. Gen). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **Vol.104 No. 2**. Supplementary file. 2009.
- NUSSENBLATT, R. B., MITTAL K. K., FUHRMAN S., SHARMA S. D., PALESTINE A. G. Lymphocyte Proliferative Responses of Patients with Ocular Toxoplasmosis to Parasite and Retinal Antigens, *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 107, No. 6**, 632-641, 1989.

- ORÉFICE, F., BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. Toxoplasmose. In: Oréfice F. editor. Uveíte Clínica e Cirúrgica – Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica 619-680, 2005.
- PAVESIO, C. E., LIGHTMAN, S. *Toxoplasma gondii* and Ocular Toxoplasmosis: Pathogenesis, *British Journal of Ophthalmology* **Vol. 80, No. 12**, 1099-1107, 1996.
- PEIXOTO-RANGEL, A. L. Investigação de fatores imunogenéticos associados à manifestação de retinocoroidites toxoplásmicas em área altamente endêmica para toxoplasmose. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Biologia do Reconhecer. Setembro de 2008.
- PENA, H. F. J., GENNARI, S. M. , DUBEY, J. P., SU, C. Population Structure and Mouse-Virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil, *International Journal for Parasitology* **Vol. 38, No. 5**, 561-569, 2008.
- PFEFFERKORN, E. R. Interferon gamma and the growth of *Toxoplasma gondii* in fibroblast. *Annales de l'Institute Pasteur Microbiologie*. **Vol. 137**, 348–352, 1986.
- PINON, J. M., TOUBAS D., MARX C., MOUGEOT G., BONNIN A., BONHOMME A., VILLAUME M., FOU DRINIER F., LEPAN H. Detection of Specific Immunoglobulin-E in Patients with Toxoplasmosis, *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 28, No. 8**, 1739-1743, 1990.
- PISSINATE, J. F., GOMES I. T., PERUHYPE-MAGALHAES V., DIETZE R., MARTINS O. A., LEMOS E. M. Upgrading the Flow-Cytometric Analysis of Anti-Leishmania Immunoglobulins for the Diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis, *Journal of Immunological Methods* **Vol. 336, No. 2**, 193-202, 2008.
- REIS E SOUSA C, HIENY S, SCHARTON-KERSTEN T, JANKOVIC D, CHAREST H, GERMAIN RN, SCHER A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *Journal of Experimental Medicine*. **Vol. 186**, 1819–1829, 1997.
- REMYNTOON, J.S, MCLEOD, R., THULLIEZ, P., DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In J. S. Remington, and J. O. Klein (ed.), *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 5rd ed. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa. 206-346, 2001.

- RISS, J. M., CARBONI M. E., FRANCK J. Y., MARY C. J., DUMON H., RIDINGS B. Ocular Toxoplasmosis: Demonstration of Intraocular Neoantibodies by Immunoblot, *Pathologie Biologie* **Vol. 43, No. 9**, 772-778, 1995.
- ROCHA, R. D. R., GONTIJO C. M. F., ELOI-SANTOS S. M., TEIXEIRA-CARVALHO A., CORREA-OLIVEIRA R., FERRARI T. C. A., MARQUES M. J., MAYRINK W., MARTINS O. A. Clinical Value of Anti-Live Leishmania (Viannia) Braziliensis Immunoglobulin G Subclasses, Detected by Flow Cytometry, for Diagnosing Active Localized Cutaneous Leishmaniasis, *Tropical Medicine & International Health* **Vol. 11, No. 2**, 156-166, 2006.
- RONDAY, M. J. H., ONGKOSUWITO J. V., ROTHOVA A., KIJLSTRA A. Intraocular Anti-*Toxoplasma gondii* IgA Antibody Production in Patients with Ocular Toxoplasmosis, *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 127, No. 3**, 294-300, 1999.
- ROTHOVA, A. Ocular manifestations of toxoplasmosis. *Current Opinion in Ophthalmology*. **Vol. 14**, 384-388, 2003.
- SABIN, A. B., FELDMAN H. A. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoa Parasite (*Toxoplasma*), *Science* **Vol. 108, No. 2815**, 660-663, 1948.
- SIBLEY, L. D., BOOTHROYD J. C.. Virulent-Strains of *Toxoplasma gondii* Comprise a Single Clonal Lineage, *Nature* **Vol. 359, No. 6390**, 82-85, 1992.
- SILVEIRA C., BELFORT JR. R., BURNIER JR M., NUSSENBLATT R. B. Acquired Toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 106**, 362-364. 1988.
- SMOLIN, G., THOFT, R. The cornea. Scientific Foundations and Clinical Practice. Ed. Little Brown, Boston, 307–309. 1994.
- SOUSA, A. O., S. HENRY, F. M. MAROJA, F. K. LEE, L. BRUM, M. SINGH, P. H. LAGRANGE, AND P. AUCOUTURIER. IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. *Clinical and Experimental Immunology* **Vol. 111**, 48-55. 1998.
- SPLENDRE, A. A new protozoan parasite of rabbit found in histological lesions similar to human Kala-Azar. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **Vol.104 No.2** . Supplementary file. 2009.
- SPLENDRE, A. On a new protozoan parasite of rabbits. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **Vol.104 No. 2**. Supplementary file. 2009b.

