

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LAURA NÉSPOLI NASSAR PANSINI DE JESUS

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* PELA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO COMO INDICADORES DE LESÃO OCULAR EM SOROS DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

VITÓRIA

2014

LAURA NÉSPOLI NASSAR PANSINI DE JESUS

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* PELA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO COMO INDICADORES DE LESÃO OCULAR EM SOROS DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Elenice Moreira Lemos

Coorientador: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

VITÓRIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Jesus, Laura Néspoli Nassar Pansini de, 1987-

J58a Avaliação da reatividade de anticorpos anti-Toxoplasma gondii pela técnica de citometria de fluxo como indicadores de lesão ocular em soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita / Laura Néspoli Nassar Pansini de Jesus – 2014.

61 f. : il.

Orientador: Elenice Moreira Lemos.

Coorientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Toxoplasmose congênita. 2. Toxoplasmose ocular.
3. Traumatismos Oculares. 4. Citometria de fluxo. 5. Toxoplasma gondii. I. Lemos, Elenice Moreira. II. Pereira, Fausto Edmundo Lima. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda LAURA NÉSPOLI NASSAR PANSINI apresentou a dissertação intitulada **“Avaliação da reatividade de anticorpos anti-Toxoplasma gondii pela citometria de fluxo como indicadores de lesão ocular em soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita”** em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestra em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

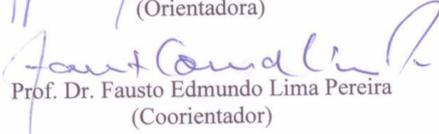
Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica LAURA NÉSPOLI NASSAR PANSINI a obter o Grau de MESTRA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 05 de dezembro de 2014


Prof. Dr. Luiz Valli
(Membro externo)


Prof. Dra. Blima Fux
(Membro interno)


Prof. Dra. Elenice Moreira Lemos
(Orientadora)


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Coorientador)

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elenice Moreira Lemos, minha orientadora de iniciação científica e mestrado. Agradeço pelos quase 7 anos de ensinamentos acadêmicos e principalmente pessoais. Sua dedicação e força são exemplo para todos que a conhecem.

Ao professor Dr. Olindo Assis Martins Filho e à Dra. Samantha Ribeiro Belo do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG pela colaboração na análise dos dados.

Ao professor Dr. José Roberto Mineo da Universidade Federal de Uberlândia – MG por ceder os parasitos utilizados nos experimentos.

Ao Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita da UFMG representado pelo Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor por ceder as amostras utilizadas neste estudo.

Ao Professor Dr. Fausto Edmundo Pereira pela oportunidade que me deu de receber seus ensinamentos valiosos e por toda boa vontade em ajudar sempre. Tenho muito orgulho de tê-lo conhecido.

À Aline Zacche e Giuliana Schimidt pela grande ajuda nos experimentos de citometria de fluxo.

Aos amigos do Laboratório de Leishmanioses do NDI, Aline, Aretha, Camila, Giuliana, Gregório, Jauber, Juliana, Lygia, Marco André, Mariela, Mauro, Natalia, Nayana, Priscila, Renata e Rodrigo por dividirem as alegrias e decepções de todo esse tempo juntos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação do NDI por todo conhecimento adquirido.

Aos amigos do mestrado do NDI, Aline, Fernanda, Janine, Kamila, Kaymerê e Pedro por todos os momentos divertidos e desesperadores que passamos juntos.

Aos colegas do NDI, obrigada por todas as risadas, conversas e desabafos na cozinha e nos corredores do NDI. Especialmente aos queridos Luciana e Daniel por todo o carinho e paciência.

Aos amigos da turma de graduação em farmácia da UFES, amigos de infância que conheci na juventude.

Ao amigos e irmãos Arthur, Sarah e Ludmila pela amizade de uma vida.

Ao meu marido, amigo e conselheiro Ricardo. Obrigada pela paciência, amor e carinho dedicados todos os dias, mesmo aqueles mais difíceis.

Aos meus pais e irmão. A vocês, todo meu coração pelo apoio durante toda a vida.

À CAPES, NDI e UFES pelo apoio financeiro.

À Deus.

RESUMO

A retinocoroidite é a manifestação mais comum causada pela infecção congênita por *Toxoplasma gondii*. Devido a gravidade das lesões oculares que podem até levar à perda completa da visão, a detecção precoce da toxoplasmose congênita e da lesão ocular são essenciais para o tratamento. Este trabalho possuiu o objetivo de avaliar a aplicabilidade da pesquisa de anticorpos IgG e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*T. gondii* por citometria de fluxo como marcador laboratorial das diferentes formas de lesões retinocoroidais na toxoplasmose congênita. Foram analisadas 88 amostras de soro de recém-nascidos com toxoplasmose congênita, sendo 25 sem lesão ocular (SL), 10 com lesão ocular ativa (RA), 26 com lesão ocular ativa e cicatricial (RAC) e 27 com lesão ocular cicatricial (RC). Foram também utilizadas 19 amostras de soro de recém-nascidos não infectados que apresentaram IgG positivo após o nascimento (NI). Essas amostras foram obtidas a partir de soros de recém-nascidos participantes de um programa de triagem neonatal realizado em Minas Gerais realizado nos anos de 2006 e 2007. Os resultados demonstraram que os recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentam maior reatividade de anticorpos IgG total e subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 do que indivíduos não infectados. No grupo não infectado, o único anticorpo com mais de 50% de indivíduos com alta reatividade de anticorpos foi IgG4. Ao comparar os grupos de indivíduos com toxoplasmose congênita, foi observado que o grupo RAC, seguido de RC, apresentou maior reatividade principalmente para os anticorpos IgG1 e IgG3 comparado aos recém-nascidos dos grupos RA e SL, enquanto que pacientes do grupo RA apresentaram maior reatividade para IgG4 do que indivíduos dos outros grupos. IgG1 foi a única subclasse capaz de diferenciar os grupos NI, SL dos grupos RAC e RC. Também foi avaliado o índice de avidéz de IgG total, que não permitiu estabelecer nenhum critério de diferenciação das formas de lesão ocular causadas pelo *T. gondii*. Portanto, a citometria de fluxo demonstrou que pode ser um método laboratorial complementar para ser utilizado como indicador das diferentes lesões oculares causadas pela toxoplasmose congênita

Palavras-chave: Toxoplasmose congênita. Toxoplasmose ocular. Lesões oculares. Retinocoroidite. Citometria de fluxo. *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Retinochoroiditis is the most important disorder caused by *Toxoplasma gondii* infection. Because of severity of ocular lesions that can lead to blindness, early detection of congenital toxoplasmosis and ocular lesion are critical to treatment. The purpose of this study was evaluate the research applicability of IgG and subclasses IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 by flow citometry as a laboratorial biomarker for different forms of ocular lesions in congenital toxoplasmosis. For this purpose, was investigated the presence of antibodies anti-*T. gondii* IgG and subclasses by flow citometry. 88 serum samples from newborns with congenital toxoplasmosis were analyzed, of these, were 25 without ocular lesions (SL), 10 with active ocular disease (RA), 26 with active and cicatricial ocular lesions (RAC) and 27 with cicatricial ocular lesions (RC). Were also used 19 serum samples from uninfected infants with a positive IgG after birth (NI). These samples were obtained from Neonatal Screening Program in Minas Gerais, Brazil performed in the years 2006 and 2007. The results demonstrate that infants with congenital toxoplasmosis showed greater reactivity of antibodies IgG and subclasses IgG1, IgG2 and IgG3 than newborns uninfected. In the non-infected group the only antibody with over 50% of individuals with high antibody reactivity was IgG4. Among infants infected, the group of patients with lesions RAC showed greater reactivity to IgG and subclasses IgG1, IgG2 and IgG3 than infants groups of RC, RA and SL. Patients in group RA showed greater reactivity to IgG4 than other groups. IgG1 was the only subclass capable to differentiate group NI and SL than group RAC and RC. Was also evaluated IgG avidity that not allowed to establish any criteria for differentiating forms of eye lesion caused by *Toxoplasma*. Therefore, the results demonstrated that flow citometry can be used as an additional biomarker for different forms of retinochoroiditis.

Keywords: Congenital toxoplasmosis. Ocular toxoplasmosis. Ocular lesions. Retinochoroiditis. Flow citometry. *Toxoplasma gondii*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	16
Figura 2 - Lesões oculares causadas pela infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	23
Figura 3 - Cinética de anticorpos durante a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	24
Figura 4 – Organograma de seleção de amostras de soros de recém-nascidos	32
Tabela 1 - Diluições seriadas dos soros para cada anticorpo utilizado nos ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo	35
Tabela 2 - Especificidade, marcação, clone, origem e diluição de uso de anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 utilizados para detecção no citômetro de fluxo	35
Figura 5 - Aquisição dos dados no citômetro de fluxo e análise no programa Cell-Quest	37
Figura 6 - Reatividade média de IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita com lesão ocular e sem lesão ocular	41
Figura 7 - Reatividade média de subclasses de IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita com lesão ocular e sem lesão ocular.....	42

Figura 8 - Reatividade média e individual de subclasses de IgG anti- <i>T.gondii</i> em soros de recém-nascidos não infectados (NI), de recém-nascidos com toxoplasmose congênita sem lesão ocular (SL) e de recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentado diferentes formas de retinocoroidite: retinocoroidite ativa (RA), retinocoroidite ativa e cicatricial (RAC) e retinocoroidite cicatricial (RC)	44
Figura 9 - Gráfico de média de reatividade de anticorpos IgG e subclasses anti- <i>T. gondii</i> obtida utilizando soros de recém-nascidos com ou sem toxoplasmose congênita	45
Figura 10 - Análise categórica da reatividade de IgG anti- <i>T. gondii</i> e suas subclasses em recém-nascidos não infectados (NI), recém-nascidos com toxoplasmose congênita sem lesão ocular (SL) e em recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentado diferentes formas de retinocoroidite: retinocoroidite ativa (RA), retinocoroidite ativa e cicatricial (RAC) e retinocoroidite cicatricial (RC)	46
Figura 11 - Níveis ascendentes de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> e suas subclasses em recém-nascidos não infectados (NI), recém-nascidos com toxoplasmose congênita sem lesão ocular (SL) e em recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentado diferentes formas de retinocoroidite: retinocoroidite ativa (RA), retinocoroidite ativa e cicatricial (RAC) e retinocoroidite cicatricial (RC)	47
Figura 12 - Índice de avidéz de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> em soros de recém-nascidos não infectados (NI), de recém-nascidos com toxoplasmose congênita sem lesão ocular (SL) e de recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentado diferentes formas de retinocoroidite: retinocoroidite ativa (RA), retinocoroidite ativa e cicatricial (RAC) e retinocoroidite cicatricial (RC)	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR - Pacientes altamente reativos

CDC - *Centers for Diseases Control and Prevention*

CL - Recém-nascidos com lesão ocular

DNA - Ácido desoxiribonucleico

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Ensaio Imunoenzimático

FITC - *Fluorescein isothiocyanate* - Isotiocianato de fluoresceína

FL-1 - Fluorescência tipo 1

FL-2 - Fluorescência tipo 2

IA - Índice de avidéz

ICAM-1 - *Intercellular Adhesion Molecule 1* – Molécula de adesão intracelular tipo 1

IgA - Imunoglobulina da classe A

IgE - Imunoglobulina da classe E

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgG1 - Imunoglobulina da classe G subclasse 1

IgG2 - Imunoglobulina da classe G subclasse 2

IgG3 - Imunoglobulina da classe G subclasse 3

IgG4 - Imunoglobulina da classe G subclasse 4

IgM - Imunoglobulina da classe M

MFF - MaxFax Fix

NI - Recém-nascidos não infectados

PBS - *Phosphate buffered saline* - Salina tamponada com fosfatos

PCR - Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase

PPFP - Porcentagem de parasitos fluorescentes positivos

qPCR - *Real Time PCR* – PCR em tempo real

RA - Recém-nascidos com toxoplasmose congênita e lesão ocular ativa

RAC - Recém-nascidos com toxoplasmose congênita e lesão ocular ativa e cicatricial

RC - Recém-nascidos com toxoplasmose congênita e lesão do tipo cicatricial

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

rMIC3 - Antígeno recombinante

SAPE - *Streptavidin-phycoerythrin* – Estreptoavidina-ficoeritrina

SFB - Soro fetal bovino

SL - Recém-nascidos com toxoplasmose congênita e sem lesão ocular

IFN- γ - Interferon gama

TGF- β - Fator de crescimento transformante beta

Th1 - *T Cell helper 1* – Células T auxiliares tipo 1

Th2 - *T Cell helper 2* – Células T auxiliares tipo 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA	18
1.2 TOXOPLASMOSE OCULAR	19
1.2.1 <i>Classificação das lesões oculares causadas pelo <u>Toxoplasma gondii</u></i>	21
1.2.2 <i>Resposta imune humoral na toxoplasmose ocular</i>	23
2 OBJETIVO GERAL	29
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MÉTODOS	31
3.1 ASPÉCTOS ÉTICOS	31
3.2 AMOSTRAS	31
3.3 OBTENÇÃO E PREPARO DAS FORMAS TAQUIZOÍTAS DE <i>Toxoplasma gondii</i>	33
3.4 DETECÇÃO DE IgG E SUBCLASSES DE IgG ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	33
3.5 ENSAIO DE AVIDEZ DE IgG ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	36
3.6 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS	36
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS	40
4.1 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE IgG ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> EM SOROS DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA APRESENTADO DIFERENTES FORMAS DE RETINOCOROIDE	40

4.2 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE SUBCLASSES DE IgG ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> EM SOROS DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA APRESENTADO DIFERENTES FORMAS DE RETINOCOROIDITE	41
4.3 ANÁLISE CATEGÓRICA DE RECÉM-NASCIDOS COM ALTA E BAIXA REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i>	45
4.4 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE AVIDEZ DE IgG ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> EM SOROS DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA APRESENTADO DIFERENTES FORMAS DE RETINOCOROIDITE	48
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	57
7 REFERÊNCIAS	59

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença de grande distribuição mundial causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Estima-se que a prevalência da doença em adultos possa atingir até 30% da população mundial dependendo da região avaliada e dos métodos empregados no estudo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Em mais de 80% dos indivíduos adultos imunocompetentes infectados a toxoplasmose é assintomática e autolimitada. Quando ocorrem manifestações clínicas geralmente são inespecíficas como febre, fadiga e linfadenopatia que podem ser confundidas com outras doenças. Em contraste, em pacientes imunocomprometidos as manifestações clínicas são mais severas como pneumonia, encefalite, miocardite e doença ocular grave. Quando a infecção ocorre durante a vida fetal ou em recém-nascidos pode causar lesões graves, especialmente no sistema nervoso central, deixando sequelas importantes como hidrocefalia e calcificações cerebrais. Podem causar ainda retinocoroidite, induzir nascimento prematuro, e até a morte do embrião ou do feto. A retinocoroidite é a lesão mais comum causada pela infecção congênita por *T. gondii* (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

O *T. gondii* foi descoberto em 1908 por Nicolle & Manceaux na África ao estudarem o roedor nativo *Ctenodactylus gondi* e ao mesmo tempo por Alfonso Splendore no Brasil ao realizar estudos em coelhos (DUBEY *et al.*, 2012). É um protozoário do filo Apicomplexa, pertencente à classe *Conoidasida*, ordem *Eucoccidiorida*, família *Sarcocystidae*, subfamília *Toxoplasmatidae* e gênero *Toxoplasma*, sendo a única espécie conhecida desse gênero até o momento. É capaz de infectar uma grande variedade de vertebrados, inclusive o homem.

