



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Incidência e soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* no município de Santa Cruz e análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular do estado do Rio Grande do Norte.

Débora de Almeida Aloise

Belo Horizonte

2016

DÉBORA DE ALMEIDA ALOISE

Incidência e soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* no município de Santa Cruz e análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular do estado do Rio Grande do Norte.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

Co – Orientador: Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto

Belo Horizonte

2016

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia. – Laboratório de Toxoplasmose.

Co – Orientador: Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose.

Colaboradores:

Dra. Fabrícia Lima Fontes – Departamento Biologia Celular e Genética, CB/UFRN

Dra. Lucymara Fassarella Agnez-Lima – Departamento Biologia Celular e Genética, CB/UFRN

Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo – Centro de Pesquisas René Rachou – LBDM

Dra. Mariângela Carneiro – Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG

Dr. Olindo Assis Martins Filho – Centro de Pesquisas René Rachou – LBDM

Dra. Rita de Cássia Silva Portela - Departamento Biologia Celular e Genética, CB/UFRN

Dr. Wendel Coura – Vital – Departamento de Análise Clínicas - UFOP

Dedico este trabalho a Décio e Suely,
que exercem, com louvor, a função de
pais e avós. Obrigada, por me ensinar,
através do exemplo, como ser uma
pessoa cada vez melhor.
AMO VOCÊS.

“Se você só fizer o que sabe, nunca será
mais do que você é agora”.

(Mestre Shifu)

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, por ter me apresentado inúmeras pessoas, e até anjos sem asas, durante essa empreitada, permitindo meu crescimento pessoal e profissional;
- ✓ À minha família, minha base (minha outra metade da laranja) que sempre encarou com uma pitada de bom humor meus picos de estresse. Décio (pai), Suely (mãe), André (irmão), Ludimila (irmã) e Amanda (sobrinha), este trabalho também é de vocês;
- ✓ Ao orientador Ricardo Vítor pela confiança, pelos momentos de crescimento acadêmico, pela paciência diante das minhas dificuldades e por todo o ensinamento transmitido;
- ✓ Ao co-orientador Válter Andrade, pela amizade e por ter me incentivado a fazer o doutorado na UFMG. Valeu muito a pena! Obrigada pela confiança, pelas críticas, sugestões e pelo agradável convívio;
- ✓ À Mariângela Carneiro e Wendel Coura-Vital, pela valiosa contribuição nas análises estatísticas, além das sugestões e críticas para elaboração da tese e artigo;
- ✓ Aos Dr. Olindo Assis Martins Filho e Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo, pela preciosa contribuição da análise das citocinas, além da paciência e atenção dispensadas;
- ✓ Às Dra. Lucymara Fassarella, Dra. Rita de Cássia e Dra. Fabricia Fontes pela importante orientação e execução das técnicas de imunogenética, além da troca de experiências;
- ✓ Aos Agentes Comunitários de Saúde, em especial, Randerli, Sheila e Andréa, pela imensa ajuda durante a execução deste trabalho;
- ✓ Aos administradores das Unidades Básicas de Saúde, principalmente, Tata, Branca e Surama pela importante ajuda fornecida diante da logística do trabalho;
- ✓ Aos Agentes de Combate às Endemias, Edivândio e Chaguinha, pela alegria, energia positiva e, principalmente, pela coragem demonstrada diante dos animais abordados;
- ✓ Aos voluntários da cidade de Santa Cruz, pelo acolhimento e confiança;
- ✓ Ao Edson Santana, pelo auxílio no transporte da equipe durante a realização deste trabalho;