- STAVNEZER, J. Immunoglobulin class switching. *Current Opinion Immunology* **Vol. 8**, 199–205, 1996.
- STAVNEZER, J. Regulation of Antibody-Production and Class Switching by TGF-Beta, *Journal of Immunology* **Vol. 155, No. 4**, 1647-1651, 1995.
- STEPICK-BIEK P., THULLIEZ P., ARAUJO F. G., REMINGTON J. S. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. **Vol.162**, 270 – 273. 1990.
- STREILEIN, J. W. Immunoregulatory Mechanisms of the Eye, *Progress in Retinal and Eye Research* **Vol. 18, No. 3**, 357-370, 1999.
- STREILEIN, J. W., MASLI S., TAKEUCHI M., KEZUKA T. The Eye's View of Antigen Presentation, *Human Immunology* **Vol. 63, No. 6**, 435-443, 2002.
- SUBAUSTE, C. S., CHUNG J. Y., DO D., KONIARIS A. H., HUNTER C. A., MONTOYA J. G., PORCELLI S., REMINGTON J. S. Preferential Activation and Expansion of Human Peripheral-Blood Gamma-Delta T-Cells in Response to *Toxoplasma gondii* in Vitro and Their Cytokine Production and Cytotoxic Activity against *T. gondii*-Infected Cells, *Journal of Clinical Investigation* **Vol. 96, No. 1**, 610-619, 1995.
- SUZUKI, L. A., ROCHA R. J., ROSSI C. L. Evaluation of Serological Markers for the Immunodiagnosis of Acute Acquired Toxoplasmosis, *Journal of Medical Microbiology* **Vol. 50, No. 1**, 62-70, 2001.
- TENTER A. M., HECKEROTH A. R. AND WEISS L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* **Vol. 30**, 1217-1258, 2000.
- TIBAYRENC, M., F. KJELLBERG, ARNAUD, J., OURY, B., BRENIERE, S. F., DARDE, M. L. AYALA, F. J. Are Eukaryotic Microorganisms Clonal or Sexual - a Population-Genetics Vantage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **Vol. 88, No. 12**, 5129-5133, 1991.
- TRESELER, P. A., FOULKES G. N., SANFILIPPO F. The Expression of HLA Antigens by Cells in the Human Cornea, *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 98, No. 6**, 763-772, 1984.
- TURUNEN, H. J., LEINIKKI P. O., SAARI K. M. Demonstration of Intraocular Synthesis of Immunoglobulin-G Toxoplasma Antibodies for Specific Diagnosis of Toxoplasmic Chorioretinitis by Enzyme-Immunoassay, *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 17, No. 6**, 988-992, 1983.

