

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECTOLOGIA E MEDICINA
TROPICAL

**RETINOCOROIDITE TOXOPLÁSMICA
PRESUMIDA ATIVA: PARÂMETROS
CLÍNICOS E AVALIAÇÃO DA
EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA DOS
MONÓCITOS CD14⁺**

Vinícius Monteiro Castro

Belo Horizonte
Julho - 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECTOLOGIA E MEDICINA
TROPICAL

RETINOCOROIDITE TOXOPLÁSMICA PRESUMIDA ATIVA: PARÂMETROS CLÍNICOS E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA DOS MONÓCITOS CD14⁺

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Oréfice
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cynthia Azeredo Cordeiro

Aluno: Vinícius Monteiro Castro

Belo Horizonte
Julho - 2012

C355r Castro, Vinícius Monteiro de.
Retinocoroidite toxoplásmica presumida ativa [manuscrito]:
parâmetros clínicos e avaliação da expressão imunofenotípica dos
monócitos CD14+. / Vinícius Monteiro de Castro. -- Belo Horizonte:
2012.
143f.: il.
Orientador: Fernando Oréfice.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Monócitos. 2. Tomografia de Coerência Óptica. 3. Angiografia. 4.
Citocinas. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Oréfice, Fernando. II.
Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM : WH 200

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora

Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação

Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Prof^a. Anelise Impelziere Nogueira

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:

Infectologia e Medicina Tropical

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior

Sub-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Infectologia e Medicina Tropical

Manoel Otávio da Costa Rocha (Titular)

Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (Suplente)

Vandack Alencar Nobre Júnior (Titular)

Ricardo de Amorim Correa (Suplente)

Antônio Luiz Pinho Ribeiro (Titular)

Maria do Carmo Pereira Nunes (Suplente)

Denise Utsch Gonçalves (Titular)

Fabiana Simão Machado (Suplente)

Antônio Lúcio Teixeira Júnior (Titular)

Mariângela Carneiro (Suplente)

Antônio Vaz de Macedo (Disc. Titular)

Gláucia Helena Martinho (Disc. Suplente)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Lucas e Vera, pois o carinho e a dedicação dispensados por eles me deram o exemplo como devo caminhar na vida.

Dedico também a minha grandiosa esposa, Maria Alice, pois sempre vi em seu silencioso olhar o apoio para seguir este árduo caminho.

Agradecimentos

Início este item da dissertação fazendo comentários. Ele foi o último a ser escrito, acreditando que seria de fácil execução. Doce engano! Talvez se portasse uma memória genial como a do meu pai, ou se fosse um memorialista como Pedro Nava, não cometeria tantas injustiças por esquecer de pessoas importantes para a conclusão deste trabalho. Perdoem-me aqueles que aqui não foram citados, mas com certeza absoluta contribuíram direta ou indiretamente para este feito!

As pessoas estão citadas numa ordem, mas não se enganem, os sentimentos não respeitam *status* ou qualquer linearidade cronológica, todas fazem parte da minha vida, cada uma compondo um retalho da minha colcha.

Ao meu **Prof. Dr. Fernando Oréfice**, tenho tanto a lhe agradecer, pois ao me receber, não apenas em seu grandioso serviço, mas praticamente no seu núcleo familiar, proporcionou-me a possibilidade de conhecer um novo mundo composto de pessoas maravilhosas.

Prof^a. Dr^a. Cynthia Azeredo Cordeiro, você foi a idealizadora deste trabalho, e cumpriu até o fim sua missão, demonstrando ser uma professora nata.

Prof^a. Dr^a. Érica Leandro Marciano, apenas você sabe o peso da minha gratidão pelo que fez por mim. E mais ainda, por ter feito de coração.

Prof^a. Dr^a. Juliana Lambert Oréfice e Prof. Dr. Rogério Alves Costa, vocês não mediram esforços para a execução deste trabalho, e sempre estiveram presentes para ensinar. Recordo como em simples palavras o Prof. Rogério conseguiu explicar a tão incompreensível *remodelação vascular*.

Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira, você acreditou em mim, e sempre obtive o seu apoio. Meus mais profundos sentimentos.

Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, juro que tentei absorver ao máximo seus ensinamentos, e tentarei repassá-los para aqueles que estiverem ao meu redor.

Prof. Dr. Wesley Ribeiro Campos, obrigado pelo apoio.

Rodrigo Junio, tenho as recordações dos bons momentos de descontração juntamente com a Érica, tomando nosso *chá das 5* às 4 horas da tarde na Faculdade de Farmácia.

Thais Bessa, por muitas vezes você me tranquilizou, tenho você como uma amiga.

Bernadete, Denimara e Harley, vocês estão muito além do que simplesmente terem participado deste trabalho, agradeço suas amizade e carinho.

Leila, obrigado pelo seu carinho (e cafezinhos, é claro!).

Victório Vinceguerra Neto, pessoa disponível, caprichoso, tentei absorver um pouco da sua personalidade. Espero que por isso não cobre direitos autorais.

Felipe, Karitas e Gisele, aprendemos juntos, e apesar do curto tempo de convívio, tenho vocês como amigos.

Xandão, você me mostra que nunca devemos desistir.

Vivi, Lili, não tenho muito a dizer a vocês duas. Vocês são as minhas princesas.

Silvéria, você sofreu por eu não ter horário para almoçar, mas foi para ter este resultado.

Paulo Roberto e Maria Lúcia, vocês são minha segunda família.

Aos Pacientes, são por vocês que escolhi este caminho. Muito obrigado!

Agradecimento Especial

Acácio da Ophthalmos®, sem a sua cooperação este trabalho não seria viável.

"Nenhum dever é mais importante do que a gratidão."
(Marco Túlio Cícero, Arpino, 3 de Janeiro de 106 a.C. - Formia, 7 de
Dezembro de 43 a.C.)

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS	XI
LISTAS DE TABELAS	XII
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 TOXOPLASMOSE.....	26
2.1.1 O Agente Etiológico.....	26
2.1.1.1 História	26
2.1.1.2 Toxoplasma gondii e Cepas.....	28
2.1.1.3 Ciclo de Vida e Transmissão.....	29
2.1.2 Epidemiologia.....	32
2.1.3 Manifestações Clínicas.....	33
2.1.3.1 Manifestações Sistêmicas da Infecção Aguda.....	33
2.1.3.2 Retinocoroidite Presumidamente Toxoplásmica.....	34
2.1.3.3 Complicações da Uveíte Toxoplásmica.....	36
2.1.4 Diagnóstico.....	36
2.1.4.1 Sorologia da Infecção do Toxoplasma gondii e PCR.....	37
2.1.4.2 Exames Complementares na Oftalmologia.....	38
2.1.5 Toxoplasmose Ocular: Congênita ou Adquirida?	39
2.1.6 Tratamento da Retinocoroidite Presumidamente Toxoplásmica.....	40
2.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	41
2.2.1 Imunidade Inata.....	41
2.2.2 Monócitos	42
2.2.3 Citocinas	43
2.2.3.1 Fator de Necrose Tumoral- α	44
2.2.3.2 Interleucina 12.....	45
2.2.3.3 Interleucina 6.....	46
2.2.3.4 Interleucina 10.....	46
2.2.4 Interação do Hospedeiro e Parasito.....	47
2.2.5 Resposta Imune na Toxoplasmose.....	48
2.2.5.1 Controle Imune na Infecção Aguda.....	49
2.2.5.2 Controle Imune na Infecção Crônica.....	49
2.2.5.3 Resposta Imune na Retinocoroidite Presumidamente Toxoplásmica.....	50
3. OBJETIVOS DO ESTUDO	53
3.1 OBJETIVO GERAL	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4. PACIENTES E MÉTODOS	55
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	56
4.2 PACIENTES E MÉTODOS.....	56
4.2.1 Pacientes	56
4.2.2 Exame Oftalmológico	58
4.2.3 Retinografia	60
4.2.4 Angiografia por Fluoresceína Sódica e por Indocianina Verde.....	61

4.2.5 Tomografia de Coerência Óptica	63
4.2.6 Imunofenotipagem dos Monócitos CD14 ⁺	64
4.2.6.1 Marcação de Superfície e Intracelular.....	66
4.2.6.2 Estratégia de análise.....	67
4.2.7 Análise Estatística	70
4.2.8 Cálculo do Tamanho Amostral	70
4.2.9 Aspectos Éticos	71
5. RESULTADOS	72
5.1 CARACTERÍSTICAS DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS.....	73
5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA RETINOCOROIDITE TOXOPLÁSMICA ATIVA	75
5.2.1 Análise Clínica e Biomicroscópica do Grupo RCT.....	75
5.2.2 Tamanho da Lesão Retinocoroidiana pela Retinografia	78
5.2.3 Características da Lesão Retinocoroidiana Avaliadas pela FA e ICGA....	79
5.2.4 Características das Lesões Retinocoroidianas Avaliadas pelo sOCT	81
5.3 AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DOS MONÓCITOS CD14⁺ DO SANGUE PERIFÉRICO NOS GRUPOS RCT E CONTROLES	83
5.3.1 Expressão do TNF- α nos Monócitos CD14 ⁺	83
5.3.2 Expressão da IL-12 nos Monócitos CD14 ⁺	85
5.3.3 Expressão da IL-6 nos Monócitos CD14 ⁺	88
5.3.4 Expressão de IL-10 nos Monócitos CD14 ⁺	89
5.4 CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE CITOCINAS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	92
6. DISCUSSÃO	94
6.1 DISCUSSÃO CLÍNICA	95
6.2 DISCUSSÃO IMUNOLÓGICA.....	100
6.3 CORRELAÇÃO CLÍNICA-IMUNE	103
6.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	104
6.5 PERSPECTIVAS	105
6.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
7. CONCLUSÕES	107
9. REFERÊNCIAS	109
10. ANEXOS	126
11. APÊNDICES	136

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Vias de transmissão da toxoplasmose..	31
Figura 2: Relação entre parasita e hospedeiro. (A) Equilíbrio entre parasita e hospedeiro. (B) Desequilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e as características do parasito, resultando na morte ou do hospedeiro ou do parasito.	48
Figura 3: Esquema da retina para localização das lesões retinocoroidianas.	59
Figura 4: Retinografia demonstrando a área da lesão retinocoroidiana (linha branca) próxima à lesão cicatrizada. (A) Antes do tratamento; (B) após o tratamento.	60
Figura 5: Angiografia por Indocianina Verde. (A) e (B) Antes do tratamento, nas fases intermediária e tardia; (C) e (D) após o tratamento, nas fases intermediária e tardia. Setas brancas: lesão retinocoroidiana; setas negras: infiltrados coroidianos.	62
Figura 6: Angiografia por Fluoresceína Sódica. (A) e (B) Antes do tratamento, nas fases intermediária e tardia; (C) e (D) após o tratamento, nas fases intermediária e tardia. Setas brancas: lesão retinocoroidiana; setas negras: flebite.	63
Figura 7: Tomografia de Coerência Óptica mensurando-se a altura e o <i>smudge</i> da lesão retinocoroidiana presumidamente toxoplásmica. (A) Antes do tratamento; (B) após o tratamento. Linha vertical vermelha: maior extensão em altura; linha horizontal amarela: maior extensão longitudinal (<i>smudge</i>).	64
Figura 8: Estratégia de análise para quantificar o percentual de células CD14 ⁺ que expressaram as citocinas TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-12 nas CMSP no Meio.	68
Figura 9: Estratégia de análise para quantificar o percentual de células CD14 ⁺ que expressaram as citocinas TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-12 nas CMSP com estímulo pelo STAg.	69

Figura 10: Relação do tamanho amostral com poder do teste. Análise da porcentagem de monócitos CD14 ⁺ que expressaram a citocina TNF- α obtidos sem e com estímulo pelo STAg.	71
Figura 11: Representação dos valores da Acuidade Visual do grupo com retinocoroidite toxoplásmica ativa antes e depois do tratamento em pontos pareados de 16 indivíduos.	77
Figura 12: Expressão da citocina TNF- α em monócitos CD14 ⁺ dos controles negativos (CT-), controles positivos (CT+) e pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa no Meio e após estímulo com STAg.	83
Figura 13: Representação em <i>box-plot</i> da porcentagem de monócitos CD14 ⁺ que expressam a citocina TNF- α no Meio e com estímulo pelo STAg no grupo RCT.	84
Figura 14: Expressão da citocina IL-12 em monócitos CD14 ⁺ dos controles negativos (CT-), controles positivos (CT+) e pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica (RCT) ativa no Meio e após estímulo com STAg.	86
Figura 15: Representação em <i>box-plot</i> da porcentagem de monócitos CD14 ⁺ que expressam a citocina IL-12 no Meio e com estímulo pelo STAg no grupo RCT.	87
Figura 16: Expressão da citocina IL-6 em monócitos CD14 ⁺ dos controles negativos (CT-), controles positivos (CT+) e pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica (RCT) ativa no Meio e após estímulo com STAg.	88
Figura 17: Representação em <i>box-plot</i> da porcentagem de monócitos CD14 ⁺ que expressam a citocina IL-6 nos diferentes grupos.	89
Figura 18: Expressão da citocina IL-10 em monócitos CD14 ⁺ dos controles negativos (CT-), controles positivos (CT+) e pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa no Meio e após estímulo com STAg.	90
Figura 19: Representação em <i>box-plot</i> da porcentagem de monócitos CD14 ⁺ que expressam a citocina IL-10 no Meio e com estímulo pelo STAg no grupo RCT.	91

Figura 20: Análises de correlações avaliando a maior altura da área de lesão retinocoroidiana ativa com a percentagem de monócitos CD14 ⁺ expressando TNF- α	92
Figura 21: Análises de correlações avaliando a intensidade do <i>haze</i> vítreo de pacientes com lesão retinocoroidiana ativa com a percentagem de monócitos CD14 ⁺ expressando IL-6.	93

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Características dos grupos quanto à idade e gênero	73
Tabela 2: Características do exame biomicroscópico dos 20 pacientes com retinocoroidite toxoplásmica ativa.....	76
Tabela 3: Acuidade visual dos pacientes com retinocoroidite ativa antes e após o tratamento.....	77
Tabela 4: Diâmetro da lesão retinocoroidiana ativa medida pela Retinografia	79
Tabela 5: Características das alterações encontradas na Angiografia por Fluoresceínica Sódica e Indocianina Verde nos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa	81
Tabela 6: Características das alterações encontradas na Tomografia de Coerência Óptica nos pacientes com retinocoroidite ativa	82
Tabela 7: Características dos grupos controles e grupo dos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa quanto à expressão da citocina TNF- α sem (Meio) e com estímulo (STAg) nos monócitos CD14 ⁺	85
Tabela 8: Características dos grupos controles e grupo dos pacientes com retinocoroidite toxoplásmica ativa quanto à expressão da citocina IL-12 sem (Meio) e com estímulo (STAg) nos monócitos CD14 ⁺	87
Tabela 9: Características dos grupos controles e grupo dos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa quanto à expressão da citocina IL-6 sem (Meio) e com estímulo (STAg) nos monócitos CD14 ⁺	89
Tabela 10: Características dos grupos controles e grupo dos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa quanto à expressão da citocina IL-10 sem (Meio) e com estímulo (STAg) nos monócitos CD14 ⁺	91

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrômetro
mL	mililitro
mg	miligrama
°C	grau centígrado
APC	Célula Apresentadora de Antígeno (<i>Antigen Presenting Cell</i>)
AV	Acuidade Visual
CT-	Grupo Controle Negativo (IgG negativo - sem lesão ocular)
CT+	Grupo Controle Positivo (IgG positivo - sem lesão ocular)
CD	Grupo de Diferenciação (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CMSP	Célula Mononucleare do Sangue Periférico
CT	Controle
DC	Célula Dendrítica (<i>Dendritic Cell</i>)
DD	Diâmetro de Disco Óptico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
ETDRS	<i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
ELISA	Ensaio Imuno Adsorvente Ligado à Enzima
FA	<i>Fluorescein Sodic Angiography</i>
FITC	Isocianato de Fluoresceína
FACS	<i>Fluorecence Acitivated Cell Sorter</i>
FSC	<i>Forward Angle Light Scatter</i>
Foxp3	Fator de Transcrição <i>forkhead box p3</i>
Haze	opacidade
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano
ICAM-1	Molécula-1 de Adesão Intercelular

ICGA	<i>Indocyanin Green Angiography</i>
IFA	Imunofluorescência
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
iNOS	Óxido Nítrico Sintase indutível
ISAGA	<i>Immunsorbent Agglutination Assay</i>
LogMAR	Logarítmo do Menor Ângulo de Resolução
LPS	Lipopolisacarídeos
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP	Proteína Inflamatória para Macrófagos
MNSR	Membrana Neovascular Subretiniana
MyD88	Proteína de Diferenciação Mielóide 88
n	tamanho amostral
NF- κ B	Fator Nuclear kapa B
NK	Célula Matadora Natural (<i>Natural Killer</i>)
NKT	Célula T Matadora Natural (<i>T Natural Killer</i>)
Nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
sOCT	<i>spectral Optic Coherence Tomography</i>
OD	Olho Direito
OE	Olho Esquerdo
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PCR	Reação da Cadeia de Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PMN	Polimorfonuclear
PRR	Receptor de Reconhecimento Padrão
PE	Ficoeritrina
RCA	Reação da Câmara Anterior
RCT	Grupo Retinocoroidite Presumidamente Toxoplásmica Ativa
RNA	Ácido Ribonucléico

ROS	Espécies Reativas do Oxigênio
RPM	Rotações Por Minuto
RPT	Retinocoroidite Presumidamente Toxoplásmica
<i>smudge</i>	maior extensão linear da lesão retinocoroidiana
STAg	Antígeno Solúvel de Taquizoítos (<i>Soluble Tachyzoites Antigen</i>)
TCR	Receptor de Célula T
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral-beta
Th	Linfócito auxiliar (<i>T helper</i>)
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
Treg	Célula T Reguladora

RESUMO

Introdução: A infecção *Toxoplasma gondii* é uma causa importante de doença ocular infecciosa. A patogênese da lesão retinocoroidiana associada a este agente etiológico não é completamente compreendida.

Objetivo: O presente estudo foi realizado para investigar a expressão de citocinas pelos monócitos CD14⁺ de indivíduos com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa comparando com indivíduos controles e correlacionar com as manifestações clínicas.

Métodos: Vinte (20) pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa foram consecutivamente recrutados do serviço de Uveítes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais - Brasil, entre Agosto de 2010 e Janeiro de 2011. Dezoito (18) indivíduos saudáveis, comparados por sexo e idade foram incluídos como controles, sendo nove (9) indivíduos alocados como controle negativo (sorologia IgG negativo para *T. gondii* - sem lesão ocular) e nove (9) indivíduos alocados como controle positivo (sorologia IgG positivo para *T. gondii* - sem lesão ocular). Células mononucleares do sangue periférico foram obtidos e incubados na ausência e presença de antígenos solúveis de taquizoítos (STAg) e corados com anticorpos marcados para moléculas de superfície (CD14⁺) e citocinas (TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10). As preparações foram analisadas pelo FACSCan®, selecionando a população de monócitos.

Resultados: Sem estimulação pelo STAg, não houve diferença na expressão no percentual de monócitos CD14⁺ das citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10 entre pacientes e controle negativo. Na presença do STAg, o grupo controle negativo não demonstrou mudança estatisticamente significativa na expressão das citocinas, com exceção da IL-6, já o grupo controle positivo demonstrou aumento da expressão das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10. Os pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa apresentaram na presença do STAg aumento da expressão das citocinas TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10. Correlacionamos a expressão das citocinas com as manifestações clínicas. Resultados mostraram correlação linear positiva entre TNF- α e altura máxima mensurada da lesão ativa pelo sOCT ($p=0,002$; Spearman $r^2=0,788$); correlação linear positiva entre IL-6 e intensidade do haze vítreo ($p=0,017$; correlação de Spearman $r^2=0,556$).

Conclusões: Este estudo demonstra que a resposta ao antígeno do *T. gondii* é observada em pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa, assim como indivíduos infectados pelo parasito, porém sem lesão ocular. Os resultados também sugerem que a gravidade da retinocoroidite presumidamente toxoplásmica pode estar relacionada com o balanço da expressão das citocinas.

PALAVRAS CHAVES

retinocoroidite, monócitos, citocinas, tomografia de coerência óptica,

angiografia, toxoplasmose

ABSTRACT

Introduction: *Toxoplasma gondii* infection is an important cause of infectious eye disease. The pathogenesis of retinochoroidal lesion associated with this etiologic agent is not fully understood.

Purpose: The present study was undertaken to investigate cytokine expression by CD14⁺ monocytes of patients with active toxoplasmic presumably retinochoroiditis compared with control subjects and correlate with the clinical manifestations.

Methods: Twenty (20) patients with active toxoplasmic presumably retinochoroiditis were consecutively recruited from the Uveitis Service at the Hospital das Clínicas, Federal University of Minas Gerais - Brazil, between August 2010 and January 2011. Eighteen (18) healthy subjects compared by sex and age were included as controls, nine (9) individuals allocated as a negative control (IgG serology negative for *T. gondii* - no eye injury) and nine (9) individuals assigned as positive control (IgG positive serology for *T. gondii* - no eye injury). Peripheral blood mononuclear cells were obtained and incubated in the absence or presence of soluble antigen of tachyzoites (STAg) and stained with labeled antibody to surface molecules (CD14⁺) and cytokines (TNF- α , IL-12, IL-6 and IL-10). The preparations were analyzed by FACScan® by selecting the monocyte population.

Results: Without stimulation by STAg, there was no difference in the expression of TNF- α , IL-12 and IL-10 between patients and negative control. In the presence of STAg, the negative control group showed no statistically significant change in the expression of cytokines, except IL-6, as the positive control group showed increased expression of TNF- α , IL-6 and IL-10. The patients had active toxoplasmic presumably retinochoroiditis in the presence of STAg, increased expression of TNF- α , IL-12, IL-6 and IL-10. Cytokine expression correlated with the clinical manifestations. Results showed positive linear correlation between TNF- α and maximum height of the active lesion measured by sdOCT ($p=0.002$, Spearman $r^2=0.788$), positive linear correlation between IL-6 and vitreous haze intensity ($p=0.017$, Spearman correlation $r^2=0.556$).

Conclusions: This study demonstrates that the response to *T. gondii* antigen is observed in patients with active toxoplasmic presumably retinochoroiditis, as well as individuals infected by the parasite, but no eye injury. The results also suggest that the severity of toxoplasmic presumably retinochoroiditis may be related to the balance between expression of cytokines.

KEY WORDS

retinochoroiditis, monocytes, cytokines, optical coherence tomography, angiography, toxoplasmosis

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo protozoário e parasita intracelular *Toxoplasma gondii* é mundialmente prevalente em humanos e em outros animais homeotérmicos. Pertencente ao filo Apicomplexa, como o *Plasmodium spp.*, parasito de importância pela doença que causa, malária, o *T. gondii* tornou-se um protótipo para a pesquisa por tratar-se de uma espécie mais propícia para manipulação genética, eficiente nas transinfecções e expressões de epitopos, pouco complicados em comparação as outras espécies deste filo.

O *T. gondii* é causador de doenças como encefalites, miocardites e pneumonites nos seres humanos, afetando virtualmente qualquer célula nucleada, porém com preferência pelas células constitutivas do sistema nervoso central, incluindo os grupos celulares responsáveis pela visão. Preocupações são dirigidas a todos os indivíduos infectados, pois estão susceptíveis a adquirirem a retinocoroidite toxoplásmica, doença com potencialidade de causar a cegueira, e às gestantes não infectadas, pois a aquisição do parasito durante a fase gravídica pode causar danos ao feto em desenvolvimento.

Oftalmologistas lidam diariamente com o sofrimento de pessoas que por razões ainda desconhecidas do nosso entendimento, adquiriram a infecção, muitas vezes sem sintomas, e desenvolveram a síndrome uveítica posterior consequente ao *T. gondii*, tornando-se cegas. Este sofrimento nos tornam responsáveis por tentar contribuir com o esclarecimento dos mecanismos imunes envolvidos no aparecimento da doença ocular.

O estudo do *T. gondii* deve focar tanto na biologia do parasito, como a estrutura, os mecanismos bioquímicos, genéticos, mas também no papel da imunidade do hospedeiro.

A importância do hospedeiro é clinicamente observada quando verificamos que determinados indivíduos não desenvolvem a doença ocular, mesmo sendo portadores de cicatrizes retinocoroidianas extensas ou múltiplas, enquanto outros apresentam recidivas frequentes, mesmo sem estarem associados a alguma doença imunossupressora.

Neste presente estudo, procuramos avaliar a resposta de um componente do sistema imune inato presente na circulação venosa periférica, os monócitos, durante a atividade da doença ocular, através da expressão de citocinas sabidamente importantes para o controle da infecção aguda e crônica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TOXOPLASMOSE

2.1.1 O Agente Etiológico

2.1.1.1 História

O dicionário da língua portuguesa Houaiss define o termo parasita como “organismo que vive de e em outro organismo, dele obtendo alimento e não raro causando-lhe dano” (Houaiss *et alii*, 2009). Qualquer agente infeccioso pode ser considerado um parasita, mas o termo é estrito aos protozoários e aos vermes helmínticos.

Os protozoários habitam o planeta Terra há milhões de anos, e relatos históricos demonstram que o parasitismo causava temores aos homens, vistos nos documentos chineses datados nos anos 2.700 a.C., pelo Imperador Huang Ti, no tratado médico *Nei Ching (Canon of Medicine)*, no qual lista sintomas como dor de cabeça, calafrios e febres terçã e quartã, sugestivos da malária (Cox, 2004). Testes genéticos específicos para *Plasmodium falciparum* revelaram como sendo a possível *causa mortis* do faraó Tuntankamom a malária, ocorrido nos anos 1.500-1.000 a.C. (Hawass *et alii*, 2010).

Nossa história será voltada para um protozoário em especial: *Toxoplasma gondii*.

Desconhecido da história por apresentar poucos sintomas, foi apenas no início do século XX, após ser descoberto por três pesquisadores, Charles Nicolle e Louis Manceaux, em 1908, na Tunísia, nos tecidos do roedor silvestre *Ctenodactylus gundi*, e concomitantemente por Alphonso Splendore em São Paulo, nos coelhos, que o parasita tornou-se motivo de intensos estudos no mundo (Cox, 2004).

Foi creditado as primeiras observação da doença em seres humanos causada pelo parasito *T. gondii* aos pesquisadores Joseph Jankû, em 1923, na Tchecoslováquia, ao descrever os achados das lesões oculares, Carlos Margarinos Torres, em 1927, no Rio de Janeiro, ao descrever uma criança de 2 anos de vida com hidrocefalia e portadorados cistos do protozoários (Torres, 1927) e Richard Richter, em 1936, em Chicago, ao descrever um caso de meningoencefalite num recém-nascido. Os três são os primeiros descritores das lesões consequentes ao parasito *T. gondii*, apesar de todos inicialmente descreverem o agente como se fosse uma nova espécie do gênero *Encephalitozoon* (Wolf et Cohen, 1937; Wolf et alii, 1939a; Wolf et alii, 1939b).

Os patologistas norte-americanos, Wolf, Cowen e Paige, foram os primeiros a identificarem o *T. gondii* numa criança que desenvolveu convulsões aos 3 dias de vida e apresentava lesões nas máculas, visualizadas pelo oftalmoscópio. O recém-nascido faleceu e autopsiado foi encontrado *T. gondii* livres e intracelulares nos tecidos cerebrais e retinianos (Wolf et alii, 1939b).