O ciclo de vida do *T. gondii* é heteroxeno facultativo, durante o qual apresenta três formas: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. O ciclo do protozoário se desenvolve em duas fases: fase sexuada ou coccidiana e fase assexuada. A fase sexuada ocorre apenas nas células epiteliais do intestino delgado de felinos não imunes, os hospedeiros definitivos do parasito. A fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários após a infecção com esporozoítos derivados de oocisto ou após a exposição a bradizoítos derivados de cistos, geralmente ingeridos com alimentos de origem animal.

Os hospedeiros definitivos são os membros da família *Felidae*, entre os quais o gato doméstico é o mais importante para o homem. Os hospedeiros intermediários são diversas aves e mamíferos, incluindo o homem (Figura 1).

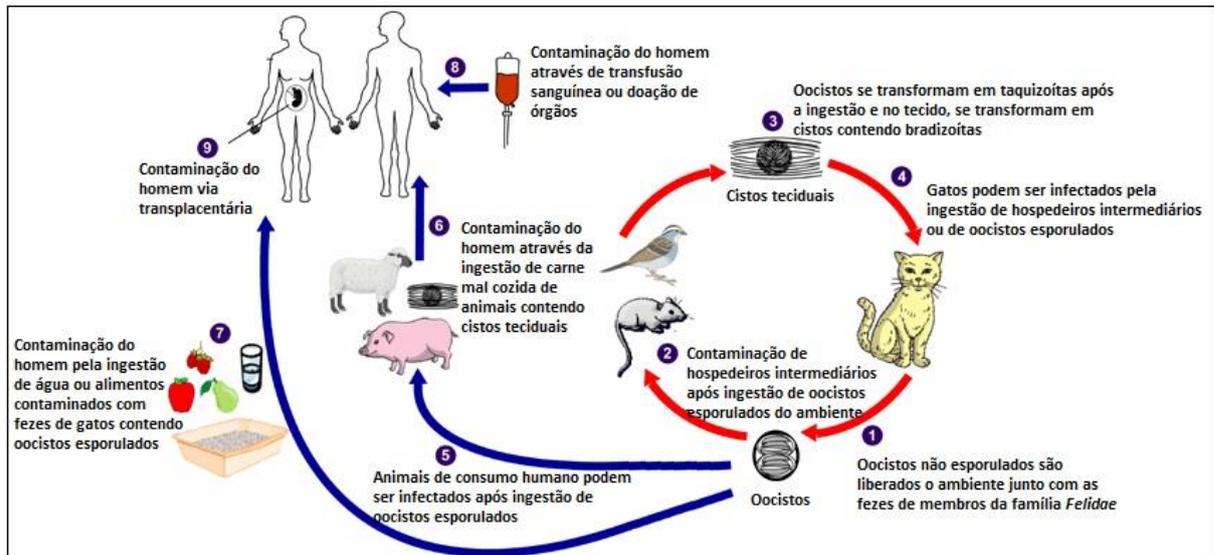


Figura 1. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Adaptado do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), 2013.

Os hospedeiros definitivos se infectam ingerindo qualquer uma das três formas evolutivas do parasito (FRENKEL, 1970). Os esporozoítos, taquizoítos e bradizoítos ao penetrarem nos enterócitos desses hospedeiros sofrerão um processo de reprodução assexuada (merogonia) dentro do vacúolo parasitóforo, originando merozoítos. Após o rompimento da célula, os merozoítos são liberados, penetram em novos enterócitos e se transformam em formas sexuais masculinas e femininas. As formas masculinas saem das células e fecundam as formas femininas, formando o zigoto. O zigoto originará os oocistos e quando a célula epitelial se romper, o oocisto será liberado junto com as fezes do animal. No ambiente, os oocistos maturam e passam a apresentar esporozoítos tornando-se então infectantes. Os oocistos podem permanecer infectantes no ambiente por cerca de 12 a 18 meses se estiverem em condições favoráveis de umidade e temperatura (DUBEY, 2010a). É interessante observar que essa infecção no hospedeiro definitivo faz desenvolver resposta imunitária que impede reinfecções. Portanto, os membros da família *Felidae* só eliminam oocistos na primeira infecção.

A contaminação dos hospedeiros intermediários pode ocorrer após a ingestão de oocistos maduros, cistos teciduais contendo bradizoítos ou, mais raramente, pelo contato com taquizoítos. As formas taquizoítos não resistem ao suco gástrico, porém as que penetram na mucosa digestiva são capazes de dar continuidade ao ciclo. Essas são as formas evolutivas de multiplicação rápida e, em teoria, capazes de infectar qualquer célula de vertebrados. Após passarem pelo trato gastrointestinal, em cujas células se multiplicam por divisão assexuada dentro de um vacúolo parasitóforo, originam outros taquizoítos os quais podem penetrar novamente células do intestino e continuar se multiplicando dando origem a novos taquizoítos ou se disseminar pelos tecidos. A disseminação dos taquizoítos se faz por via sanguínea e linfática de modo tal que todos os tecidos do hospedeiro podem ser acometidos. O maior ou menor acometimento vai depender de vários fatores, dentre eles a quantidade de parasitos, a susceptibilidade do hospedeiro e a virulência da cepa infectante.

Essa fase inicial ou proliferativa caracteriza a fase aguda da toxoplasmose. Com o aparecimento da resposta imune do hospedeiro, a maioria dos taquizoítos é eliminada do sangue, linfa e dos tecidos. Os taquizoítos que resistem e escapam da resposta imunitária, passam a se multiplicar mais lentamente sendo agora chamados de bradizoítos. Os bradizoítos formam cistos teciduais que são capazes de se desenvolver em vários órgãos, sendo mais frequentes nos tecidos neural e muscular, acometendo encéfalo, olhos e músculos esquelético e cardíaco. A formação de cistos teciduais, nos quais a multiplicação é muito lenta e a disseminação é controlada, gera a fase assintomática da infecção que ao que parece persiste por anos ou até por toda a vida do hospedeiro. Essa persistência da infecção por longos períodos é atestada pelas reativações que podem ser observadas em estados de imunodepressão, a exemplo da AIDS (DUBEY, 1998A; 2010A).

Surtos de toxoplasmose aguda em humanos de várias regiões do mundo demonstram que as fontes de infecção variam de acordo com diferenças culturais e hábitos alimentares (TENTER; HECKEROTH; WEISS; 2000). Nesses surtos a ingestão de carne crua ou mal cozida de animais que contenham cistos em seus tecidos parece a principal forma de infecção. No entanto, a alta prevalência da infecção em humanos sugere que outras formas de infecção podem existir. Hoje é sabido que o homem e outros animais se contaminam por meio da ingestão de oocistos maduros presentes no ambiente, eliminados com as fezes de felídeos infectados não imunes. Estes

oocistos podem contaminar água, solo, alimentos, caixas de areia dos gatos domésticos e lixo, além da possibilidade de serem carregados por insetos (BAHIA-OLIVEIRA *et al*, 2003, KRAVETZ & FEDERMAN, 2005).

Outras formas menos comuns de transmissão incluem transfusão sanguínea ou de plasma caso haja taquizoítos livres no sangue ou plasma do doador, transplantes de órgãos contendo cistos teciduais com a reativação da doença devido ao uso de imunossupressores, e acidentes de laboratório em que os primeiros relatos foram dados por Remington & Gentry em 1970. Em 1998, um estudo sugeriu que o leite contendo taquizoítos era um fator associado à infecção primária entre humanos. Apesar de não haver evidências que comprovem esta transmissão, o leite não pode ser descartado como possível fonte de infecção. O *T. gondii* já foi encontrado em outros fluidos corporais além do leite como urina, escarro e sêmen, mas não existe nenhuma evidência conclusiva que comprove a transmissão do parasito pelo contato com estes fluidos (PAUL, 1998, TENTER; HECKEROTH; WEISS; 2000)

1.1 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A infecção pelo *T. gondii* geralmente é capaz de desencadear uma resposta imunológica duradoura e protetora. Esta resposta em mulheres, caso a infecção ocorra antes da gravidez, previne na maioria dos casos a transmissão do *T. gondii* por via transplacentária para o feto (HILL & DUBEY, 2002). Contudo, a infecção primária em gestantes é o problema mais importante relacionado à toxoplasmose porque é na fase aguda da infecção que a transmissão para o feto pode ocorrer. No Brasil, a prevalência da toxoplasmose congênita varia de 5 a 23 casos para cada 10.000 nascidos vivos, dependendo da região avaliada e do método utilizado no estudo (DUBEY *et al*, 2012).

Durante a disseminação do parasito na gestante, o *T. gondii* coloniza e se multiplica na placenta, atingindo a circulação do feto em cerca de 30% dos casos. O risco de transmissão do parasito para o feto no primeiro trimestre de gravidez é menor, aumentando com o passar do tempo gestacional, devido à redução do espaço entre o sangue materno e o fetal nas vilosidades coriônicas. No entanto, a doença congênita

é mais grave quando a infecção é adquirida nos três primeiros meses de gestação (ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012).

Na maioria dos casos, o recém-nascido infectado pode ser assintomático ou apresentar sintomas subclínicos. Em 1942, Sabin reuniu achados clínicos e propôs que três sinais seriam típicos da toxoplasmose congênita: hidrocefalia (macro ou microcefalia), calcificação cerebral e retinocoroidite. Atualmente, perturbações neurológicas também são incluídas nesse quadro, conhecido como téttrade de Sabin. Além destes sinais, também pode ocorrer nos recém-nascidos, perda da audição, linfadenopatia, febre, dificuldade de aprendizado, entre outros sintomas inespecíficos. Dessa forma, o diagnóstico diferencial com outras doenças congênitas é muito importante. (MONTROYA; LIESENFELD, 2004, REMINGTON, 2006).

1.2 TOXOPLASMOSE OCULAR

A toxoplasmose ocular é geralmente uma uveíte posterior que afeta na maioria dos casos a retina com acometimento secundário da coróide, portanto, uma retinocoroidite. No Brasil, estima-se que 80% dos casos de uveíte posterior ocorram devido à infecção pelo *T. gondii* (MELAMED et al, 2010). Em alguns pacientes, o *T. gondii* pode afetar também o corpo vítreo e a câmara anterior dos olhos (RATHINAN; ASHOK, 2010). Formas atípicas e mais agressivas da toxoplasmose ocular podem ocorrer como neuroretinite, vasculite retinal oclusiva, retinal e subretinal, neovascularização e diversas lesões do nervo óptico (SMITH; CUNNINGHAM, 2002).

Trato uveal ou úvea é uma região ocular extremamente vascularizada composta pela íris, corpo ciliar e coróide, localizada entre a retina e a esclera. Uveíte é um termo genérico utilizado para denominar inflamações que ocorrem tanto no trato uveal quanto para as que atingem a retina e a esclera (ATMACA; SIMSEK; BATIOGLU; 2004).

As uveítes podem ser classificadas de acordo com a posição anatômica da lesão em: uveítes anteriores, intermediárias, posteriores e panuveítes. Nas uveítes anteriores há o acometimento da íris e dos corpos ciliares. Nas intermediárias ocorre inflamação no corpo vítreo, na retina periférica e na parte posterior dos corpos ciliares. Nas

posteriores há o envolvimento da coróide e da retina. Quando há o acometimento de dois ou mais seguimentos classifica-se como panuveíte (BLOCH-MICHEL & NUSSENBLATT, 1987).

A retinocoroidite causada pelo *T. gondii* é reconhecida como a causa mais comum de uveíte posterior em indivíduos imunocompetentes em todo o mundo (ORÉFICE & BAHIA-OLIVEIRA, 2005). No Brasil, vários estudos demonstram a importância da retinocoroidite por *T. gondii*. Em São Paulo foi relatado que a principal causa de dificuldade visual em crianças é a retinocoroidite por *T. gondii* (HADDAD *et al*, 2007). Um grande estudo realizado no estado de Minas Gerais no ano de 2009, no qual foram avaliados 146.307 recém-nascidos, revelou que das crianças com toxoplasmose congênita 79,8% apresentaram lesões retinocoroidais consistentes com as causadas pelo *T. gondii* (VASCONCELOS-SANTOS *et al*, 2009). Outro estudo realizado em MG, entretanto restrito à região de Montes Claros, demonstrou que todas as lesões oculares de crianças com toxoplasmose congênita avaliadas na ocasião foram classificadas como retinocoroidite (SOARES *et al*, 2011). Em Goiânia, a maioria dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita avaliados no ano de 2009 apresentavam lesões consistentes com retinocoroidite (RODRIGUES *et al*, 2009).