- VALLOCHI, A. L., NAKAMURA M. V., SCHLESINGER D., MARTINS M. C., SILVEIRA C., BELFORT R., RIZZO L. V. Ocular Toxoplasmosis: More Than Just What Meets the Eye, *Scandinavian Journal of Immunology* **Vol. 55, No. 4**, 324-328, 2002.
- VILLENA, I., AUBERT D., BRODARD V., QUEREUX C., LEROUX B., DUPOUY D., REMY G., FOU DRINIER F., CHEMLA C., GOMEZ-MARIN J. E., PINON J. M. Detection of Specific Immunoglobulin E During Maternal, Fetal, and Congenital Toxoplasmosis, *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 37, No. 11**, 3487-3490, 1999.
- VITELLI-AVELAR, D. M., SATHLER-AVELAR R., WENDLING A. P. B., ROCHA R. D. R., TEIXEIRA-CARVALHO A., MARTINS N. E., DIAS J. C. P., RASSI A., LUQUETTI A. O., ELOI-SANTOS S. M., MARTINS-FILHO O. A. Non-Conventional Flow Cytometry Approaches to Detect Anti-*Trypanosoma cruzi* Immunoglobulin G in the Clinical Laboratory, *Journal of Immunological Methods* **Vol. 318, No. 1-2**, 102-112, 2007.
- VONLAUFEN N., KANZOK S.M., WEK R.C., SULLIVAN JR., W,J, Stress response pathways in protozoan parasites. *Cell Microbiology* **Vol.10**, 2387-2399. 2008.
- WANG, H. M., KAPLAN H. J., CHAN W. C., JOHNSON M. The Distribution and Ontogeny of Mhc Antigens in Murine Ocular Tissue, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **Vol. 28, No. 8**, 1383-1389, 1987.
- WEBB R. M., TABBARA K. F. AND O'CONNOR G. R. Retinal vasculitis in ocular toxoplasmosis in non human primates. *Retina* **Vol. 4**, 182-188, 1984.
- WEISS L.M., KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Biosciences* **Vol. 5**, 391-405, 2000.
- WHITTLE, R. M., WALLACE G. R., WHISTON R. A., DUMONDE D. C., STANFORD M. R. Human Antiretinal Antibodies in Toxoplasma Retinochoroiditis, *British Journal of Ophthalmology* **Vol. 82, No. 9**, 1017-1021, 1998.
- WHITTLE, R. M., WALLACE G. R., WHISTON R. A., DUMONDE D. C., STANFORD M. R. Human Antiretinal Antibodies in Toxoplasma Retinochoroiditis, *British Journal of Ophthalmology* **Vol. 82, No. 9**, 1017-1021, 1998.
- WONG B., GOLD J. W. M., BROWN A. E., LANGE M., FRIED R., GRIECO M., MILDVAN D., GIRON J., TAPPER M. L., LERNER C. W., ARMSTRONG D. Central-nervous-system Toxoplasmosis in homosexual men and parenteral drug abusers. *Annals of Internal Medicine* **Vol. 100**, 36-42. 1984.

- WONG, S. Y., HAJDU M. P., RAMIREZ R., THULLIEZ P., MCLEOD R., REMINGTON J. S. Role of Specific Immunoglobulin-E in Diagnosis of Acute Toxoplasma Infection and Toxoplasmosis, *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 31, No. 11**, 2952-2959, 1993.
- YANO, A., F. AOSAI, M. OHTA, H. HASEKURA, K. SUGANE, AND S. HAYASHI. Antigen presentation by *Toxoplasma gondii*-infected cells to CD4<sup>+</sup> proliferative T cells and CD8<sup>+</sup> cytotoxic cells. *Journal of Parasitology* **Vol. 75**, 411–416. 1989.
- YAROVINSKY, F. Toll-Like Receptors and Their Role in Host Resistance to *Toxoplasma gondii*, *Immunology Letters* **Vol. 119, No. 1-2**, 17-21, 2008.
- YONG, E. C., CHI E. Y., FRITSCHÉ T. R., HENDERSON W. R. Human Platelet-Mediated Cytotoxicity against Toxoplasma-Gondii - Role of Thromboxane, *Journal of Experimental Medicine* **Vol. 173, No. 1**, 65-78, 1991.

## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO *Livre e Esclarecido*

Convidamos você a participar ou permitir que o(a) menor :-----  
-----participe do estudo “Toxoplasmose ocular em Campos dos Goytacazes: investigação de fatores imunogenéticos e ambientais determinantes na manifestação de retinocoroidites toxoplásmicas”. Esse estudo é desenvolvido na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), e se destina a compreender os fatores que contribuem para que melhor possamos compreender a doença que pode se desenvolver nos olhos por causa da toxoplasmose. Informamos que a sua participação e/ou do(a) menor nesse estudo é voluntária e será através de doação de amostras de sangue venoso (no máximo trinta mililitros) e exames oftalmológicos (exame de vista para ver a retina). Os riscos e desconfortos possíveis de ocorrerem são pequena dor no momento da entrada da agulha com a possibilidade de formação de hematomas (manchas roxas), após a coleta do sangue. Todo o material de coleta de sangue é descartável. O colírio para o exame de vista causa, por um tempo, a sensação de visão turva (embaçada), mas que logo passa. A sua participação ou do(a) menor como voluntário (a) não trará nenhum benefício financeiro. Porém é vantajoso o fato de uma pessoa saber se tem ou não a toxoplasmose, pois ela poderá planejar, caso seja positiva, visitas freqüentes a oftalmologistas (oculistas) para o devido acompanhamento. Além disso, será importante para as mulheres, saberem antes da gravidez, se são positivas ou negativas para a toxoplasmose para contarem aos seus médicos a fim de receberem a orientação correta para prevenir a infecção do feto. Caso você aceite o convite de participar desse estudo como voluntário os seus dados não serão revelados a ninguém e a sua identidade será preservada. Somente a coordenadora do projeto, uma servidora técnica e uma aluna de doutorado terão acesso aos seus dados. Uma forma que utilizaremos para preservar sua identidade é o uso de códigos, ao invés de seu nome, durante todas as etapas do estudo.

É importante você saber que não deve esperar resultados imediatos ou pessoais a não ser o resultado do teste sorológico e do exame de vista. A qualquer momento você ou o(a) menor poderá se retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete em prejuízo à continuidade de seu acompanhamento médico como também a nenhum outro paciente de seu convívio ou membro de sua família.

Esclarecemos que a amostra de sangue fornecida para o projeto de pesquisa, será enviada ao exterior, onde parte das análises será feita e, posteriormente, armazenado ou eliminado, segundo sua autorização expressa no termo de consentimento para estocagem e uso futuro da amostra de sangue coletada. Garantimos que não haverá armazenamento de suas amostras de sangue e formação de banco de dados no exterior que posteriormente à análise será destruído. O armazenamento de amostras de sangue e, formação de banco de dados do material biológico serão feitos somente no Brasil por até no máximo 5 (cinco) anos. Finalmente, tendo você compreendido perfeitamente tudo o que lhe foi informado sobre a sua participação no estudo e, estando consciente dos seus direitos, das suas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a sua participação implicam, gostaríamos de saber se você aceita o convite de participar desse projeto, dando o seu consentimento sem que para isso você tenha sido forçado ou obrigado.

Qualquer dúvida dirigir-se ao Laboratório de Biologia do Reconhecer (UENF) ou aos pesquisadores envolvidos referidos abaixo:

Profa. Lílian Maria Garcia Bahia Oliveira

Telefone: (22)27261647 / 27625951

Doutoranda Alba Lucínia Peixoto Rangel

Telefone: (22)27261627 /

27261501

**ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:**

**Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ**

**Av. Brasil, - Manguinhos – Rio de Janeiro/RJ – CEP:**

**Telefone: (21)38829011**

**Campos dos Goytacazes, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_**

***Assinatura do voluntário ou responsável pelo(a) menor***

**Assinatura do pesquisador responsável**

**CONSENTIMENTO PARA ESTOCAGEM E USO FUTURO DE ESPÉCIMES  
COLETADAS COM AUTORIZAÇÃO DO CEP (COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA)<sup>1</sup>**