Pinkerton, Weinman e Henderson em 1941 (Pinkerton et Henderson, 1941) reconheceram a infecção aguda causada pelo *T. gondii* em adultos.

Sabin, em 1941, fez o relato de uma criança de 6 anos de idade que faleceu após 30 dias de doença, com um quadro de convulsões, delírios, febre e pleocitose, mas sem sinais de irritação meníngea. O parasito foi isolado injetando-se um preparado do tecido encefálico em cobaias. As iniciais da criança, RH, até hoje, identificam uma das cepas do *T. gondii* (Sabin, 1941). Anos mais tarde, o pesquisador e seus colaboradores fizeram a descrição da encefalite toxoplásmica em humanos (Sabin et alii, 1952 *apud* Miller et alii, 1969).

Sabin, em 1948, descreveu o uso do teste de azul de metileno para detectar anticorpos contra o *T. gondii* (padrão ouro para avaliação da infecção em humanos) (Sabin et Feldman, 1948). O teste ficou conhecido como Teste do Corante (*Dye Test* - DT) ou Teste de Sabin e Feldman, utilizado até hoje

como padrão ouro por laboratórios de referência (Reiter-Owona *et alii*, 1999).

Em 1952, a relação entre lesão retinocoroidiana e *T. gondii* foi confirmada por Helenor Campbell Wilder Foerster ao descrever uma série de 53 casos de olhos enucleados com lesões granulomatosas e áreas de necrose central (Holland *et Lewis*, 2002).

Num grande trabalho realizado por Desmonts e Couvrier, publicado em 1974, fica definida a transmissão vertical do parasito quando a mulher adquire o parasito durante a gestação. O trabalho demonstra as taxas de transmissão quando as mulheres são tratadas ou não com espiramicina, e a gravidade da manifestação clínica para o recém-nascido de acordo com o tempo gestacional em que ocorre a infecção materna (Desmonts *et Couvreur*, 1974).

A associação da toxoplasmose com malignidades tornou-se clara em 1968, quando evidenciaram-se por meio de estudos em autópsias de 4 pacientes em tratamento para melanoma, linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica e leucemia mielocítica aguda no Instituto Nacional do Câncer em Bethesda, EUA, juntamente com dados de outros casos descritos desde o ano de 1953 (Vietzke *et alii*, 1968).

Em 1984 é comprovada a característica oportunista do parasita quando o ser humano é acometido pelas alterações consequentes a contaminação do vírus da imunodeficiência humana - HIV (Luft *et alii*, 1984).

2.1.1.2 *Toxoplasma gondii* e Cepas

Pertencente ao filo Apicomplexa, assim como outros parasitas intracelulares obrigatórios causadores de doenças em humanos e animais, como a malária (*Plasmodium spp.*), babesiose (*Babesia spp.*), criptosporíase (*Cryptosporidium spp.*), coccidiosis em aves domésticas (*Eimeria spp.*), teilerioses (*Theileria spp.*), o *T. gondii* é parasita intracelular obrigatório e

necessita dos hospedeiros intermediários e definitivos para completarem o seu ciclo evolutivo (Shigerahu, 2011).

O *T. gondii* é a única espécie do seu gênero, tradicionalmente apresenta 3 cepas diferentes, classificadas como tipo I, II e III, e algumas cepas atípicas ou recombinantes (Dardé, 2004), porém dependendo da análise genética utilizada, podemos classificar em 100 cepas diferentes (Dardé, 2008). A importância das cepas do parasito se deve a variação da virulência, sendo maior nos tipo I e mediana para os tipos II e III (Pena *et alii*, 2008).

Dubey *et alii*, 2004, avaliaram tecidos musculares de 54 gatos no estado do Paraná e encontraram o parasito em 37 animais com a proporção de 15 gatos (40,5%) apresentando cepas do tipo I e 22 gatos (59,5%) apresentando cepas do tipo III (Dubey *et alii*, 2004). Numa avaliação de 71 gatos em São Paulo, encontraram o parasito em 46 animais com a seguinte relação: 34 gatos (72,4%) apresentando a cepa do tipo I; 12 gatos (25,5%) com a cepa do tipo III; 1 gato (2,1%) com cepas dos tipos I e III (Pena *et alii*, 2006).

2.1.1.3 Ciclo de Vida e Transmissão

Os felídeos são os hospedeiros definitivos nos quais ocorrem a reprodução sexuada e os demais animais homeotérmicos são os hospedeiros intermediários nos quais ocorrem a reprodução assexuada.

Existem três diferentes estágios no ciclo de vida do parasita: bradizoítos, taquizoítos e esporozoítos localizados dentro dos oocistos esporulados (Frenkel, 1974).

Os taquizoítos (do grego *tachos*: rápido), termo nomeado por Frenkel, 1974, é uma forma que apresenta multiplicação rápida do parasito, ocorrendo tanto nos hospedeiros intermediários quanto nos hospedeiros definitivos, com exceção das células dos intestinos dos felinos. Eles têm o formato de crescente ou arco, com a ponta anterior conóide e a ponta posterior ovalada,

com tamanho aproximado de 2 a 6 μm . Agregados de taquizoítos são chamados clones, colônias terminais ou grupos. Multiplicam-se assexuadamente por endodiogenia, uma forma especializada de reprodução na qual 2 células filhas são originadas a partir de uma células mãe (Frenkel, 1974).

In vivo, os grupos de taquizoítos têm formas evolutivas diferentes devido a multiplicação assincrônica, mas rosetas podem ser formadas, resultantes de crescimento sincrônico. Depois de penetrar na célula hospedeira, há um período de tempo variável de repouso até sua multiplicação dependente da cepa e do tipo celular invadido. Cepas mais virulentas em camundongos possuem uma taxa de multiplicação maior, e maior tendência a formarem rosetas (Frenkel, 1974).

Os taquizoítos possuem organelas responsáveis pela adesão e penetração nas células parasitadas, como micronemas e roptrias. Entram nas células hospedeiras por penetração ativa ou fagocitose. Já dentro da célula, o taquizoíto torna-se ovóide e é circundado pelo vacúolo parasitóforo, formado pelas membranas do parasito e da célula hospedeira, e vive por mecanismos de evasão da destruição intracelular, inibindo a fusão de vacúolos e lisossomas e neutralização de enzimas (Carvalho *et* Melo, 2006). Têm a capacidade de produzir energia, crescer e multiplicar, promovendo a síntese protéica e de pirimidinas, dependendo apenas da produção das purinas pelas células hospedeiras (Dubey *et alii*, 1998).

A forma bradizoíta (do grego *bradi*: lento) também foi cunhado por Frenkel, 1974. Contidos dentro de cistos teciduais, vivem no ambiente intracelular e se multiplicam por endodiogenia. O tamanho pode variar em torno de: 5 μm nos cistos jovens que contém apenas 2 bradizoítos; 70 μm nos tecidos encefálicos; 100 μm nos tecidos musculares quando os cistos são mais velhos, neste caso contendo centenas de bradizoítos (Frenkel, 1974). Cistos intactos provavelmente não causam nenhum dano e podem persistir por toda vida do hospedeiro sem causar resposta inflamatória. Os bradizoítos são

mais resistentes a destruição por enzimas proteolíticas que os taquizoítos (Dubey *et alii*, 1998).

Oocistos têm formato esférico e cerca de 10 a 12 µm de diâmetro. Cada oocisto contém dois esporocistos e cada esporocito contém 4 esporozoítos, estes com estrutura semelhante ao taquizoíto. A esporulação ocorre no ambiente, após 1 a 5 dias da excreção, dependendo da temperatura e oxigenação (Frenkel, 1974).

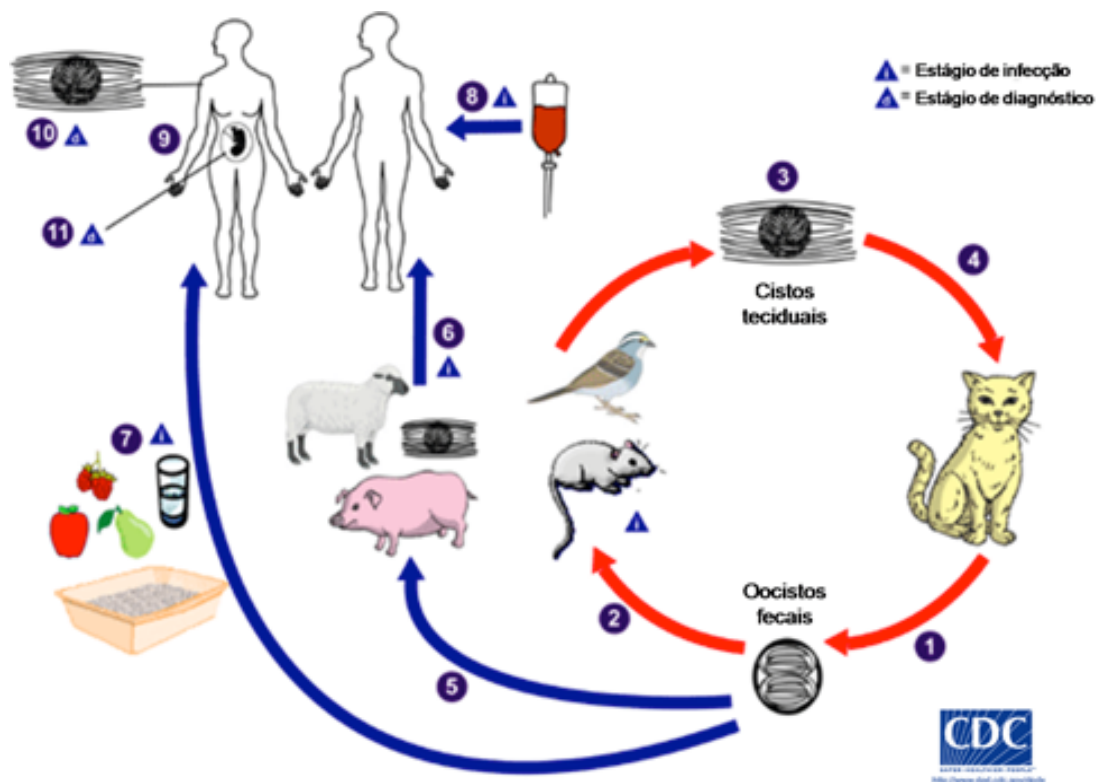


Figura 1: Vias de transmissão da toxoplasmose. (1) Oocistos não esporulados são eliminados nas fezes dos gatos; (2) hospedeiros intermediários tornam-se infectados com os oocistos; (3) presença de cistos nos tecidos musculares e neurais dos hospedeiros; (4) cistos teciduais são capazes de contaminar o hospedeiro definitivo; (5) e (6) seres humanos contaminam-se ao ingerirem carnes contendo cistos teciduais, (7) alimentos contaminados com oocistos fecais, (8) transfusão sanguínea e transplante de órgãos ou (9) transmissão vertical; (10) diagnóstico por métodos sorológicos, visualização de cistos teciduais ou (11) PCR do líquido amniótico.

Figura adaptada do site do CDC – www.dpd.cdc.gov/dpdx

O hospedeiro intermediário infecta-se por 3 modos: a) ingestão de oocistos esporulados contendo as formas esporozoítas; b) ingestão de cistos teciduais viáveis contidas em carnes mal cozidas; c) transmissão sanguínea, via mais comum para a transmissão vertical, ou pelo transplante de órgãos.

Os hospedeiros definitivos também infectam-se da mesma maneira que os hospedeiros intermediários, ingestão de oocistos esporulados ou de cistos teciduais e transmissão vertical. A diferença é a formação dos gametócitos dos parasitos nas células enteroepiteliais, e conseqüentemente dos oocistos que serão eliminados nas fezes e contaminarão o ambiente. Apenas no ambiente os oocistos irão esporular e liberar os esporocistos contendo esporozoítos (Tenter *et alii*, 2000).

No hospedeiro intermediário, os parasitos ingeridos na forma de cistos teciduais ou de oocistos esporulados são liberados na forma infectante, os taquizoítos. Estes infectam as células nucleadas, preferencialmente as células dos tecidos musculares, nervosos e retinianos, e transformam-se novamente em sua forma dormente, os bradizoítos. Assim mantêm-se por período de tempo indeterminando quando um novo ciclo taquizoíto-bradizoíto surja, infectando novas células (Tenter *et alii*, 2000).

2.1.2 Epidemiologia

A distribuição do parasito é mundial, estimando-se que cerca de um terço da população mundial seja portadora do parasito, mas a soroprevalência varia com a região estudada e com os métodos empregados (Holland, 2010). As variações geográficas dependem do clima, dos hábitos alimentares, das condições socioeconômicas e com o grupo etário pesquisado (Remington, 1974).

Nos Estados Unidos da América, a soroprevalência é estimada em 22,5%, e entre as mulheres em fase reprodutiva em 15%, enquanto países como França o percentual entre mulheres em período fértil é de aproximadamente

71%, e na Nigéria com 78% de soropositividade para a infecção pelo *T. gondii* nas mulheres grávidas (Jones *et alii*, 2001).

Na década de 90 a soroprevalência nos países da Europa Central como Austria, Bélgica, França, Alemanha e Suíça variavam entre 37 e 58% nas mulheres em idade reprodutiva. A prevalência aumenta nos países da América Latina como: Argentina, Brasil, Cuba, Jamaica e Venezuela, com prevalências que variam entre 51 e 72%, e nos países do Oeste Africano como: Benin, Camarão, Congo, Gabão e Togo com prevalências entre 54 e 77% (Tenter *et alii*, 2000).

No Brasil há variações conforme a região do país e com a idade. Nos adultos variam entre 50 e 83%, com os maiores valores encontrados nos estados do Pará, Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul, e os menores na Bahia, Minas Gerais e Mato Grosso (Oréfice *et alii*, 2010).

2.1.3 Manifestações Clínicas

2.1.3.1 Manifestações Sistêmicas da Infecção Aguda

A infecção aguda do *T. gondii* se manifesta clinicamente no ser humano de maneira variada. Depende do estado imune do hospedeiro e período de vida da infecção, pré-natal ou pós-natal.

O hospedeiro imunocompetente apresenta-se, na maioria dos casos, assintomático na primo-infecção (Remington, 1974). As manifestações, quando ocorrem são: mal-estar inespecífico, febre, fadiga, linfadenopatia, pneumonite, hepatite, miocardite, polimiosite, meningoencefalite, retinite (Bowie *et alii*, 1997).

Estima-se que a linfadenomegalia toxoplásmica seja responsável por aproximadamente 5% de todas as outras etiologias (McCabe *et alii*, 1987). Os linfonodos têm as características de serem firmes, móveis, indolores e do

tipo não supurativo. A biópsia demonstra hiperplasia folicular, com histiócitos epitelióides nas margens dos centros germinativos, distensão focal dos *sinus* com células monocitóides e ocasionalmente demonstrando cistos ou taquizoítos.

O hospedeiro imunodeprimido apresenta-se de maneira similar ao hospedeiro imunocompetente, porém, dependendo do grau de falência do sistema imune, a infecção irá manifestar doença com maior risco de vida, como meningoencefalite (Suzuki *et alii*, 1988).

A infecção primária durante o período pré-natal tem consequências mais graves, e depende do período gestacional que a gestante contamina-se com o parasito, pois há uma relação inversa entre a gravidade da doença, taxa de contaminação e o período gestacional (Dunn *et alii*, 1999).

As infecções adquiridas pouco tempo antes ou no momento da concepção podem não resultar em contaminação do feto. As infecções ocorridas no primeiro trimestre irão resultar em contaminação de 10 a 25% dos fetos, e as manifestações serão mais severas, ocorrendo principalmente alterações do sistema nervoso central, como microcefalia, hidrocefalia, epilepsia, encefalite, atraso psicomotor, e ainda, anemia, icterícia, retinocoroidite, estrabismo, trombocitopenia (Remington *et alii*, 2001). As infecções que ocorrem no segundo trimestre da gestação têm taxas de contaminação de 30 a 50%, e as infecções do terceiro trimestre têm taxas de 60 a 70%, podendo tais recém-nascidos nascerem assintomáticos, porém com risco de desenvolverem sequelas como retinocoroidite anos mais tarde (Dunn *et alii*, 1999).

2.1.3.2 Retinocoroidite Presumidamente Toxoplásmica

A retinocoroidite pelo *T. gondii* dificilmente ocorrerá como manifestação da infecção aguda, apesar de ser encontrada em maiores taxas nos pacientes imunodeprimidos. Mais comumente, a retinocoroidite será manifestação da doença congênita ou da reativação da infecção crônica.

Uma vez infectados pelo parasito, os cistos contendo suas formas bradizoítas são encontrados dentro das células retinianas, e por mecanismos ainda não compreendidos, mas dependente de fatores imunes do hospedeiro e do próprio parasito, ocorre o rompimento dos cistos, levando a liberação das formas infectantes, os taquizoítos. McMenamin *et alii*, 1986, estudando as características ultraestruturais de retinas de camundongos infectados pelo *T. gondii*, encontraram células de Müller contendo cistos, e algumas células ganglionares parasitadas, porém não havia evidência morfológica indicativa de toxicidade ou de reação inflamatória ao redor das células contendo os cistos (McMenamin *et alii*, 1986). No mesmo experimento, mas relatado num artigo à parte, Dutton *et alii*, 1986, estudaram a reação inflamatória presente nas retinas de camundongos infectados pelo *T. gondii* e encontraram grau variado de severidade, de infiltração leve de células mononucleares até completa destruição da retina externa, epitélio pigmentar da retina e coróide, na presença de reação inflamatória granulomatosa. Interessante a descrição de não terem encontrado cistos do parasita nos focos da lesão inflamatória (Dutton *et alii*, 1986).

A manifestação clínica da toxoplasmose ocular é a síndrome uveítica: olho vermelho (injeção ciliar), células na câmara anterior, de intensidade variável, *flare*, consequente da quebra da barreira vascular, células no corpo vítreo, *haze* vítreo e, na maioria dos casos, a lesão retinocoroidiana ativa (Dodds *et alii*, 2008).

A lesão retinocoroidiana ativa apresenta-se como uma placa de coloração branco a amarelada, aspecto algodinoso, com margens mal delimitadas, associado com edema retiniano perilesional. Elas surgem como lesões satélites das lesões cicatrizadas ou isoladas (Friedman *et Knox*, 1969).

As lesões podem ocorrer em qualquer parte da retina, mas lesões adquiridas no período pré-natal geralmente ocorrem na região macular (Holland, 2003; Holland, 2004).

2.1.3.3 Complicações da Uveíte Toxoplásmica

As complicações da uveíte toxoplásmica irão depender do grau de inflamação causada ao olho, ao número de reativações e a localização da lesão (Bosch-Driessen *et alii*, 2000).

A inflamação intensa poderá causar grave opacificação do corpo vítreo, com condensação das fibras colágenas, formação de cilindros vítreos; glaucoma por obstrução do seio camerular ou por formação das goniossinéquias; catarata subcapsular posterior pelo processo inflamatório ou pelo uso dos glicocorticóides tópicos ou sistêmicos; descolamento da retina e hemorragia vítrea pela retração do corpo vítreo; edema cistóide da mácula; buraco macular; hemorragia retiniana, atrofia óptica, membranas epirretinianas, oclusões vasculares, formação de membranas neovasculares subretinianas e *phthisis bulbi* (Bosch-Driessen *et alii*, 2002).

A cada reativação da uveíte toxoplásmica mais um ciclo de infecção e inflamação irá ocorrer.

A lesão inicial poderá acometer a região macular, e quanto mais próximo da fóvea, pior o prognóstico visual, pois uma vez ocorrido o dano tecidual, não será regenerado.

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da toxoplasmose ocular não depende apenas das manifestações clínicas, especialmente oculares, nem apenas de exames complementares laboratoriais, ou exames de imagem (angiografia ou tomografia de coerência óptica). O diagnóstico é uma soma de achados que comprovam que infecção ocular suspeitamente seja de origem toxoplásmica (da Mata *et Oréfice*, 2002), e a exclusão dos demais diagnósticos diferenciais da uveíte posterior (Vasconcelos-Santos *et alii*, 2011).

2.1.4.1 Sorologia da Infecção do *Toxoplasma gondii* e PCR

O diagnóstico sorológico é o primeiro método utilizado para avaliar se o paciente apresenta ou não infecção pelo parasito. Podemos identificar 4 tipos de imunoglobulinas, IgM, IgG, IgA e IgE, no soro de pacientes infectados pelo *T. gondii*. Cada imunoglobulina apresenta características temporais que auxiliará a determinar se a infecção é aguda ou crônica, apesar de encontrar situações na toxoplasmose ocular que a dúvida persistirá (Montoya, 2002; Montoya *et Remington*, 2008).

A IgM pode ser identificada pelos métodos de duplo sanduíche ou de captura pelo ELISA, IFA e ISAGA (Liesenfeld *et alii*, 1997). Surge inicialmente à infecção e persiste por cerca de 1 ano, apesar de descrições na literatura de 12 anos de positividade após o contágio (Bobic *et alii*, 1991). A IgG pode ser identificada utilizando-se os métodos do *Dye Test*, ELISA, IFA e Teste de Aglutinação Direto Modificado. Surge no soro após 1 a 2 semanas após a infecção, pico de 1 a 2 meses, e persistência por toda a vida do indivíduo (Montoya, 2002). A IgA pode ser identificado pelos métodos ELISA e ISAGA. Utilizado principalmente para avaliação da toxoplasmose congênita ou adultos agudamente infectados. E finalmente, IgE que pode ser demonstrado pelo ELISA, em indivíduos agudamente infectados, apresentando uma positividade de meses, porém com validade inferior ao IgA (Montoya, 2002).

Montoya *et alii*, 1999, sugeriram que em pacientes com apresentação atípica da doença ocular ativa seja realizado análise do fluido intraocular pelo PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Montoya *et alii*, 1999), por trazer maior especificidade ao diagnóstico em relação ao Teste de Goldmann-Witmer (Bou *et alii*, 1999; Groot-Mijnes *et alii*, 2006).

2.1.4.2 Exames Complementares na Oftalmologia

2.1.4.2.1 Angiografia por Fluoresceína Sódica e Indocianina Verde

Como o próprio nome diz, complementar, os exames de imagem, FA (*Fluorescein Sodic Angiography* - Angiografia por Fluoresceína Sódica), ICGA (*Indocyanin Green Angiography* - Angiografia por Indocianina Verde) e OCT (*Optic Coherence Tomography* - Tomografia de Coerência Óptica) auxiliam no manejo da doença toxoplásmica ocular, porém mais uma vez, o diagnóstico é baseado nos achados clínicos e suportados pelo perfil sorológico do pacientes.

A FA demonstra alterações associadas a doença como vasculites, oclusões vasculares, *shunts* arteriovenosos na retina e retinocoroidianos, edema macular, membranas neovasculares subretinianas e inflamação do nervo óptico. A ICGA tem o importante papel de avaliar extensão do envolvimento coroidiano na evolução da lesão e na identificação de membranas neovasculares subretinianas (Bernasconi *et alii*, 1997; Guex-Croiser *et alii*, 1998; Atmaca *et alii*, 2006).

O envolvimento da coróide durante a atividade da doença toxoplásmica ocular foi percebida por diversos pesquisadores ao visualizarem imagens hipofluorescentes espalhadas pelo polo posterior, em áreas às vezes distantes da lesão ativa, e o chamaram de *satellite dark dots* (Bernasconi *et alii*, 1997; Guex-Croiser *et alii*, 1998). Explicações para o surgimento de tais lesões ainda permanecem em discussão, mas acredita-se que seja consequente ao surgimento de reações inflamatórias não infecciosas na coróide (Amaro *et alii*, 2007).

2.1.4.2.2 Tomografia de Coerência Óptica

O OCT utiliza-se da luz para a formação da imagem, obtendo-se em alta resolução, cortes seccionais da retina, permitindo visualização das várias camadas retinianas.

A nova geração de OCT, utilizando-se do fenômeno físico chamado domínio espectral (*spectral domain*) tem uma resolução espacial entre 3 e 4 μm e é aproximadamente 50 vezes mais rápido que os OCT de domínio temporal (*time domain*) (Costa *et alii*, 2006; Gupta *et alii*, 2008; Lamirel *et alii*, 2010).

Oréface *et alii* (2006) avaliaram os achados vitreoretinianos durante a atividade da toxoplasmose ocular e descreveram alterações não detectadas durante o exame clínico, como por exemplo: edema macular, tração vitreomacular e maculosquisis (Oréface *et alii*, 2006).

2.1.5 Toxoplasmose Ocular: Congênita ou Adquirida?

Se a retinocoroidite toxoplásmica é fruto de uma infecção adquirida intrauterina ou adquirida pós-natal foi tema bastante discutido desde a observação de Wolf *et alii*, 1939, que concluíram as alterações do sistema nervoso central, encéfalo e retina em um recém-nascido (Wolf *et alii*, 1939b). Como as manifestações clínicas da infecção aguda são poucas, as características das lesões intraoculares das duas formas são semelhantes, e os resultados sorológicos são pouco específicos para predizer o tempo de infecção, as duas formas etiológicas são indistinguíveis (Gilbert *et alii*, 2000).

Embora Hogan, 1951, acreditava que a maioria dos casos de retinocoroidite toxoplásmica era consequente a infecção adquirida, Perkins, em 1973, acreditava que a infecção no Reino Unido era congênita, e essa ideia persistiu por décadas (Holland, 2003).

Anos mais tarde, Holland, 1999, e Gilbert *et* Stanford, 2000, publicaram trabalhos demonstrando o papel da infecção adquirida na prevalência da manifestação da retinocoroidite presumidamente toxoplásmica (Holland, 1999; Gilbert *et* Stanford, 2000).

Glasner *et alii*, 1992, concluíram que 17,7% dos casos de toxoplasmose ocular no sul do Brasil eram adquiridas no período pós-natal, e Silveira *et alii*, 2001, demonstraram que 8,3% dos indivíduos com infecção pós-natal não apresentavam lesão ocular, desenvolvendo após um período de acompanhamento de 7 anos (Glasner *et alii*, 1992; Silveira *et alii*, 2001).

Numa epidemia em Vitória, Canadá, 21% dos casos revelaram envolvimento ocular (Burnett *et alii*, 1998).

Outras considerações de cunho epidemiológico levam a crer sobre a superioridade dos casos de infecção pós-natal sobre a pré-natal: a) a maioria dos indivíduos com doença ocular são identificados na segunda a quarta décadas de vida; b) a prevalência da infecção por *T. gondii* aumenta com a idade.

2.1.6 Tratamento da Retinocoroidite Presumidamente Toxoplásmica

Logo após a identificação do agente etiológico, pesquisadores começaram a tratar a retinocoroidite presumidamente toxoplásmica com antimaláricos e sulfonamidas, baseados em estudos em animais (Holland, 2003). A combinação de prednisona, pirimetamina e sulfonamidas permanece até hoje como terapêutica preferida dos especialistas contra o parasito. Outras combinações de drogas também são utilizadas, como a azitromicina e atovaquona, mas em revisões sistematizadas, nenhuma delas mostraram-se superiores em reduzir o tempo de doença ativa ou a taxa de recorrência em pacientes imunocompetentes (Stanford *et alii*, 2003). Nos pacientes imunossuprimidos pelo vírus HIV foi demonstrado que a doença ocular torna-se inativa mais rapidamente quando tratado comparando-se com a história

natural da doença sem intervenção (Holland, 1988; Cochereau-Massin *et alii*, 1992). Consenso existe na contra-indicação do uso do corticóide como monoterapia, por piorar a lesão ocular e promover a reativação da infecção crônica (Bosch-Driessen *et Rothova*, 1998).