Acredita-se que o desfecho da infecção na toxoplasmose congênita dependa tanto da carga parasitária quanto do tipo de cepa de *T. gondii* com a qual o paciente está infectado. Em 2013, Costa e colaboradores avaliaram amostras de sangue periférico de 150 crianças com toxoplasmose congênita confirmada pela técnica de PCR em tempo real. Neste estudo, foi possível correlacionar a parasitemia apresentada com as formas de lesão ocular, principalmente para lesões oculares ativas (COSTA *et al*, 2013). Segundo Gilbert e colaboradores (2008), crianças brasileiras possuem probabilidade cinco vezes maior de desenvolver toxoplasmose grave do que crianças nascidas na Europa. Essa diferença pode ser devido à presença de diferentes populações do parasito existentes na América do Sul em relação à Europa e América do Norte (AJZENBERG *et al*, 2004, LEHMANN *et al*, 2006). No Brasil, a cepa do tipo I parece estar mais envolvida com lesões oculares, enquanto na França e nos EUA a principal responsável pelos acometimentos é a do tipo II (COMMODARO *et al*, 2009). Entretanto, um estudo recente realizado no Brasil revelou que embora uma grande variedade de genótipos do *T. gondii* tenha sido identificada a partir do soro de recém-

nascidos com toxoplasmose congênita, não foi possível correlacionar estes genótipos com as lesões oculares dos recém-nascidos (CARNEIRO *et al* 2013).

Além desses fatores, acredita-se que a resposta imunitária seja muito importante na patogênese da retinocoroidite, admitindo-se que mecanismos de hipersensibilidade possam estar envolvidos (GARWEG; CANDOLFI, 2009).

É possível que as formas taquizoítos do *T. gondii* possam chegar ao tecido ocular de duas maneiras: através da circulação sanguínea quando livres no plasma ou através de leucócitos circulantes infectados uma vez que ocorre a migração de células para o olho atraídas por quimiocinas liberadas durante a infecção. Achados recentes sugerem que os taquizoítos também podem atravessar o endotélio vascular da retina de forma não assistida, com participação da ICAM-1 deste endotélio (FURTADO *et al*, 2012a). Outra teoria supõe que os parasitos podem atingir os olhos provenientes do cérebro, possivelmente através do nervo óptico. Essa hipótese é suportada por achados de cistos de parasitos na periferia do nervo óptico e na proximidade de vasos sanguíneos. (FURTADO *et al*, 2012b).

1.2.1 Classificação das lesões oculares causadas por *Toxoplasma gondii*

O pouco entendimento sobre a toxoplasmose ocular dificulta a associação de dados laboratoriais com o perfil clínico do paciente (GARWEG *et al*, 2005). Dessa forma, até o momento, o diagnóstico da retinocoroidite por *T. gondii* é basicamente clínico (COMMODARO *et al*, 2009). Além disso, busca-se o diagnóstico da doença ocular apenas quando o paciente apresenta alguma dificuldade visual ou, no caso de crianças assintomáticas, quando a mãe foi primoinfectada durante a gestação.

O diagnóstico clínico baseia-se principalmente em achados de lesões oculares consideradas como causadas pelo *T. gondii*. Quando ocorrem manifestações atípicas, métodos mais invasivos podem ser utilizados para auxiliar no diagnóstico, como a identificação de cistos oculares em biópsias e PCR para detecção de DNA do parasito no fluido ocular (VASCONCELOS-SANTOS, 2012, BUTLER *et al*, 2013).

Após o diagnóstico complexo da toxoplasmose ocular, a segunda dificuldade encontrada é a classificação das lesões causadas pelo parasito. Existem diferentes formas de classificação das lesões oculares baseadas principalmente nas características do dano causado. Em 2005, Oréfice e Bahia-Oliveira propuseram um sistema de classificação para pesquisas epidemiológicas baseado em critérios morfológicos que refletem o grau de prejuízo da retina, onde as lesões foram divididas em tipo I, II e III. Neste sistema de classificação, a lesão do tipo I é a de maior acometimento da retina, seguida da lesão de tipo II e do tipo III, com menor acometimento da retina, sendo que na lesão do tipo III não é possível afirmar a sua etiologia.

As lesões oftalmológicas por toxoplasmose podem ser acompanhadas na sua evolução, pois mostram aspectos morfológicos diferentes (Figura 2). Nas primeiras seis semanas, ocorrem lesões com focos amarelo esbranquiçados e um recobrimento opaco do corpo vítreo, comumente acompanhada de grave reação inflamatória vítrea, caracterizando a lesão aguda. Após o período inicial, ocorre regressão da lesão ativa e formação de uma cicatriz e passa a ser chamada de lesão cicatricial. Quando ao exame oftalmológico identificam-se lesões com características de lesão ativa e de lesão cicatricial ao mesmo tempo, denomina-se lesão cicatricial e ativa, sendo considerada em adultos uma provável recorrência da lesão. Em 60% dos casos ocorre a reativação das lesões, principalmente nas bordas das cicatrizes retinocoroidais, porém os fatores que levam a esta recorrência ainda são desconhecidos. Acredita-se que a ruptura espontânea ou após choque mecânico por trauma dos cistos do parasito na retina seja um dos fatores importantes para a reativação (GOLDENBERG *et al*, 2013).

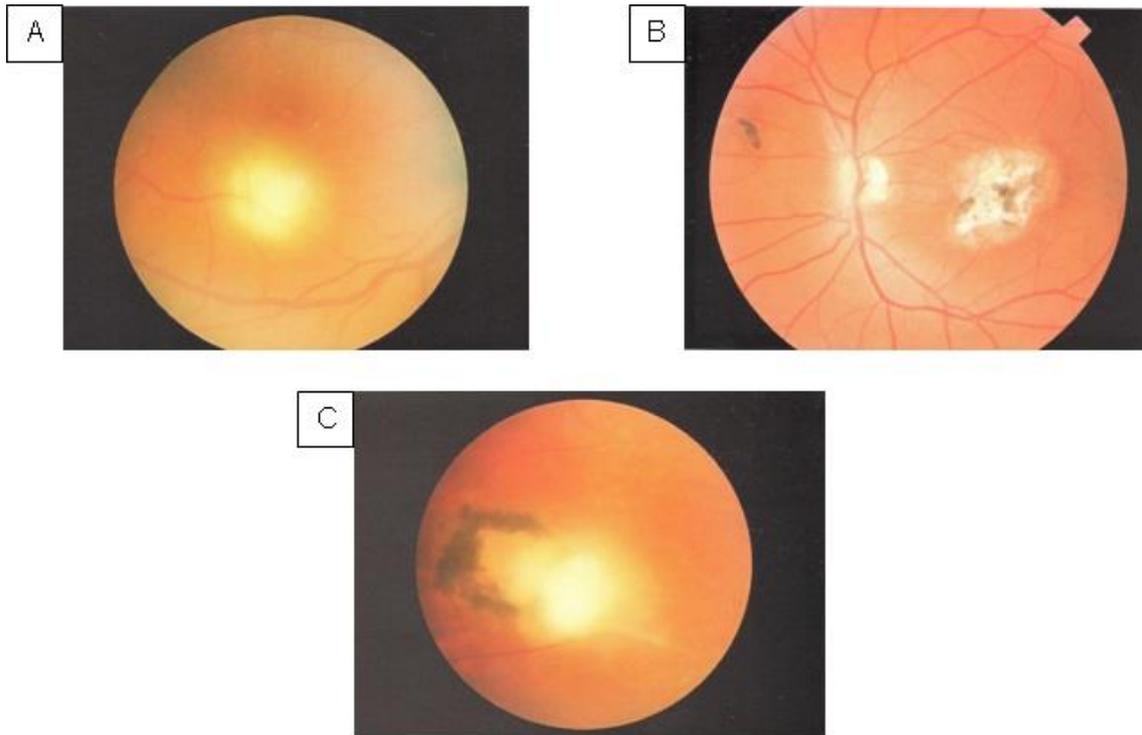


Figura 2. Lesões oculares causadas pela infecção por *T. gondii*. **A.** Lesão aguda **B.** Lesão cicatricial **C.** Lesão aguda e cicatricial. Modificado de Oréfice F e Bahia-Oliveira, 2005.

1.2.2 Resposta imune humoral na toxoplasmose ocular

Os anticorpos IgA e IgM são os primeiros a serem produzidos após a infecção por *T. gondii* e atingem o *plateau* em cerca de um mês (Figura 3). As imunoglobulinas IgM são os principais ativadores do complemento, são excelentes aglutinadores, característica utilizada em técnicas de diagnóstico. Os anticorpos IgM geralmente atingem o pico de 1 a 2 meses após a infecção, decaem após alguns meses e tornam-se negativos. Todavia, podem permanecer detectáveis por um ano ou mais em alguns indivíduos. Por outro lado, em raros casos a IgM pode tornar-se negativa em 3 meses de infecção ou serem dificilmente detectáveis (ROBERT-GANGNEUX & DARDÉ, 2012).

Os anticorpos IgM circulantes em recém-nascidos geralmente são considerados de origem fetal e são utilizados como diagnóstico para infecção congênita uma vez que

este anticorpo não é capaz de atravessar a placenta. As anticorpos IgE específicos também são produzidos no início da infecção, mas rapidamente desaparecem.

Os anticorpos IgG são produzidos sistemicamente e são a principal classe de anticorpos envolvidos na resposta imune humoral durante a infecção pelo *T. gondii*. A imunoglobulina IgG pode ser detectada em tempos de infecção diferentes dependendo da técnica laboratorial utilizada. Independente da técnica, o IgG atinge o *plateau* em 2-3 meses de infecção, decai numa velocidade variável e persiste por toda a vida do paciente em títulos residuais. Os anticorpos IgG de baixa avidéz predominam no início da infecção enquanto que os anticorpos de alta avidéz indicam infecção passada. Contudo, anticorpos IgG de baixa avidéz podem persistir circulantes no indivíduo portanto, não é possível afirmar que a infecção é de fato recente.

Estudos tem demonstrado que as subclasses de IgG estão presentes em diferentes proporções durante a toxoplasmose onde IgG1, IgG2 e IgG3 parecem ser predominantes. Durante a infecção, os taquizoítos são rapidamente lisados através da ação da via clássica do complemento e vem sendo relatado a importância dos anticorpos na prevenção da proliferação de taquizoítos tanto na infecção primária quanto na recorrente. (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004, ROBERT-GANGNEUX & DARDÉ, 2012).

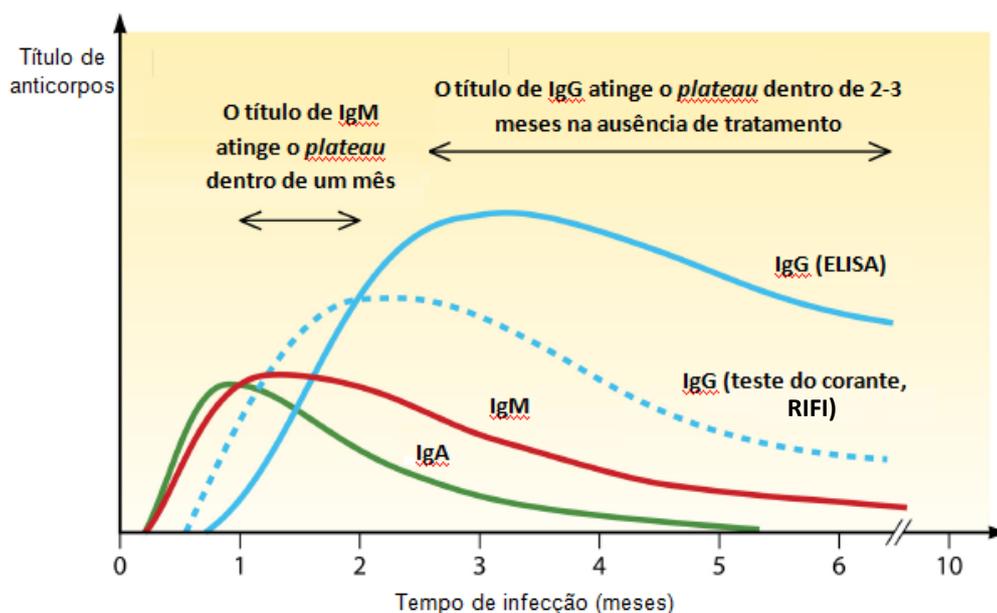


Figura 3. Cinética de anticorpos durante a infecção por *Toxoplasma gondii*. Adaptado de Robert-Gangneux & Dardé, 2012

Apesar da doença ocular ser a manifestação clínica mais comum da toxoplasmose (HOLLAND, 2004), poucos estudos tem sido realizados para compreender a resposta humoral de pacientes portadores de lesões oculares devido a infecção por *T. gondii*.

Após estudos de Witmer (1954), Goldman (1957) e Desmonts (1966) foi possível sugerir se há foco ocular da doença utilizando um índice capaz de relacionar a concentração total de anticorpos no humor aquoso com a concentração total dos mesmos anticorpos no soro (Coeficiente de Goldman-Witmer-Desmonts). Este coeficiente é determinado dividindo-se os anticorpos específicos presentes no humor aquoso ou vítreo pelos anticorpos IgG totais do humor aquoso ou vítreo (valor X). Posteriormente, divide-se os anticorpos específicos do soro pelos anticorpos IgG totais do soro (Valor Y). Após, divide-se os dois valores encontrados (X/Y) e o resultado encontrado é o coeficiente (C). O índice elevado indica a possível produção intraocular de anticorpos durante a toxoplasmose ocular, constituindo-se em uma prova indireta da existência do parasito dentro do olho (VASCONCELOS-SANTOS, 2012). Este coeficiente até hoje tem se mostrado uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose ocular (ERRERA *et al*, 2011).