- ✓ À Rosálida Estevan Nazar Lopes (Rosa), um dos anjos sem asas que Deus me apresentou. Sou muito grata pelos ensinamentos, pela paciência e pelos conselhos. Admiro sua inata habilidade de auxiliar incondicionalmente;
- ✓ Aos amigos Paula, Ivana, Marco Túlio, Nathalie, Jordanna, Gisele, Letícia, Warllem, Joice, Ana Carolina, Alcinna, Dani, Priscila e Lucas por ter compartilhado a “sofrência” das disciplinas cursadas, além de muitas risadas e comemorações; Levo um pedacinho de cada um de vocês comigo;
- ✓ À amiga Tatiana, pela amizade, conversas, risadas e pelo agradável acolhimento em sua casa; De você levarei um “pedaço”;
- ✓ À melhor equipe de campo da galáxia: Ramiza, Gislaine, Vanessa, e principalmente, Marlus Venâncio. Obrigada por me ajudarem incansavelmente na execução deste trabalho. Obrigada não apenas pela ajuda, mas pelo apoio, pelas conversas “filosóficas”, conselhos e momentos de carinho e descontração durante as coletas;
- ✓ Ao pessoal do LABMAT, especialmente, a Marianne pela imensa ajuda na coleta de sangue dos voluntários;
- ✓ Ao pessoal do Laboratório de Toxoplasmose da UFMG, pela troca de experiências;
- ✓ Aos membros integrantes da banca de defesa, por aceitarem o convite honrando-nos com suas presenças, comentários e sugestões;
- ✓ À Sumara e Sibebe, secretárias do Programa de Pós-graduação em Parasitologia, pelo carinho e atenção dispensados durante o tempo que morei em Belo Horizonte;
- ✓ À equipe do setor de oftalmologia do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) e, especialmente, ao Dr. Carlos Alexandre pela atenção e essencial ajuda na triagem dos pacientes;
- ✓ Ao Dr. Diego Sampaio, da clínica Oftalmed, pela atenção e disponibilidade para avaliar os pacientes, se mostrando sempre solícito e pronto para contribuir com o trabalho;
- ✓ Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia na pessoa de seu coordenador, Prof. Ricardo T. Fujiwara, pela possibilidade de realização deste trabalho;
- ✓ À Faculdade de Ciências da Saúde do Trairí (FACISA), pelo suporte para a realização das etapas iniciais deste trabalho, além de conceder liberação das atividades didáticas durante parte do período de desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Índice de figuras	v
Índice de tabelas	viii
Lista de abreviaturas e siglas	xiii
1. Introdução	
1.1. Histórico	1
1.2. Aspectos biológicos de <i>Toxoplasma gondii</i>	3
1.3. Mecanismos de transmissão	5
1.4. Interação parasito – hospedeiro	7
1.5. Toxoplasmose em portadores de HIV	9
1.6. Toxoplasmose congênita	10
1.7. Diagnóstico e tratamento	12
2. Justificativa	15
3. Capítulo 1: Soroprevalência da infecção por <i>T. gondii</i> na população do município de Santa Cruz - RN	
3.1. Introdução	18
3.2. Objetivos	21
3.3. Material e Métodos	22
3.4. Resultados	30
3.5. Discussão	49
4. Capítulo 2: Incidência da toxoplasmose no município de Santa Cruz-RN, 2014 – 2015.	
4.1. Introdução	56
4.2. Objetivos	59
4.3. Material e Métodos	60
4.4. Resultados	65
4.5. Discussão	84
5. Capítulo 3: Soroprevalência da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em animais presentes nas residências do município de Santa Cruz – RN e sua associação com a prevalência em humanos	
5.1. Introdução	87
5.2. Objetivos	92

5.3. Material e Métodos	93
5.4. Resultados	95
5.5. Discussão	102
6. Capítulo 4: Análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular no estado do Rio Grande do Norte	
6.1. Introdução	107
6.2. Objetivos	115
6.3. Material e Métodos	116
6.4. Resultados	122
6.5. Discussão	133
7. Conclusões	138
8. Referências	139
9. Anexos	162