2.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imune evoluiu para proteger os organismos multicelulares dos patógenos e a proteção contra patógenos está a cargo de um sistema complexo de interação entre órgãos, tecidos, células e moléculas que compõem o sistema imune (Iwasaki *et Medzhitov*, 2010).

O sistema imune compreende três níveis de proteções que relacionam-se entre si: a) barreiras externas físicas como pele, mucosa, epitélio ciliado, e químicas como ácidos do estômago, enzimas proteolíticas secretadas; b) imunidade inata; c) imunidade adaptativa (Moser *et Leo*, 2010).

No presente estudo, daremos ênfase a imunidade inata e uma das suas principais células, os monócitos e 4 citocinas produzidas por este tipo celular, TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10.

2.2.1 Imunidade Inata

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa do hospedeiro para microrganismos que penetram no corpo, vencendo as barreiras físicas e químicas. Este mecanismo de defesa não tem “memória”. Tempo de resposta imediata à agressão (Moser *et Leo*, 2010).

As células que compreendem o sistema imune inato são os macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e monócitos. Estas células são rapidamente recrutadas para o sítio de infecção, promovendo uma linha de defesa imediata (Moser *et Leo*, 2010).

As células do sistema imune inato são capazes de detectarem invasão do patógeno através de receptores para os patógenos, os receptores de reconhecimento padrão (*Pattern Recognition Receptors* - PRR), dentre eles, o receptor do tipo toll (*Toll-Like Receptor* - TLR) (Kawai *et al.* Akira, 2010). Estes receptores reconhecem uma série de estruturas moleculares conservadas expressas pelos patógenos de uma dada classe. As estruturas moleculares derivadas dos patógenos (*Pathogen Associated Molecular Pattern* - PAMP) representam uma complexa estrutura molecular que são distintas para cada grupo de microrganismos (Iwasaki *et al.* Medzhitov, 2010).

As células fagocíticas representam um importante mecanismo efetor da resposta inata. No contato com um patógeno os fagócitos realizam fagocitose, e dentro de uma vesícula intracelular são destruídos por um complexo de enzimas proteolíticas e espécies reativas oxidativas produzidas dentro de tais células. As células fagocíticas também produzem mediadores solúveis chamados citocinas e quimiocinas que aumentam a capacidade fagocítica e recrutamento das células.

Importante relatar que uma subsequente infecção causará a mesma cascata de eventos, similar na cinética e intensidade (Moser *et al.* Leo, 2010).

2.2.2 Monócitos

O sistema fagocítico mononuclear consiste de monócitos circulantes no sangue e de macrófagos nos tecidos. Durante a hematopoiese na medula óssea, as células progenitoras dos monócitos e granulócitos se diferenciam em pró-monócitos que deixam a medula óssea e entram na circulação sanguínea onde amadurecem. O tempo em que circulam no sangue é de apenas 8 horas, quando então, aumentam de tamanho e migram para os tecidos, diferenciando-se em macrófagos teciduais específicos (Geissmann *et al.*, 2010).

O processo de diferenciação do monócito em macrófago envolve a modificação da estrutura celular. Os monócitos tornam-se cinco a dez vezes maiores, as organelas intracelulares aumentam em tamanho e número, produzem níveis elevados de enzimas hidrolíticas, e iniciam a secreção de vários fatores solúveis (Geissmann *et alii*, 2010).

2.2.3 Citocinas

As interações entre as células são mediadas por proteínas designadas citocinas (*cytos*: célula; *kinein*: mover-se). As citocinas são proteínas ou glicoproteínas de baixo peso molecular secretadas pelas células, principalmente células do sistema imune, em resposta a inúmeros estímulos (Abbas *et Lichtman*, 2007).

As citocinas são referidas com interleucinas para designar a sua produção por leucócitos e agem sobre diversas células. Algumas citocinas são denominadas por nomes consagrados, como fator de necrose tumoral e interferon. Há um subgrupo de citocinas chamadas quimiocinas que têm uma função principal de quimiotaxia (Gonçalves *et alii*, 2007).

As citocinas ligam-se a receptores específicos de membrana nas células-alvos, desencadeando uma via de transdução de sinais que leva a alteração de expressão gênica, causando estimulação ou inibição da ativação, proliferação ou diferenciação, secreção de anticorpos ou de outras citocinas.

As citocinas possuem características de pleotropia (certa citocina apresenta efeitos biológicos diferentes em diferentes células-alvo); redundância (duas ou mais citocinas apresentam o mesmo efeito); sinergia (duas ou mais citocinas juntas aumentam a intensidade do efeito); antagonismo (duas citocinas apresentam efeitos contrários na célula-alvo); indução de cascata (a citocina promove a produção de uma ou mais citocinas para induzir novas células) (Abbas *et Lichtman*, 2007).

Os efeitos das citocinas apenas se tornam eficazes se ligadas em receptores específicos para cada citocina. Os receptores das citocinas ativados são responsáveis por iniciarem a sinalização.

2.2.3.1 Fator de Necrose Tumoral- α

Isolado em 1984, a substância até então desconhecida foi nomeado como fator de necrose tumoral, após reconhecer sua capacidade de regredir massas tumorais infectadas por bactérias. A letra grega alfa o diferencia de outra substância da mesma família, o Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor* - TNF) beta, conhecido também como linfotóxina (LT) alfa, o qual também fazem parte a linfotóxina beta, CD40L e *Fas Ligand* (MacEwan, 2002).

As principais fontes produtoras de TNF- α são os fagócitos mononucleares ativados, células T estimuladas por antígenos, células NK (*Natural Killer*) e mastócitos. O estímulo para sua produção é a interação de um receptor do tipo *toll* de um macrófago com o lipopolissacarídeo (LPS) de um patógeno. O Interferon (IFN) gama produzido pelas células T e NK aumentam a síntese de TNF- α por macrófagos estimulados por LPS (Grivennikov *et* Karin, 2011).

A principal função fisiológica do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar essas células para erradicar microrganismos. Outras funções: induzir as células do endotélio vascular expressarem moléculas de adesão para os leucócitos, inicialmente para neutrófilos, e, em seguida monócitos e linfócitos; estimular macrófagos a secretarem quimiocinas, induzindo a quimiotaxia de leucócitos e o recrutamento; estimular os fagócitos mononucleares a produzirem IL-1, que age sinergicamente com TNF- α ; estimular as atividades microbicidas dos neutrófilos e macrófagos (Grivennikov *et* Karin, 2011).

Em infecções graves o TNF- α é produzido em grandes quantidades e causa anormalidades clínicas: age no hipotálamo induzindo febre; age no fígado

aumentando a síntese de proteínas de fase aguda, proteína amilóide A e fibrinogênio; age nos tecidos musculares e adiposos, causando caquexia, por suprimir o apetite e reduzir a produção da lipoproteína lipase, enzima necessária para liberar ácidos graxos de lipoproteínas circulantes para serem usados pelos tecidos; reduz a contratilidade do miocárdio e do tônus da musculatura lisa dos vasos; causa trombose intravascular, pela perda das propriedades anticoagulantes normais do endotélio; queda das concentrações de glicose, devido ao aumento da utilização da glicose pela musculatura e a redução da reposição pelo fígado (Abbas *et Lichtman*, 2007).

2.2.3.2 Interleucina 12

A IL-12 é o principal mediador da resposta imune inata inicial a microrganismos intracelulares e é um indutor essencial da imunidade mediada por células, a imunidade adquirida. Ela diferencia células T CD4⁺ em células T auxiliares tipo 1 e estimula a produção de IFN- γ pelas células T e NK. Sendo uma citocina derivada de monócitos, providencia uma ligação entre as respostas imunes inatas e adquiridas (Yilmaz *et alii*, 2005).

A IL-12 existe como heterodímero ligado por pontes dissulfeto entre as subunidades p35 e p40 que são codificadas em diferentes cromossomas, 3 e 5, respectivamente. Vários tipos celulares produzem a p35, mas apenas as células fagocíticas e dendríticas produzem a p40. A atividade biológica da IL-12 é conseguida apenas com essas duas subunidades ligadas (Trinchieri *et Gerosa*, 1996; Yilmaz *et alii*, 2005).

As principais fontes produtoras de IL-12 são as células dendríticas e os macrófagos. Durante as reações da imunidade inata aos microrganismos, a IL-12 é produzida em resposta a sinalização pelo TLR. As células T auxiliares também induzem a produção da citocina pelos macrófagos e células dendríticas, estimuladas pelos antígenos, mediante a ligação entre CD40L e CD40. O IFN- γ , produzido pelas NK e células T, também induz a produção de IL-12.

Os efeitos biológicos são: estimular a produção de IFN- γ pelas células NK e linfócitos T; em sinergismo com IFN- γ , estimular a diferenciação de linfócitos T auxiliares CD4⁺ em células Th1 produtoras de IFN- γ ; acentuar as funções citotóxicas de células NK ativadas e linfócitos T citotóxicos (*Cytolytic T Lymphocyte* - CTL) CD8⁺.

2.2.3.3 Interleucina 6

A IL-6 é uma citocina atuante na imunidade inata e adquirida, têm função pleiotrópica, atuando em várias células, tanto leucocitárias quanto não leucocitárias. É sintetizada por células mononucleares (monócitos e macrófagos), células endoteliais, fibroblastos e linfócitos T ativados, em respostas a patógenos e outras citocinas como IL-1 β e TNF- α (Heinrich *et alii*, 1990).

A IL-6, por sua ação pleiotrópica, atua de várias formas e em diferentes tipos celulares, como por exemplo: estimulando a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos; estimulando a produção de neutrófilos do progenitores da medula óssea; estimulando o crescimento de linfócitos B que se diferenciam em produtores de linfócitos B; atuando similarmente como fator de crescimento para plasmócitos neoplásicos, promovendo o crescimento de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais, os quais são derivados de mielomas; promovendo reações imunes mediadas por células ao estimular a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias e ao inibir a geração e ações de linfócitos T reguladores (Kishimoto, 2010).

2.2.3.4 Interleucina 10

A IL-10 é produzida por vários subtipos de linfócitos como: Th1, Th2, Tr1 e Th17; e por monócitos, macrófagos ativados e algumas células dendríticas (Opal *et alii*, 1998; Mosser *et Zhang*, 2008).

A sinalização da IL-10 inicia-se pela ligação com um complexo de 2 receptores, IL-10R1 e IL-10R2. A ligação da IL-10 com IL-10R1 é de alta afinidade e a interação seguida com IL-10R2 permite iniciar o sinal de transdução sendo, portanto, um receptor heterodímero (Mosser *et* Zhang, 2008).

Exerce efeitos regulatórios negativos em vários genes de citocinas inflamatórias como: IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α e quimiocinas do grupo CC e CXC (Mosser *et* Zhang, 2008).

A principal função biológica é exercida nas células dendríticas e nos macrófagos, sendo um potente inibidor da apresentação de antígenos. Inibe a expressão de HLA-DR e a hiperregulação de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86. Inibe a diferenciação em DC (*Dendritic Cell* - Células Dendríticas) de precursores monócitos e também a maturação das DC (Mosser *et* Zhang, 2008).

2.2.4 Interação do Hospedeiro e Parasito

A interação entre parasito e hospedeiro dependem de fatores relacionados aos dois. Foi demonstrado que diferentes cepas do parasito são capazes de causarem graus diferenciados de virulência em camundongos e há a possibilidade de ocorrer diferenças na severidade da doença ocular. Do outro lado, temos provado que alterações do sistema imune do hospedeiro permitem a reativação da infecção latente dos cistos teciduais, principalmente no encéfalo e retina (Maubon *et alii*, 2008) (Figura 2).

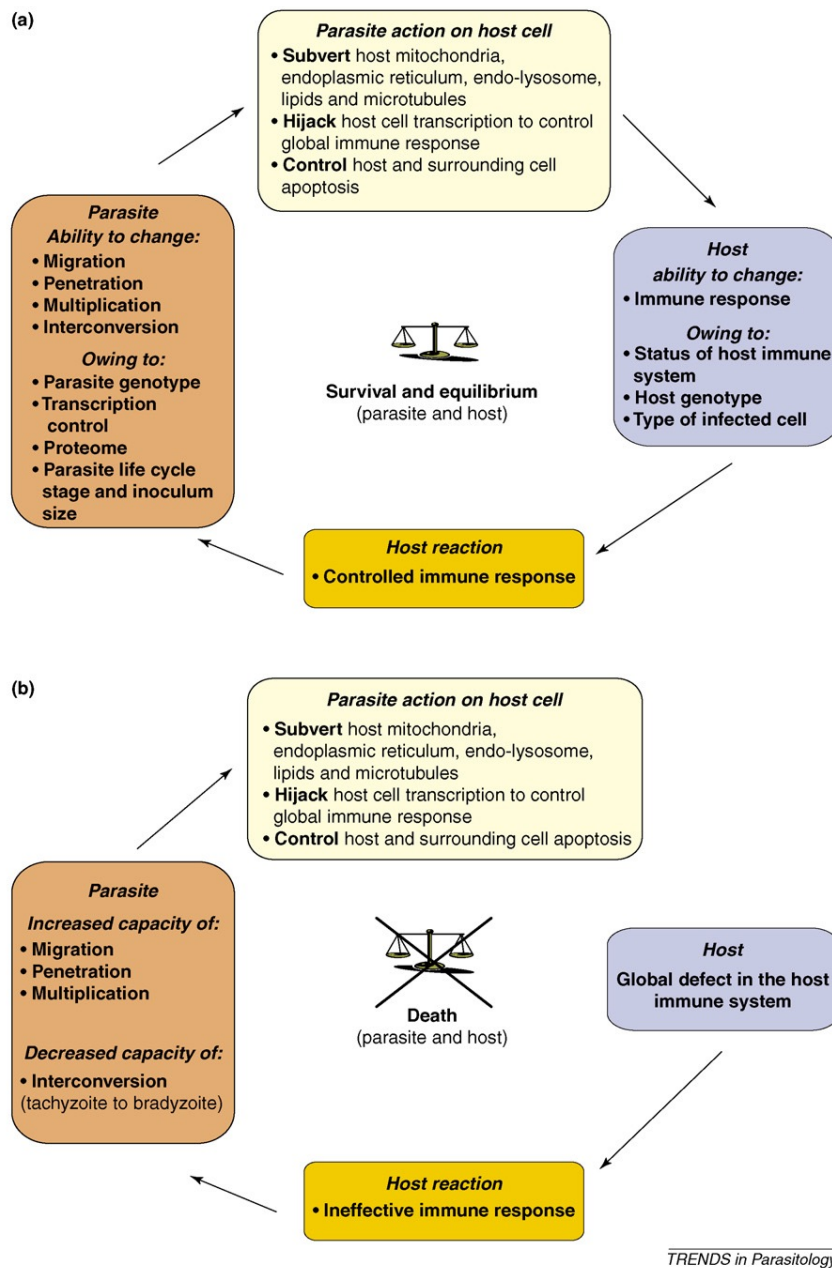


Figura 2: Relação entre parasita e hospedeiro. (A) Equilíbrio entre parasita e hospedeiro. (B) Desequilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e as características do parasita, resultando na morte ou do hospedeiro ou do parasita.

Fonte: Maubon *et alii*, 2008.

2.2.5 Resposta Imune na Toxoplasmose

O parasitismo intracelular do *T. gondii* e as várias formas evolutivas do seu ciclo de vida faz com que a resposta do sistema imune torne-se complexa, envolvendo as células do sistema inato e adquirido.

Dado o modelo complexo que é a infecção pelo *T. gondii*, para melhor compreendermos como se dá a resposta imune na toxoplasmose, vamos subdividir este item em: controle imune da infecção aguda; controle imune da infecção crônica; resposta imune na retinocoroidite toxoplásmica.

2.2.5.1 Controle Imune na Infecção Aguda

O controle da infecção aguda em camundongos é mediada pela produção de IFN- γ pela células NK induzida pela IL-12 (Gazzinelli *et alii*, 1992).

As células dendríticas são as primeiras a produzirem IL-12 no baço em resposta ao antígeno solúvel de taquizoítos (*Soluble Tachyzoite Antigen* - STAg), sem a necessidade de serem previamente expostos ao IFN- γ ou sinalizados pela células T (Reis e Sousa *et alii*, 1997). Os macrófagos e neutrófilos também são uma fonte de IL-12, além da produção de IFN- γ pelos primeiros e TNF- α pelos últimos (Miller *et alii*, 2009).

A importância da produção do eixo IL-12 - IFN- γ deve-se ao fato delas serem responsáveis pelo controle imune da infecção estimulando fatores microbicidas intracelulares, como a ativação da via do Óxido Nítrico (NO) (Wallace *et Stanford*, 2008), indução da indoleamina 2,3-dioxigenase que degrada o triptofano, necessário para o crescimento do parasita, e sendo uma ponte de ligação com o sistema imune adaptativo ao ativarem os linfócitos T (Wallace *et Stanford*, 2008).

2.2.5.2 Controle Imune na Infecção Crônica

Durante a infecção crônica, os linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺, têm um importante papel no controle crônico da toxoplasmose. A depleção dos dois subtipos são necessários para a reativação da doença (Gazzinelli *et alii*, 1992).

Nos camundongos, os linfócitos CD4⁺ são subdivididos em linfócitos Th1 e Th2. Os linfócitos Th1 são produtores das citocinas IL-12 e IFN- γ , enquanto

os linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. A resistência está relacionada com a resposta promovida pela produção de IL-12 e IFN- γ pelos subtipos Th1 (Yap *et alii*, 2000).

Os linfócitos CD8⁺ demonstraram serem essenciais durante a fase ativa da infecção pelo *T. gondii*, tanto em camundongos quanto em seres humanos (Gazzinelli *et alii*, 1991). A atividade é exercida ao serem estimulados pela IL-2 secretados pelo CD4⁺, exercendo atividade citolítica contra os taquizoítos e as células infectadas pelo parasito (Gazzinelli *et alii*, 1996).

2.2.5.3 Resposta Imune na Retinocoroidite Presumidamente Toxoplásmica

O papel das citocinas na retinocoroidite toxoplásmica tem sido estudado em modelos animais, nos quais tem sido proposto que citocinas apresentam um importante papel no controle da doença. Camundongos infectados pelo *T. gondii* desenvolveram inflamação ocular focal e envolvimento do epitélio pigmentar da retina. O tratamento desses animais com anti-IFN- γ ou anti-TNF- α resultou em um aumento das lesões oculares, associadas principalmente com os taquizoítas (Gazzinelli *et alii*, 1994). Outro estudo demonstrou, no entanto, que a estimulação de endotélio vascular retiniano de camundongos infectados com IFN- γ , TNF- α e IL-1 β inibiu o crescimento do parasita dentro destas células (Brunton *et alii*, 2000). Esses resultados sugerem que IFN- γ e TNF- α são elementos cruciais no controle do crescimento parasitário e estão diretamente associado ao desenvolvimento das lesões oculares.

IFN- γ é um importante mediador inflamatório com atividades antitoxoplasma. Foram usados camundongos com deficiência da produção desta citocina como modelo de hospedeiro imunocomprometido. Uma maior carga parasitária foi observada na retina, coróide e nervo óptico dos camundongos com essa deficiência. Taquizoítos foram observados nos imunodeficientes e bradizoítos nos animais selvagens. A angiofluoresceinografia demonstrou

vazamento nos capilares retinianos dos hospedeiros imunodeficientes (Norose *et alii*, 2003).

A IL-10 é uma citocina com importante propriedade anti-inflamatória e imunossupressora. Para entender o papel da IL-10 na retinocoroidite toxoplásmica foram comparados camundongos com deficiência funcional do gene desta interleucina e camundongos controles selvagens (sem qualquer deficiência) após injeção intraperitoneal do parasita. Aumento da infiltração celular e necrose foram observados no tecido ocular dos hospedeiros imunodeficientes em relação aos controles (Lu *et alii*, 2003).

Foi investigado também o papel da IL-6 em olhos de camundongos infectados pelo parasita, comparando a progressão da doença e o desenvolvimento da resposta imune local em camundongos selvagens e em camundongos com deficiência da produção dessa interleucina. Os hospedeiros imunodeficientes desenvolveram uma inflamação mais grave da retina, vítreo e úvea associada com o aumento do número de parasitas (Lyons *et alii*, 2001).

Realizou-se um estudo para avaliar a produção de citocinas pelas células mononucleares do sangue periférico, em resposta ao antígeno do *T. gondii* em pacientes brasileiros. Os indivíduos foram divididos em quatro grupos: com toxoplasmose ocular congênita, com toxoplasmose ocular adquirida, soropositivos e soronegativos. Pacientes com diagnóstico de toxoplasmose ocular adquirida apresentaram maiores níveis de IL-1 do que indivíduos assintomáticos. Por outro lado, indivíduos assintomáticos secretaram significativamente mais IL-12 e IFN- γ do que os indivíduos com toxoplasmose ocular adquirida. Esses dados sugerem que a resistência ao desenvolvimento de lesões oculares está associada com a habilidade de produzir IL-12 e IFN- γ , e que a susceptibilidade à ocorrência de lesões está possivelmente relacionada com uma maior produção de IL-1. Já os pacientes com toxoplasmose ocular congênita secretaram significativamente menos IL-12 e IFN- γ em resposta ao antígeno parasitário do que os pacientes com a doença adquirida. A resposta diminuída ao antígeno pelas células T dos indivíduos

com toxoplasmose ocular congênita sugere que as células T específicas para o *T. gondii* podem ter sido destruídas ou “anergizadas” pela exposição ao antígeno do parasita no período pré-natal (Yamamoto *et alii*, 2000).

Um estudo francês também avaliou a produção de IFN- γ , IL-10 e IL-4 por células mononucleares do sangue periférico, após cultura, expostas ao antígeno do *T. gondii*. Essas células foram coletadas de indivíduos portadores de toxoplasmose ocular congênita, adquirida ou indeterminada, indivíduos com sorologia positiva, mas sem lesão ocular e indivíduos com sorologia negativa. Não foi encontrada diferença significativa na produção dessas citocinas entre os indivíduos. Sugere-se que o achado contrário ao estudo anterior, Yamamoto *et alii*, 2000, se deva a diferenças em alguns fatores, como tempo de cultura das células sanguíneas, carga parasitária na cultura e carga parasitária na infecção congênita (Fatoohi *et alii*, 2006).

Cultura de células do epitélio pigmentar da retina de humanos foi utilizada para investigar a resposta celular primária das células retinianas à replicação intracelular do *T. gondii*, através da medida dos níveis secretados de IL-1, IL-6, fator estimulador de colônias de granulócito-macrófago (GM-CSF) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). Os níveis dessas moléculas aumentaram progressivamente com o tempo e em correlação com o número de células infectadas, assim como com a concentração intracelular do parasita, sugerindo um papel imunorregulatório dessas moléculas no processo fisiopatológico da toxoplasmose ocular (Naginei *et alii*, 2000).

Os resultados desses estudos demonstram a importância das citocinas na modulação da resposta imune na toxoplasmose ocular e sugere que a deficiência na produção de determinadas citocinas pode acarretar um aumento das lesões oculares, associado a um maior número de parasitas (Cordeiro *et alii*, 2010).

3. OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imunofenotípica nos monócitos CD14⁺ de citocinas TNF- α , IL-12, IL-6, e IL-10 nos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica (RPT) ativa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a expressão imunofenotípica dos monócitos CD14⁺ nos pacientes com RPT ativa, antes e após a estimulação com antígenos de taquizoítos solúveis e compará-los com os controles.
- 2) Investigar a associação entre a expressão das citocinas nos monócitos CD14⁺ com as características clínicas.
- 3) Investigar a associação entre a expressão das citocinas nos monócitos CD14⁺ com as características da angiografia por fluoresceína sódica, angiografia por indocianina verde e tomografia de coerência óptica espectral.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

O trabalho utilizou-se de dois delineamentos de estudos: transversal e experimental.

O estudo clínico transversal consistiu na avaliação e coleta dos dados clínicos em dois momentos distintos, antes e após o tratamento específico para toxoplasmose ocular. Os pacientes com RPT ativa eram submetidos ao exame clínico e oftalmológico. Mensurava-se a acuidade visual corrigida, obtinha-se a retinografia, e realizava-se os exames de angiografia com fluoresceína sódica, angiografia por indocianina verde e sOCT.

Os grupos controles eram submetidos apenas ao exame clínico e oftalmológico em um único momento para descartamos quaisquer anormalidades físicas e alterações oculares.

O estudo experimental foi realizado no Laboratório de Biologia das Interações Celulares do Instituto de Ciências Biológicas e consistiu na avaliação das amostras do sangue periférico dos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa e dos indivíduos controles para analisar as citocinas TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10 em monócitos CD14⁺. Avaliando-se o comportamento da expressão das citocinas em dois meios diferentes, sem e com estímulo pelo antígeno solúvel do taquizoíto (*Soluble Tachyzoite Antigen* - STAg).

4.2 PACIENTES E MÉTODOS

4.2.1 Pacientes

Os pacientes foram selecionados do serviço de Uveítes do Hospital São Geraldo - anexo do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de

Minas Gerais (UFMG). Vinte (20) pacientes participaram do estudo, como grupo Retinocoroidite Presumidamente Toxoplásmica Ativa (RCT), e dezoito (18) indivíduos participaram como controles, subdivididos em grupo Controle Negativo (CT-) (sorologia IgG negativa pelo método ELISA para *T. gondii* - sem lesão ocular) e grupo Controle Positivo (CT+) (sorologia IgG positiva pelo método ELISA para *T. gondii* - sem lesão ocular), possuindo 9 indivíduos cada grupo. O estudo foi aprovado pelo Comitê em Ética e Pesquisa (COEP) pela UFMG e todos os indivíduos participantes foram aceitos após leitura, concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os critérios de inclusão para o grupo RCT foram:

- a- idade maior que 18 anos;
- b- ausência de doenças sistêmicas prévias ou concomitantes a uveíte posterior por toxoplasmose, inclusive HIV;
- c- não uso de medicamentos durante a uveíte posterior presumidamente por toxoplasmose - exceção para o uso de anticoncepcional oral;
- d- diagnóstico clínico e sorológico de uveíte por toxoplasmose;
- e- doença ocular ativa, iniciado há menos de 10 dias e sem tratamento;
- f- presença de cicatriz retinocoroidiana no mesmo olho ou no olho contralateral à lesão ativa;
- g- seguimento dos cuidados e tratamento adequado.

Os critérios para inclusão do grupo CT-:

- a- idade maior que 18 anos;
- b- ausência de doenças sistêmicas prévias ou atuais, inclusive HIV;
- c- não uso de medicamentos - exceção para o uso de anticoncepcional oral;
- d- ausência de doença ocular e cicatriz retinocoroidiana;
- e- sorologias para toxoplasmose negativas (IgG e IgM negativos).

Os critérios para inclusão do grupo CT+:

- a- idade maior que 18 anos;
- b- ausência de doenças sistêmicas prévias ou atuais;
- c- não uso de medicamentos - exceção para o uso de anticoncepcional oral;
- d- ausência de doença ocular e cicatriz retinocoroidiana;
- e- sorologia para toxoplasmose positiva (IgG positivo).