Caso o sangue que eu forneci (ou que o(a) menor-----forneceu com meu consentimento para o projeto de pesquisa intitulado: “Toxoplasmose ocular em Campos dos Goytacazes: investigação de fatores imunogenéticos e ambientais determinantes na manifestação de retinocoroidites toxoplásmicas”, não seja totalmente utilizado, eu autorizo que o restante seja:

- Eliminado.
- Destruído em até 5 anos após o início do estudo, sem que seja utilizado em pesquisas futuras, a não ser que eu forneça novamente meu consentimento.
- Armazenado por até 5 anos e possa ser usado em pesquisas futuras com o mesmo propósito do atual projeto de pesquisa
- Armazenado por até 5 anos e possa ser usado em pesquisas futuras de qualquer tipo.
- Armazenado por 5 anos somente com autorização do CEP, ou quando for o caso, da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), podendo haver renovação do tempo mediante solicitação da instituição depositária acompanhada de justificativa e relatório das atividades desenvolvidas com o material, como previsto por lei na Res. 347/2005 .

Quero que minha identidade seja:

- Removida do material restante.
- Mantida no material restante desde que minha identidade seja preservada

NOME DO PARTICIPANTE :

**P:**

**ID:**

ASSINATURA DO PARTICIPANTE

\_\_\_\_\_

NOME DO RESPONSÁVEL \_\_\_\_\_

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL \_\_\_\_\_

NOME DA TESTEMUNHA \_\_\_\_\_

ASSINATURA DA TESTEMUNHA \_\_\_\_\_

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

<sup>1</sup> Revisado de acordo com a res. 347/2005.

## ANEXO 2



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

## PARECER Nº 013/2007

**Registro CONEP: 13391** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE - não informado.

Processo nº 25000.164899/2006-12

Projeto de Pesquisa: *"Toxoplasmose ocular em campos dos Goytacazes: Investigação de fatores imunogenéticos e ambientais determinantes na manifestação de retinocoroidites toxoplásmicas"*.

Pesquisador Responsável: Dra. Lílian M. Garcia Bahia Oliveira

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Área Temática Especial: Cooperação estrangeira e Genética Humana

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 1103/2006, relativo ao projeto em questão, cabem as seguintes considerações:

1. Nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) contempla redação sob forma de convite e com linguagem mais acessível ao nível sócio-cultural dos sujeitos e informa dados do armazenamento de acordo com a Res. CNS 347/2005;
2. O orçamento detalhado foi apresentado com as fontes de fomento;
3. O cronograma apresentado é compatível com a proposta de atividades, todavia está apresentado em língua inglesa. Solicita-se sua tradução para o vernáculo (Res. CNS 196/96, VI) e apresentação ao CEP;
4. Solicita-se ao CEP anexar ao protocolo o número do CAAE.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa.

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 22 de janeiro de 2007.

Gyselle Saddi Tannous  
Coordenadora Interina da CONEP/CNS/MS

## ANEXO 3

**SOLUÇÕES****- Solução A para Adsorção com Proteína A**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4g
NaCl	8,8g
H <sub>2</sub> O	1000ml
pH	8

**- PBS 10x**

NaCl	85,0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	15,5g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	2,3g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml
pH	7,2 -7,4

**- Tampão Carbonato-Bicarbonato**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59g
NaHCO <sub>3</sub>	2,39g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml
pH	9,6

**- Solução substrato para revelação****• Solução A**

C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O	21g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml

**• Solução B**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	53,6g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml

• **Para 10 ml de solução de revelação:**

Solução A	2,8ml
Solução B	2,2ml
H <sub>2</sub> O destilada	5ml
ABTS	0,01g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,5µl

**- Max Facs Fix**

Paraformaldeído	10g
Cacodilato de Sódio	10,2
NaCl	33,25g
H <sub>2</sub> O mili-Q	1000ml

# 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](#)