RESUMO

A toxoplasmose é uma das mais comuns infecções parasitárias em todo o mundo e as estimativas de soroprevalência para populações humanas e animais apresentam grandes variações até mesmo dentro de uma mesma região. Estudos relacionados a toxoplasmose nos estados do Nordeste do Brasil são poucos e nenhum trabalho neste sentido foi encontrado na literatura no que diz respeito ao município de Santa Cruz – RN. Neste trabalho analisou-se a prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* tanto em humanos como em animais (cão, gato e ave) desse município. O ensaio imunoenzimático (ELISA) para detectar IgG mostrou que 66,2% da população humana apresentavam anticorpos anti – *T. gondii*. Anticorpos IgM anti-*T. gondii* foram identificados em 4,0% desses voluntários, dos quais 22,1% apresentaram resultado IgG negativo (IgM⁺/IgG⁻), e 77,9% apresentaram sorologia positiva tanto para IgM como para IgG (IgM⁺/IgG⁺). O teste de avidéz, realizado nos soros IgG positivos, associado à presença de IgM identificou 2% desses voluntários com infecção classificada como recente. Os fatores de risco associados a infecção foram identificados através da aplicação de questionário. Permaneceram no modelo final após análise logística multivariada os seguintes fatores: idade (> 45 anos/ OR 7,4; 95%IC; Intervalo 3,7-14,8; p=0,01), grau de escolaridade (Analfabeto/OR 2,8; 95%IC; Intervalo 1,6-5,0; p=0,00), quantidade de gatos na residência (> 3 gatos/ OR 2,0; 95%IC; Intervalo 1,2-3,5; p=0,01), ausência de caixa d'água (OR 2,0; 95%IC; Intervalo 1,4-3,1; p=0,01) e ingestão de leite cru/não pasteurizado (OR 2,0; 95%IC; Intervalo 1,3-3,0; p=0,01). Após acompanhamento dos voluntários soronegativos por, aproximadamente, um ano, a taxa de incidência da infecção por *T. gondii* observada neste município foi de 6,8/1000 pessoas / mês. Os ensaios sorológicos para detectar IgG realizados nos animais, presentes no domicílio e/ou peridomicílio do município de Santa Cruz, mostraram soroprevalência de 47,4% nas aves, 75,8% nos cães e 60,1% nos gatos. Exceto para cães, a infecção por este protozoário mostrou associação estatística com a idade (Aves: idade > 12 meses/ OR 4,5; 95%IC; Intervalo 1,5-13,5; p=0,00 / Gato: idade > 5 anos/ OR 3,4; 95%IC; Intervalo 1,4 – 8,3; p=0,00). A infecção toxoplásmica em humanos é frequentemente subclínica, no entanto pode evoluir e apresentar um quadro clínico, principalmente com retinocoroidite. A resposta imune provavelmente apresenta um papel relevante na evolução da infecção e, neste trabalho, encontramos associação estatística entre toxoplasmose ocular e o polimorfismo do gene *APEXI* (rs1130409). A

análise de regressão logística mostrou maior chance de desenvolver a lesão ocular naqueles pacientes com alelos polimórficos (GG) ou heterozigotos (GT). Nenhuma correlação foi encontrada, na população estudada, entre o gene *MyD88* (rs7744) e lesão ocular. Também não se observou correlação entre a retinocoroidite e o perfil de expressão das citocinas IL-4, IL-5, IL-17A, IFN- γ e TNF- α .

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*; Soroprevalência; Incidência; Fatores de risco; Santa Cruz-RN; Toxoplasmose ocular; *APEXI*, Citocinas.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is one of the most common parasitic infections worldwide and estimates of seroprevalence for human and animal populations vary widely even within the same region. Toxoplasmosis-related survey in the states of Northeastern Brazil are few and no studies has been found in the literature with regard to the municipality of Santa Cruz - RN. In this paper we analyzed the prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in both humans and animals (dog, cat and chicken) of this municipality. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect IgG showed that 66.2% of the human population had anti - *T. gondii* antibodies. IgM anti- *T. gondii* antibodies were identified in 4.0% of these volunteers, of which 22.1% had negative results IgG (IgM⁺/ IgG⁻), and 77.9% tested positive for both IgM and IgG (IgM⁺/IgG⁺). The avidity test, performed on positive IgG sera, associated with IgM antibodies identified 2% of volunteers with infection classified as recent. Risk factors associated with infection were identified through a questionnaire. The final model after multivariate logistic analysis the following factors: age (> 45 years / OR 7.4; 95% CI, 3.7 to 14.8 range, p = 0.01), educational level (Illiterate / OR 2.8; 95% CI, 1.6 to 5.0 range; p = 0.00), number of cats in residence (> 3 cats / OR 2.0; 95% CI, 1.2-3 range, 5, p = 0.01), no water tank (OR 2.0; 95% CI, 1.4 to 3.1 range; p = 0.01) and ingestion of raw / unpasteurized milk (OR 2.0; 95% CI, 1.3 to 3.0 range; p = 0.01). After follow-up of seronegative volunteers for one year, approximately, the incidence rate of infection by *T. gondii* observed in this municipality was 6.8 / 1000 person / month. Serological tests to detect IgG antibodies performed in animals, present in the home the municipality of Santa Cruz, showed seroprevalence of 47.4% in chicken, 75.8% in dogs and 60.1% in cats. Except for dogs, infection with this protozoan showed statistical association with age (Chicken: age > 12 months / OR 4.5; 95% CI, 1.5 to 13.5 range, p = 0.00 / Cat: age > 5 years / OR 3.4; 95% CI; range 1.4 to 8.3; p = 0.00). *Toxoplasma gondii* infection in humans is often subclinical, however can develop and present a clinical signs, especially with retinochoroiditis. The immune response probably has a role in the evolution of infection and, in this study, we found a statistical association between ocular toxoplasmosis and polymorphism *APEX1* gene (rs1130409). The logistic regression analysis showed increased the risk of developing eye injury in patients with polymorphic alleles (GG) or heterozygous (GT). No correlation was found in the population studied between *MyD88*