Todos os pacientes com uveíte posterior secundária a toxoplasmose foram acompanhados durante o período de doença ativa num intervalo quinzenal ou menor de acordo com as necessidades de suas reavaliações. O tratamento utilizado foi o preconizado pelo serviço de Uveítes do Hospital São Geraldo - HC/UFMG (protocolo Prof. Dr. Fernando Oréfice) que consiste em (Anexo A):

- a- sulfadiazina 4 gramas diárias, divididas em 4 doses, durante 42 dias;
- b- pirimetamina 25 mg - dose de ataque de 75 mg no primeiro dia, 50 mg nos segundo e terceiro dias e 25 mg diário durante 39 dias;
- c- prednisona 0,5 mg/kg/dia - dose diária única pela manhã, com redução de 5 mg a cada 6 dias, iniciado 1 dias após sulfadiazina e pirimetamina;
- d- ácido fólico 15 mg - 3 vezes por semana, durante 42 dias.

4.2.2 Exame Oftalmológico

O grupo RCT e os grupos controles, CT- e CT+, foram submetidos à avaliação oftalmológica que incluiu: medida da acuidade visual corrigida em LogMAR (Logaritmo do Mínimo Ângulo de Resolução); medida da pressão ocular pela tonometria de aplanção; biomicroscopia do segmento anterior; biomicroscopia do segmento posterior; oftalmoscopia binocular indireta.

A acuidade visual foi mensurada utilizando-se a tabela ETDRS a 4 metros, utilizando-se a medida por LogMAR.

Durante o exame biomicroscópico foi avaliada a intensidade da reação da câmara anterior (RCA), *haze* vítreo e o tamanho da lesão de retinocoroidite ativa de acordo com o diâmetro do disco óptico (DD).

A atividade da lesão ocular foi definida por suas características: lesão com margens indefinidas, coloração branco-amarelada, aspecto algodinoso, presença de edema perilesional.

A intensidade da RCA foi estimada de acordo com a classificação internacional proposta pelo Standardization of Uveitis Nomenclature (The SUN, 2005).

A intensidade das opacidades do corpo vítreo foi classificada da seguinte forma (Kimura *et alii*, 1959):

0 = nenhuma opacidade;

+ = poucas opacidades; nítida observação do fundo ocular;

++ = poucas opacidades; leve borramento visual dos detalhes do fundo ocular;

+++ = muitas opacidades; marcada dificuldade de visualização dos detalhes do fundo ocular, mas ainda permitindo distinção das estruturas oculares;

++++ = opacidades densas que impedem a observação do fundo ocular.

A localização da lesão era definida da seguinte forma (Holland *et alii*, 1989) (Figura 3):

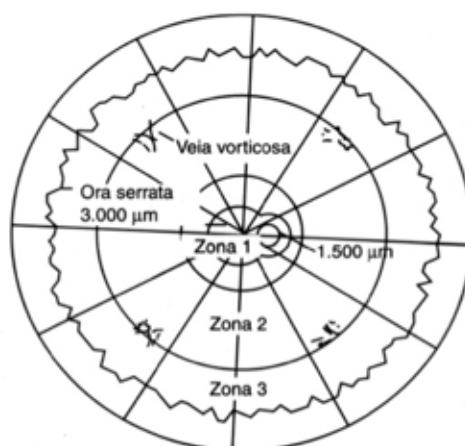


Figura 3: Esquema da retina para localização das lesões retinocoroidianas.

Fonte: Holland *et alii*, 1989.

Zona 1: correspondente a uma área de aproximadamente 3000 μm (2 DD) a partir da fóvea (corresponde aproximadamente à área compreendida entre as grandes arcadas vasculares temporais) ou 1500 μm das margens do disco óptico;

Zona 2: anterior à zona 1 até o equador do globo ocular, que é identificado pela borda anterior das ampolas das veias vorticosas;

Zona 3: estendendo-se anterior à zona 2 até a ora serrata.

4.2.3 Retinografia

A retinografia foi obtida por meio da fotografia do fundo do olho, com as pupilas dilatadas, utilizando-se a luz branca com o retinógrafo TRC-50IX® (Topcon Corporation, Tóquio, Japão), antes e após o tratamento. Adquiridas as imagens, com recurso do *software* do aparelho, delimitamos a área correspondente à lesão ocular ativa, excluindo o edema perilesional (Figura 4).

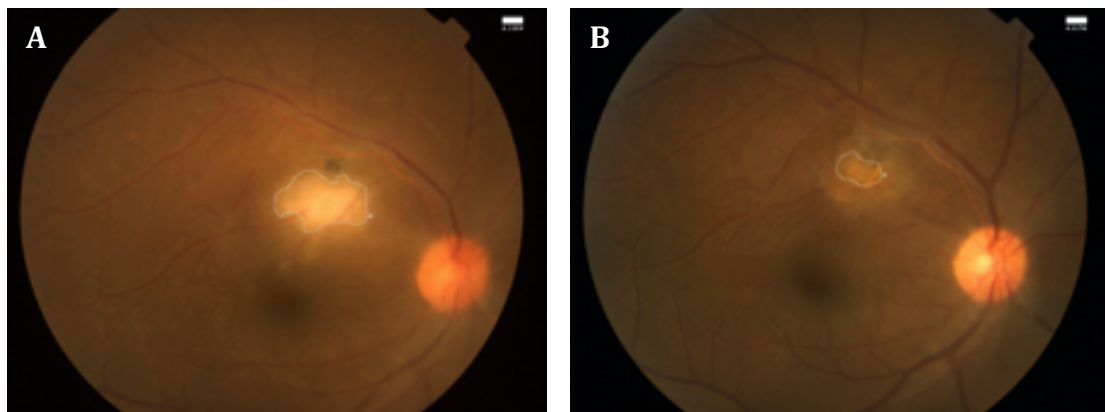


Figura 4: Retinografia demonstrando a área da lesão retinocoroidiana (linha branca) próxima à lesão cicatrizada. (A) Antes do tratamento; (B) após o tratamento.

4.2.4 Angiografia por Fluoresceína Sódica e por Indocianina Verde

As imagens foram obtidas de acordo com o protocolo da clínica CBCV (Centro Brasileiro de Ciências Visuais), utilizando-se o aparelho HRA + OCT Spectralis® (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemanha).

Os pacientes foram submetidos ao exame de angiografia por fluoresceína sódica e por indocianina verde, focando a lesão ativa e toda retina, inclusive a periferia. Os teste foram feitos antes e depois do tratamento.

Primeiramente injetava-se 01 mL da solução de 7,5 mg/mL de indocianina verde diluído em 09 mL de água bidestilada, em *bolus*, na veia periférica do membro superior direito, seguido de infusão de soro fisiológico num volume de 05 mL, também em *bolus*. O tempo de duração de obtenção das imagens foi de 30 minutos, iniciando no olho acometido pela lesão ativa, e inspecionando-se em seguida o olho contralateral (Figura 5).

Ao fim da fase intermediária da angiografia pela indocianina verde, iniciava-se a avaliação pela angiografia por fluoresceína sódica. Injetava-se 5 ml de fluoresceína sódica a 10%, em *bolus*, no mesmo acesso venoso periférico obtido para a indocianina verde, porém em seringas diferentes, sem haver mistura das duas soluções. Iniciava-se a obtenção das imagens com lente de 55 graus, no olho acometido pela lesão ativa e, em seguida, avaliava-se o olho contralateral. A duração da obtenção das imagens era de aproximadamente 15 minutos (Figura 6).

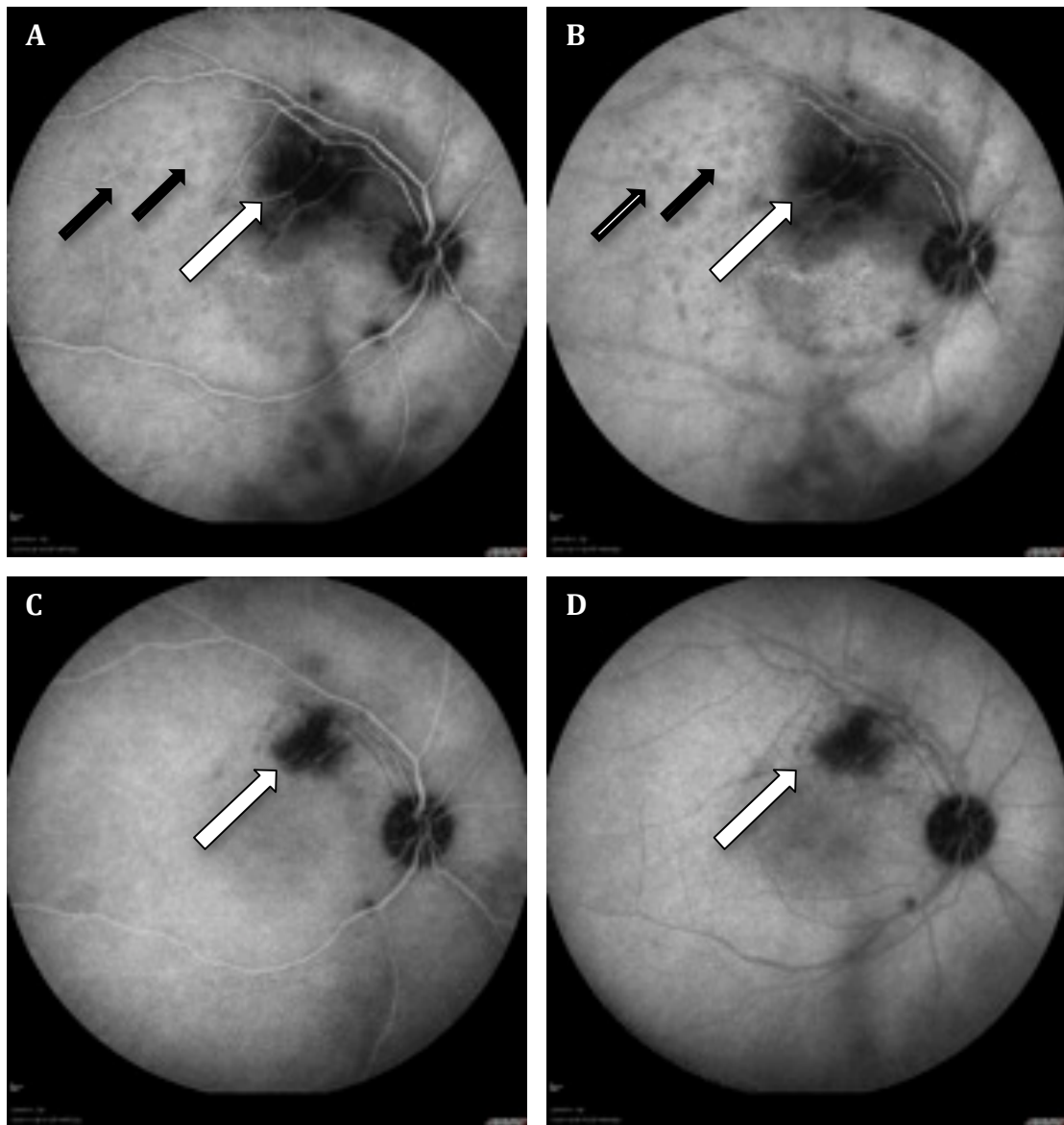


Figura 5: Angiografia por Indocianina Verde. (A) e (B) Antes do tratamento, nas fases intermediária e tardia; (C) e (D) após o tratamento, nas fases intermediária e tardia. Setas brancas: lesão retinocoroidiana; setas negras: infiltrados coroidianos.

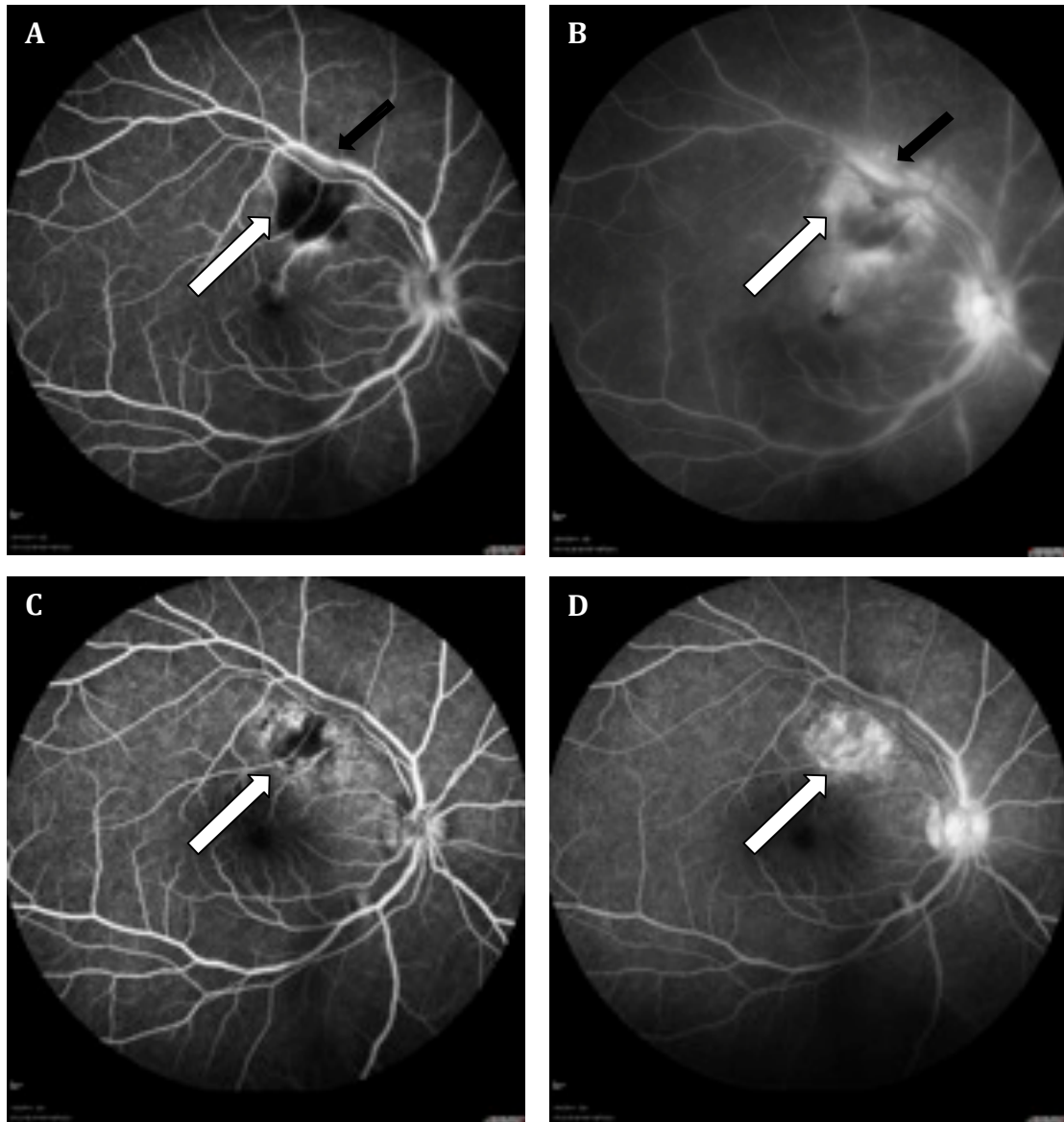


Figura 6: Angiografia por Fluoresceína Sódica. (A) e (B) Antes do tratamento, nas fases intermediária e tardia; (C) e (D) após o tratamento, nas fases intermediária e tardia. Setas brancas: lesão retinocoroidiana; setas negras: flebite.

4.2.5 Tomografia de Coerência Óptica

Utilizou-se o aparelho HRA + OCT Spectralis® (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemanha), com o protocolo de aquisição das imagens incluindo *scans* horizontais das áreas da lesão ativa e da mácula.

Os pacientes foram submetidos ao exame de imagem pelo sOCT ao serem diagnosticados com toxoplasmose ocular ativa, antes do início do tratamento, e após o término do tratamento (Figura 7).

Nas imagens obtidas, analisaram-se a maior altura da lesão e o maior tamanho linear da lesão (*smudge*). Avaliado pelo *expert* em retina, Prof. Dr. Rogério Alves Costa.

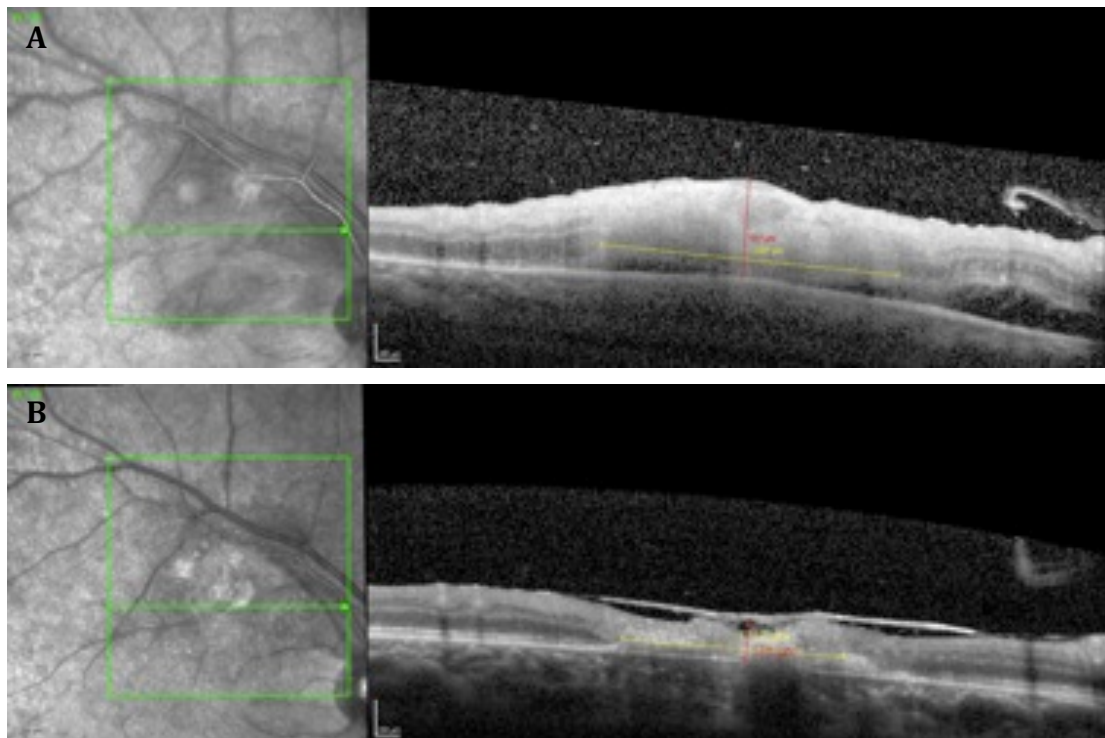


Figura 7: Tomografia de Coerência Óptica mensurando-se a altura e o *smudge* da lesão retinocoroidiana presumidamente toxoplásmica. (A) Antes do tratamento; (B) após o tratamento. Linha vertical vermelha: maior extensão em altura; linha horizontal amarela: maior extensão longitudinal (*smudge*).

4.2.6 Imunofenotipagem dos Monócitos CD14⁺

Todo material utilizado na coleta era estéril, coletado no serviço de Uveítes do Hospital São Geraldo - HC/UFMG, e condicionados em caixa de isopor a temperatura ambiente.

O procedimento para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi realizado na capela com fluxo laminar. A amostra sanguínea era levado ao Laboratório de Biologia das Interações Celulares do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, chefiado pela Prof^a. Dr^a. Walderez Ornelas Dutra, num período inferior a 4 horas.

Foram coletados 20 mL de sangue periférico em tubos tipo à vácuo contendo heparina sódica e a essa amostra foram acrescidos solução fisiológica contendo fosfato (PBS) no mesmo volume que o do sangue a ser analisado. O sangue acrescido de PBS foi então vertido lentamente sob o Ficoll-Paque® (GE Healthcare, Nova Jersey, EUA) contido em tubos plásticos. O volume de Ficoll-Paque® é o mesmo que o do sangue original. O tubo com o gradiente de Ficoll-Paque® foi centrifugado a 1200 rpm, por 40 minutos a temperatura ambiente (entre 18 e 23 °C).

Após a centrifugação, o plasma era coletado e armazenado. O anel de CMSP presente na interface do plasma com o Ficoll-Paque® era coletado com o auxílio de uma pipeta e transferido para outro tubo, onde eram feitas as lavagens em PBS a 4°C para remoção de resíduos de Ficoll-Paque®. Esse tubo era lavado e centrifugado (1200 rpm, por 10 minutos a 4°C) por duas vezes. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante era descartado e o precipitado celular ressuspenso em meio RPMI-1640 suplementado com antibióticos (penicilina 200 UI/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL), 1 mM de L-glutamina e 10% de soro humano inativado AB Rh⁺, na concentração final de 1×10^7 células por mL. A viabilidade celular era avaliada pelo corante intravital azul de Tripán (diluição das células em corante 1:20 v/v) seguido da contagem em câmara de Neubauer.

Após contagem, as CMSP eram colocadas em cultura na presença de antígeno solúvel de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (STAg), preparados conforme o trabalho executado por Gazzinelli *et alii*, 1991 (Gazzinelli *et alii*, 1991).

As amostras eram incubadas por 20 horas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. Nas últimas 4 horas, adicionava-se brefeldina A (1 µg/ml), necessária para assegurar a retenção da citocina intracelular, uma vez que essa substância as mantém no interior do complexo de Golgi (Klausner *et alii*, 1992). Transcorrido as 4 horas após as 16 horas de incubação, iniciava-se o protocolo de marcação de antígenos de superfície celular e citocinas intracelulares.

4.2.6.1 Marcação de Superfície e Intracelular

As CMSP de pacientes infectados com *T. gondii* com lesão ocular ativa (Grupo RCT), bem como de indivíduos infectados sem a lesão ativa (Grupo CT+) e os indivíduos não infectados (Grupo CT-) foram avaliados em diferentes situações de cultura: CMSP mantidas em cultura contendo apenas meio RPMI completo (Meio) e cultura contendo meio RPMI completo acrescido de STAg.

Transcorrido o tempo de cultura, as células (aproximadamente 2×10^5 CMSP) foram incubadas na presença de anticorpos monoclonais (mAb) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE) por 20 minutos a 4°C para a marcação das moléculas de superfície CD14 presente nos monócitos, bem como para os controles de isotipo. Após marcação, as amostras foram lavadas com PBS e fixadas com 200 µL de PBS com 2% de formaldeído.

Após fixação, as células foram permeabilizadas com solução de saponina e incubadas com mAb conjugados com PE para as citocinas presente no ambiente intracelular TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10 por 30 minutos a 4°C. As células eram lavadas, fixadas e adquiridas utilizando o citômetro de fluxo FACSCan® (Becton, Dickinson and Company, Califórnia, EUA). Os dados obtidos eram analisados considerando o padrão de citocinas intracitoplasmáticas e seus marcadores de superfície, utilizando o programa

CellQuest Pro Software® (Becton, Dickinson and Company, Califórnia, EUA) e FlowJo 7.6.5® (Tree Star Incorporation, Oregon, EUA).

A avaliação do perfil celular foi realizado em cada amostra, considerando os parâmetros de tamanho e granulosidade das células. Para a aquisição, armazenamento e análise dos dados referentes à resposta celular foi empregado o citômetro de fluxo FACSCan®, equipado com sistema de computador contendo o *software* CellQuest Pro Software®.

As populações de monócitos foram selecionadas em gráficos de tamanho versus granulosidade. A identificação da população celular de interesse foi confirmada através dos gráficos de intensidades de fluorescência, tendo como marcador constitutivo a molécula de superfície CD14.

4.2.6.2 Estratégia de análise

Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse (R1), o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, incluindo as modalidades FL1 *versus* FL2 e histogramas de FL2 (Figura 8 e 9).

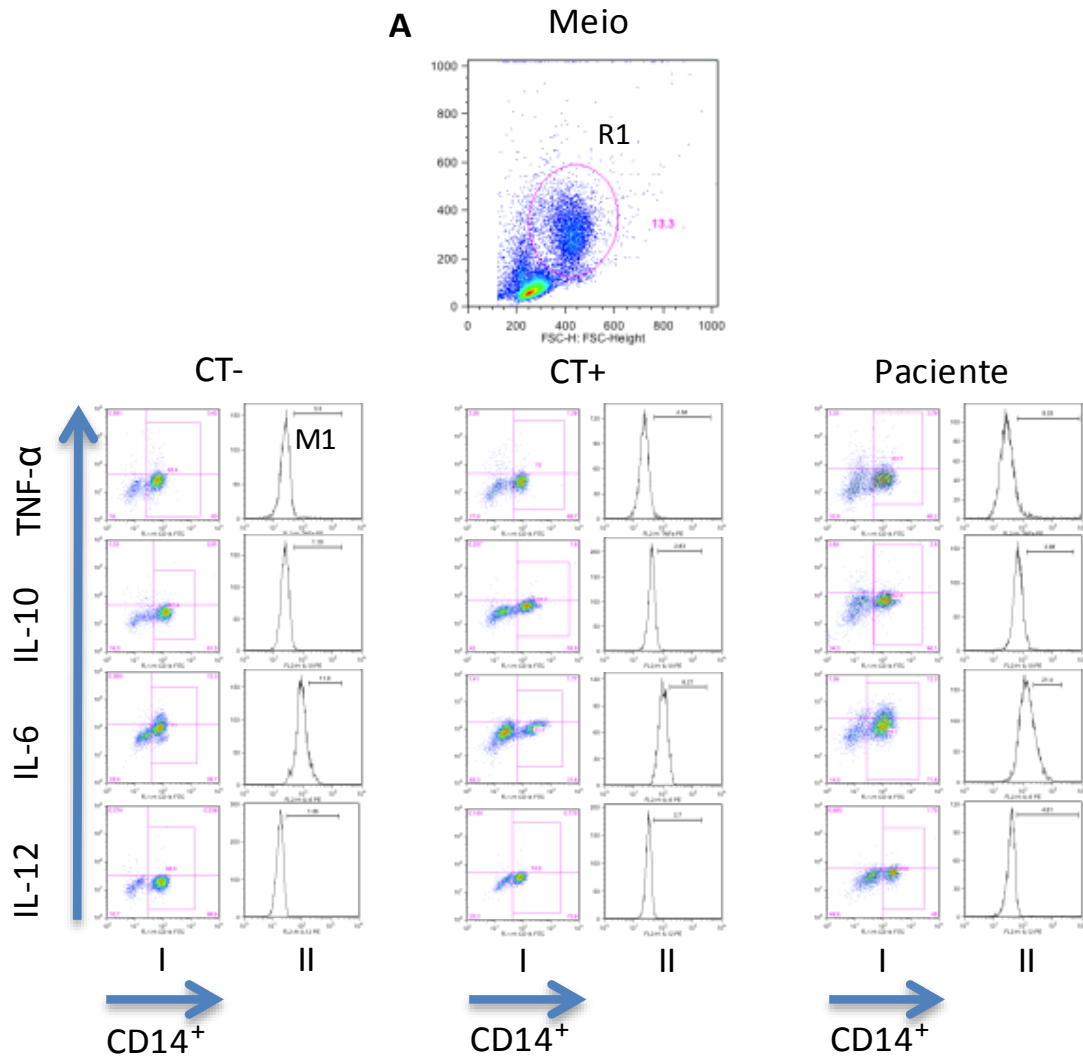


Figura 8: Estratégia de análise para quantificar o percentual de células CD14⁺ que expressaram as citocinas TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-12 nas CMSP no Meio.

Seleção da população CD14⁺ total para os monócitos provenientes de CMSP, com seleção da região R1 (A), seguido de posicionamento dos quadrantes (I) e determinação do percentual de frequência das células duplo positivas com posicionamento de M1 em gráficos de histogramas construídos a partir da região R1(II).