Com o objetivo de compreender a imunopatogênese da toxoplasmose ocular, Lu e colaboradores em 2004 utilizaram um modelo experimental de camundongos *knockout* para células CD4, CD8 ou células B. Neste estudo, os camundongos selvagens apresentaram necrose grave, inflamação e replicação dos parasitos nos olhos. Em contraste, inflamação leve e sem sinais de necrose associada ao aumento de carga parasitária foi encontrada em animais *knockout* para células CD4. Já camundongos *knockout* para CD8 e animais *knockout* para células B demonstraram aumento de necrose em resposta a uma infecção ocular primária e a carga parasitária foi aumentada nos olhos desses animais sendo maior ainda para *knockout* de células B. Não houve aumento nos níveis de IFN- γ e TNF- α no soro de animais *knockout* para CD4 após infecção assim como não houve aumento dos níveis de IgG no soro ou humor aquoso de animais *knockout* para células B. Estes resultados sugerem que as células TCD8 e B desempenham um papel importante na limitação da proliferação de taquizoítos nos olhos o que indica indiretamente a importância dos anticorpos na defesa do organismo durante a doença (LU F, HUANG S, KASPER H.L, 2004).

Avaliando amostras de indivíduos humanos com a manifestação ocular, Garweg e colaboradores em 2004, utilizando a técnica de *imunoblotting* avaliaram amostras de

humor aquoso de 46 indivíduos com toxoplasmose ocular e observaram que proteínas reconhecidas por IgG foram detectadas em 98% dos casos e para IgA em 78% das amostras avaliadas. Comparando com o grupo sem manifestações de inflamação ocular (grupo controle), admitiu-se que em 70% dos casos há evidência de produção local de anticorpos IgG nas amostras de toxoplasmose ocular.

Papadia e colaboradores em 2011, utilizando a técnica de ELISA, avaliaram a presença de IgG anti-*T. gondii* no soro de pacientes adultos e crianças com toxoplasmose ocular ativa, toxoplasmose ocular inativa e como grupo controle pacientes com uveítes causadas por outros agentes. Neste estudo, os autores demonstraram que 96% dos pacientes com uveíte ativa compatível com toxoplasmose ocular apresentaram títulos de IgG anti-*T. gondii* no soro quatro vezes maiores que o valor do ponto de corte estabelecido. Além disso, este mesmo estudo revelou que pacientes com características clínicas compatíveis com lesão ocular aguda causada pelo *T. gondii* possuem 93% de chance de apresentarem títulos mais elevados de IgG (cerca de 20 vezes mais altos) do que pacientes com doença inativa ou com outras uveítes causadas por outros agentes.

Estudos tem demonstrado a correlação entre a presença de anticorpos IgA anti-*T. gondii* na lágrima de pacientes com toxoplasmose ocular e a lesão ativa. Lynch e colaboradores em 2011 avaliaram amostras de lágrimas de 29 pacientes com uveíte posterior aguda causada por *T. gondii* por meio da técnica de ELISA. No estudo foi comparado a presença de IgA durante a fase aguda da doença e a fase inativa e foi demonstrado que há uma queda significativa da quantidade de anticorpos IgA na fase inativa da lesão.

Apesar de anticorpos IgA serem produzidos pelas células da placenta, uma explicação para a provável produção local de IgA durante a toxoplasmose ocular é o fato de que durante a fase intestinal do ciclo do parasito linfócitos localizados na lâmina própria do trato intestinal são sensibilizados, porém podem migrar para diferentes áreas inclusive para a retina onde podem produzir IgA ao entrarem em contato com o parasito. Acredita-se também que a produção de IgA no local da infecção pode ser devido a presença de TGF- β que favorece a mudança de isotipo para IgA. Na infecção aguda, IgA pode permanecer por 8 a 9 meses (HEGAB S. M, AL-MUTAWA S.A, 2003).

Na tentativa de complementar a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, Suresh e colaboradores (2012) utilizando a técnica de ELISA avaliaram o índice de avidéz de

IgG anti-*T. gondii* em adultos com retinocoroidite por *T. gondii* e demonstraram que pacientes com reativação da toxoplasmose ocular apresentam índice de avidéz de IgG mais alto quando comparado a pacientes com infecção ocular recentemente adquirida.

Com relação ao perfil de anticorpos de recém-nascidos com toxoplasmose ocular, ainda são raros os estudos. Recentemente, de Souza-e-Silva e colaboradores (2013) utilizaram a técnica de ELISA para avaliar a reatividade de IgG e suas subclasses anti-antígenos recombinantes no soro de recém-nascidos com toxoplasmose congênita. Os resultados demonstraram que a reatividade de IgG total para o antígeno recombinante rMIC3 foi associada negativamente à lesão do tipo ativa e cicatricial (RAC). Recém-nascidos com RAC apresentaram quatro vezes menos chance de ter anticorpos IgG total anti-rMIC3 do que recém-nascidos infectados sem lesão ocular, ou seja, quanto mais anticorpos IgG total, menor a chance de apresentar a lesão do tipo RAC. No mesmo estudo foi demonstrado que os níveis de IgG2 e IgG4 anti-rMIC3 possuem associação positiva com a presença de lesões retinocoroidais sugerindo que pode haver uma correlação entre a resposta imune humoral traduzida pela produção destes dois anticorpos e a retinocoroidite causada pelo *T. gondii*.

Portanto, devido à escassez de dados relacionados à pesquisa de anticorpos e a presença de lesões oculares em recém-nascidos com toxoplasmose congênita, neste estudo utilizamos a citometria de fluxo para a pesquisa de IgG e suas subclasses bem como para a pesquisa de avidéz de IgG em soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita e retinocoroidite na tentativa de estabelecer um indicador laboratorial das diferentes formas de lesões oculares causadas pelo *T. gondii*.

OBJETIVO

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* por citometria de fluxo como indicador laboratorial das diferentes formas de lesões retinocoroidais na toxoplasmose congênita.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de anticorpos IgG total e das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*T. gondii* em soros de recém-nascidos não infectados e com toxoplasmose congênita e correlacionar com as formas de lesões retinocoroidais ativa, ativa e cicatricial e cicatricial.
- Avaliar o índice de avidéz de IgG total anti-*T. gondii* em soros de recém-nascidos não infectados e com toxoplasmose congênita e correlacionar com as formas de lesões retinocoroidais ativa, ativa e cicatricial e cicatricial.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 ASPÉCTOS ÉTICOS

Este estudo utilizou amostras de soros de recém-nascidos obtidas de um estudo do programa de triagem neonatal o qual foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, Parecer nº 0298/06.

3.2 AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de soro de recém-nascidos participantes de um programa de triagem neonatal realizado em Minas Gerais nos anos de 2006 e 2007. Durante o programa de triagem, amostras de sangue dos recém-nascidos foram coletadas em papel de filtro 5 a 7 dias após o nascimento. O diagnóstico da toxoplasmose congênita foi realizado por ELISA de captura para detecção de IgM anti-*T.gondii* (TOXO IgM Q-Preven, Symbiosis Diagnóstica Ltda, Leme, Brasil). Nos casos positivos ou indeterminados, amostras de soro foram coletadas 1 a 2 meses depois do nascimento e realizado um ensaio confirmatório com a metodologia ELFA-VIDAS para pesquisa de IgM e IgG.(Biomerieux AS, Lyon, França).

Foram confirmadas como verdadeiramente positivas para toxoplasmose congênita as crianças que apresentaram níveis de IgG elevados após 12 meses de vida pela técnica de ELFA-VIDAS. Os recém-nascidos que apresentaram IgG negativo após 12 meses de vida foram considerados não infectados.

No mesmo dia da coleta do soro foi realizado o exame oftalmológico nos recém-nascidos participantes. Durante a avaliação oftalmológica dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita, foram classificados como pacientes sem lesão ocular (SL), pacientes com retinocoroidite ativa (RA), com retinocoroidite cicatricial (RC) e retinocoroidite cicatricial e ativa (RAC).

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 88 amostras de soro de recém-nascidos com toxoplasmose congênita, sendo 25 sem lesão ocular (SL), 10 com lesão ativa (RA), 26 com lesão ativa e cicatricial (RAC) e 27 com lesão cicatricial (RC). Foram também utilizadas 19 amostras de soro de recém-nascidos não infectados que apresentaram IgG positivo após o nascimento (NI) (Figura 4).

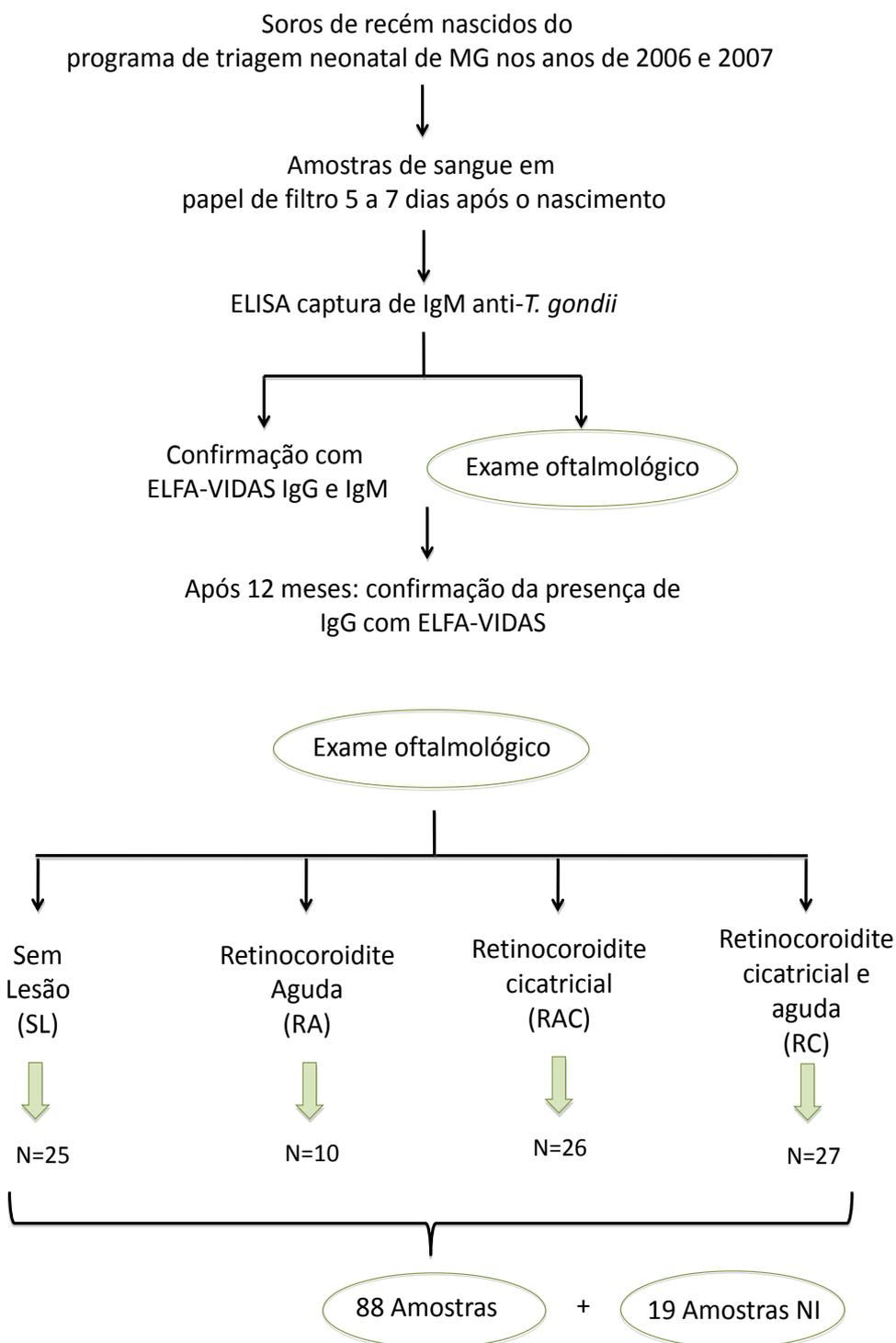


Figura 4. Organograma de seleção de amostras de soros de recém-nascidos.

3.3 OBTENÇÃO E PREPARO DAS FORMAS TAQUIZOÍTAS DE *Toxoplasma gondii*

Os parasitos foram gentilmente cedidos pelo professor José Roberto Mineo da Universidade Federal de Uberlândia – MG. Taquizoítos da cepa padrão RH de *T. gondii* foram mantidos em camundongos Balb/C de idade entre 6 a 9 semanas. Foram realizadas passagens seriadas nos animais em intervalos de 48 a 72 horas de um inóculo contendo aproximadamente 10^6 taquizoítos/mL. Os taquizoítos foram coletados por lavagem intraperitoneal com solução salina estéril tamponada a 0,01M (PBS, pH=7,2-7,4). Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 45 x g, 1 minuto, a 4°C para retirar possíveis restos celulares provenientes do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado duas vezes a 720 x g, 10 minutos, a 4°C com PBS. Os parasitos foram tratados com solução fixadora Max Fax Fix (MFF) pH=7,2 (10g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cacodilato de sódio e 6,65g/L de cloreto de sódio) diluído 1:1 em PBS e armazenado a 4°C por 24 horas. Após a fixação, foi realizada uma nova centrifugação a 1.000 x g, 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em PBS e os parasitos contados em câmara hemocitométrica. No momento do uso, a concentração dos parasitos foi ajustada para $5,0 \times 10^6$ taquizoítos/mL em PBS enriquecido com 3% de soro fetal bovino (PBS-3% SFB).

3.4 DETECÇÃO DE IgG E SUBCLASSES DE IgG ANTI-*Toxoplasma gondii* POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os ensaios de imunofluorescência para detecção de anticorpos anti-taquizoítos de *T. gondii* foram realizados segundo o protocolo descrito por Silva-dos-Santos e colaboradores (2012).