gene (rs7744) and eye injury. Also, no correlation was found between retinochoroiditis and the expression profile of the cytokines IL-4, IL-5, IL-17A, IFN- γ and TNF- α .

Keywords: *Toxoplasma gondii*; seroprevalence; Incidence; Risk factors; Santa Cruz-RN; ocular toxoplasmosis; *APEX1*; Cytokines.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	O ciclo biológico do protozoário <i>Toxoplasma gondii</i> em hospedeiros intermediários e definitivos (Robert-Gangneux e Dardé 2012).....	4
Figura 2.	Esquema ilustrando as várias fontes de transmissão do protozoário <i>Toxoplasma gondii</i> para humanos e animais (Robert-Gangneux e Dardé 2012).....	6

CAPÍTULO 1

Figura 3.	Mapa do Rio Grande do Norte dividido em mesorregiões.....	22
Figura 4.	Mapa do Rio Grande do Norte com o município de Santa Cruz destacado em vermelho. (Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Santa_Cruz_(Rio_Grande_do_Norte)).....	23
Figura 5.	Mapa do município de Santa Cruz - RN mostrando a disposição das cinco áreas. (Mapa elaborado pelo Agente de Combate às endemias Nicolas Kelps em 2015).....	24
Figura 6.	Frequência dos voluntários que tem o hábito de ingerir leite cru / não pasteurizado de gado no município de Santa Cruz – RN.....	36
Figura 7.	Relação entre idade e sorologia das mulheres voluntárias do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014. A. Proporção, por faixa etária, de mulheres soropositivas e soronegativas para toxoplasmose. B. Distribuição, por faixa etária, apenas das mulheres soronegativas	40

CAPÍTULO 2

Figura 8.	Concentração ideal de soro e de conjugado utilizados no ELISA-IgM. Os valores acima das colunas (* <i>signal-to-ratio</i> - S/N) indicam a razão entre a média de absorbância de oito soros positivos (azul) pela média da absorbância de sete soros negativos (vermelho). Optou-se pelas diluições com maior valor S/N, ou seja, S/N = 9,1.	65
------------------	---	----

Figura 9.	Frequência de voluntários IgG ⁺ /IgM ⁻ que se encontra com infecção recente (avidez < 50 %) e com infecção crônica (avidez ≥ 50%) por <i>Toxoplasma gondii</i>	68
Figura 10.	Frequência de voluntários IgG ⁺ /IgM ⁺ que se encontra com infecção recente (avidez < 50 %) e com infecção crônica (avidez ≥ 50%) por <i>Toxoplasma gondii</i>	68
Figura 11.	Delineamento do estudo.....	69