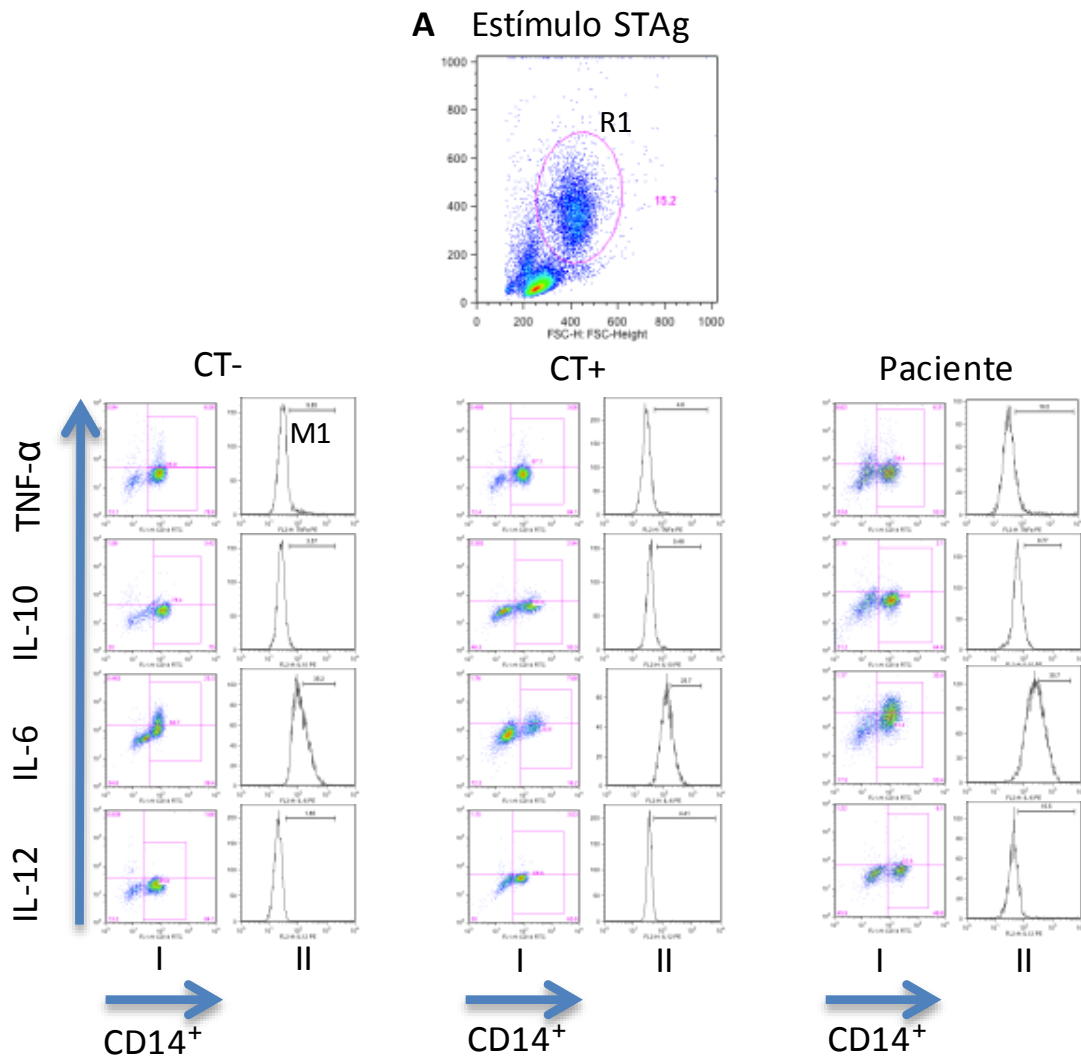


Figura 9: Estratégia de análise para quantificar o percentual de células CD14⁺ que expressaram as citocinas TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-12 nas CMSP com Estímulo pelo STAg. Seleção da população CD14⁺ total para os monócitos provenientes de CMSP, com seleção da região R1 (A), seguido de posicionamento dos quadrantes (I) e determinação do percentual de frequência das células duplo positivas com posicionamento de M1 em gráficos de histogramas construídos a partir da região R2(II).

4.2.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 4.0® (São Diego, EUA) e JMP 5.0.5® (Carolina do Norte, EUA). Os cálculos foram realizados definindo-se os dados como do tipo não-paramétrico, pareados, utilizando-se o Teste de Wilcoxon. Para avaliação de 3 grupos independentes utilizou-se do Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, quando verificava-se diferença entre os grupos. Os testes de hipóteses foram avaliados considerando-se um nível de significância menor ou igual a 0,05.

4.2.8 Cálculo do Tamanho Amostral

Utilizamos o programa G*Power 3.1® (Dusseldorf, Alemanha) para o cálculo do tamanho amostral. O tamanho amostral foi inicialmente definido de acordo com a conveniência e a disponibilidade dos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa em participarem do estudo e da quantidade de material disponível para a realização das análises laboratoriais (anticorpos) e dos exames complementares (fluoresceína sódica e indocianina verde).

Após o grupo RCT ter sido constituído por 20 indivíduos, aplicou-se a análise da magnitude de efeito, de acordo com as médias de desvios padrões de cada subgrupo, considerando-se cada citocina analisada, TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10, para o teste não-paramétrico com grupos pareados, definindo-se o nível de significância de 0,05 e poder de 0,95. Obteve-se para cada citocina analisada um número de amostras necessárias, como: para TNF- α , tamanho amostral (n) de 7, para IL-12, n de 6, para IL-6, n de 4 e para IL-10, n de 4 (Figura 10).

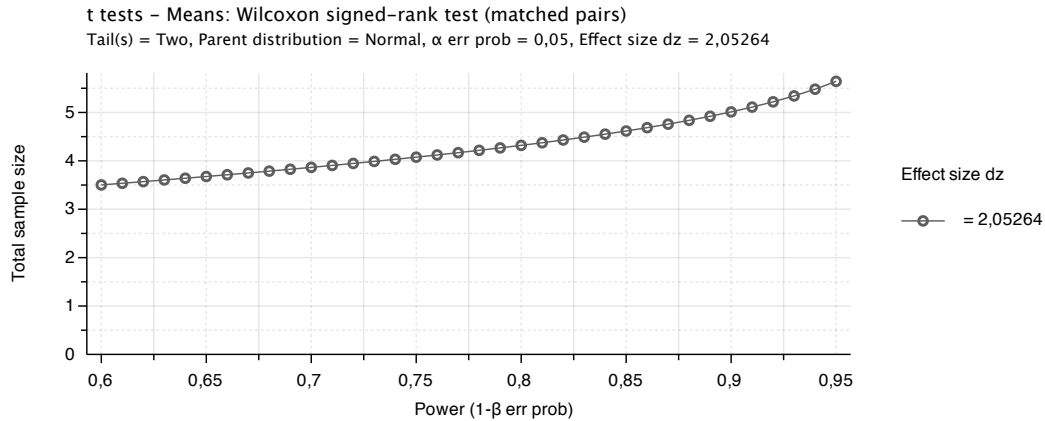


Figura 10: Relação do tamanho amostral com poder do teste. Análise da porcentagem de monócitos CD14⁺ que expressaram a citocina TNF- α obtidos sem e com estímulo pelo STAg. Poder (1-beta) do estudo, dado o nível de significância de 0,05; a magnitude de efeito de 2,05; teste de hipótese bicaudal; teste de Wilcoxon.

4.2.9 Aspectos Éticos

O projeto foi, inicialmente, aprovado pelo Departamento de Oftalmologia - Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia do Hospital das Clínicas da UFMG. Em seguida, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG no dia 20 de setembro de 2010, sob o parecer número ETIC 0354.0.203.000-10 (Anexo B), seguida da aprovação pelo conselho da minha participação como pesquisador no dia 21 de novembro de 2011 (Anexo C).

Os participantes da pesquisa foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo, a importância de sua colaboração, os possíveis benefícios e a ausência de riscos. Exigiu-se, ainda, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, segundo as diretrizes do COEP - UFMG, fundamentadas na Declaração de Helsinque de 1975, referendada em 2000 (Anexo E).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS

O estudo foi constituído por 3 grupos, classificados como: grupo RCT (evidências clínicas e laboratoriais de retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa); grupo Controle Negativo (CT-) (sorologia IgG negativa para *T. gondii* - sem lesão ocular); grupo Controle Positivo (CT+) (sorologia IgG positiva para *T. gondii* IgG - sem lesão ocular).

O grupo CT- foi composto por 9 indivíduos, 7 mulheres (77,78%) e 2 homens (22,22%), com idade média de $31,11 \pm 6,64$ anos. O grupo CT+ foi composto por 9 indivíduos, composto por 8 mulheres (88,89%) e 1 homem (11,11%), com idade média de $29,22 \pm 4,84$ anos. O grupo RCT foi composto por 20 indivíduos, sendo 11 mulheres (55%) e 9 homens (45%), com idade média de $26,95 \pm 8,29$ anos (Tabela 1).

Tabela 1: Características dos grupos quanto à idade (anos) e gênero.

		Grupos			
		CT-/n (%)	CT+/n (%)	RCT/n (%)	Valor p
Sexo	Feminino	7 (77,78%)	8 (88,89%)	11 (55%)	0,159*
	Masculino	2 (22,22%)	1 (11,11%)	9 (45%)	
Média ± DP					
Idade		$31,11 \pm 6,64$	$29,22 \pm 4,84$	$26,95 \pm 8,29$	0,202*

*Teste Kruskal-Wallis; nível de significância de 0,05;

CT-: Grupo Controle Negativo; CT+: Grupo Controle Positivo; RCT: Grupo Retinocoroidite Ativa;
n: tamanho amostral; DP: desvio padrão

Aplicando-se a análise estatística, teste de Kruskal-Wallis, para comparar a média de idade entre os três grupos independentes, observa-se não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,20$). Avaliou-se

também a comparação entre os sexos dos três grupos, não existindo diferença estatisticamente significativa ($p=0,16$) (Tabela 1).

Foi prescrito para os 20 pacientes, pertencentes ao grupo RCT, tratamento para RCT com sulfadiazina, pirimetamina, prednisona e ácido fólico por um período de 42 dias, conforme preconizado pelo serviço de Uveítes do Hospital São Geraldo - HC/UFMG (protocolo Prof. Dr. Fernando Oréfice) (Anexo A). Exceções ocorreram com paciente número 2 que não realizou o tratamento; pacientes números 3 e 4 que necessitaram estender o tratamento para 60 e 90 dias, respectivamente, pois não tiveram critérios clínicos e de imagens de resolução da retinocoroidite toxoplásmica no período de 45 dias; paciente número 8 que terminou o tratamento com 35 dias por ter apresentado intolerância à medicação prescrita; paciente número 20 que usou apenas sulfametoxazol/trimetoprima por ter tido intolerância à prednisona, pirimetamina e sulfadiazina.

No grupo RCT, os pacientes números 2, 3 e 4 (4 realizou apenas a retinografia) não retornaram para serem submetidos aos exames complementares; a paciente número 20 não foi possível realizar os exames complementares pois a lesão retinocoroidiana toxoplásmica ativa estava localizada na extrema periferia; o paciente número 12 foi submetido aos exames complementares antes de iniciar o tratamento mas não os realizou após o tratamento (apenas retinografia) por ter apresentado descolamento retiniano no olho com lesão. Foram portanto excluídos das análises clínicas comparativas.

Os indivíduos dos grupos CT- e CT+ foram submetidos ao exame oftalmológico, não evidenciando-se alterações oculares. Todos apresentavam acuidade visual corrigida LogMAR igual a 0, sem ou com uso de lentes corretivas, e não havia lesões intraoculares, principalmente retinocoroidianas.

Investigados 20 indivíduos do grupo RCT, 8 (40%) eram a primeira manifestação da retinocoroidite toxoplásmica relatada, apesar de

apresentarem cicatrizes sugestivas de retinocoroidite toxoplásmica, e 12 (60%) eram recidivas.

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA RETINOCOROIDITE TOXOPLÁSMICA ATIVA

5.2.1 Análise Clínica e Biomicroscópica do Grupo RCT

Avaliaram-se 20 olhos com lesão ativa pela retinocoroidite, em 20 indivíduos, 10 indivíduos (50%) apresentavam lesão no OD e 10 indivíduos (50%) com lesão no OE (Tabela 2).

A proporção da localização da retinocoroidite ativa nos 20 olhos foi: 7 olhos (35%) com lesão na zona 1; 11 olhos (55%) com lesão na zona 2; olhos 2 (10%) com lesão na zona 3 (Figura 3) (Tabela 2).

Tabela 2: Características do exame biomicroscópico dos 20 pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa.

Exame Biomicroscópico		n (%)
Olho	Direito	10 (50%)
	Esquerdo	10 (50%)
RCA*	Ausente	8 (40%)
	1+	6 (30%)
	2+	4 (20%)
	3+	2 (10%)
	4+	0
Tipo	Satélite	17 (85%)
	Focal	2 (10%)
	Punctata	1 (5%)
Localização**	Zona 1	7 (35%)
	Zona 2	11 (55%)
	Zona 3	2 (10%)
Tamanho	<1DD	12 (60%)
	1-2DD	7 (35%)
	>2DD	1 (5%)
Haze vítreo***	0,5+	6 (30%)
	1+	5 (25%)
	2+	4 (20%)
	3+	5 (25%)
	4+	0

n: tamanho mostral; DD: diâmetro de disco óptico; RCA: reação de câmara anterior.

* SUN – Working Group, 2005

** Holland *et alii*, 1989

*** Kimura *et alii*, 1959

A acuidade visual corrigida (AV) foi mensurada em todos os indivíduos com RCT, mas realizada a análise estatística em apenas 16 olhos com lesão RCT, 3 foram excluídos por apresentarem acuidade visual inferior a 1,3 (números 3, 11 e 12), pois a medida da AV pela tabela ETDRS não torna-se precisa em baixas acuidades visuais, e no paciente número 2 por não ter utilizado a medicação. A média da acuidade visual em LogMAR antes do tratamento foi $0,43 \pm 0,49$. Após o tratamento, a média da acuidade visual foi $0,12 \pm 0,24$. Houve diferença estatisticamente significativa entre a AV antes e após tratamento ($p=0,001$) (Tabela 3).

Tabela 3: Acuidade visual corrigida (LogMAR) dos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa antes e após o tratamento.

Acuidade Visual			
	n	Média \pm DP	Valor p
Pré-tratamento	16	$0,43 \pm 0,49$	0,001
Pós-tratamento		$0,12 \pm 0,24$	

n: tamanho amostral; DP: desvio padrão.

A Figura 11 demonstra a acuidade visual em pontos pareados antes e após o tratamento.

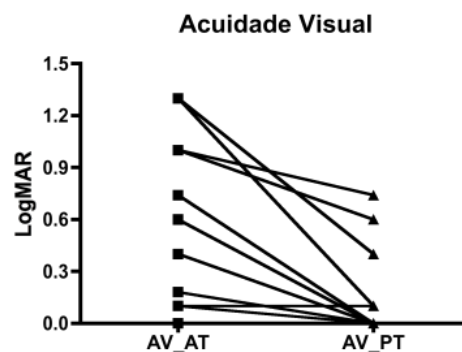


Figura 11: Representação dos valores da Acuidade Visual do grupo com retinocoroidite toxoplásmica ativa antes e depois do tratamento em pontos pareados de 16 indivíduos. Valor $p=0,002$ (teste Wilcoxon; nível de significância de 0,05).

A proporção dos 20 olhos com reação da câmara anterior (RCA) antes do tratamento foi: 8 olhos (40%) ausência de RCA; 6 olhos (30%) com + de RCA; 4 olhos (20%) com 2+ de RCA; 2 olhos (10%) com 3+ de RCA; nenhum com 4+ de RCA (Tabela 1).

Apenas 2 olhos (10%) apresentavam precipitados ceráticos em 20 olhos examinados.

O *haze* vítreo estava presente em todos os 20 indivíduos avaliados antes do tratamento na seguinte proporção: 6 olhos (30%) com 0,5+; 5 olhos (25%) com 1+; 4 olhos (20%) com 2+; 5 olhos (25%) com 3+; nenhum com 4+ (Tabela 1).

Dos 20 olhos examinados do Grupo RCT, o tipo de lesão distribuiu-se na seguinte proporção: 17 olhos (85%) com lesão satélite; 2 olhos (10%) com lesão focal; 1 olho (5%) com lesão puntata (Tabela 1).

5.2.2 Tamanho da Lesão Retinocoroidiana pela Retinografia

As lesões retinocoroidianas foram mensuradas antes e após o tratamento, utilizando-se a retinografia. Avaliados 17 pacientes, foram excluídos os pacientes de números 2, não utilizou a medicação prescrita; 3, não retornou para realizar os exames complementares; 20, não foi possível realizar a retinografia pela localização periférica da lesão retinocoroidiana presumidamente toxoplásmica ativa.

O tamanho médio da lesão em mm^2 , antes do tratamento foi $5,26 \pm 3,87 \text{ mm}^2$. Após tratamento foi $3,08 \pm 3,49 \text{ mm}^2$. Houve diferença estatisticamente significativa entre as duas fases, antes e após tratamento ($p=0,003$) (Tabela 4).

Tabela 4: Diâmetro da lesão retinocoroidiana ativa medida pela Retinografia (mm²).

	Retinografia		
	n	Média ± DP	Valor p
Pré-tratamento	17	5,26 ± 3,87	0,003
Pós-tratamento	17	3,08 ± 3,49	

n: tamanho amostral; DP: desvio padrão.

5.2.3 Características da Lesão Retinocoroidiana Avaliadas pela FA e ICGA

Em 16 pacientes foram avaliadas a proporção da apresentação de três características pela angiografia por fluoresceína sódica e por indocianina verde: flebite, extravasamento de disco óptico e infiltrados coroidianos.

A flebite esteve presente em 13 olhos (81,25%) dos 16 olhos avaliados, e em 3 olhos (18,75%) estava ausente, antes do tratamento; após o tratamento, 10 olhos (76,9%) não apresentavam vasculite, e 3 olhos (23,1%) persistia o extravasamento do corante pelos vasos retinianos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos pareados ($p=0,0078$) (Tabela 5).

O extravasamento do disco óptico esteve presente em 14 olhos (87,5%) dos 16 olhos avaliados, e ausente em 2 olhos (22,5%), antes do tratamento. Após o tratamento, o extravasamento do disco óptico esteve ausente em 12 olhos (92,3%), e presente em apenas 1 olho (6,7%). Houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos pareados ($p=0,0039$) (Tabela5).

Os infiltrados coroidianos foram avaliados em 15 dos 20 olhos, antes do tratamento. A alteração angiográfica esteve presente em 10 olhos (56,25%) e

ausente em 5 olhos (43,75%). A avaliação da alteração após o tratamento foi realizado em 12 olhos. Os infiltrados coroidianos estavam ausentes em 11 olhos (91,7%), e presente em apenas 1 olho (8,3%). A diferença estatística era significativa entre os grupos pareados ($p=0,0078$) (Tabela 5).

Nas três avaliações realizadas com os exames de FA e ICGA, os resultados não foram obtidos de 3 pacientes, pois não aceitaram fazer exame após o tratamento.

Tabela 5: Características das alterações encontradas na Angiografia por Fluoresceína Sódica e Indocianina Verde nos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa.

Angiografia por Fluoresceína e Indocianina Verde				
		Pré- tratamento n (%)	Pós- tratamento n (%)*	Valor p**
Flebite	presente	13 (81,25%)	3 (23,1%)	0,0078
	ausente	3 (18,75%)	10 (76,9%)	
Extravasamento do disco óptico	presente	14 (87,5%)	1 (6,7%)	0,0039
	ausente	2 (22,5%)	12 (92,3%)	
Infiltrados Coroidianos	presente	10 (56,25%)	1 (8,3%)	0,0078
	ausente	5 (43,75%)	11 (91,7%)	

n: tamanho amostral; DP: desvio padrão

*perda de seguimento de 3 pacientes;

** Valor p para Teste de Wilcoxon, nível de significância de 0,005;

5.2.4 Características das Lesões Retinocoroidianas Avaliadas pelo sOCT

As lesões foram mensuradas quanto sua maior extensão em altura e maior extensão linear (*smudge*), antes e após o tratamento, utilizando-se o HRA + OCT Spectralis®, obtido pela aquisição dos *scans* horizontais da área da lesão.

A média do *smudge* da lesão em μm antes do tratamento foi $2166,0 \pm 853,7 \mu\text{m}$. Após o tratamento foi $844,4 \pm 692,7 \mu\text{m}$. Houve diferença

estatisticamente significativa ($p=0,0078$), com tamanho amostral de 12 olhos (Tabela 6).

A média da maior altura da lesão mensurado pelo sOCT em μm antes do tratamento foi de $456,7 \pm 122,0 \mu\text{m}$. Após o tratamento foi de $246,0 \pm 57,8 \mu\text{m}$. Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$), com tamanho amostral de 12 olhos (Tabela 6).

Tabela 6: Características das alterações encontradas na Tomografia de Coerência Óptica (μm) nos pacientes com retinocoroidite ativa.

Tomografia de Coerência Óptica			
	n = 12	Média \pm DP	Valor p
<i>Smudge</i>	Pré-tratamento	2166 \pm 853,7	0,0078
	Pós-tratamento	844,4 \pm 692,7	
Altura	Pré-tratamento	456,7 \pm 122	0,001
	Pós-tratamento	246 \pm 57,8	

n: tamanho amostral; DP: desvio padrão.

O descolamento seroso retiniano pelo sOCT estava presente em 11 olhos (61%) de 18 pacientes avaliados e ausentes em 7 olhos, antes do tratamento (39%). Após o tratamento, não havia descolamento seroso retiniano nos 18 olhos (100%) avaliados.

5.3 AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DOS MONÓCITOS CD14⁺ DO SANGUE PERIFÉRICO NOS GRUPOS RCT E CONTROLES

5.3.1 Expressão do TNF- α nos Monócitos CD14⁺

A expressão do TNF- α pelos monócitos CD14⁺ dos indivíduos do grupo RCT, demonstra-se elevada em relação aos indivíduos do grupo CT-, tanto quando comparados nas condições sem e com estímulo pelo STAg. A expressão da citocina eleva-se ainda mais quando estimulado pelo STAg, com diferença significativa, quando comparado com os grupos controles, CT- e CT+ (Figura 12).

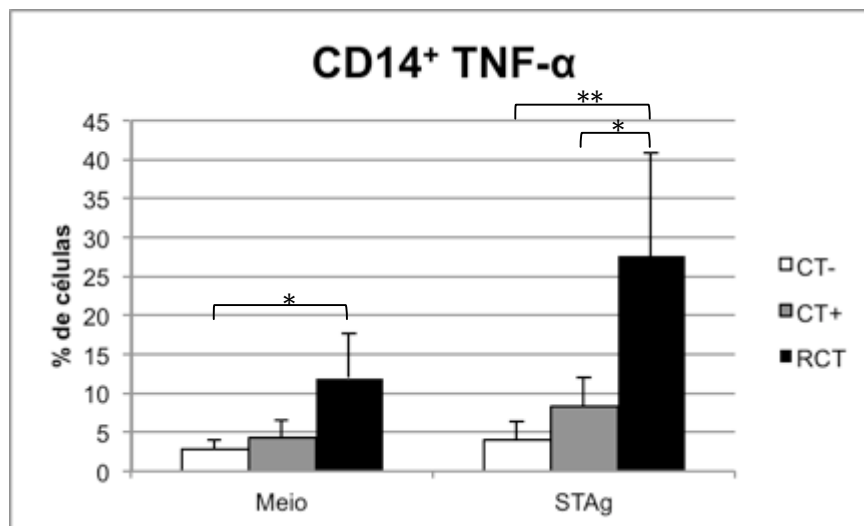


Figura 12: Expressão da citocina TNF- α em monócitos CD14⁺ dos controles negativos (CT-), controles positivos (CT+) e pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa no Meio e após estímulo com STAg.

Os resultados expressos em médias e desvio padrão, com número amostral de 8 (CT-), 7 (CT+) e 19 (RCT) indivíduos; Teste de Kruskal-Wallis. Os parênteses indicam as diferenças estatisticamente significativas entre as condições. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Verificou-se que na presença de lesão retinocoroidiana ativa, a expressão da citocina TNF- α está aumentada quando comparado na ausência e na presença de estímulo pelo STAg ($p=0,0002$) (Figura13). O mesmo comportamento não é comprovado nos grupos controles, principalmente no CT- que não demonstra diferença estatística ($p=0,219$), e apesar dos cálculos estatísticos demonstrarem uma diferença significativa no CT+ ($p=0,016$), essa diferença está aquém da observada no grupo RCT (Tabela 7).

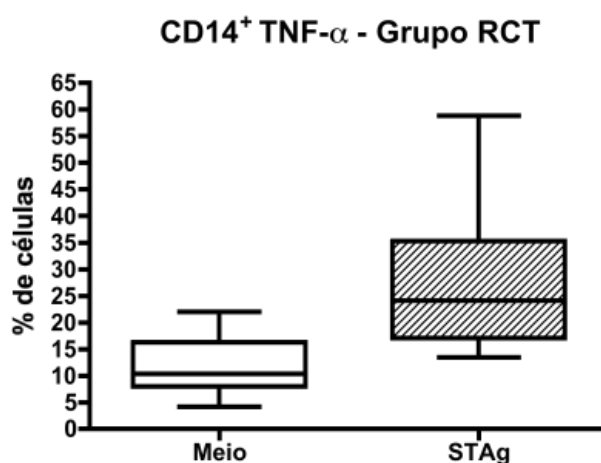


Figura 13: Representação em *box-plot* da porcentagem de monócitos CD14⁺ que expressam a citocina TNF- α no Meio e com estímulo pelo STAg no grupo RCT, em 19 indivíduos ($p=0,0002$).

A linha horizontal dentro da caixa representa o percentil 50 (mediana); a linha inferior da caixa representa o percentil 25 e a linha superior o percentil 75. As linhas finas inferiores representam o percentil 10 e as superiores o percentil 90.

Teste de Wilcoxon; nível de significância de 0,05.

A análise descritiva da expressão do TNF- α nas células mononucleares CD14⁺ do sangue periférico que expressam a citocina na ausência e presença do estímulo STAg está representado na Tabela 7.

Tabela 7: Características dos grupos controles e grupo dos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa quanto porcentagem de monócitos CD14⁺ que expressaram a citocina TNF- α sem (Meio) e com estímulo (STAg).

		TNF- α			
		n	Média \pm DP	Mediana (25%-75%)	Valor p
CT-	Meio	8	2,84 \pm 1,20	2,50 (1,95-3,90)	0,219
	STAg		4,05 \pm 2,38	3,15 (2,40-6,00)	
CT+	Meio	7	4,37 \pm 2,12	4,90 (2,40-6,30)	0,016
	STAg		8,26 \pm 3,75	8,70 (4,60-8,70)	
RCT	Meio	19	11,93 \pm 5,68	10,40 (8,00-16,30)	0,0002
	STAg		27,61 \pm 13,22	24,10 (17,10-35,30)	

n: tamanho amostral; DP: desvio padrão; (25%-75%): quartis 25 e 75.