Em placas de microtitulação de 96 poços de fundo em U foram adicionados 50µL dos soros dos pacientes, diluídos 1: 32.000 a 2.048.000 para a pesquisa de IgG e IgG1, 1:250 a 1:16.000 para a pesquisa de IgG2, 1:1000 a 64.000 para IgG3 e 1:500 a 32.000 para IgG4 (Tabela 1). Em seguida foram adicionados 50µL da suspensão de parasitos numa concentração de $5,0 \times 10^6$ taquizoítos/mL.

Após um período de incubação de 30 minutos a 37°C, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS-3% SFB gelado e a placa foi centrifugada a 1.000 x g por 10 minutos a 4°C.

Posteriormente, para revelar os anticorpos IgG anti-taquizoítos, adicionou-se em cada poço 50µL de anticorpo secundário anti-IgG marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC – Sigma Chemical Corp., St Louis, MO, EUA) na diluição 1:20.000 seguido de incubação a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Os parasitos foram lavados duas vezes com PBS-3% SFB gelado por centrifugação a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado vertendo a placa rapidamente seguido de agitação.

Para a detecção das subclasses de IgG anti-*T. gondii*, o procedimento foi semelhante ao realizado para anticorpos IgG, porém, neste caso o conjugado adicionado em cada poço foi o anticorpo anti-subclasse biotilado na diluição 1:20.000 para IgG1, 1:1.000 para IgG2 e IgG4 e 1:2.000 para IgG3.

A placa foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Os parasitos foram lavados duas vezes com PBS-3% SFB gelado, por centrifugação a 1.000 x g por 10 minutos a 4°C. Adicionou-se 20µL de estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE – SouthernBiotech Associates, Birmingham, AL) na diluição pré-estabelecida de 1:400 e incubou-se a 37°C durante 30 minutos ao abrigo da luz. Os parasitos foram novamente lavados duas vezes com PBS-3% SFB gelado por centrifugação a 1.000 x g por 10 minutos a 4°C.

Após a centrifugação foram adicionados 200µL de solução fixadora MFF em todos os poços, seguido de incubação por no mínimo 30 minutos e no máximo 24 horas. A placa foi mantida a 4°C ao abrigo de luz até o momento da aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

A especificidade, a marcação, o clone, a origem e a diluição dos anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 utilizados nos ensaios de citometria de fluxo estão resumidos na tabela 2.

Tabela 1. Diluições seriadas dos soros para cada anticorpo utilizado nos ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo.

Anticorpo	Diluições dos Soros
IgG Total	1/32.000 – 1/2.048.000
IgG1	1/32.000 – 1/2.048.000
IgG2	1/250 – 1/16.000
IgG3	1/1.000 – 1/64.000
IgG4	1/500 – 1/32.000

Tabela 2. Especificidade, marcação, clone, origem e diluição de uso de anticorpos IgG e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 utilizados para detecção no citômetro de fluxo.

Anticorpo	Especificidade	Marcação	Clone	Origem	Diluição de uso
AcP. Anti-IgG total	Fragmento Fc	FITC	-	Cabra	1/20.000
AcM. Anti IgG1	Fragmento Fc	Biotina*	8c/6-39	Camundongo	1/20.000
AcM. Anti IgG2	Fragmento Fc	Biotina*	HP-6040	Camundongo	1/1.000
AcM. Anti IgG3	Fragmento Fc	Biotina*	HP-6050	Camundongo	1/1.000
AcM. Anti IgG4	Fragmento Fc	Biotina*	HP-6025	Camundongo	1/1.000

AcM = Anticorpo monoclonal. AcP = Anticorpo policlonal

FITC = Isotiocianato de Fluoresceína

*AcM biotilados foram posteriormente incubados com estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE) para a detecção.

3.5 ENSAIO DE AVIDEZ DE IgG ANTI-*Toxoplasma gondii* POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para detectar a avidéz de IgG, os ensaios foram realizados em duplicata. Após a incubação dos soros com os parasitos, as placas foram lavadas com 100µL de PBS-3% SFB por centrifugação a 1.000 x g, durante 10 minutos, 4°C. Posteriormente foi realizada uma lavagem diferencial onde uma das placas foi tratada com uma solução de uréia na concentração de 6M e a outra placa com PBS-3% SFB. As duas placas foram incubadas por 5 minutos sobre agitação leve e centrifugadas a 1.000 x g, 10 minutos e 4°C. O sobrenadante foi desprezado e foram realizadas outras duas lavagens com PBS-3% SFB por centrifugação a 1.000 x g, 10 minutos 4°C. A revelação dos anticorpos foi realizada da mesma forma descrita no protocolo de detecção de anticorpos IgG total anti-taquizoítos de *T. gondii*.

O cálculo do índice de avidéz (IA) foi realizado segundo a fórmula:

$$\text{Índice de Avidéz (IA)} = [\text{PPFP}_{(\text{com uréia})} / \text{PPFP}_{(\text{sem uréia})}] \times 100$$

De acordo com o critério estabelecido por Silva-dos-Santos e colaboradores (2012), a diluição escolhida para realização dos cálculos de IA para cada amostra foi a última diluição do soro na qual a reatividade nos ensaios sem adição de uréia foi maior ou igual a 30% de parasitos fluorescentes positivos (PPFP). Valores de IA acima ou iguais a 60 foram considerados de alta avidéz.

3.6 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

A aquisição dos dados foi realizada utilizando o citômetro de fluxo FACSsort (Becton Dickinson) analisando-se 5.000 parasitos e os resultados foram expressos em PPFP. A análise dos dados foi realizada no programa *Cell-Quest*. No gráfico de tamanho (FSC- *Forward scatter*) por complexidade interna ou granulosidade (SSC- *side scatter*)

(Figura 4A) foi selecionada a população mais homogênea de parasitos utilizando o ajuste de tamanho e granulosidade em escala log com valores E00 e 350, respectivamente. A partir desta população foram construídos histogramas representando a intensidade de fluorescência dos parasitos para cada amostra analisada. Para avaliar a fluorescência dois tipos de marcações foram utilizadas nos ensaios: o fluorocromo FITC, que emite uma fluorescência verde quando excitado (FL1- fluorescência do tipo 1) e o sistema biotina/SAPE emissor de fluorescência de cor laranja quando excitado (FL2- fluorescência do tipo 2).

Em cada experimento foi realizado um controle sem a adição de soro, contendo apenas parasitos e o anticorpo secundário. Este controle foi utilizado para descartar fluorescências inespecíficas, sendo que o PFP não poderia ultrapassar 2% (Figura 4B). Após a análise deste controle, foi realizada a análise de uma mistura de amostras sabidamente negativas e de uma mistura de amostras sabidamente positivas, utilizadas com controle do teste (Figura 4C). Cada controle era composto pela mistura de 10 soros de recém-nascidos selecionados aleatoriamente.

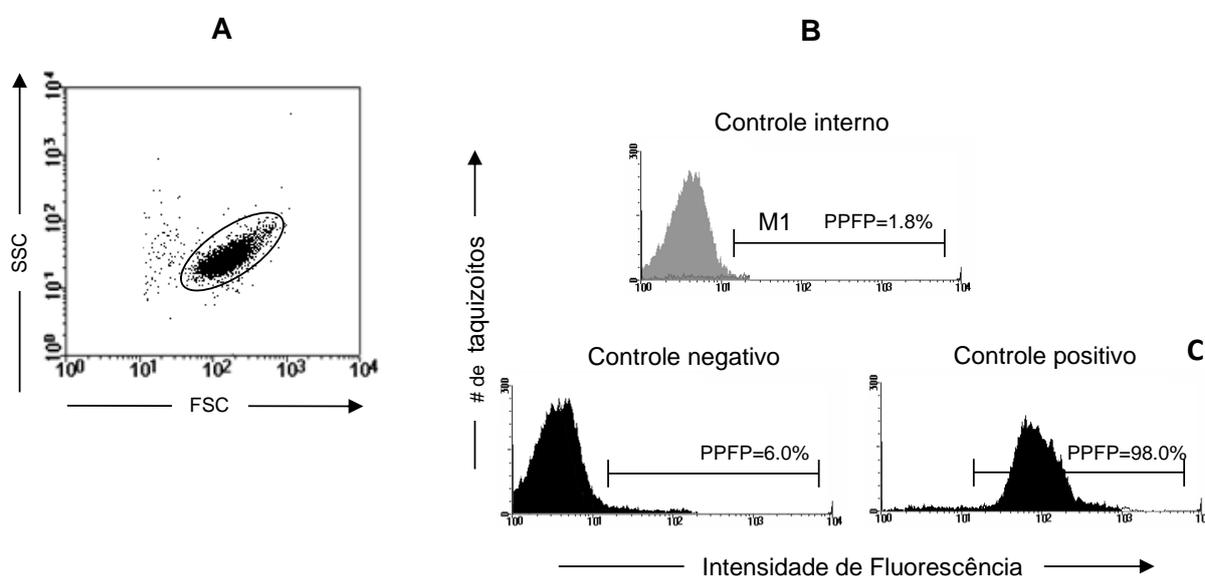


Figura 5. Aquisição dos dados no citômetro de fluxo e análise no programa Cell-Quest. **A.** Seleção da população mais homogênea de taquizoitos fixados. **B.** Controle interno: avaliação da reatividade inespecífica do conjugado utilizando apenas parasitos anticorpo secundário. **C.** Controle negativo representado PFP de 6% e como controle positivo com PFP de 98%.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa GraphPrism versão 5.0. O teste aplicado para comparação de médias de reatividade foi ANOVA seguido do teste de Kruskal-Wallis. Considerou-se estatisticamente significativo os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE IgG ANTI-*Toxoplasma gondii* EM SOROS DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA APRESENTANDO DIFERENTES FORMAS DE RETINOCOROIDITE

Para a análise da reatividade de anticorpos IgG pela da técnica de citometria de fluxo, inicialmente foi necessário estabelecer a diluição do soro a ser utilizada. Para isso, um gráfico foi construído com a média das reatividades dos anticorpos IgG em soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita com lesão ocular (CL) e sem lesão ocular (SL). A partir deste gráfico foi selecionada a diluição que melhor discriminou o grupo CL do grupo SL (Figura 5).

A análise da curva de titulação demonstrou que a diluição do soro 1:512.000 foi a que apresentou maior amplitude de segregação entre os grupos CL e SL e foi portanto, utilizada para a análise da reatividade individual (Figura 5A).

A figura 5B mostra a reatividade média e individual de IgG anti-*T. gondii* em soros de recém-nascidos do grupo SL e de recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentado diferentes formas de retinocoroidite: retinocoroidite ativa (RA), retinocoroidite ativa e cicatricial (RAC) e retinocoroidite cicatricial (RC). Como referência, foi também avaliada a reatividade de soros de recém-nascidos não infectados mas apresentado IgG anti-*T.gondii* (NI). Os soros NI foram incluídos de modo a avaliar a diferença entre a reatividade de anticorpos dos recém-nascidos não infectados que apresentam IgG positivo para *T. gondii* transmitido pela mãe via placenta e a reatividade de anticorpos IgG dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita. Os resultados mostraram que recém-nascidos com toxoplasmose congênita do grupo RAC e RC apresentam maior reatividade de IgG em relação a recém-nascidos do grupo NI.

Analisando apenas recém-nascidos com toxoplasmose congênita foi possível observar que apenas os recém-nascidos do grupo RAC apresentam maior reatividade de anticorpos IgG anti-*T. gondii* quando comparados ao grupo SL. Este mesmo grupo também mostrou maior reatividade de anticorpos IgG quando comparado ao grupo RA.

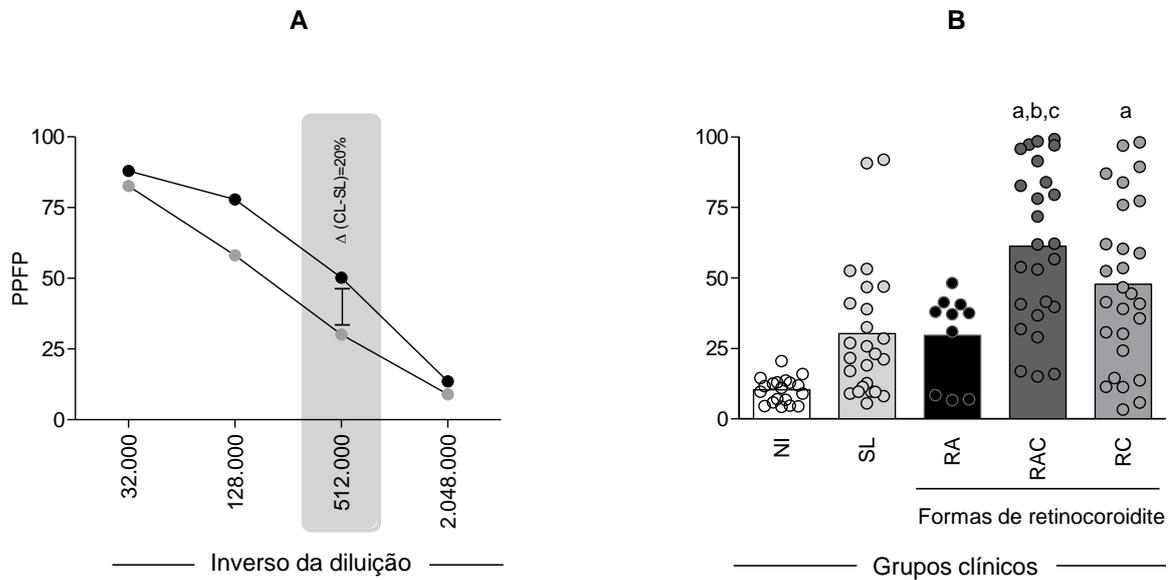


Figura 6. Reatividade média de IgG anti-*T. gondii* em soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita com lesão ocular (●) e sem lesão ocular (○). Em cinza está destacada a diluição que melhor discrimina os grupos com lesão (CL) e sem lesão ocular (SL), onde delta representa a diferença de PFP entre os grupos na diluição selecionada (A). Reatividade média e individual de IgG anti-*T. gondii* em soros de recém-nascidos não infectados (NI), de recém-nascidos com toxoplasmose congênita sem lesão ocular (SL) e de recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentando diferentes formas de retinocoroidite: retinocoroidite ativa (RA), retinocoroidite ativa e cicatricial (RAC) e retinocoroidite cicatricial (RC) (B). As letras a, b, c e representam a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao NI, SL e RA, respectivamente.