CAPÍTULO 4

Figura 12.	Estabelecimento da mediana global (ponto de corte), para cada citocina, baseado na Intensidade Média de Fluorescência (IMF).	126
Figura 13.	Análise do perfil das citocinas nos grupos controle e com lesão ocular. A. Categorização dos indivíduos de acordo com a mediana calculada a partir da Intensidade Média de Fluorescência de cada citocina. Indivíduos com valores abaixo da mediana são representados por retângulo branco e aqueles com valores acima são representados por retângulo preto. A frequência (%) de indivíduos denominados “alto produtores” (acima da mediana), para cada citocina, é mostrada ao final da sequência dos retângulos. B. Frequência de indivíduos “alto produtores” encontrada nos grupos controles e com lesão ocular. NI: controle negativo; TOXO: controle positivo sem lesão ocular; Ocular TOXO: com lesão ocular.....	127

- Figura 14.** Influência do polimorfismo do gene *APEXI* na frequência de indivíduos com “altos” níveis de citocinas no soro. **A.** Diagrama categorizando os indivíduos “baixo produtores” (retângulos brancos) e “alto produtores” (retângulos pretos) em relação ao genótipo. **B.** Frequência de alto produtores para cada citocina observada para cada genótipo. HN: homozigoto normal (TT); HP: homozigoto polimórfico (GG); HT: heterozigoto (GT)..... 130
- Figura 15.** Influência do polimorfismo do gene *MyD88* na frequência de indivíduos com “altos” níveis de citocinas no soro. **A.** Diagrama categorizando os indivíduos baixo produtores (retângulos brancos) e alto produtores (retângulos pretos) em relação ao genótipo. **B.** Frequência de alto produtores para cada citocina observada para cada genótipo. HN: homozigoto normal (TT); HT: heterozigoto (GT)..... 131
- Figura 16.** Influência dos níveis séricos de citocinas no *status* de perda de visão. **A.** Diagrama categorizando os indivíduos baixo produtores (retângulos brancos) e alto produtores (retângulos pretos) em relação ao *status* da perda da visão organizado em três categorias: perda de 0 a 20% de visão, perda de 21 a 59% de visão e perda de visão igual ou superior a 60%. **B.** Frequência de “alto produtores” observada para cada citocina em relação ao *status* de perda de visão..... 132

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Número total de famílias (n=8965) distribuído por área no município de Santa Cruz – RN, em 2014	30
Tabela 2.	Número de famílias (n=1217) e de pessoas (n=1540) distribuídas por área no município de Santa Cruz – RN	30
Tabela 3.	Características dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	31
Tabela 4.	Características das residências dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	32
Tabela 5.	Aspectos comportamentais relacionados à ingestão de oocistos pelos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	33
Tabela 6.	Aspectos comportamentais dos voluntários em relação a gatos dentro e fora das residências do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	35
Tabela 7.	Aspectos comportamentais relacionados a ingestão de cistos de <i>Toxoplasma gondii</i> pelos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	36
Tabela 8.	Ocorrência de problemas de visão, transplantes de órgãos, transfusão de sangue e aborto nos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	37
Tabela 9.	Características dos voluntários do município de Santa Cruz – RN associadas à soroprevalência, 2013 – 2014.....	39
Tabela 10.	Renda familiar e grau de escolaridade das 5 áreas do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	41
Tabela 11.	Análise univariada da positividade para toxoplasmose e características dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	42
Tabela 12.	Análise univariada das características das residências dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	43

Tabela 13.	Aspectos comportamentais relacionados à ingestão de oocistos/taquizoítos pelos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	44
Tabela 14.	Análise univariada de aspectos comportamentais dos voluntários em relação a permanência de gatos dentro e fora das residências do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	45
Tabela 15.	Análise univariada dos aspectos comportamentais relacionados a ingestão de carne crua/mal passada, possivelmente contaminada com cistos de <i>Toxoplasma gondii</i> , pelos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	46
Tabela 16.	Análise univariada das ocorrências de problemas de visão, transplantes de órgãos, transfusão de sangue e aborto nos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	47
Tabela 17.	Análise multivariada dos aspectos relacionados a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> no município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	48