5.3.2 Expressão da IL-12 nos Monócitos CD14⁺

A expressão de IL-12 pelos monócitos CD14⁺ nos indivíduos com lesão retinocoroidiana ativa, grupo RCT, demonstra-se elevado em relação aos indivíduos do grupo CT-, quando analisadas nas condições sem e com estímulo STAg, enquanto a expressão da citocina eleva-se significativamente quando estimulado pelo STAg, quando comparado com os grupos controles, CT- e CT+ (Figura 14).

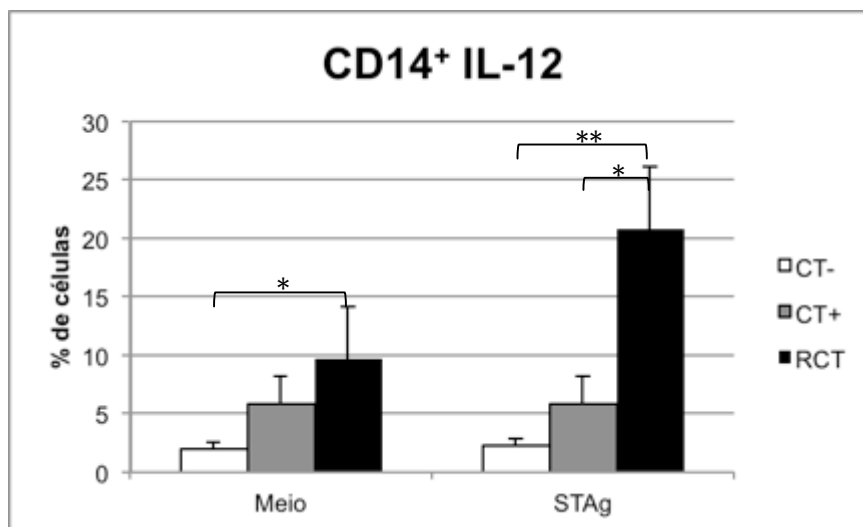


Figura 14: Expressão da citocina IL-12 em monócitos CD14⁺ dos controles negativos (CT-), controles positivos (CT+) e pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica (RCT) ativa no Meio e após estímulo com STAg.

Os resultados expressos em médias e desvio padrão, com número amostral de 9 (CT-), 7 (CT+), e 20 (RCT) indivíduos; Teste de Kruskal-Wallis. Os parênteses indicam as diferenças estatisticamente significativas entre as condições. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

Verificou-se que na presença de lesão retinocoroidiana ativa, a expressão da citocina IL-12 é aumentada, quando comparado na ausência e na presença de estímulo pelo *T. gondii* ($p < 0,0001$) (Figura 15). O mesmo comportamento não é comprovado nos grupos controles, os cálculos estatísticos não demonstram diferença significativa no CT- ($p = 0,1953$), e no CT+ ($p = 1,0625$) (Tabela 8).

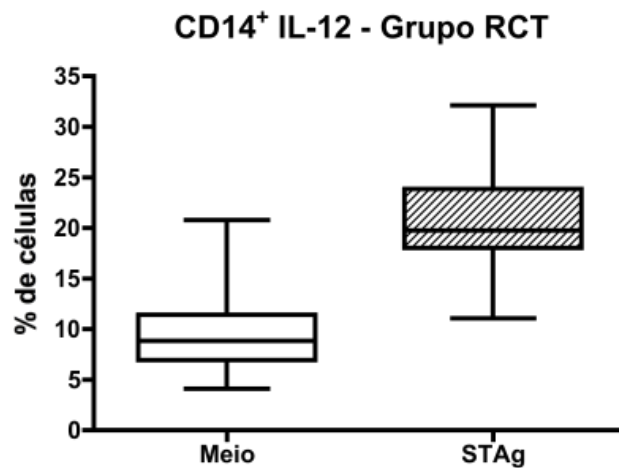


Figura 15: Representação em *box-plot* da porcentagem de monócitos CD14⁺ que expressam a citocina IL-12 no Meio e com estímulo pelo STAg no grupo RCT, em 20 indivíduos. A linha horizontal dentro da caixa representa o percentil 50 (mediana); a linha inferior da caixa representa o percentil 25 e a linha superior o percentil 75. As linhas finas inferiores representam o percentil 10 e as superiores o percentil 90. Valor $p < 0,0001$ (teste de Wilcoxon; nível de significância de 0,05).

A análise descritiva da produção de IL-12 nas células mononucleares CD14⁺ do sangue periférico que expressam a citocina na ausência e presença do estímulo STAg está representado na Tabela 8.

Tabela 8: Características dos grupos controles e grupo dos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa quanto a porcentagem de monócitos CD14⁺ que expressaram a citocina IL-12 sem (Meio) e com estímulo (STAg).

		IL-12			
		n	Média ± DP	Mediana (25%-75%)	Valor p
CT-	Meio	9	1,96 ± 0,59	2,20 (1,40-2,35)	0,1953
	STAg		2,27 ± 0,59	2,00 (1,80-2,90)	
CT+	Meio	7	5,87 ± 2,31	5,20 (5,00-8,80)	1,0625
	STAg		5,82 ± 2,39	5,80 (4,40-7,50)	
RCT	Meio	20	9,69 ± 4,41	8,85 (6,95-11,45)	<0,0001
	STAg		20,79 ± 5,34	19,75 (18,05-23,85)	

n: tamanho amostral; DP: desvio padrão; (25%-75%): quartis 25 e 75.

5.3.3 Expressão da IL-6 nos Monócitos CD14⁺

A expressão da IL-6 nos monócitos CD14⁺ quando avaliados nas duas condições de cultura celular, ausência e presença do estímulo pelo STAg, nos três grupos (RCT, CT- e CT+) comportou-se de maneira similar, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 16).

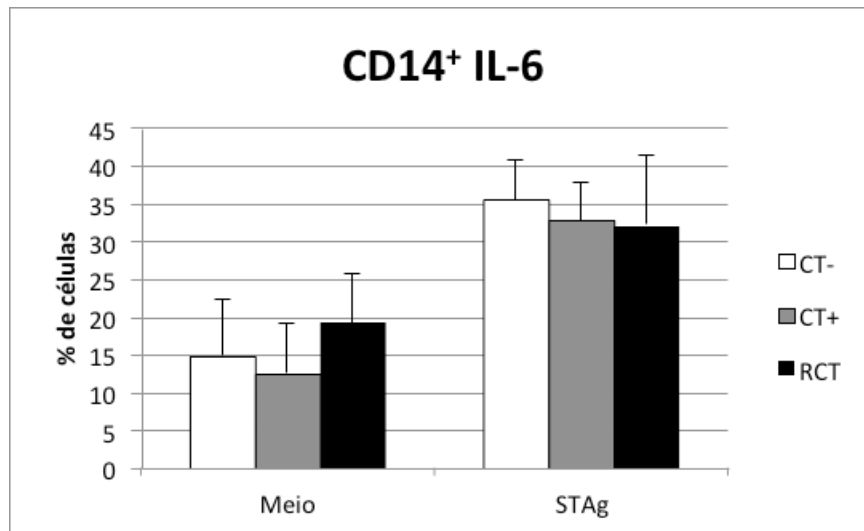


Figura 16: Expressão da citocina IL-6 em monócitos CD14⁺ dos controles negativos (CT-), controles positivos (CT+) e pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica (RCT) ativa no Meio e após estímulo com STAg.

Os resultados expressos em médias e desvio padrão, com número amostral de 9 (CT-), 9 (CT+) e 19 (RCT) indivíduos; Teste de Kruskal-Wallis. Não há diferença estatisticamente significativa entre as condições.

Realizamos também a comparação entre os diferentes meios de cultura celular, ausência e presença de estímulo pelo STAg, em cada grupo, e interessantemente, percebemos que a presença do estímulo foi capaz de estimular a expressão da citocina IL-6 pelos monócitos CD14⁺, nos três grupos, RCT ($p=0,0001$), CT- ($p=0,0039$) e CT+ ($p=0,0039$) (Figura 17).

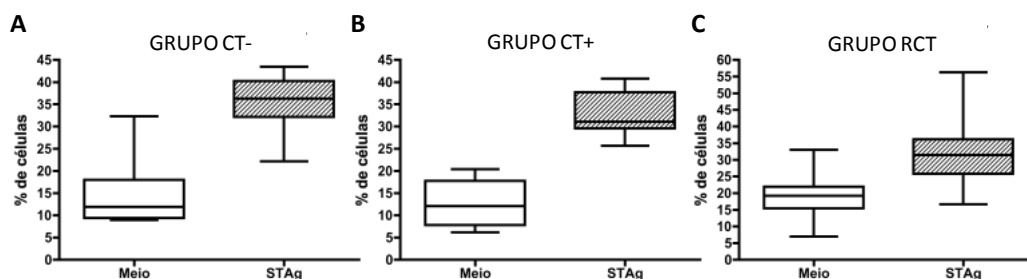


Figura 17: Representação em *box-plot* da porcentagem de monócitos CD14⁺ que expressam a citocina IL-6 nos diferentes grupos.

(A) Comparação entre o Meio e o estímulo pelo STAg no grupo Controle Negativo (CT-), em 9 indivíduos ($p=0,0039$); (B) Comparação entre o Meio e o estímulo pelo STAg no grupo Controle Positivo (CT+), em 9 indivíduos ($p=0,0039$); (C) Comparação entre o Meio e o estímulo pelo STAg no grupo RCT, em 19 indivíduos ($p=0,0001$).

A linha horizontal dentro da caixa representa o percentil 50 (mediana); a linha inferior da caixa representa o percentil 25 e a linha superior o percentil 75. As linhas finas inferiores representam o percentil 10 e as superiores o percentil 90.

Teste de Wilcoxon; nível de significância de 0,05.

A análise descritiva da IL-6 nas células mononucleares CD14⁺ do sangue periférico que expressam a citocina na ausência e presença do estímulo STAg está representado na Tabela 9.

Tabela 9: Características dos grupos controles e grupo dos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa quanto a porcentagem de monócitos CD14⁺ que expressaram a citocina IL-6 sem (Meio) e com estímulo (STAg).

		IL-6			
		n	Média ± DP	Mediana (25%-75%)	Valor p
CT-	Meio	9	14,62 ± 7,53	11,90 (9,40-18,00)	0,0039
	STAg		35,48 ± 6,55	36,30 (32,15-40,25)	
CT+	Meio	9	12,59 ± 5,23	12,10 (7,85-17,75)	0,0039
	STAg		32,89 ± 4,90	31,10 (29,60-40,80)	
RCT	Meio	19	19,37 ± 6,36	19,20 (15,50-21,90)	0,0001
	STAg		32,13 ± 9,25	31,50 (25,80-36,20)	

n: tamanho amostral; DP: desvio padrão; (25%-75%): quartis 25 e 75.

5.3.4 Expressão de IL-10 nos Monócitos CD14⁺

Ao analisarmos a expressão de IL-10 nos indivíduos do grupo RCT na ausência de estímulo pelo STAg (meio), verificamos que esta citocina apresenta-se elevada quando comparadas aos indivíduos dos grupos controles na mesma condição. Quando os monócitos foram submetidos ao estímulo pelo STAg, observamos aumento da expressão no grupo RCT, com diferença estatisticamente significativa, com valores $p < 0,01$ em relação ao grupo CT- $p < 0,001$ em comparação ao grupo CT+ (Figura 18).

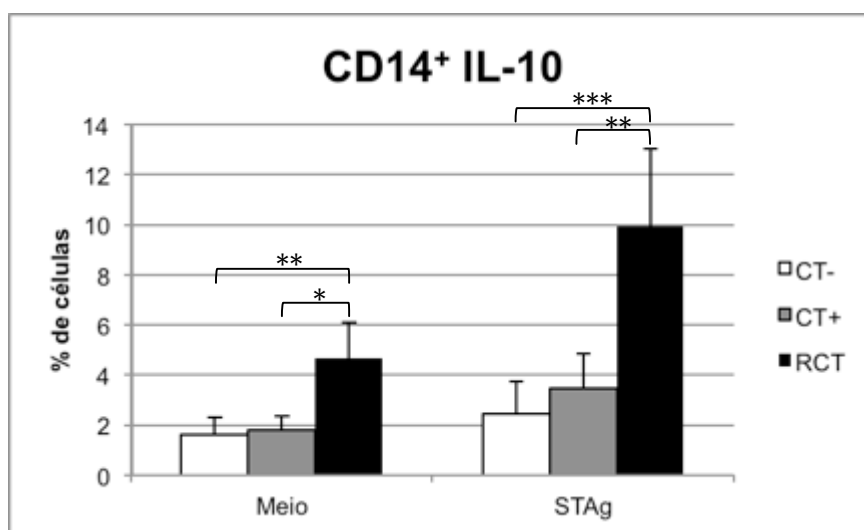


Figura 18: Expressão da citocina IL-10 em monócitos CD14⁺ dos controles negativos (CT-), controles positivos (CT+) e pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa no Meio e após estímulo com STAg.

Os resultados expressos em médias e desvio padrão, com número amostral de 9 (CT-), 8 (CT+) e 19 (RCT) indivíduos; Teste de Kruskal-Wallis. Os parênteses indicam as diferenças estatisticamente significativas entre as condições. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

O aumento da produção desta citocina quando comparado o grupo RCT na ausência e presença do estímulo pelo STAg foi estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) (Figura 19). Observamos também diferença estatisticamente significativa quando avaliamos o grupo CT+ ($p = 0,016$) nas duas condições de cultura celular, porém com valor p inferior ao observado no grupo RCT. Não houve diferença estatística no grupo CT- ($p = 0,461$) quando comparados os diferentes meios (Tabela 10).

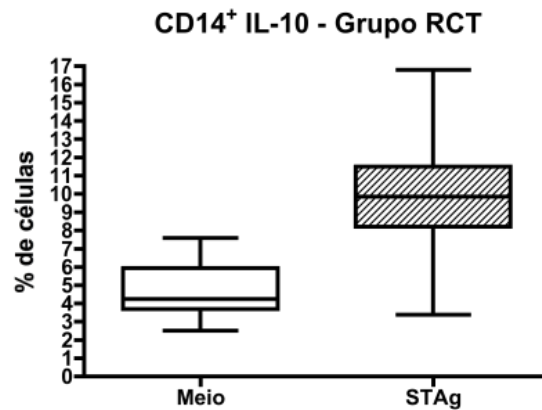


Figura 19: Representação em *box-plot* da porcentagem de monócitos CD14⁺ que expressam a citocina IL-10 no Meio e com estímulo pelo STAg no grupo RCT, em 20 indivíduos ($p < 0,0001$).

A linha horizontal dentro da caixa representa o percentil 50 (mediana); a linha inferior da caixa representa o percentil 25 e a linha superior o percentil 75. As linhas finas inferiores representam o percentil 10 e as superiores o percentil 90.

Teste de Wilcoxon; nível de significância de 0,05.

A análise descritiva das células mononucleares do sangue periférico CD14⁺ que expressam IL-10 sem e com estímulo STAg está representado na Tabela 10.

Tabela 10: Características dos grupos controles e grupo dos pacientes com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa quanto a porcentagem de monócitos CD14⁺ que expressaram a citocina IL-10 sem (Meio) e com estímulo (STAg).

		IL-10			
		n	Média ± DP	Mediana (25%-75%)	Valor p
CT-	Meio	9	1,63 ± 0,65	1,50 (1,15-1,80)	0,461
	STAg		2,42 ± 1,31	1,70 (1,20-3,60)	
CT+	Meio	8	1,78 ± 0,56	1,65 (1,35-2,10)	0,016
	STAg		3,46 ± 1,39	3,30 (2,55-4,50)	
RCT	Meio	20	4,67 ± 1,43	4,25 (3,70-5,95)	<0,0001
	STAg		9,92 ± 3,14	9,85 (8,20-11,50)	

n: tamanho amostral; DP: desvio padrão; (25%-75%): quartis 25 e 75.

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE CITOCINAS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Avaliou-se a correlação entre a porcentagem de monócitos que expressaram as citocinas TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10 na ausência do estímulo pelo STAg, com as seguintes características dos indivíduos com retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa, antes do tratamento: reação da câmara anterior, *haze* vítreo, tamanho da lesão ativa, presença de flebite, presença de extravasamento do disco óptico, presença infiltrados coroidianos, maior altura da lesão e maior tamanho linear (*smudge*) mensuradas pelo sOCT.

Houve correlação linear positiva entre a expressão do TNF- α nos monócitos CD14⁺ com a medida da maior altura mensurada pelo sOCT conforme visualizado na Figura 20.

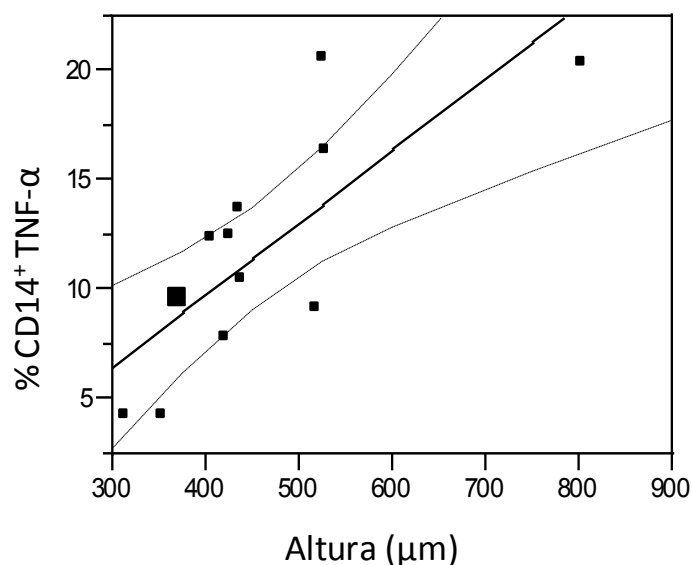


Figura 20: Análises de correlações avaliando a maior altura da área de lesão retinocoroidiana ativa com a porcentagem de monócitos CD14⁺ expressando TNF- α . Os resultados expressos diagramas de dispersão, com número amostral de 12 indivíduos. Valor $p=0,002$ (correlação de Spearman; nível de significância de 0,05); $r^2=0,788$.

Houve também correlação linear positiva entre expressão da IL-6 nos monócitos CD14⁺ com a medida do grau de intensidade do *haze* vítreo conforme demonstrado na Figura 21.

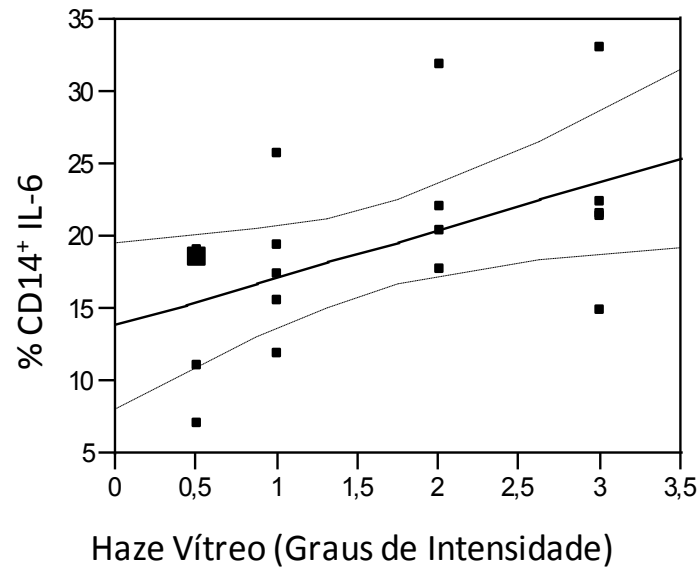


Figura 21: Análises de correlações avaliando a intensidade do *haze* vítreo de pacientes com lesão retinocoroidiana ativa com a porcentagem de monócitos CD14⁺ expressando IL-6. Os resultados estão expressos em diagramas de dispersão, com número amostral de 18 indivíduos. Valor $p=0,017$ (correlação de Spearman; nível de significância de 0,05); $r^2=0,556$.

6. DISCUSSÃO

O nosso estudo tem uma importante característica que o torna pioneiro na pesquisa da toxoplasmose ocular, a caracterização imunofenotípica dos monócitos associada a correlação clínica em face da doença ativa. A execução deste trabalho envolveu três instrumentos para a análise da doença em seres humanos: exame clínico para adequadamente avaliar o binômio paciente-doença; análise dos traços fenotípicos das células em relação à produção das citocinas, pela citometria de fluxo; emprego de técnicas aprimoradas para avaliar as consequências oculares da doença toxoplásmica, FA, ICGA e sOCT.

Discutiremos os achados clínicos, celulares e as correlações em seções distintas e, em seguida faremos críticas quanto às limitações do estudo, as perspectivas para os próximos trabalhos e, finalizando o capítulo, faremos as conclusões obtidas deste estudo.

6.1 DISCUSSÃO CLÍNICA

Durante o período da pesquisa recrutamos os indivíduos de acordo com os critérios de inclusão/exclusão estabelecidos previamente, tentando evitar os fatores de confusão que inviabilizariam o trabalho.

Analizamos as características das populações dos 3 grupos, CT-, CT+ e RCT, quanto a idade e sexo. Encontramos que nos 3 grupos haviam homogeneidade quanto esses dados (Tabela 01), possibilitando-nos as comparações entre os grupos. A homogeneidade das populações quanto a idade, sexo, e a correlação destes traços com estudos posteriores nos permitem inferências estatísticas na população da região onde foi realizado o estudo.

A média das idades do grupo RCT foi de $27,0 \pm 8,3$ anos (Tabela 01). Observamos que dos 20 indivíduos (todos apresentavam lesão retinocoroidiana cicatrizada sugestiva de origem toxoplásmica), apenas 8

indivíduos (40%) relatavam ser a primeira manifestação “percebida”, 8 indivíduos (40%) relatavam ser a segunda recidiva, 3 indivíduos (15%) a terceira recidiva e apenas 1 indivíduo (5%) relatava ser a décima recidiva da doença.

Friedmann *et* Knox, 1969, verificaram que a idade média dos “episódios iniciais” era de 25,3 anos (Friedmann *et* Knox, 1969) e, anos mais tarde, Gilbert *et alii*, 1999, encontraram 26,5 anos como idade média do “primeiro episódio”, e Bosch-Driessen *et alii*, 2002, ao investigarem uma série de 215 pacientes com lesão ocular ativa, uma idade média de 31,1 anos (Gilbert *et alii*, 1999; Bosch-Driessen *et alii*, 2002), levantando-se a hipótese que a idade participaria como um dos fatores que pode influenciar nos episódios de atividade da doença ocular e até mesmo na gravidade das lesões (Holland, 2009).

Portanto, a média de idade do nosso grupo RCT encontrava-se de acordo com estudos epidemiológicos executados por Fridmann *et* Knox, 1969, Gilbert *et alii*, 1999, e Bosch-Driessen *et alii*, 2002, porém ressalva deve ser dada ao fato que as médias de idade destes autores foram descritos como “primeiro episódio” relatado pelo paciente.

Avaliamos a evolução da acuidade visual dos pacientes antes e após o tratamento, importante desfecho nas doenças oculares. Verificamos melhora da acuidade visual significativa quando comparado antes e depois do tratamento nos 16 pacientes avaliados.

A acuidade visual inicial e final dependem de vários aspectos da doença como a intensidade do *haze* vítreo, da localização da lesão retinocoroidiana, da extensão da lesão, e aparecimento de complicações (formação de MNSR, edema macular cistóide, descolamento de retina, formação de sinéquias, catarata, membrana epirretiniana, oclusão vascular) (Holland, 2003). Bosch-Driessen *et alii*, 2002, não observaram diferença estatisticamente significativa na média da acuidade visual entre os pacientes tratados e não tratados e referem que a cegueira legal ocorria mais frequentemente secundário a

localização macular da lesão, a ocorrência de descolamento de retina e atrofia do nervo óptico (Bosch-Driessen *et alii*, 2002). As situações mais graves ocorreram nos casos de tratamento com corticóide sem a complementação com antibioticoterapia e nos pacientes imunossuprimidos (Bosch-Driessen *et Rothova*, 1998).

Dentre os critérios de inclusão/exclusão, o tempo decorrido entre a percepção dos sintomas oculares e o diagnóstico da retinocoroidite toxoplásmica ativa não podiam ultrapassar o período de 10 dias. Este tempo foi determinado arbitrariamente, mas baseamos primariamente na história natural da uveíte toxoplásmica não tratada que cura espontaneamente num período médio de tempo de 16 semanas (Nolan *et Rose*, 1968), e considerando que a lesão ocular tem um período de piora progressiva, com um pico, seguido da regressão. Desta maneira, tentamos controlar o meio de uma situação com múltiplas variáveis.

As dificuldades encontradas por pesquisadores para determinar o melhor tratamento para a uveíte toxoplásmica é ausência de uma padronização das múltiplas manifestações oculares da doença (Oréfice F, comunicação pessoal), determinando a existência de múltiplas variáveis e conseqüentemente elevado número do tamanho amostral para possibilitar inferências estatísticas.

Quanto as características do lado do acometimento ocular, não houve diferença entre os olhos acometidos já que metade apresentou lesão ativa no olho direito e a outra metade no olho esquerdo. A inflamação do segmento anterior foi ausente em 8 (40%), 1+ em 6 (30%), 2+ em 4 (20%) e 3+ em 2 (10%), e nenhum paciente apresentou 4+. A gravidade da uveíte anterior pode variar de ausente a intensa e do tipo granulomatosa ou não (Delair *et alii*, 2011). Num estudo com 210 pacientes com retinocoroidite toxoplásmica ativa, a inflamação intraocular foi mais intensa em pacientes idosos, e relacionava-se positivamente com o tamanho da lesão e a localização mais periférica (Dodds *et alii*, 2008).

Entendemos que o processo inflamatório estende-se além da lesão focal retinocoroidiana, acometendo o corpo vítreo, a coróide longe do foco, com descrições na literatura de acometimento do olho contralateral avaliado pela ICGA (Atmaca *et alii*, 2006).

Tipicamente as lesões surgem como “satélites”, na margem de uma lesão preexistentemente cicatrizada (Holland, 2003). Essa característica foi a principal encontrada no estudo, sendo 17 (85%) do tipo satélite, sendo 2 (10%) do tipo focal e apenas uma (5%) do tipo punctata.

A localização das lesões ativas no estudo estão de acordo com estudos anteriores como em Assis *et Oréfice*, 1997, que encontraram 50% das lesões na zona I, 44,2% na zona II e 5,8% na zona III (Assis *et Oréfice*, 1997). Talvez diferenças anatômicas e microvasculares entre a mácula e a retina periférica criem um microambiente que favoreça a localização do parasita em determinadas áreas da retina. Yang *et alii*, 2000, demonstraram que existe uma diferença na localização da população de leucócitos na retina, ocorrendo uma redução quando parte da periferia para a mácula (Yang *et alii*, 2000).

Nosso estudo apresentou que a maioria, 60% das lesões, apresentavam tamanho inferior a 1 diâmetro de disco, enquanto 35% tinham tamanho de 1 a 2 DD e apenas 5% tinham tamanho maior que 2 DD. O tamanho da lesão está de acordo com o estudo de Assis *et Oréfice*, 1997, que demonstraram que 69% das lesões tinham tamanho inferior a 1 DD e 31% maior que 2 DD (Assis *et Oréfice*, 1997).

Analizamos neste estudo as alterações iniciais da doença quando diagnósticas, antes de iniciarmos o tratamento, encontradas nos exames complementares, FA, ICGA, sOCT, e as comparamos ao final do tratamento. Consideramos apenas a qualidade de estar ou não presente, pois a quantificação destas características são múltiplas e poderiam limitar o estudo pelo número amostral.