4.2 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE SUBCLASSES DE IgG ANTI-*Toxoplasma gondii* EM SOROS DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA APRESENTANDO DIFERENTES FORMAS DE RETINOCOROIDITE

Utilizando a mesma estratégia aplicada na pesquisa de anticorpos IgG, inicialmente foi necessário estabelecer a diluição do soro a ser utilizada na pesquisa das diferentes subclasses de IgG anti-*T. gondii*. Para isso, um gráfico foi construído com a média das reatividades dos anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita sem lesão ocular (SL) e soros de recém-nascidos com

lesão ocular (CL). A partir deste gráfico foi selecionada a diluição que melhor discriminou o grupo CL do grupo SL (Figura 6).

Os resultados mostraram que a diluição que melhor discriminou os grupos CL e SL para a pesquisa de anticorpos IgG1 foi 1:2.048.000, para IgG2 foi 1:4000, para IgG3 foi 1:16.000 e para IgG4 foi 1:500.

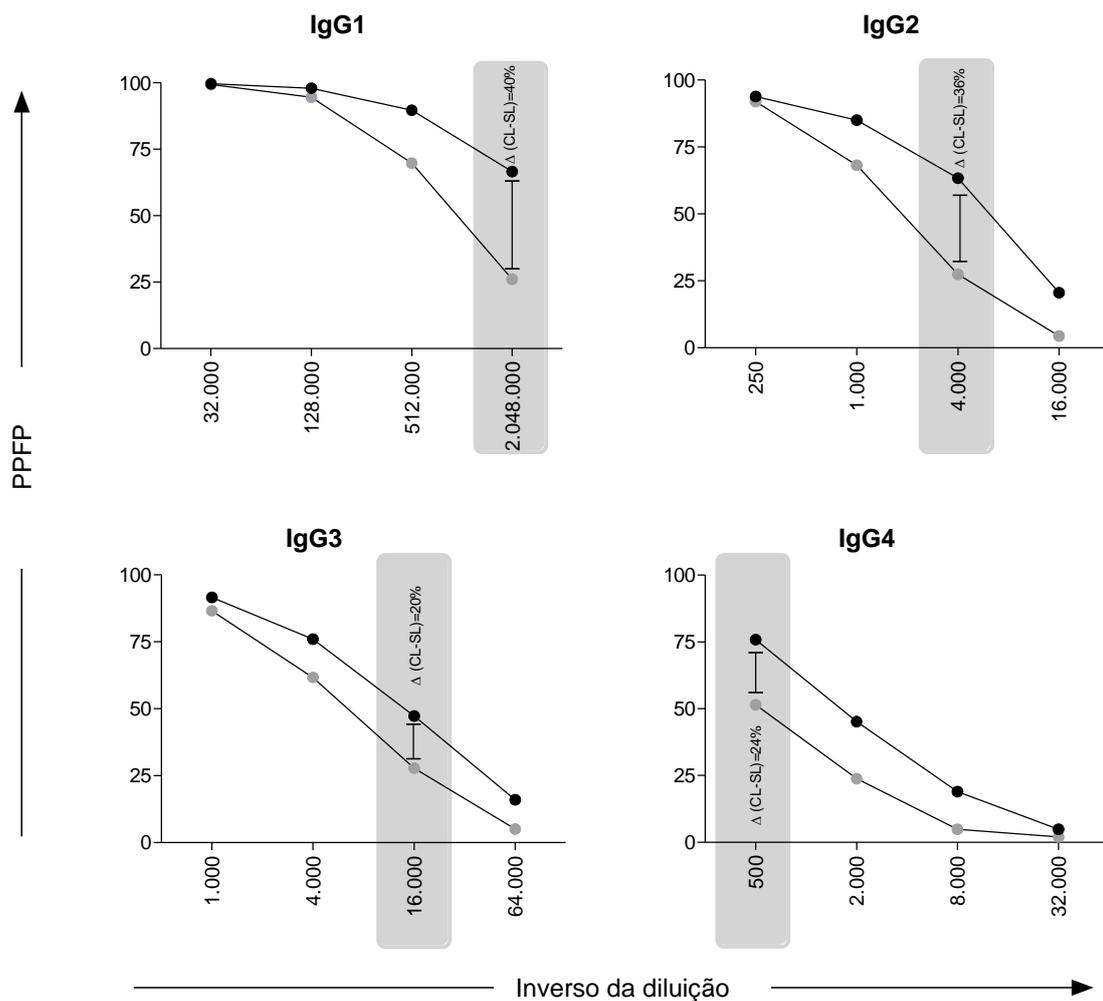


Figura 7. Reatividade média de subclasses de IgG anti-*T. gondii* em soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita com lesão ocular (●) e sem lesão ocular (○). Em cinza está destacada a diluição que melhor discrimina os grupos com lesão (CL) e sem lesão ocular (SL), onde delta representa a diferença de PPFP entre os grupos na diluição selecionada.

A Figura 7 mostra a reatividade média e individual das subclasses de IgG anti-*T. gondii* em soros de recém-nascidos do grupo SL e de recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentado diferentes formas de retinocoroidite: RA, RAC e RC e soros de

recém-nascidos do grupo NI. Os resultados mostraram que recém-nascidos com toxoplasmose congênita com lesão ocular independente da forma de retinocoroidite apresentam maior reatividade de IgG1 em relação aos recém-nascidos do grupo NI. Entre os recém-nascidos com toxoplasmose congênita foi observado que o grupo RAC e RC apresentam maior reatividade de IgG1 quando comparados ao grupo SL. Além disso, foi observado que o grupo RAC apresenta maior reatividade de IgG1 que o grupo RA.

Com relação à pesquisa de IgG2, os resultados mostraram que recém-nascidos dos grupos RAC e RC apresentam maior reatividade em relação ao grupo NI e SL.

Resultados semelhantes aos de IgG2 foram observados quando avaliada a reatividade de IgG3 em soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita em relação ao grupo NI, ou seja, os recém-nascidos dos grupos RAC e RC apresentam maior reatividade quando comparados ao grupo NI. Entretanto, quando avaliados apenas os recém-nascidos com toxoplasmose congênita, apenas o grupo RAC apresentou maior reatividade de IgG3 quando comparado ao grupo SL.

Na análise de IgG4 foi observado um padrão diferente de reatividade quando comparado às outras subclasses, uma vez que o grupo NI apresentou maior reatividade de IgG4 com relação ao grupo SL e RAC. Com relação apenas aos recém-nascidos com toxoplasmose congênita foi observado que os grupos RA e RC apresentaram maior reatividade de IgG4 que o grupo SL e o RAC apresentou menor reatividade de IgG4 comparado ao grupo RA.

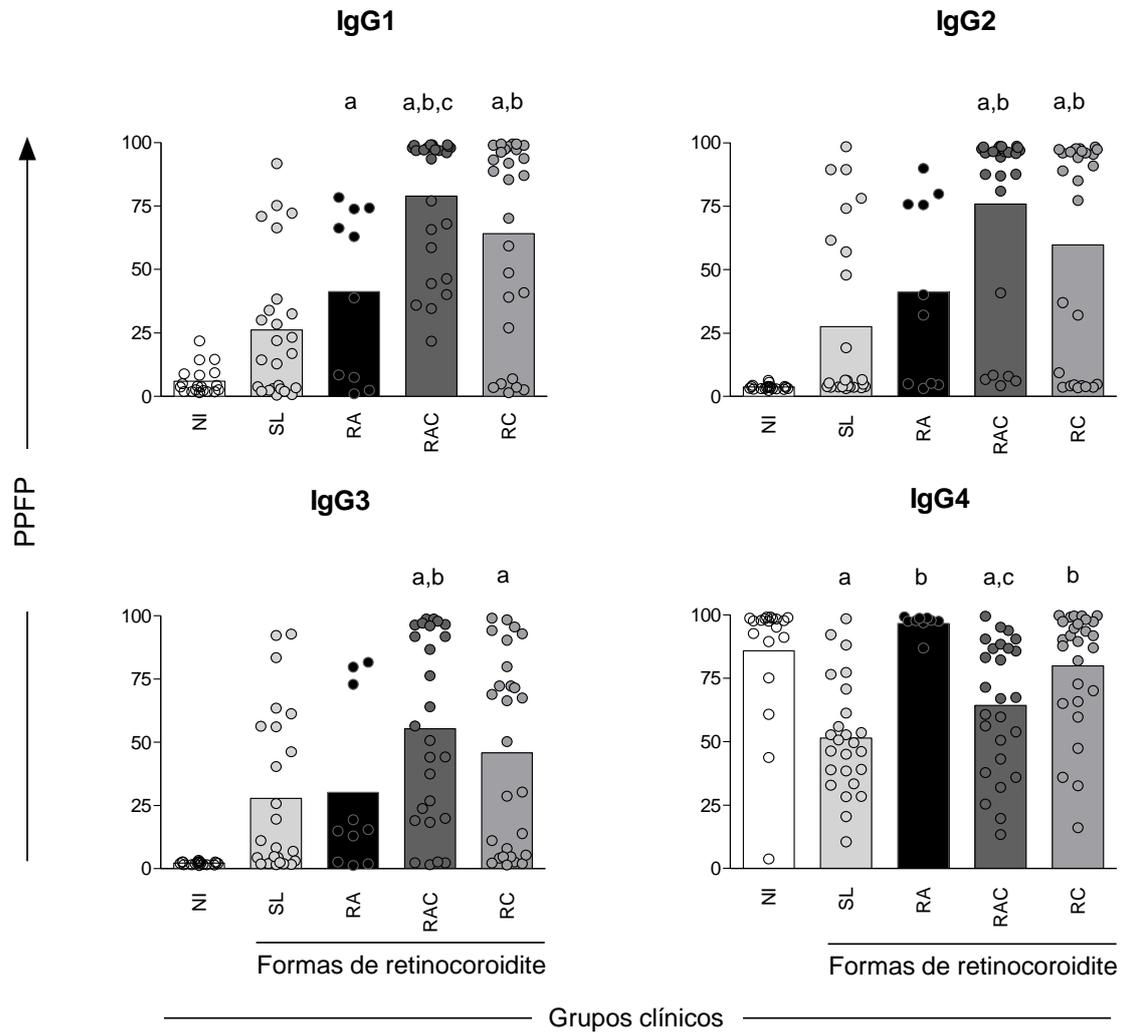


Figura 8. Reatividade média e individual de subclasses de IgG anti-*T. gondii* em soros de recém-nascidos não infectados (NI), de recém-nascidos com toxoplasmose congênita sem lesão ocular (SL) e de recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentado diferentes formas de retinocoroidite: retinocoroidite ativa (RA), retinocoroidite ativa e cicatricial (RAC) e retinocoroidite cicatricial (RC). As letras a, b, c e representam a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao NI, SL e RA, respectivamente.

4.3 ANÁLISE CATEGÓRICA DE RECÉM-NASCIDOS COM ALTA E BAIXA REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii*

Durante a análise da reatividade individual para IgG e suas subclasses (Figura 7) foi observado que alguns pacientes apresentavam reatividades muito distintas da reatividade média dos demais recém-nascidos do mesmo grupo. Portanto, na tentativa de avaliar se essa diferença de reatividade poderia ser utilizada para discriminar os grupos de pacientes de acordo com o tipo de lesão ocular foi realizada uma avaliação da porcentagem de indivíduos com toxoplasmose congênita que apresentavam reatividade acima da média para IgG e suas subclasses (indivíduos com altos níveis de anticorpos) (Figura 8). Da mesma forma que as demais análises, os dados obtidos foram comparados aos dos grupos de pacientes com toxoplasmose mas sem lesão ocular e de recém-nascidos não infectados porém com IgG positiva para *T. gondii*.

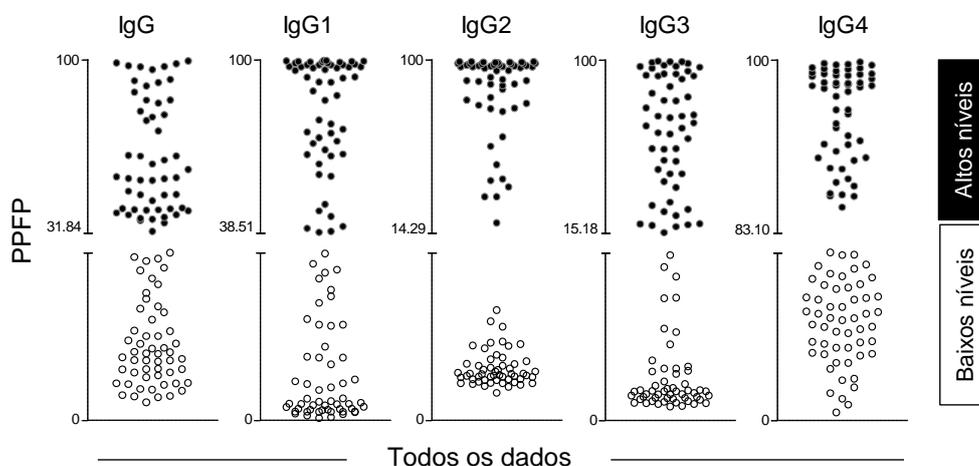


Figura 9. Gráfico de média de reatividade de anticorpos IgG e subclasses anti-*T. gondii* obtida utilizando soros de recém-nascidos com ou sem toxoplasmose congênita. A média de reatividade foi calculada através da média de PPFP para cada anticorpo utilizando todas as amostras testadas.

Foram considerados recém-nascidos com alta reatividade de anticorpos aqueles que apresentaram PPFP acima da média de reatividade para cada anticorpo dentre todos os recém-nascidos avaliados. Além disso, foi considerado significativo apenas quando 50% ou mais dos indivíduos apresentavam alta reatividade (Figura 9).