CAPÍTULO 2

Tabela 18.	Distribuição dos voluntários IgM ⁺ por área no município de Santa Cruz – RN. A presença do fator reumatóide foi observada em 9 amostras.....	66
Tabela 19.	Características dos três voluntários IgM ⁺ / IgG ⁻ (acompanhados por um ano para confirmação da soroconversão de IgG) e de suas respectivas residências em relação aos fatores de risco identificados no município de Santa Cruz – RN.	67
Tabela 20.	Distribuição dos voluntários soronegativos por área e pelo número de coletas posteriores no município de Santa Cruz – RN.....	69
Tabela 21.	Características individuais dos voluntários acompanhados no município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.	70

Tabela 22.	Características das residências dos voluntários acompanhados no município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.	71
Tabela 23.	Características comportamentais e alimentares dos voluntários soronegativos acompanhados no município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.....	72
Tabela 24.	Ocorrência de problemas de visão, transplantes de órgãos e transfusão de sangue nos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.	75
Tabela 25.	Características sorológicas dos voluntários do município de Santa Cruz – RN que apresentaram soroconversão no intervalo de 4 – 6 meses após a primeira análise.....	76
Tabela 26.	Taxa de incidência da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> no município de Santa Cruz – RN.	77
Tabela 27.	Características dos voluntários que apresentaram soroconversão para anticorpos IgG anti – <i>Toxoplasma gondii</i> e de suas respectivas residências em relação aos fatores de risco identificados no município de Santa Cruz – RN.....	78
Tabela 28.	Análise univariada das características dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.	79
Tabela 29.	Análise univariada das características das residências dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.	79
Tabela 30.	Análise univariada das características comportamentais e alimentares dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.....	81
Tabela 31.	Análise univariada das ocorrências de sinais clínicos relacionados a infecção por <i>T. gondii</i> em voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.	83

CAPÍTULO 3

Tabela 32.	Características das aves do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	95
Tabela 33.	Características dos cães do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	96
Tabela 34.	Características dos gatos do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	97
Tabela 35.	Análise univariada da prevalência da toxoplasmose associada as características das aves presentes no município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	98
Tabela 36.	Análise univariada da prevalência da toxoplasmose associada as características dos cães presentes no município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	99
Tabela 37.	Análise univariada da prevalência da toxoplasmose associada as características dos gatos presentes no município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014	100
Tabela 38.	Soroprevalência da toxoplasmose em humanos e em animais nas diferentes áreas do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	101
Tabela 39.	Associação através do teste de Spearman da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> entre humanos e em animais nas diferentes áreas do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.....	101

CAPÍTULO 4

Tabela 40.	Características individuais dos controles e voluntários com toxoplasmose ocular do Rio Grande do Norte.....	122
Tabela 41.	Aspectos relacionados a uveíte dos voluntários do Rio Grande do Norte com toxoplasmose ocular.....	123
Tabela 42.	Aspectos imunológicos dos voluntários do Estado do Rio Grande do Norte com toxoplasmose ocular	124
Tabela 43.	Frequência genotípica dos controles e dos voluntários com toxoplasmose ocular do Estado do Rio Grande do Norte.....	125
Tabela 44.	Análise univariada da frequência alélica dos genes <i>APEXI</i> e <i>MyD88</i> dos controles e voluntários com lesão ocular do estado do Rio Grande do Norte.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – *Acquired immune deficiency syndrome* – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

APE1/Ref-1 – Endonuclease apurínica/apirimidínica

CBA - *Cytometric Bead Array*

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* - ácido etilenodiamino tetra-acético

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

FACISA - Faculdade de Ciências da Saúde do Trairí

HIV – *human immunodeficiency virus* – vírus da imunodeficiência humana

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDEMA – Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente

IFN- γ – *Interferon gama*

IgA - Imunoglobulina da classe A

IgE - Imunoglobulina da classe E

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgM - Imunoglobulina da classe M

IR – Índice de reatividade

IL - Interleucina

MMP-9 – *Matrix Metalloproteinase* – Metaloproteinase de matriz

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene* - Fator de diferenciação mieloide 88

N – Número amostral

NK - *Natural Killer* – Células Natural Killer

OR – *Odds Ratio* – Razão de chances ou possibilidades

PCR- *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da Polimerase

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de comprimento no fragmento de restrição