A flebite esteve presente antes do tratamento em 81,3% dos pacientes, porém essa porcentagem reduziu para 23,1% após o tratamento. Assim ocorreu com extravasamento do disco óptico, presente em 87,5% dos casos antes do tratamento, e em apenas 6,7% após. A manutenção da flebite e da inflamação do nervo óptico por si só não representam ao nosso parecer uma continuidade da presença de atividade da doença, mas agressões por complexos imunes, fatores de crescimento, quimiocinas, que causam quebra da barreira hematorretiniana e consequente extravasamento através dos vasos.

Os infiltrados coroidianos estiveram presentes em 56,3% dos pacientes antes do tratamento e em apenas 8,3% após o tratamento. Como já avaliados e concluídos por Bernasconi *et alii*, 1997, e Guex-Croiser *et alii*, 1998, tais lesões coroidianas podem representar focos infecciosos difusos pela coróide (Bernasconi *et alii*, 1997; Guex-Croiser *et alii*, 1998) ou áreas focais na coriocapilar de ausência de perfusão (Atmaca *et alii*, 2006), e talvez a presença em grande quantidade poderia predizer a intensidade do processo inflamatório. Como apenas analisamos o resultado entre presença e ausência, não podemos inferir qualitativamente as características dos achados pela ICGA nem quanto a natureza dos infiltrados.

Escolhemos duas características que pelas análises do sOCT nos trazem resultados objetivos e mensuráveis quanto a evolução das lesões retinocoroidianas, o *smudge* e altura da lesão. Ambas características apresentaram mudanças quando avaliadas antes e após o tratamento, com significância estatística. Oréfica *et alii*, 2007, demonstraram, entre várias características pelo OCT3, critérios que poderiam ser utilizados para determinar controle do processo ativo como: redução da espessura da lesão; desorganização das camadas retinianas; hiperreflectividade focal da camadas coriocapilar/coróidea (Oréfica *et alii*, 2007).

6.2 DISCUSSÃO IMUNOLÓGICA

Iniciaremos a discussão relacionado as observações da expressão de importantes citocinas pelos monócitos CD14⁺ relacionadas ao controle imunológico do parasito *T. gondii*. Será discutida cada citocina separadamente em subseções para tornar a compreensão didática, porém sempre tendo como raciocínio que todas citocinas são expressas simultaneamente, não ocorrendo a expressão isolada em cada célula.

Inicialmente avaliamos a citocina TNF- α . A expressão dessa citocina pelos monócitos CD14⁺ encontrava-se elevada quando analisada na condição de cultura meio, e apresentava aumento quando estimulado *in vitro* pelo STAg, no grupo RCT. No Grupo CT+ ocorria o mesmo aumento, porém com diferença estatística não tão pronunciada quanto o Grupo RCT (Tabela 7). Não observamos diferença entre a expressão desta citocina quando analisada sem e com estímulo pelo STAg no grupo CT- (Tabela 7). Portanto, sugerimos que há expressão do TNF- α pelos monócitos CD14⁺ circulantes no sangue periférico durante a retinocoroitite toxoplásmica ativa, e por um mecanismo não avaliado por este estudo, essas células eram portadoras de um “gatilho” que propiciaria o aumento desta expressão quando estimulado pelo STAg.

A importância do TNF- α para controle da infecção aguda contra o *T. gondii* em modelos animais utilizando camundongos, já fora extensivamente demonstrado, porém concluindo-se que apenas a citocina sozinha não era capaz de controlar a infecção. Adams *et alii*, 1990, demonstraram que os macrófagos peritoneais tornavam-se ativados depois de serem tratados com a combinação de TNF- α e INF- γ *in vitro*, e que as células ativadas inibiam a replicação dos taquizoítos pela formação de NO, molécula microbicida intracelular (Adams *et alii*, 1990). Outros autores demonstraram que apenas o TNF- α e o NO não eram essenciais para o controle da infecção aguda *in vivo*, mas eram essenciais para o controle da infecção crônica (Scharton-Kersten *et alii*, 1997; Deckert-Schlütter *et alii*, 1998; Yap *et alii*, 1998).

Em humanos, dois importantes estudos avaliaram o papel do TNF- α . Yamamoto *et alii*, 2000, demonstraram que a secreção do TNF- α apresentava aumento quando estimulado com STAg em pacientes com retinocoroidite toxoplásmica adquirido (Yamamoto *et alii*, 2000). Outro estudo, investigando a associação entre o polimorfismo do TNF- α (-308G/A) e a retinocoroidite toxoplásmica em humanos, Cordeiro *et alii*, 2008, não encontraram nenhuma associação com a ocorrência ou recorrência da doença ocular (Cordeiro *et alii*, 2008).

A expressão da IL-12 pelos monócitos CD14⁺ apresentou comportamento similar ao TNF- α . A IL-12 apresentava-se elevada quando analisada no meio sem estímulo, *ex vivo*, e havia aumento significativo quando estimulado pelo STAg, *in vitro*, no grupo RCT. Já a expressão da IL-12 nos grupos CT- e CT+, não apresentou aumento quando estimulados pelo STAg (Tabela 8). Mais uma vez, evidenciamos que os monócitos CD14⁺ circulantes no sangue periférico são capazes de expressar a atividade da doença intraocular, e que essas células apresentam mecanismos “gatilhos” para incrementar a produção da citocina em face a um novo estímulo.

A IL-12 é o indutor mais importante para a síntese de IFN- γ durante a fase aguda da infecção. A neutralização do IL-12 com anticorpos anti-IL-12 resulta na mortalidade de 100% dos camundongos infectados com cepas avirulentas do *T. gondii* e a mortalidade está associada com a queda da produção do IFN- γ (Gazzinelli *et alii*, 1994). As células dendríticas foram identificadas como a maior fonte de produção de IL-12 no baço em resposta ao *T. gondii* (Reis e Souza *et alii*, 1997), apesar de haver ainda controvérsias sobre qual tipo celular seria o primeiro indutor da IL-12 durante a infecção aguda pelo parasito (Lieberman *et Hunter*, 2002). Yap *et alii*, 2000, demonstraram que a IL-12 é necessária para a manutenção da produção de IFN- γ pela células T mediando a resistência a infecção crônica (Yap *et alii*, 2000). Portanto o eixo IFN- γ - IL-12 deverá estar intacto tanto para a proteção do hospedeiro na fase aguda da infecção quanto na fase crônica.

Neste estudo, verificamos que a expressão da citocina IL-6 apresenta-se elevada nos monócitos CD14⁺ tanto no grupo RCT quanto nos grupos controles quando confrontamos as condições de Meio e STAg, sendo a diferença mais significativa no grupo RCT. Diante desse contexto, podemos sugerir que a expressão da IL-6 ocorre de forma inespecífica. É importante ressaltar que para as demais citocinas, não observamos o mesmo tipo de comportamento. Assim, apenas a presença de um antígeno protéico foi capaz de induzir a produção de IL-6 pelos monócitos CD14⁺.

A IL-6 é uma citocina que regula vários aspectos da resposta imune na fase aguda (Akira *et alii*, 1993). O RNAm-IL-6 é expressa nos cérebros de camundongos infectados por *T. gondii* (Gazzinelli *et alii*, 1992; Hunter *et alii*, 1992; Deckert-Schlütter *et alii*, 1995). Suzuki *et alii*, 1997, e Jebbari *et alii*, 1998, demonstraram que camundongos deficientes em IL-6 (IL-6^{-/-}) formam um número aumentado de cistos e áreas de inflamação associados aos taquizoítos no seus cérebros em relação aos camundongos controles (Suzuki *et alii*, 1997; Jebbari *et alii*, 1998). Este resultado demonstra que IL-6 tem uma função protetora contra a formação de cistos e a proliferação de taquizoítos nos cérebros de camundongos infectados. E os níveis séricos de IFN- γ estavam reduzidos nos controles em relação dos camundongos IL-6^{-/-} (Jebbari *et alii*, 1998), demonstrando que o papel protetor da IL-6 na encefalite toxoplásmica é devido a sua capacidade de estimular a produção de IFN- γ , sistemicamente na fase aguda da infecção e localmente no cérebro nas fases crônicas, e por induzir a infiltração e o acúmulo de diferentes tipos de células T no cérebros de camundongos infectados.

Em camundongos infectados por *T. gondii*, um aumento do IL-6 é correlacionado com sinais clínicos (Beaman *et alii*, 1992). Beaman *et alii*, 1994, demonstraram que a IL-6 permitem a multiplicação intracelular de *T. gondii* em camundongos (Beaman *et alii*, 1994).

Em humanos, Matowicka-Karna *et alii*, 2008, estudaram a produção de citocinas humorais (IL-5, IL-6 e IL-10) em 52 mulheres antes do tratamento para infecção aguda pelo *T. gondii*, e observaram que a IL-5 e IL-6

apresentavam-se com valores duas vezes aumentados em relação às mulheres saudáveis, concluindo ser a IL-6 uma citocina de produção sensível ao estado inflamatório, porém não específico (Matowicka-Karna *et alii*, 2009).

A expressão da IL-10 pelos monócitos CD14⁺, no grupo RCT, apresentou-se elevada quando analisada na ausência do estímulo (meio), e quando estimulado pelo STAg, apresentou expressivo aumento, comparando-se aos grupos CT- e CT+. Comportamento similar as citocinas TNF- α e IL-12. Novamente, sugerimos que os monócitos CD14⁺ do sangue periférico dos pacientes são células que apresentam uma característica hiperresponsiva, e a propensão destas células estarem aptas a desencadear uma resposta inflamatória, quando estimuladas por antígenos do parasito, é evidente. Observamos também que as mesmas células que expressavam citocinas com atividades proinflamatórias, expressavam a IL-10, notadamente uma citocina com caráter modulador da resposta inflamatória.

A IL-10 é um importante regulador da resposta imune (Kühn *et alii*, 1993). Camundongos deficientes em IL-10 (IL-10^{-/-}) morrem durante a fase aguda da infecção com *T. gondii*, e sua mortalidade está relacionada com o desenvolvimento de uma grave reação imune no fígado mediado por células Th1 (Gazzinelli *et alii*, 1996) e intestinos (Suzuki *et alii*, 2000). Quando os camundongos IL-10^{-/-} eram tratados com sulfadiazina para controlar o estágio agudo da infecção, sobreviviam, mas desenvolviam respostas inflamatórias nos seus cérebros nos estágios tardios da infecção (Wilson *et alii*, 2005).

6.3 CORRELAÇÃO CLÍNICA-IMUNE

Observamos correlação positiva entre os níveis de monócitos CD14⁺ produtores de TNF- α e a altura da lesão na retina mensurado pelo sOCT, assim como verificamos a correlação linear positiva entre a expressão de IL-6 e o grau do *haze* vítreo avaliado clinicamente. As duas citocinas identificadas,

TNF- α e IL-6, são substâncias relacionadas às respostas inflamatórias da fase aguda, portanto é possível o aumento da sua expressão em processos inflamatórios mais intensos. Sugerimos que a expressão elevada pode ter uma influência na intensidade da inflamação ocular, e mais precisamente, nas características da lesão retinocoroidiana toxoplásmica.

A correlação pode não significar a real causa e efeito. Não podemos inferir que os monócitos CD14⁺ em humanos serão os mesmos que irão transformar-se nas células apresentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas e macrófagos. Como identificado por Auffrey *et alii*, 2007, os monócitos Gr1⁺ em camundongos, identificados como similares aos monócitos CD14⁺, sendo responsáveis pela identificação do sítio inflamado e extravasamento, modificando-se em células dendríticas, células importantes para o controle da toxoplasmose aguda (Auffrey *et alii*, 2007; Robben *et alii*, 2005). Roberts *et alii*, 2001, estudaram as características histopatológicas de 10 fetos e 2 recém-nascidos com toxoplasmose ocular, e identificaram que as células inflamatórias presentes nas lesões consistiam em linfócitos, T e B, células plasmáticas e macrófagos (Roberts *et alii*, 2001).

6.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Não podemos concluir no presente estudo como ocorria o aumento do número de monócitos CD14⁺ que expressavam as citocinas TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10 quando estimuladas *in vitro* pelo STAg. Yarovinsky *et alii*, 2005, demonstraram o papel do TLR na produção de IL-12 pelas células dendríticas (Yarovinsky *et alii*, 2005). Enquanto Tacke *et alii*, 2006, demonstraram que os monócitos são capazes de responderem quando ainda na medula óssea (Tacke *et alii*, 2006). Os monócitos nos pacientes com RCT já encontravam-se “primados” quando foram estimulados pelo STAg, para produzirem aumento do número de células que expressaram as citocinas TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-10. Apesar da citocina IL-6 não demonstrar ser necessário que o estímulo seja específico, ainda é considerada uma citocina de fase aguda,

apresentando-se aumentada em situações que poderiam causar estresse celular (Filisetti *et* Candolfi, 2004).

6.5 PERSPECTIVAS

O presente trabalho é apenas o início de uma longa linha de pesquisa desenvolvida pelo nosso grupo, lideros pelo Prof. Dr. Fernando Oréfice e Prof^a. Dr^a. Cynthia Azeredo Cordeiro. O trabalho ainda deverá descrever o comportamento de uma importante linhagem celular para o controle imune do parasito, os linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺, e dará origem a caracterização genética dos indivíduos portadores da lesão retinocoroidiana pelo *T. gondii*.

A linha de pesquisa deverá futuramente tentar desvendar como os subtipos do parasita podem modular a resposta inflamatória. Nosso estudo avaliou os antígenos de uma cepa virulenta, a cepa RH.

6.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aspecto mais importante deste estudo foi a possibilidade de verificar a expressão das citocinas pelos monócitos CD14⁺ no sangue periférico diante da atividade da doença. Podemos comprovar em seres humanos, detalhando o tipo celular e a expressão de suas principais citocinas, durante a fase ativa da retinocoroidite presumidamente toxoplásmica.

Concluimos ao executarmos este estudo que o processo inflamatório que ocorre no tecido retinocoroidiano, em dimensões milimétricas, a maioria delas de tamanho inferior a 1500 µm, têm repercussões sistêmicas que podem ser detectadas em sítios longínquos como nas células sanguíneas da circulação sistêmica.

Dúvidas ainda persistem quanto a fisiopatologia imune da doença causada pelo parasitismo crônico do *T. gondii*.

7. CONCLUSÕES

- 1) Durante a fase ativa da retinocoroidite presumidamente toxoplásmica a porcentagem dos monócitos CD14⁺ que expressam as citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10 estão elevados quando comparados com os grupos controles, e quando são estimulados pelo STAg ocorre aumento da porcentagem dos monócitos que expressam tais citocinas. Observa-se que expressão da IL-6 pelos monócitos CD14⁺ nos grupos CT-, CT+ e RCT já encontram-se elevados e há um aumento quando estimulados pelo STAg.

- 2) Há uma correlação positiva entre a expressão da citocina IL-6 nos monócitos CD14⁺ e a intensidade do *haze* vítreo durante a atividade da lesão.

- 3) Há uma correlação positiva entre a expressão da citocina TNF- α nos monócitos CD14⁺ e a altura da lesão retinocoroidiana ativa mensurada pelo sOCT.

9. REFERÊNCIAS

Abbas AK *et* Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

Adams LB, Hibbs JB, Taintor RR *et* Krahenbuhl JL (1990). Microbiostatic effect of murine - activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 144:2725-2729.

Akira S, Taga T *et* Kishimoto T (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54:1-78.

Amaro MH, Muccioli C, Abreu MT *et* Belfort Jr. R (2007). Remote hypofluorescent dots in recurrent ocular toxoplasmosis on indocyanine green angiography. *Arq Bras Oftalmol* 70(6):901-904.

Assis Jr. R, Araújo C, Campos WR, Freitas NA, Agostini Netto J *et* Oréfice F (1997). Estudo de 52 casos com lesões ativas supostamente toxoplásmicas (biomicroscópio, morfológico, topográfico, terapêutico). *Rev Bras Oftal* 56(8):569-585.

Atmaca LS, Simsek T, Sonmez PA *et* Sonmez K (2006). Fluorescein and indocyanine green angiography in ocular toxoplasmosis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244:1688-1691.

Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G *et* Geissmann F (2007). Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* 317:666-670.

Beaman MH, Wong SY *et* Remington JS (1992). Cytokines, Toxoplasma and intracellular parasitism. *Immunol Rev* 127:97-117.

Beaman M, Hunter C *et* Remington J (1994). Enhancement of intracellular replication of *T. gondii* by IL-6. Interaction with IFN- γ and TNF- α . *J Immunol* 153:4583-4587.

Bernasconi O, Auer C *et* Herbort CP (1997). Recurrent toxoplasmic retinochoroiditis. *Ocular Immunol Inflamm* 5(3):207-211.

Bobić B, Sibalić D *et* Djurković-Djaković O (1991). High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecol Obstet Invest* 31(3):182-184.

Bosch-Driessen LEH *et* Rothova A (1998). Sense and nonsense of corticosteroid administration in the treatment of ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 82:858-860.

Bosch-Driessen LEH, Berendschot TJM, Ongkosuwito JV *et* Rothova A (2002). Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. *Ophthalmology* 109(5):869-878.

Bosch-Driessen LEH, Karimi S, Stilma JS *et* Rothova A (2000). Retinal detachment in ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology* 107(1):36-40.

Bou G, Figueroa MS, Martí-Belda P, Navas E *et* Guerrero A (1999). Value of PCR for Detection of *Toxoplasma gondii* in Aqueous Humor and Blood Samples from Immunocompetent Patients with Ocular Toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 37(11):3465-3468.

Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB *et* Marion SA. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet* 350(9072):173-177.

Brunton CL, Wallace GR, Graham E *et* Stanford MR (2000). The effect of cytokines on thereplication of *T. gondii* within rat retinal vascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* 102(2):182-188.

Burnett AJ, Shortt SG, Isaac-Renton J, King A, Werker D et Bowie WR (1998). Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology* 105(6):1032-1037.

Carvalho CS et Melo EJT (2006). Acidification of the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii* in the presence of hydroxyurea. *An Acad Bras Cienc* 78(3):475-484.

Cochereau-Massin I, LeHoang P, Lautier-Frau M, Zerdoun E, Zazoun L, Robinet M, Marcel P, Girard B, Katlama C, Leport C et al. (1992). Ocular toxoplasmosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Am J Ophthalmol* 114:130-135.

Cordeiro CA, Moreira PR, Costa GC, Dutra WO, Campos WR, Oréface F et Teixeira Jr. AL (2008). TNF- gene polymorphism (-308G/A) and toxoplasmic retinochoroiditis. *Br J Ophthalmol* 92:986-988.

Cordeiro CA, Moreira PR, Dutra WO, Young L, Campos WR, Oréface F et Teixeira Jr. AL (2010). Immunology of the toxoplasmic retinochoroiditis. *Arq Bras Oftalmol* 73(6):548-551.

Costa RA, Skaf M, Melo Jr. LAS, Calucci D, Cardillo JA, Castro JC, Huang D et Wojtkowski M (2006). Retinal assessment using optical coherence tomography. *Prog Retin Eye Res* 25(3):325-353.

Cox FE (2004). History of human parasitic diseases. *Infect Dis Clin North Am* 18(2):171-188.

da Mata AP et Oréface F (2002). Toxoplasmosis. Em: Foster CS, Vitale AT (eds). *Diagnosis and Treatment of Uveitis*. Philadelphia: WB Saunders.

Dardé ML (2004). Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità* 40(1):57-63.

Dardé ML (2008). *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite* 15(3):366-371.

Deckert-Schlütter M, Albrecht S, Hof H, Wiestler D et Schlüter D (1995). Dynamics of the intracerebral and splenic cytokine mRNA production in *Toxoplasma gondii* - resistant and - susceptible congenic strains of mice. *Immunology* 85(3):408-418.

Deckert-Schlütter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H et Schlütter D (1998). Crucial role of TNF receptor type I (p55), but not of TNF receptor type II (p75), in murine toxoplasmosis. *J Immunol* 160:3427-3436.

Delair E, Latkany P, Noble G, Rabiah P, McLeod R et Brézin A (2011). Clinical Manifestations of Ocular Toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm* 19(2):91-102.

Desmonts G et Couvreur J (1974). Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull N Y Acad Med* 50(2):146-159.

Dodds EM, Holland GN, Stanford MR, Yu F, Siu WO, Shah KH, Loon NTDV, Muccioli C, Hovakimyan A et Barisani-Asenbauer T (2008). Intraocular Inflammation Associated with Ocular Toxoplasmosis: Relationships at Initial Examination. *Am J Ophthalmol* 146:856-865.

Dubey JP, Lindsay DS et Speer CA (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11(2):267-299.

Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, Vianna MC, Kwok OC, Shen SK, Thulliez P et Lehmann T (2004). *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol* 90(4):721-726.

Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C et Gilbert R (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 353:1829-1833.

Dutton GN, McMenamin PG, Hay J et Cameron S (1986). The Ultrastructural Pathology of Congenital Murine Toxoplasma Retinochoroiditis. Part II: the Morphology of the Inflammatory Changes. *Exp Eye Res* 43:545-560.

Fatoohi F, Cozon GJ, Wallon M, Kodjikian L et Peyron F (2006). Systemic T cell response to *Toxoplasma gondii* antigen in patients with ocular toxoplasmosis. *Jpn J Ophthalmol* 50(2):103-110.

Filisetti D et Candolfi E (2004). Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità* 40(1):71-80.

Frenkel JK (1974). Breaking the transmission chain of Toxoplasma: a program for the prevention of human toxoplasmosis. *Bull N Y Acad Med* 50(2):228-235.

Friedmann CT et Knox DL (1969). Variations in recurrent active toxoplasmic retinochoroiditis. *Arch Ophthalmol* 81:481-493.

Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM et Sher A (1991). Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 146(1):286-292.

Gazzinelli RT, Xu Y, Hieny S, Cheever A et Sher A (1992). Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 149(1):175-180.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G et Sher A (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 153(6):2533-2543.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kesten T, Cheever A, Kühn R et Müller W (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acute infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD14⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 157:798-805.

Geissmann MGM, Jung S, Sieweke MH, Merad M et Ley K (2010). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* 327(5966):656–661.

Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, Murray PI, Pavesio CE, Gormley PD, Masters J, Parker SP et Stanford MR (1999). Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect* 123:283-289.

Gilbert RE et Stanford MR (2000). Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br J Ophthalmol* 84(2):224-226.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Jr. M, Silveira S, Camargo ME, Nussenblatt RB, Kaslow RA et Belfort Jr. R. (1992). An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 114:136-144.

Gonçalves RM, Rodrigues DH, Costa AMC, Teixeira MM, Campos WR, Oréfice F et Teixeira Jr. AL (2007). Increased serum levels of CXCL8 chemokine in acute toxoplasmic retinochoroiditis. *Acta Ophthalmol Scand* 85:871-876.

Grivennikov SI *et* Karin M (2011). Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann Rheum Dis* 70(1):104-108.

Groot-Mijnes JDF, Rothova A, Van Lonn AM, Schuller M, Dam-Van Loon N HT, Boer JH, Schuurman R *et* Weersink AJL (2006). Polymerase Chain Reaction and Goldmann-Witmer Coefficient Analysis Are Complementary for the Diagnosis of Infectious Uveitis. *Am J Ophthalmol* 141:313-318.

Guex-Croiser Y, Auer C, Bernasconi O *et* Herbort CP (1998). Toxoplasmic retinochoroiditis: resolution without treatment of the perilesional satellite dark dots seen by indocyanine green angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236:476-478.

Gupta V, Gupta P, Singh R, Dogra MR *et* Gupta AA (2008). Spectral-Domain Cirrus High-Definition Optical Coherence Tomography Is Better than Time-Domain Stratus Optical Coherence Tomography for Evaluation of Macular Pathologic Features in Uveitis. *Am J Ophthalmol* 145:1018-1022.

Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, Ahmed A, Elleithy H, Ball M, Gaballah F, Wasef S, Fateen M, Amer H, Gostner P, Selim A, Zink A *et* Pusch CM (2010). Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. *J Am Med Assoc* 303(7):638-647.

Heinrich PC, Castell JV *et* Andus T (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265(3):621-636.

Holland GN (1989). Ocular toxoplasmosis in the immunocompromised host. *Int Ophthalmol* 13(6):399-402.

Holland GN (1999). Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 128:502-505.

Holland GN (2003). Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol* 136:973-988.

Holland GN (2004). Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. *Am J Ophthalmol* 137:1-17.

Holland GN (2009). Ocular toxoplasmosis: the influence of patient age. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(2):351-357.

Holland GN (2010). An Epidemic of Toxoplasmosis. *Arch Ophthalmol* 128(1): 126-128.

Holland GN, Engstrom R, Glasgow BJ, Berger BB, Daniels SA, Sidikaro Y, Harmon JA, Fischer DH, Boyer DS, Rao NA *et al.* (1988). Ocular toxoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 106:653-667.

Holland GN *et* Lewis KG (2002). An update on current practices in the management of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 134:102-114.

Houaiss A, Villar MS *et* Franco FMM. Dicionário Houaiss da língua portuguesa. 1ª ed. Rio de Janeiro: Objetiva; 2009.

Hunter CA, Roberts CW *et* Alexander J (1992). Kinetics of cytokine mRNA production in the brains of mice with progressive toxoplasmic encephalitis. *Eur J Immunol* 22:2317-2322.

Iwasaki A *et* Medzhitov R (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327:291-295.

Jebbari H, Roberts CW, Ferguson DJ, Bluethmann H *et* Alexander J (1998). A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 20:231-239.

Jones JL, Kuzsan-Moran D, Wilson M, McQuillan G, Navin T et McAuley JB (2001). *Toxoplasma gondii* Infection in the United States: Seroprevalence and Risk Factors. *Am J Epidemiol* 154(4):357-365.

Kawai T et Akira S (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5):373- 384.

Kimura SJ, Thygeson P et Hogan MJ (1959). Signs and symptoms of uveitis. II. Classification of the posterior manifestations of uveitis. *Am J Ophthalmol* 47(5):171-176.

Kishimoto T (2010). IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 22(5):347-352.

Klausner RD, Donaldson JG et Lippincott-Schwartz J (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116(5):1071-1080.

Kühn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K et Müller W (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.

Lamirel C, Newman NJ et Biousse V (2010). Optical Coherence Tomography (OCT) in Optic Neuritis and Multiple Sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 166(12):978-986.

Lieberman LA et Hunter CA (2002). The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Intern Rev Immunol* 21:373-403.

Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K et Remington JS (1997). False-Positive Results in Immunoglobulin M (IgM) *Toxoplasma* Antibody Tests and Importance of Confirmatory Testing: the Platelia Toxo IgM Test. *J Clin Microbiol* 35(1):174-178.

Lu F, Huang S et Kasper LH (2003). Interleukin-10 and pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. *Infect Immun* 71(12):7159-7163.

Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE et Remington JS (1984). Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *J Am Med Assoc* 252:913-917.

Lyons RE, Anthony JP, Ferguson DJ, Byrne N, Alexander J, Roberts F et Roberts CW (2001). Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complex class I and transforming growth factor beta and a protective role for interleukin-6. *Infect Immun* 69(4):2589-2595.

MacEwan DJ (2002). TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14(6):477-492.

Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V et Kemonia H (2009). Does *Toxoplasma gondii* Infection Affect the Levels of IgE and Cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha)? *Clin Dev Immunol* 2009:374696 4 pages.

Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart MP, Dardé ML et Pelloux H (2008). What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol* 24(7):299-303.

McCabe RE, Brooks RG, Dorfman RF et Remington JS (1987). Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis* 9(4):754-774.