Com base nesses parâmetros foi observado que no grupo NI apenas para IgG4 há mais de 50% de recém-nascidos altamente reativos (79%).

Para o grupo SL não foram observados recém-nascidos com altos níveis de reatividade para nenhum dos anticorpos avaliados.

Já para os grupos com toxoplasmose congênita e lesão ocular foi observado que 60% dos recém-nascidos do grupo RA apresentaram alta reatividade para IgG total, IgG1 e IgG2. Por outro lado, 100% dos recém-nascidos pertencentes a esse grupo demonstraram-se altamente reativos para IgG4.

No grupo RAC 80% dos recém nascidos apresentaram alta reatividade para IgG total, 88% para IgG1, 81% para IgG2 e 85% para IgG3 demonstrando ser esse grupo o que apresentava um maior número de indivíduos com altos níveis de todos os anticorpos, com exceção de IgG4.

Avaliando o grupo de recém-nascidos com lesão ocular do tipo RC, foi observado que 64% dos recém-nascidos apresentaram alta reatividade para IgG total, 71% para IgG1, 64% para IgG2, 57% para IgG3 e 61% para IgG4. O grupo RC também apresentou um grande número de indivíduos com altos níveis de anticorpos, embora em menores porcentagens que o grupo RAC.

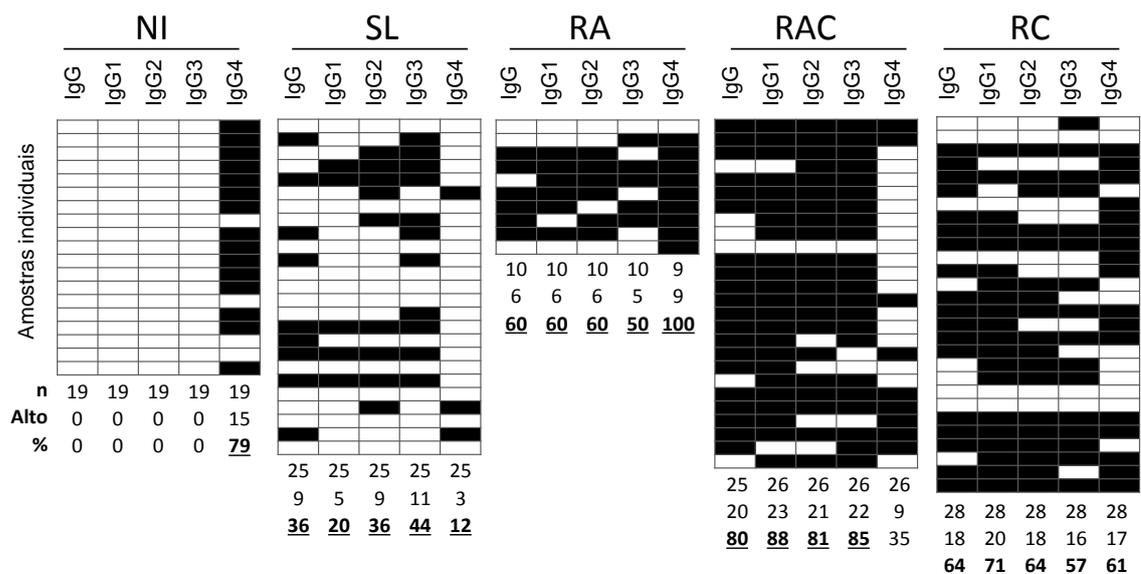


Figura 10. Análise categórica da reatividade de IgG anti-*T. gondii* e suas subclasses em recém-nascidos não infectados (NI), recém-nascidos com toxoplasmose congênita sem lesão ocular (SL) e em recém-nascidos com toxoplasmose congênita

apresentando diferentes formas de retinocoroidite: retinocoroidite ativa (RA), retinocoroidite ativa e cicatricial (RAC) e retinocoroidite cicatricial (RC). O tamanho da amostra de cada grupo (n), o total e a porcentagem (%) de indivíduos alto produtores de anticorpos (■) estão representados abaixo dos diagramas. Porcentagem acima de 50% foi destacada em cada grupo de lesão ocular.

Uma vez realizada a análise categórica dos recém-nascidos de acordo com a reatividade para IgG e as diferentes subclasses, foi avaliada em ordem crescente a porcentagem de indivíduos altamente reativos para os anticorpos em cada grupo. Esta análise foi realizada com o objetivo de determinar se havia algum anticorpo capaz de discriminar as diferentes formas de retinocoroidite (Figura 10). A análise dos dados revelou que IgG1 foi a única subclasse capaz de diferenciar os grupos NI, SL dos grupos RAC e RC. Os grupos NI e SL apresentam baixa porcentagem de indivíduos com alta reatividade de IgG1 anti-*T. gondii*, enquanto os grupos RAC e RC apresentam alta porcentagem de indivíduos com alta reatividade de IgG1. Já o grupo RA apresenta uma porcentagem intermediária de indivíduos altamente reativos para IgG1 em relação aos grupos RAC e RC.

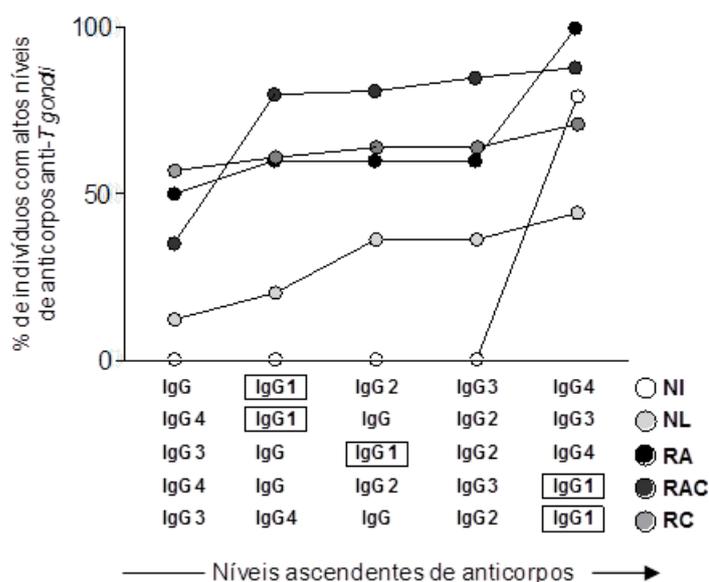


Figura 11. Níveis ascendentes de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e suas subclasses em recém-nascidos não infectados (NI), recém-nascidos com toxoplasmose congênita sem lesão ocular (SL) e em recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentando diferentes formas de retinocoroidite: retinocoroidite ativa (RA), retinocoroidite ativa e cicatricial (RAC) e retinocoroidite cicatricial (RC). Os dados estão representados como a porcentagem de indivíduos com altos níveis de anticorpos anti-*T. gondii*.

4.4 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE AVIDEZ DE IgG ANTI-*Toxoplasma gondii* EM SOROS DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA APRESENTANDO DIFERENTES FORMAS DE RETINOCOROIDITE

Uma vez que já foi demonstrada a possível correlação entre lesões oculares devido à toxoplasmose e a alta avidéz de IgG (SURESH *et al*, 2012), avaliou-se o índice de avidéz (IA) de IgG anti-*T. gondii* nos soros dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita de diferentes formas de retinocoroidite.

Para o cálculo do índice de avidéz, selecionou-se para cada paciente a última diluição do soro cujo PFP foi igual ou maior que 30% definida através do experimento sem uréia (SILVA-DOS-SANTOS *et al*, 2012).

A Figura 11 mostra os resultados do índice de avidéz de IgG anti-*T. gondii* obtidos de soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita com diferentes lesões oculares além de pacientes não infectados. Foi possível observar que os recém-nascidos não infectados apresentam maior índice de avidéz de IgG que os recém-nascidos infectados independente da forma de retinocoroidite, contudo não foi possível estabelecer um critério de diferenciação dos indivíduos infectados avaliando o índice de avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

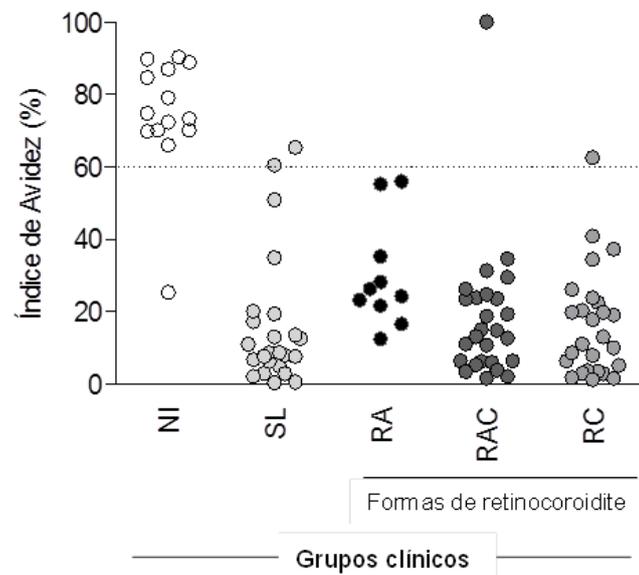


Figura 12. Índice de avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em soros de recém-nascidos não infectados (NI), de recém-nascidos com toxoplasmose congênita sem lesão ocular (SL) e de recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentando diferentes formas de retinocoroidite: retinocoroidite ativa (RA), retinocoroidite ativa e cicatricial (RAC) e retinocoroidite cicatricial (RC). Foi considerado um índice de avidéz alto aquele maior que 60% (SILVA-DOS-SANTOS *et al*, 2012).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A toxoplasmose é uma doença que pode permanecer assintomática por toda a vida do indivíduo, entretanto, a retinocoroidite é a manifestação clínica mais frequente na toxoplasmose congênita. Devido à gravidade das lesões oculares que podem até levar a perda completa da visão, a detecção precoce da toxoplasmose congênita e da lesão ocular são essenciais para o tratamento.

A presença de lesões oculares ativas, ativas e cicatriciais ou cicatriciais nos recém-nascidos avaliados neste estudo pode ser consequência de vários fatores dentre os quais a virulência do parasito, a suscetibilidade individual do hospedeiro bem como a resposta imune específica ao *T. gondii* podem ser citados. Entretanto, a hipótese de que a infecção com parasitos de diferentes virulências ou genótipos levaria a diferentes manifestações oculares não foi confirmada por Carneiro *et al* (2013) ao avaliar este mesmo grupo de recém-nascidos.

Outra possibilidade é que o tempo de infecção possa ter um impacto no desenvolvimento dos diferentes tipos de retinocoroidite observada nesses recém-nascidos. Porém, os recém-nascidos avaliados nesse estudo foram selecionados por meio de um programa de investigação de toxoplasmose congênita em neonatos, logo nenhuma informação sobre a idade gestacional em que a infecção ocorreu estava disponível.

Com relação ao papel da resposta imune no desenvolvimento das lesões oculares, a maioria dos estudos tem avaliado pacientes adultos com lesão ocular sugestiva de serem causadas pelo *T. gondii*, sendo raros os estudos de crianças com toxoplasmose congênita e lesão ocular.

Portanto, em busca de indicadores para as diferentes manifestações da retinocoroidite causada pela toxoplasmose congênita, avaliamos inicialmente o perfil de anticorpos IgG total anti-*T. gondii* nos soros de recém-nascidos com toxoplasmose congênita. Observamos que os recém-nascidos com as formas de lesão RAC e RC apresentam mais alta reatividade para anticorpos IgG quando comparados aos grupos SL e RA. Considerando que a lesão do tipo RAC pode ser uma lesão em processo de cicatrização, podemos supor que o alto nível de anticorpos específicos estaria contribuindo para a formação de cistos, portanto para a cicatrização da lesão.

Em 2012, de-Souza-e-Silva analisou as mesmas amostras de soros de recém-nascidos do nosso estudo porém utilizando a técnica de ELISA com antígenos anti-rMIC3. Diferente do nosso trabalho, observaram que recém-nascidos com toxoplasmose congênita porém sem lesões oculares possuem maior probabilidade de apresentarem IgG total anti-rMIC3 quando comparados a recém-nascidos com lesões ativas ou cicatriciais. Esta divergência entre os estudos pode ser explicada pela diferença de sensibilidade e especificidade entre as técnicas avaliadas. Para o nosso estudo, optamos pela citometria de fluxo pois já demonstrou ser mais sensível e específica para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (SILVA-DOS-SANTOS, 2012)

Uma vez que houve diferença no perfil dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* entre os diferentes grupos avaliados passamos a estudar a reatividade das diferentes subclasses de IgG.

De uma forma geral, os resultados demonstraram que na toxoplasmose congênita há produção de anticorpos IgG1>IgG3>IgG2>IgG4, sendo a doença portanto caracterizada pela maior produção de IgG1 e IgG3. Observamos também que indivíduos com lesão ocular apresentam maiores níveis de anticorpos do que indivíduos sem lesão ocular.

A análise dos dados revelou que pacientes do grupo RAC e RC foram os que apresentaram maior nível de anticorpos principalmente da subclasse IgG1 e IgG3. Anticorpos IgG1 e IgG3 são importantes ativadores do sistema complemento, iniciando uma resposta imune rápida contra o parasito. Uma vez ativado, o sistema do complemento auxilia na resolução da infecção, neste caso, na formação dos cistos e cicatrização das lesões. Com base nesta análise é possível supor que recém-nascidos que produzem mais anticorpos IgG1 e IgG3 são capazes de resolver a infecção de forma mais eficiente. Portanto, esta poderia ser uma explicação para que pacientes com lesões cicatriciais seja RAC ou RC apresentem maior reatividade para esses anticorpos.

Costa e colaboradores em 2013 analisando as mesmas amostras utilizadas em nosso estudo, porém utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR) observaram que a maioria dos recém-nascidos com lesões oculares apresentaram resultado positivo para qPCR enquanto que a maioria das crianças sem lesão retinocoroidal foram negativas. Ainda neste estudo, a maioria dos recém-nascidos com lesão ativa apresentaram qPCR positivo. Segundo o autor, a alta positividade observada para os

pacientes avaliados sugere que a carga parasitária pode estar associada a lesões ativas. Além disso, pacientes com lesão do tipo RAC e RC apresentaram menor positividade para qPCR do que pacientes RA.