SNP – *Single Nucleotide polymorphism* – Polimorfismo de nucleotídeo único

SST – Solução Salina contendo Tween

STAG – *Soluble tachyzoite antigen*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th - *T helper*

TLR - *Toll-like Receptors* – Receptores Toll-like

TNF- *Tumor Necrosis Factor* – Fator de necrose tumoral

T. gondii – *Toxoplasma gondii*

UBS – Unidade Básica de saúde

UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

VEGF – Vascular endothelial Growth Factor – fator de crescimento endotelial vascular

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

O fim do século XIX e início do século XX foi um período que marcou as ciências biomédicas. Nesse período, diversas novas espécies de parasitos protistas foram descobertos, e muitos identificados como agentes etiológicos de importantes doenças humanas. Em 1888, Laveran descreveu o gênero *Plasmodium* (agente etiológico da malária) e mais tarde, em 1903, descreveu a *Leishmania donovani* (um dos agentes etiológicos do calazar). Na sequência, em 1907, Forde descreveu *Trypanosoma gambiense* (agente da tripanossomíase africana ou doença do sono) e, em 1908, *Toxoplasma gondii* (agente etiológico da toxoplasmose) era descrito. Para a ciência brasileira, os primeiros 10 anos do século XX foram notavelmente marcados pelo envolvimento dos cientistas brasileiros na descrição de *T. gondii* (por Splendore), *Pneumocystis carinii*, *Trypanosoma cruzi* (ambos descritos por Carlos Chagas, em 1909) e *Leishmania braziliensis*, descrito por Viana, em 1911 (Souza et al. 2009).

Laveran (1900) parece ter sido o primeiro autor a descrever *T. gondii* em pardais de Java (Oréfice et al. 2010). No entanto, a identificação deste protozoário ocorreu simultaneamente por Nicolle e Manceaux (1908) em um roedor norte-africano (gundi), e por Afonso Splendore (1908), em um coelho no Brasil. O nome *Toxoplasma gondii* foi proposto por Nicolle e Manceaux (1909) baseado na forma do estágio de infecção (*toxon* = arco) e o termo *gondii* pode ter resultado do erro de ortografia do hospedeiro original – *Ctenodactylus gundi* (Ferguson 2009).

Entre 1908 e 1937 foram feitos diversos relatos identificando *Toxoplasma* em diferentes espécies animais, incluindo seres humanos. Sabin e Olitsky (1937) mostraram que *Toxoplasma* é um parasito intracelular obrigatório que poderia ser transmitido entre animais de laboratório através da inoculação intracranial, subcutânea e intraperitoneal utilizando homogeneizado de cérebro infectado. Além disso, foram observadas variações na virulência deste protozoário e aumento da virulência após contínuas passagens em animais de laboratório (Ferguson 2009). Uma importante contribuição brasileira foi a descrição inicial da toxoplasmose congênita pelo patologista Margarinos Torres, em 1927. A importância da toxoplasmose congênita como causa da toxoplasmose ocular passou a ser reconhecida a partir dos trabalhos de Wilder (1952) e Perkins (1973).

Em 1948, uma técnica sorológica foi desenvolvida para identificar seres humanos e animais infectados pelo parasito através da caracterização dos anticorpos anti-

Toxoplasma (Sabin e Feldman, 1948). Esta técnica mostrou que grande proporção da população humana e de animais domésticos apresentava esses anticorpos específicos. Os resultados encontrados com esta técnica mudou a percepção da infecção por este protozoário. Tal parasito, antes considerado raro, passou a ser um dos mais comuns parasitos infectando o homem e animais, causando na maioria dos seus hospedeiros poucos sintomas ou se mostrando assintomático.