McMenamin PG, Dutton N, Hay J et Cameron S (1986). The Ultrastructural Pathology of Congenital Murine Toxoplasmic Retinochoroiditis, Part I: the Localization and Morphology of *Toxoplasma* Cysts in the Retina. *Exp Eye Res* 43:529-543.

Miller CM, Boulter NR, Ilkin RJ et Smith NC (2009). The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 39:23-39.

Montoya JG (2002). Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 15:185(Suppl 1):S73-82.

Montoya JG et Remington JS (2008). Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. *Clin Infect Dis* 47:554-566.

Montoya JG, Parmley S, Liesenfeld O, Jaffe GJ et Remington JS (1999). Use of the Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis. *Ophthalmology* 106:1554-1563.

Moser M et Leo O (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine* 28(S3):C2-C13.

Mosser DM et Zhang X (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 226:205-218.

Nagineni CN, Detrick B et Hooks JJ (2000). *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of interleukin 1 (IL-1), IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and intercellular adhesion molecule 1 by human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun* 68(1):407-410.

Nolan J et Rosen ES (1968). Treatment Of Active Toxoplasmic Retinochoroiditis. *Brit J Ophthal* 52:396-399.

Norose K, Mun HS, Aosai F, Chen M, Piao LX, Kobayashi M et al. (2003). IFN-gamma-regulated *Toxoplasma gondii* distribution and load in the murine eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(10):4375-4381.

Opal SM, Wherry JC et Grint P (1998). Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 27(6):1497-1507.

Oréface JL, Costa RA, Campos WR, Calucci D, Scott IU et Oréface F (2006). Third-Generation Optical Coherence Tomography Findings in Punctate Retinal Toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 142:503-505.

Oréface JL, Costa RA, Oréface F, Campos WR, Lima DC et Scott IU (2007). Vitreoretinal morphology in active ocular toxoplasmosis: a prospective study by optical coherence tomography. *Br J Ophthalmol* 91:773-780. DOI: 10.1136/bjo.2006.108068.

Oréface F, Filho RC, Barboza AL, Oréface JL et Calucci D (2010). Acquired ocular toxoplasmosis Post-birth ocular toxoplasmosis. *Rev Bras Oftalmol* 69 (3):184-207.

Pena HF, Soares RM, Amaku M, Dubey JP et Gennari SM (2006). *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res Vet Sci* 81(1):58-67.

Pena HF, Gennari SM, Dubey JP et Su C (2008). Population structure and mouse - virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol* 38(5):561-569.

Pinkerton H et Henderson RG (1941). Adult toxoplasmosis: a previously unrecognized disease entity simulating the typhus - spotted fever group. *J Am Med Assoc* 116:807-814.

Reis e Souza C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN et Sher A (1997). *In Vivo* Microbial Stimulation Induces Rapid CD40 Ligand-independent Production of Interleukin 12 by Dendritic Cells and their Redistribution to T Cell Areas. *J Exp Med* 186(11):1819-1829.

Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Dardé ML, Disko R, Dreazen O, Dumon H, Grillo R, Gross U, Hayde M, Holliman R, Ho-Yen DO, Janitschke K, Jenum PA, Naser K, Olszewski M, Thulliez P et Seitz HM

(1999). The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull World Health Organ* 77(11):929-935.

Remington JS (1974). Toxoplasmosis in the adult. *Bull NY Acad Med* 50: 211-227.

Remington JS, Mcleod R et Thulliez P (2001). Toxoplasmosis. Em: Remington JS, Klein J (eds). *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. Philadelphia PA: WB Saunders, pp. 205-346.

Robben PM, LaRegina M, Kuziel WA et Sibley D (2005). Recruitment of Gr-1⁺ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med* 201(11):1761–1769.

Roberts F, Mets MB, Ferguson JP, O'Grady R, O'Grady C, Thulliez P, Brézin AP et McLeod R (2001). Histopathological Features of Ocular Toxoplasmosis in the Fetus and Infant. *Arch Ophthalmol* 119:51-58.

Sabin AB, Eichenwald H, Feldman HA et Jacobs L (1952). Present status of clinical manifestations of toxoplasmosis in man. *J Am Med Ass* 150:1063. *apud* Miller MJ, Aronson WJ et Remington JS (1969). Late Parasitemia in asymptomatic acquired toxoplasmosis. *Ann Int Med* 71(1):139-145.

Sabin AB (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *J Am Med Ass* 116: 801-807.

Sabin AB et Feldman HA (1948). Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108:660-663.

Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J et Sher A (1997). Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 185:1261-1273.

Shigerahu S (2011). The apicomplexan plastid and its evolution. *Cell Mol Life Sci* 68:1285-1296.

Silveira C, Belfort Jr. R, Muccioli C, Abreu MT, Martins MC, Victora C, Nussenblatt RB et Holland GN (2001). A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 131(3):351-354.

Stanford MR, See SE, Jones LV et Gilbert RE (2003). Antibiotics for toxoplasmic retinochoroiditis: an evidence-based systematic review. *Ophthalmology* 110:926-931.

Suzuki Y, Israelski DM, Dannemann BR, Stepick-Biek P, Thulliez P et Remington JS (1988). Diagnosis of toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome by using a new serologic method. *J Clin Microbiol* 26(12):2541-2543.

Suzuki Y, Rani S, Liesenfeld O, Kojima T, Lim S, Nguyen TA, Dalrymple SA, Murray R et Remington JS (1997). Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *Infect Immun* 65:2339-2345.

Suzuki Y, Sher A, Yap G, Park D, Neyer LE, Liesenfeld O, Fort M, Kang H et Gufwoli E (2000). IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 164:5375-5382.

Tacke F, Ginhoux F, Jakubzick C, van Rooijen N, Merad M et Randolph GJ (2006). Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Exp Med* 203(3):583-597.

Tenter AM, Heckeroth AR et Weiss LM (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217-1258.

The Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group (2005). Standardization of Uveitis Nomenclature for reporting clinical data. Results of the first international workshop. *Am J Ophthalmol* 140:509-516.

Torres CM (1927). Morphologie d'un nouveau parasite de l'homme, *Encephalitozoon chagasi*, N. sp., observe dans un cas de meningo-encephalo-myelite congenitale avec myosite et myocardite. *C R Soc Biol* 97: 1787-1790.

Trinchieri G et Gerosa F (1996). Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* 59(4):505-511.

Vasconcelos-Santos DV, Dodds EM et Oréfice F (2011). Review for Disease of the Year: Differential Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis. *Ocular Immunol Inflamm* 19(3):171-179.

Vietzke WM, Geldermamnd AH, Grimley PG et Valsamism M (1968). Toxoplasmosis Complicating Malignancy: Experience At The National Cancer Institute. *Cancer* 21:816-827.

Wallace GR et Stanford MR (2008). Immunity and Toxoplasma retinochoroiditis. *Clin Exp Immunol* 153(3):309-315.

Wilson EH, Wille-Reece U, Dzierszynski F et Hunter CA (2005). A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol* 165:63-74.

Wolf A et Cowen D (1937). Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. *Bull Neurol Inst NY* 6:306-371.

Wolf A, Cowen D et Paige B (1939a). Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science* 89:226-227.

Wolf A, Cowen D *et* Paige B (1939b). Toxoplasmic encephalomyelitis: III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. *Am J Pathol* 15(6):657-694.

Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, Filho JK, Nussenblatt RB, Cunha-Neto E, Gazzinelli RT, Belfort Jr. R *et* Rizzo LV (2000). Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *J Infect Dis* 181:2018-2020.

Yang P, Das PK *et* Kijlstra A (2000). Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina. *Ocul Immunol Inflamm* 8(3):149-157.

Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S *et* Sher A (2005). TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein. *Science* 308:1626-1629.

Yap GS, Scharon-Kersten T, Charest H *et* Sher A (1998). Decreased Resistance of TNF Receptor p55- and p75-Deficient Mice to Chronic Toxoplasmosis Despite Normal Activation of Inducible Nitric Oxide Synthase *In Vivo*. *J Immunol* 160:1340-1345.

Yap GS, Pesin M *et* Sher A (2000). Cutting Edge: IL-12 Is Required for the Maintenance of IFN- γ Production in T Cells Mediating Chronic Resistance to the Intracellular Pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 165:628-631.

Yilmaz V, Yentur SP *et* Saruhan-Direskeneli G (2005). IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine* 30(4):188-194.

10. ANEXOS

Anexo A: Protocolo de tratamento da retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa do Hospital São Geraldo – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Prof. Dr. Fernando Oréfice).

Hospital São Geraldo – H.C.- UFMG

Setor de Uveítes

Nome:.....
 Data: .../.../.....

Uso Oral

1. Meticorten 20mg.....25 comprimidos
 Tomar no café da manhã:
 2 comprimidos por 7 dias
 1 comprimido por 6 dias
 1/2 comprimido por 6 dias
 1/4 comprimido por 6 dias e parar.
2. Daraprim 25mg.....45 comprimidos
 Tomar 3 comprimidos por dia durante 2 dias
 2 comprimidos por dia durante 2 dias
 1 comprimido por dia durante 31 dias.
3. Sulfadiazina 500 mg.....280 comprimidos
 Tomar 2 comprimidos de 6 em 6 horas (4 vezes ao dia) por 35 dias.
4. Ácido Folinico 7,5 mg.....35 comprimidos
 (manipular)
 Tomar 1 comprimido ao dia por 35 dias.

Uso Ocular

1. Maxidex ou Predfort colírio.....1 vidro
 Pingar uma gota no olho
 de 3 em 3 horas por 3 dias
 de 4 em 4 horas por 5 dias.
2. Atropina 1% colírio.....1 vidro
 Pingar uma gota no olho.....de 12 em 12 horas por 7 dias.
 (com reação de CA: células 3+/4+ ou 4+/4+)
3. Mydracyl 1% colírio.....1 vidro
 Pingar uma gota no olho.....de 8 em 8 horas por 15 dias.
 (com reação de CA: células 1+/4+ ou 2+/4+)

Observações:

1. Encaminhar para o Serviço de Uveítes com urgência.
2. Iniciar medicação oral após resultado do Hemograma + Plaquetas.
3. Fazer Hemograma + Plaquetas de 10 em 10 dias.

Anexo B: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0354.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Antonio Lúcio Teixeira Júnior
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 29 de setembro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "Estudo longitudinal de retinocoroidite toxoplásmica: avaliação dos parâmetros clínicos, inflamatórios/imunogenéticos e sorotipagem do parasita" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo C: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais incluindo a participação de pesquisadores.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0354.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Antonio Lúcio Teixeira Júnior
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 21 de novembro de 2011, a inclusão dos alunos, abaixo relacionados, ao projeto de pesquisa intitulado "**Estudo longitudinal de retinocoroidite toxoplásmica: avaliação dos parâmetros clínicos, inflamatórios/imunogenéticos e sorotipagem do parasita**":

- Vinícius Monteiro de Castro
- Thaís Fontes Bessa.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo D: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Pacientes

ESTUDO LONGITUDINAL DE RETINOCOROIDITE TOXOPLÁSMICA:
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, INFLAMATÓRIOS/IMUNE, IMUNOGENÉTICOS E SOROTIPAGEM DO PARASITA

Você está sendo convidado a participar do estudo sobre alterações clínicas, de genes relacionados a resposta imune, parâmetros inflamatórios/imunes e sorotipagem do parasita na Retinocoroidite Toxoplásmica. Antes de aceitar participar desta pesquisa clínica, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo, e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento.

O objetivo desse estudo é avaliar as alterações clínicas de pacientes com retinocoroidite toxoplásmica durante o tratamento e nos casos de recorrência da doença, estudo de sua resposta imune e definição do tipo de parasita.

A retinocoroidite toxoplásmica é uma doença causada pela infecção pelo parasita Toxoplasma gondii, acarretando comprometimento variável da visão podendo levar a cegueira. Como a menor parte dos indivíduos infectados pelo parasita desenvolvem a doença ocular, é fundamental compreender os fatores envolvidos com a manifestação da doença.

Este estudo irá consistir de exame oftalmológico de rotina no Setor de Uvéites do Hospital São Geraldo do HC/UFMG, onde serão coletados dados da história clínica e do exame oftalmológico e conforme indicação clínica você poderá realizar exames complementares como Tomografia de Coerência Óptica, Angiografia Fluoresceínica e/ou Angiografia por Indocianina Verde. Iremos coletar também uma pequena amostra do seu sangue (20mL). Esse material será encaminhado para um laboratório para estudo da resposta imune e definição do tipo do parasita.

Como critérios de inclusão temos: idade acima de 18 anos; ausência de doença de caráter imunológico.

Não haverá benefício direto com sua participação nesta pesquisa. Os dados provenientes com o estudo permitirão a melhor compreensão dessa grave doença.

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. No entanto, o pesquisador e sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG.

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida ou apresentar qualquer problema médico, contate a Dra. Cynthia Azeredo Cordeiro no telefone (31)35869050 ou a Comissão de Ética no telefone 3409-4592 ou endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005; ou a secretaria do Departamento de Uveítes no telefone (31) 3409.9568.

Consentimento: *Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para participar do estudo, até que eu decida o contrário.*

Belo Horizonte, ____ de _____ de ____.

Assinatura do paciente _____

Assinatura da testemunha _____

Assinatura do pesquisador _____

Anexo E: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos controles.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Controles

ESTUDO LONGITUDINAL DE RETINOCOROIDITE TOXOPLÁSMICA:
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS, INFLAMATÓRIOS/IMUNE, IMUNOGENÉTICOS E SOROTIPAGEM DO PARASITA

Você está sendo convidado a participar do estudo sobre alterações clínicas, de genes relacionados a resposta imune, parâmetros inflamatórios/imunes e sorotipagem do parasita na Retinocoroidite Toxoplásmica. Antes de aceitar participar desta pesquisa clínica, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo, e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento.

O objetivo desse estudo é avaliar as alterações clínicas de pacientes com retinocoroidite toxoplásmica durante o tratamento e nos casos de recorrência da doença, estudo de sua resposta imune e definição do tipo de parasita.

A retinocoroidite toxoplásmica é uma doença causada pela infecção pelo parasita Toxoplasma gondii, acarretando comprometimento variável da visão podendo levar a cegueira. Como a menor parte dos indivíduos infectados pelo parasita desenvolvem a doença ocular, é fundamental compreender os fatores envolvidos com a manifestação da doença.

Este estudo irá consistir na coleta de uma pequena amostra do seu sangue (20mL). Será realizado o teste sorológico para toxoplasmose. Assim que tivermos o resultado, entraremos em contato para comunicar o resultado. Os indivíduos positivos serão agendados para um exame oftalmológico completo e gratuito no Hospital São Geraldo do HC/UFMG para exclusão de lesões provenientes da infecção toxoplásmica. O restante do sangue será posteriormente encaminhado para um laboratório para estudo da resposta imune e definição do tipo do parasita..

Como critérios de inclusão temos: ausência de história de doença ocular e/ou de caráter imunológico prévias.

Você será beneficiado no conhecimento do seu status sorológico frente a toxoplasmose. Se o exame for positivo, você será agendado para um exame oftalmológico permitindo o diagnóstico de lesões provenientes da infecção. Além disso, os dados provenientes com o estudo permitirão a melhor compreensão dessa grave doença.

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. No entanto, o pesquisador e sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG e o Comitê de Ética em Pesquisa/HEMOMINAS, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG e o Comitê de Ética em Pesquisa/HEMOMINAS.

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Você não receberá qualquer compensação financeira por sua participação no estudo.

Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida ou apresentar qualquer problema médico, contate a Dra. Cynthia Azeredo Cordeiro no telefone 35869050; ou a Comissão de Ética/UFMG no telefone 3409-4592 ou endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005; ou a Comissão de Ética/HEMOMINAS no telefone 32484500; ou a secretaria do Departamento de Uveites no telefone 34099568.

Consentimento: *Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para participar do estudo, até que eu decida o contrário.*

Belo Horizonte, ____ de _____ de ____.

Assinatura do indivíduo _____

Assinatura da testemunha _____

Assinatura do pesquisador _____

Anexo F: Declaração de Aprovação do Mestrado.



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores Fernando Oréfice, Cynthia Azeredo Cordeiro, Joyce Hisae Yamamoto e Antônio Lúcio Teixeira Jr, aprovou a defesa de dissertação intitulada: **“RETINOCOROIDITE TOXOPLÁSMICA ATIVA PRESUMIDA: PARÂMETROS CLÍNICOS E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA DOS MONÓCITOS CD14+”** apresentada pelo mestrando **VINÍCIUS MONTEIRO DE CASTRO** para obtenção do título de Mestre em Medicina, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 13 de julho de 2012.



Prof. Fernando Oréfice
Orientador



Profa. Cynthia Azeredo Cordeiro
Coorientadora



Profa. Joyce Hisae Yamamoto



Prof. Antônio Lúcio Teixeira Jr

Anexo G: Ata da Defesa da Dissertação de Mestrado.



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 34099640 FAX: (31) 34099641



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de VINÍCIUS MONTEIRO DE CASTRO, nº de registro 2011656260. Às quatorze horas do dia treze de julho de dois mil e doze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar o trabalho final intitulado: "RETINOCOROIDITE TOXOPLÁSMICA ATIVA PRESUMIDA: PARÂMETROS CLÍNICOS E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOFENOTÍPICA DOS MONÓCITOS CD14+", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Medicina, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Fernando Oréfice, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Fernando Oréfice/ orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Profa. Cynthia Azeredo Cordeiro/ coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Profa. Joyce Hisae Yamamoto	Instituição: USP	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof. Antônio Lúcio Teixeira Jr	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 13 de julho de 2012.

Prof. Fernando Oréfice/ orientador: Fernando Oréfice
 Profa. Cynthia Azeredo Cordeiro/ coorientadora: Cynthia Azeredo Cordeiro
 Profa. Joyce Hisae Yamamoto: Joyce Hisae Yamamoto
 Prof. Antônio Lúcio Teixeira Jr: Antônio Lúcio Teixeira Jr.
 Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior/Coordenador: Vandack Alencar Nobre Jr.

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical
Faculdade de Medicina - UFMG

11. APÊNDICES

Apêndice A1: Tabela das características clínicas da retinocoroidite presumidamente toxoplásmica ativa no grupo RCT.

Paciente	Sexo	Idade (Anos)	Olho		Localização*	Tamanho**	Haze Vitreo***	BCVA Inicial†	BCVA Final†
			(Lesão Ativa)	Tipo					
1	F	20	OD	Satélite	Zona 2	<1 DD	1	0,6	2
2	F	19	OD	Satélite	Zona 1	<1 DD	2	0,74	2
3	M	31	OD	Satélite	Zona 1	1-2 DD	3	3	3
4	F	18	OD	Satélite	Zona 3	1-2 DD	0,5	0,1	1
5	M	33	OS	Satélite	Zona 2	<1 DD	1	0	2
6	F	28	OD	Satélite	Zona 2	<1 DD	0,5	0	0
7	M	23	OS	Satélite	Zona 2	<1 DD	0,5	0,1	1
8	F	28	OS	Satélite	Zona 2	<1 DD	1	0,4	2
9	M	26	OD	Focal	Zona 1	<1 DD	1	0,1	1
10	F	47	OD	Focal	Zona 2	>2 DD	3	1	1
11	F	44	OS	Satélite	Zona 1	1-2 DD	3	3	2
12	M	25	OS	Satélite	Zona 2	<1 DD	3	2	3
13	M	21	OS	Punciata	Zona 2	<1 DD	1	0	0
14	F	30	OS	Satélite	Zona 2	1-2 DD	2	0,18	0
15	M	25	OD	Satélite	Zona 1	<1 DD	0,5	0,1	3
16	M	37	OS	Satélite	Zona 1	1-2 DD	2	1,3	1
17	M	19	OS	Satélite	Zona 2	1-2 DD	3	1,3	1
18	F	21	OD	Satélite	Zona 2	1-2 DD	2	0	0
19	F	27	OE	Satélite	Zona 1	<1 DD	0,5	0,74	0
20	F	18	OD	Satélite	Zona 3	<1 DD	0,5	1,3	0,74

*Classificação Holland *et alii*, 1989;

** Tamanho comparado com diâmetro de disco;

*** Classificação de Kimura *et alii*, 1959;

† Melhor acuidade visual corrigida medida em LogMAR;

BCVA=best correct visual acuity; F=feminino; M=masculino; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; DD=diâmetro de disco.

Apêndice A2: Tabela dos dados do sOCT.

Tomografia de Coerência Óptica - espectral						
Paciente	Edema Macular	Smudge* (µm)		Altura** (µm)		
		Antes Tratamento	Após Tratamento	Antes Tratamento	Após Tratamento	
1	Ausente	3568	2084	434	347	
2	Ausente	2685	-	524	-	
3	Presente	3272	-	800	-	
4	Ausente	-	-	-	-	
5	Ausente	1700	-	418	187	
6	Ausente	985	557	350	222	
7	Ausente	971	735	369	276	
8	Ausente	-	-	-	-	
9	Ausente	1793	551	404	176	
10	-	-	-	-	-	
11	-	3252	-	436	228	
12	-	-	-	-	-	
13	Ausente	-	-	-	-	
14	Ausente	2156	560	310	217	
15	Presente	2287	1717	517	215	
16	Presente	1533	0	525	234	
17	Ausente	-	-	-	-	
18	Ausente	1490	551	423	253	
19	-	-	-	-	351	
20	-	-	-	-	-	

*Maior extensão da lesão retinocoroideiana;

** Maior altura da lesão retinocoroideiana;

µm=micrômetros.

Apêndice A3: Tabela dos dados da Angiografia por Fluoresceína e Indocianina Verde.

Paciente	Angiografia por Fluoresceína Sódica		Angiografia por Indocianina Verde	
	Antes Tratamento	Após Tratamento	Antes Tratamento	Após Tratamento
1	Presente	Presente	Presente	Presente
2	Presente	-	Presente	-
3	Presente	-	Presente	-
4	Presente	Presente	Presente	Ausente
5	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
6	Presente	Presente	Presente	Ausente
7	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
8	Presente	Ausente	Presente	Ausente
9	Ausente	-	Presente	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
14	Presente	Ausente	Presente	Ausente
15	Presente	Ausente	Presente	Ausente
16	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
17	Presente	Ausente	Presente	-
18	Presente	Ausente	Presente	Ausente
19	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
20	-	-	-	-

Paciente	Extravasamento Disco Óptico		Infiltrados Coroidianos	
	Antes Tratamento	Após Tratamento	Antes Tratamento	Após Tratamento
1	Presente	Ausente	Presente	Presente
2	Presente	-	Ausente	-
3	Presente	-	Ausente	-
4	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
5	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
6	Presente	Ausente	Presente	Ausente
7	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
8	Presente	Ausente	Presente	Ausente
9	Presente	-	Presente	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	Presente	Ausente	Presente	Ausente
14	Presente	Presente	Ausente	Ausente
15	Presente	Ausente	Presente	Ausente
16	Presente	Ausente	Presente	Ausente
17	Presente	Ausente	-	-
18	Presente	Ausente	Presente	Ausente
19	Presente	Ausente	Presente	Ausente
20	-	-	-	-

Apêndice A4: Percentual de monócitos CD14⁺ expressando citocinas no grupo RCT.

Paciente	CD14 ⁺ /TNF- α		CD14 ⁺ /IL-12		CD14 ⁺ /IL-6		CD14 ⁺ /IL-10	
	Melo	STAg	Melo	STAg	Melo	STAg	Melo	STAg
1	13,7	37,3	20,8	24,4	25,6	25,8	7,0	16,8
2	20,6	55,9	12,1	30,9	31,8	56,3	4,1	9,9
3	20,3	58,8	9,4	19,5	21,2	36,2	7,6	13,2
4	19,5	15,3	20,5	32,1	7,0	24,5	3,7	8,3
5	7,8	27,6	12,4	20,0	15,5	16,7	4,3	12,7
6	4,2	13,5	12,6	23,3	19,0	30,0	3,7	10,9
7	9,6	24,1	8,3	20,3	-	-	6,6	12,0
8	9,1	26,9	7,4	24,4	18,5	31,3	6,2	14,4
9	12,3	22,7	9,6	27,5	19,3	45,4	3,2	9,1
10	8,0	16,5	10,8	18,2	17,2	30,0	4,0	9,8

STAg=antígeno solúvel do *T. gondii*.

Apêndice A4: continuação.

Paciente	CD14*/TNF- α		CD14*/IL-12		CD14*/IL-6		CD14*/IL-10	
	Melo	STAG	Melo	STAG	Melo	STAG	Melo	STAG
11	10,4	19,7	8,9	13,2	21,4	35,7	4,7	8,1
12	4,2	14,5	6,8	19,4	33,0	40,9	2,5	3,4
13	14,5	43,4	7,1	19,3	22,2	31,5	4,4	10,4
14	-	-	8,8	11,1	11,8	18,7	4,9	7,3
15	4,2	17,1	4,1	15,5	17,6	31,9	3,1	5,6
16	9,1	26,9	5,8	22,2	11,0	23,1	4,1	5,6
17	16,3	22,9	9,4	17,9	20,2	32,5	5,7	9,8
18	8,4	28,1	6,6	15,8	14,7	38,2	3,1	9,3
19	12,5	18,0	7,4	18,8	21,9	34,3	6,2	11,0
20	22,0	35,3	5,0	21,9	19,2	27,4	4,2	10,7

Apêndice A5: Percentual de monócitos CD14⁺ expressando citocinas no grupo Controle Negativo.

Grupo Controle -	CD14 ⁺ /TNF- α		CD14 ⁺ /IL-12		CD14 ⁺ /IL-6		CD14 ⁺ /IL-10	
	Melo	STAg	Melo	STAg	Melo	STAg	Melo	STAg
1	1,7	3,4	1,2	2,9	9,0	29,1	1,7	3,6
2	3,3	5,8	1,4	1,9	13,3	36,3	3,2	3,1
3	4,6	6,2	1,5	1,5	10,3	22,2	1,9	1,7
4	4,5	1,2	2,3	2,5	9,3	37,2	1,2	3,6
5	2,5	8,1	2,3	1,8	11,8	37,7	1,5	4,6
6	-	-	2,2	2,0	11,9	35,2	1,7	1,7
7	1,4	2,9	1,4	1,8	19,5	42,8	1,1	1,2
8	2,5	2,6	2,4	2,9	32,3	43,5	1,1	1,2
9	2,2	2,2	2,9	3,1	16,5	35,3	1,3	1,1

Apêndice A6: Percentual de monócitos CD14⁺ expressando citocinas no grupo Controle Positivo.

Grupo Controle +	CD14 ⁺ /TNF- α		CD14 ⁺ /IL-12		CD14 ⁺ /IL-6		CD14 ⁺ /IL-10	
	Melo	STAg	Melo	STAg	Melo	STAg	Melo	STAg
1	5,5	11,3	8,8	11,3	6,2	25,7	2,4	3,7
2	4,9	9,6	9,2	9,6	9,4	29,6	2,8	5,5
3	6,3	8,7	5,0	8,7	13,3	31,1	1,4	3,6
4	2,4	4,6	5,2	4,6	6,3	38,2	1,3	2,2
5	6,9	13,3	-	-	10,1	40,8	1,8	1,5
6	1,1	2,4	2,7	4,4	12,1	37,2	1,2	2,9
7	3,5	7,9	5,2	7,5	15,9	29,6	1,7	5,3
8	-	-	5,0	4,5	20,4	30,5	1,6	3,0
9	-	-	-	-	19,6	33,3	-	-