Em nosso estudo, menos de 50% dos indivíduos do grupo SL apresentam-se altamente reativos para qualquer um dos anticorpos. Considerando os resultados de Costa e colaboradores (2013), podemos pensar que a ausência de lesão ocular no momento da avaliação oftalmológica associada à baixa reatividade de anticorpos encontrada pode estar relacionada a baixa carga parasitária dos indivíduos do grupo SL, retardando o surgimento da lesão ocular.

Seguindo o mesmo raciocínio, para o grupo RA a baixa reatividade de anticorpos pode permitir a manutenção da alta carga parasitária de desta forma a resolução mais lenta da lesão mantendo-se ativa. Já para RAC e RC, a alta reatividade de anticorpos IgG1 e IgG3 com consequente ativação do sistema complemento pode permitir a redução da carga parasitária e controle da multiplicação do parasito no olho e dessa forma, a cicatrização da lesão.

Além da eliminação do parasito através da ativação do complemento pelos anticorpos IgG1 e IgG3, o *T. gondii* pode ser combatido ou controlado pela ação da resposta imune do tipo Th1 (YAMAMOTO *et al*, 2000). As células Th1 produzem preferencialmente citocinas como IFN- γ que já demonstrou ser uma das principais moléculas produzidas durante a toxoplasmose ocular desempenhando um papel essencial no controle da infecção pelo *T. gondii*. (KIKUMURA, 2012). Ainda demonstrando a importância do IFN- γ , a deficiência dessa molécula está relacionada a alta carga parasitária no olho causando extensas lesões de retina durante a toxoplasmose ocular (NOROSE, 2005). Uma vez que um dos papéis do IFN- γ é induzir a mudança de isotipo de anticorpos IgG para IgG1 e IgG3, em nosso estudo podemos supor que a presença de maior reatividade desses anticorpos nas lesões do tipo RAC e RC pode estar relacionada a ativação da resposta Th1 que combate o parasito levando à formação de cistos e cicatrização da lesão.

Em nosso estudo, foi observado que 100% dos pacientes com lesão ativa apresentam alta reatividade para anticorpos IgG4 anti-*T. gondii*. De fato, anticorpos IgG4 estão relacionados a uma resposta imune do tipo Th2, ou seja, ligados a uma resposta antiinflamatória com maior dificuldade de formar cistos de parasitos e de resolução da infecção. Segundo de-la-Torre (2014), a resposta Th2 está relacionada a

características clínicas mais graves de lesões nos pacientes, dessa forma, pacientes com maior produção deste anticorpos podem ter maior dificuldade na resolução da infecção, podendo este ser o caso dos pacientes com lesão ativa avaliados em nosso estudo.

De forma semelhante, de-Souza-e-Silva (2012) observaram que IgG4 anti-MICr3 estão associados a lesões retinocoroidais em adultos. Neste estudo, foi observado que recém-nascidos com lesões do tipo RA são mais frequentemente positivos para IgG4 anti-MICr3 do que recém-nascidos sem lesão ocular sugerindo que IgG4 não possui papel protetor contra a lesão ocular por *T.gondii*. Entretanto, de-Souza-e-Silva (2012) também encontrou esta mesma situação para as lesões RAC e RC, diferente de nosso estudo.

Anticorpos IgG2 anti-*T. gondii* também foram avaliados em nosso estudo. Foi observado que os grupos de pacientes com lesão ocular apresentam maior reatividade para anticorpos IgG2 anti-*T.gondii* enquanto que os pacientes SL possuem baixa reatividade para este anticorpo comparado aos outros grupos. Semelhante a este achado, de-Souza-e-Silva (2012) encontrou que a presença de anticorpos IgG2 anti-MICr3 pode estar associada a lesões RA e RAC pois estes grupos de recém-nascidos são mais frequentemente positivos para IgG2 do que os indivíduos do grupo SL.

Uma vez avaliado o perfil de reatividade de anticorpos IgG e suas subclasses foi construído um gráfico que demonstra os níveis ascendentes de indivíduos com alta reatividade de anticorpos anti-*T. gondii*. A análise dos dados revelou claramente que o anticorpo que apresentou maior capacidade de diferenciação entre os grupos foi o IgG1. Recém-nascidos dos grupos NI e SL apresentam baixa reatividade para IgG1 comparado ao grupo RAC e RC. Entretanto, recém-nascidos do grupo RA apresentam reatividade entre os grupos NI/SL e RAC/RC.

Ainda na tentativa de encontrar um indicador para diferenciar as diferentes formas de lesões oculares, avaliamos a avidéz de IgG. Entretanto, em nosso estudo não foi possível diferenciar as formas de lesões oculares utilizando a avidéz de IgG. Pacientes não infectados possuem em sua maioria índice de avidéz de IgG elevado, provavelmente por herdarem estes anticorpos de alta avidéz da mãe. Já os infectados, independente da forma de retinocoroidite e até mesmo os sem lesão ocular, na maioria dos casos apresentam-se com baixa avidéz.

Em resumo nossos dados demonstraram que recém-nascidos com toxoplasmose ocular em fase de cicatrização apresentam maior nível de anticorpos, principalmente da subclasse IgG1 e IgG3 em relação aos recém-nascidos com lesão ativa. Além disso, foi possível sugerir que anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* detectados por citometria de fluxo podem ser usados como um indicador laboratorial auxiliar para diferenciar recém-nascidos com lesão ocular em fase de cicatrização.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, foi possível concluir que:

- Recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentaram maior reatividade para anticorpos IgG total e subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 anti-*T. gondii* comparados a recém-nascidos não infectados.
- Recém-nascidos com toxoplasmose congênita com lesão ocular do tipo ativa e cicatricial (RAC) e cicatricial (RC) apresentaram maior reatividade para os anticorpos IgG total e subclasses IgG1, IgG2 e IgG3 do que recém-nascidos com lesões oculares ativas (RA) ou sem lesão ocular (SL).
- A subclasse de anticorpos IgG4 apresentou um perfil de reatividade diferente dos demais anticorpos estando mais elevado para pacientes do grupo de lesões ativas (RA) seguido do grupo não infectado (NI).
- No grupo sem lesão (SL) não foram observados recém-nascidos com altos níveis de reatividade para nenhum dos anticorpos avaliados.
- A análise categórica dos dados revelou que IgG1 foi a única subclasse capaz de diferenciar os grupos não infectado (NI), sem lesão (SL) dos grupos de lesão ativa e cicatricial (RAC) e cicatricial (RC). Entretanto, os pacientes do grupo de lesões ativas (RA) não podem ser diferenciados dos demais grupos através desta análise.
- Não foi possível estabelecer um critério de diferenciação dos indivíduos infectados avaliando o índice de avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.
- A citometria de fluxo demonstrou ser um método laboratorial complementar para ser utilizado como indicador das diferentes lesões na retinocoroidite causada pela toxoplasmose congênita.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Ajzenberg, D. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*, **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1185–1196, 2004
- Atmaca, L. S.; Simsek, T.; Batioglu, F. Clinical features and prognosis in ocular toxoplasmosis. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 48, n.4, p. 386-91 Jul-Aug, 2004.
- Bahia-Oliveira, L. M. G. *et al.* Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State. **Brazil Emerging Infectious Disease**, v. 9, p. 55–62, 2003.
- Bloch-Michel, E.; Nussenblatt, R. B. International Uveitis Study Group recommendations for the evaluation of intraocular inflammatory disease. **American Journal of Ophthalmology**, v. 103, n. 2, p. 234-5, Feb, 1987.
- Butler, N. J. *et al.* Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 41, p. 95–108, 2013.
- Carneiro, A. C. *et al.* Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 901-7, Jan, 2013.
- CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. Toxoplasmosis: Biology. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>>. Acesso em: 28 set. 2014.
- Commodaro, A. *et al.* Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 345-350, March, 2009.
- Costa, J. G. *et al.* Real-time PCR as a prognostic tool for human congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2766-8, Jun, 2013.
- de-la-Torre, A. *et al.* Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. **Cytokine**, v. 68, n. 1, p. 23-31, 2014.
- Dubey, J. P. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. ed. 2. Flórida: CRC Press, Boca Raton, 2010.
- Dubey, J. P. *et al.* A review of toxoplasmosis in humans and animals in Ethiopia. **Epidemiology & Infection**, v. 140, n. 11, p. 1935-8, Jul, 2012.
- 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**, v. 11, p. 267–299, Apr, 1998.

- Errera, M. H. *et al.* Real-time polymerase chain reaction and intraocular antibody production for the diagnosis of viral versus toxoplasmic infectious posterior uveitis. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 249, n. 12, p. 1837-46, Dec, 2011.
- Filisetti, D. & Candolfi, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.
- Frenkel, J. K.; Dubey, J. P. and Miller, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: faecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, p. 893–896, 1970.
- Furtado, J. M. *at al.* *Toxoplasma gondii* Tachyzoites Cross Retinal Endothelium Assisted by Intercellular Adhesion Molecule-1 *In Vitro*. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 912–915, October, 2012.
- Furtado, J. M. *et al.* Migration of *Toxoplasma gondii* Infected Dendritic Cells across Human Retinal Vascular Endothelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 11, p. 6856–6862, October, 2012.
- Garweg, J. G. Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis. **Parasite Immunology**, v. 27, p. 61–68, 2005.
- Garweg, J. G. *et al.* Aqueous humor and serum immunoblotting for immunoglobulin types G, A, M, and E in cases of human ocular toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4593-8, Oct, 2004.
- Garweg, J. G.; Candolfi, E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 211-20, Mar, 2009.
- Gilbert, R. E. *et al.* Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. 277, 2008.
- Goldenberg, D. *et al.* Vitreal, retinal, and choroidal findings in active and scarred toxoplasmosis lesions: a prospective study by spectral-domain optical coherence tomography. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 251, n.8, p. 2037-45, Apr, 2013.
- Haddad, M. A. *et al.* Causes of visual impairment in children: a study of 3,210 cases. **Journal of Pediatric Ophthalmology and Strabismus**, v. 44, n. 4, p. 232-40, Jul-Aug, 2007.
- Hegab, S. M.; Al-Mutawa, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical Experimental Medicine**, v. 3, n. 2, p. 84-105, Sep, 2003.
- Hill, D.; Dubey, J. P.; *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634-40, Oct, 2002.
- Holland, G. N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part 2: disease manifestations and management. **American Journal of Ophthalmology**, v. 37, p. 1–17, 2004.

- Kikumura, A.; Ishikawa, T.; Norose, K. Kinetic analysis of cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in murine ocular toxoplasmosis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 96, n. 9, p. 1259-67, Jul, 2012.
- Kravetz, J. D. & Federman, D. G. Prevention of toxoplasmosis in pregnancy: Knowledge of risk factors. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 13, n. 3, p. 161–165, Sept, 2005.
- Lehmann, T. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 11423–11428, 2006.
- Lu, F.; Huang, S.; Kasper, L. H. CD4+ T cells in the pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v.72, n. 9, p. 4966-72, Sep, 2004.
- Lynch, L. F. *et al.* Ocular toxoplasmosis: evaluation of lacrimal-specific secretory IgA levels in both patients with active and inactive phases of the disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 625-8, Aug, 2011.
- Melamed, J.; *et al.* Ocular manifestations of congenital toxoplasmosis. **Eye**, v. 24, n. 4, p. 528-34, Apr, 2010.
- Montoya, J. G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 12, p. 1965-76, Jun, 2004.
- Norose, K. *et al.* Deterioration of visual function as examined by electroretinograms in *Toxoplasma gondii*-infected IFN-g-knockout mice. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, p. 317-21, 2005.
- Oréfice, F.; Bahia-Oliveira, L. M. G. Toxoplasmose. In: Oréfice F. editor. Uveíte Clínica e Cirúrgica. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2005.
- Papadia, M.; Aldigeri, R.; Herbort, C. P. The role of serology in active ocular toxoplasmosis. **International Ophthalmology**, v. 31, n. 6, p. 461-5, Jan, 2012.
- Paul, M. Potential risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cases with recently acquired toxoplasmosis. **Przegląd Epidemiologiczny**, v. 52, n. 447±54, 1998.
- Remington, J. S.; Gentry, L. O. Acquired toxoplasmosis: infection versus diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 174, n. 2, p. 1006-17, Oct, 1970.
- Remington, J. S. *et al.* Toxoplasmosis. Infectious diseases of fetus and newborn infant. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.
- Robert-Gangneux, F.; Dardé, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 264-96, Apr, 2012.
- Rodrigues, I. M. *et al.* Congenital toxoplasmosis: evaluation of serological methods for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgM and IgA antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 434-40, May, 2009.

Silva-dos-Santos, P. P. *et al.* Flow cytometry-based algorithm to analyze the anti-fixed *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunological Methods**, v. 378, p. 33–43, 2012.

Smith, J. R.; Cunningham, E. T. Jr. Atypical presentations of ocular toxoplasmosis. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 13, p. 387–392, 2002.

Soares, J. A. *et al.* Ocular findings in children with congenital toxoplasmosis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 74, n. 4, p. 255-7, Jul-Aug, 2011.

de Souza-e-Silva, C. H. *et al.* Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Disease**, v. 32, n. 1, p. 13-6, Jan, 2013

Suresh, S. *et al.* Serological IgG avidity test for ocular toxoplasmosis. **Clinical Ophthalmology**, v. 6, p. 147-50, Jan, 2012.

Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R.; Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217±1258, 2000.

Vasconcelos-Santos, D. V. *et al.* Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology**, v. 116, n. 11, p. 2199-205, Sep, 2009.

Vasconcelos-Santos, D. V. Ocular manifestations of systemic disease: toxoplasmosis. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 23, p. 543–550, 2012.

Yamamoto, J. H. *et al.* Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. **Journal of Infectious Disease**, v. 181, n 6, p. 2018-22, Jun, 2000.