Na década de 50, surgiu a grande questão: Como uma grande quantidade de humanos e animais tornaram-se infectados com *T. gondii*? Já se sabia que a infecção congênita podia ocorrer, mas o mecanismo pelo qual os adultos se infectavam era, até então, desconhecido. Devido às observações da forma de taquizoíto de *Toxoplasma* dentro dos macrófagos e circulando no sangue, pensou-se que sua forma de transmissão podia estar relacionada ao do protozoário *Leishmania*. Muitos estudos foram realizados na tentativa de mostrar o inseto vetor, mas foram totalmente infrutíferos. Em 1937, Sabin e Olitsky mostraram que ratos que consumiam carne de animais infectados com *T. gondii*, se infectavam, sugerindo que um método de disseminação natural seria por meio da ingestão de carne infectada por este protozoário. E nesse contexto, em 1960, Jacobs e colaboradores, demonstraram que a forma de bradizoíto em cistos teciduais pode sobreviver à exposição a ácido e tripsina confirmando o possível papel da ingestão desses cistos na transmissão do parasito (Ferguson 2009).

O papel realizado pela ingestão de carne mal passada ou crua na transmissão da toxoplasmose aos seres humanos foi confirmado por Desmonts e colaboradores (1965). Em um hospital de tuberculose em Paris onde a carne crua era fornecida como proposta terapêutica observou-se que a aquisição anual de anticorpos para *Toxoplasma* aumentou de 10% por ano para 50% quando a carne mal passada passou a ser fornecida. Quando a carne foi substituída por costeletas de cordeiro, a taxa da aquisição aumentou para 100% por ano (Ferguson 2009).

Contudo, a observação de que *Toxoplasma* pode ser transmitido através do consumo de carne não podia explicar a alta incidência em herbívoros ou vegetarianos estritos. Até meados dos anos 60 isto era um mistério. Entretanto, a descoberta de uma nova forma deste parasito em fezes de gato forneceu os primeiros indícios de outro mecanismo de transmissão. Esta nova forma poderia ser transmitida pela via oral para ratos e também sobreviver por muitos anos na água. Após intensos estudos, provas definitivas sobre este parasito foram fornecidas quase que simultaneamente por pesquisadores dos Estados Unidos, Reino Unido, Holanda e Alemanha. Esses estudos

identificaram a forma resistente de *T. gondii* como um oocisto de coccídeo com típico desenvolvimento assexuado e sexuado no intestino delgado de gatos (Frenkel et al. 1970; Hutchison et al. 1971; Overdulve 1970; Sheffield e Melton 1970). Finalmente o ciclo de vida completo de *T. gondii* foi caracterizado, definindo-o como um parasito coccídeo, onde felinos são seus hospedeiros definitivos e qualquer animal de sangue quente pode atuar como hospedeiro intermediário (Dubey et al. 1970).

1.2 Aspectos Biológicos de *Toxoplasma gondii*

Este protozoário se caracteriza por ser intracelular obrigatório de baixa especificidade (eurixênico), pois possui potencial de infectar qualquer animal homeotérmico (Dubey e Beattie, 1988; Dubey et al. 1970; Hashemi-Fesharki 1996; Esteban-Redondo e Innes 1998; Innes 1997), invadindo vários tecidos, células nucleadas e líquidos orgânicos. De acordo com Current e colaboradores (1990) *T. gondii* é classificado como pertencente ao:

REINO	Protista
SUB-REINO	Protozoa
FILO	Apicomplexa
CLASSE	Sporozoazida
SUB-CLASSE	Coccidiasina
ORDEM	Eucoccidiorida
FAMÍLIA	Sarcocystidae
SUB-FAMÍLIA	Toxoplasmatinae
GÊNERO	<i>Toxoplasma</i>
ESPÉCIE	<i>Toxoplasma gondii</i>

Segundo Adl e colaboradores (2012), *Toxoplasma gondii* é classificado da como [Apicomplexa: Conoidasida: Coccidia: Eimeriarina].

T. gondii é um protozoário prevalente na maioria das áreas do mundo e tem uma significativa importância médica e veterinária por causar aborto ou doença congênita em seus hospedeiros intermediários (Tenter et al. 2000). O ciclo de vida é heteroxeno facultativo (Figura 1), tendo como hospedeiros definitivos representantes da família Felidae, entre eles o gato doméstico (Dubey e Beattie 1988; Esteban-Redondo e Innes

1998; Dubey et al. 2004). Há três formas infectivas para *T. gondii*: os taquizoítos, os bradizoítos, e os esporozoítos (Dubey et al. 2004; Montoya e Liesenfeld 2004).

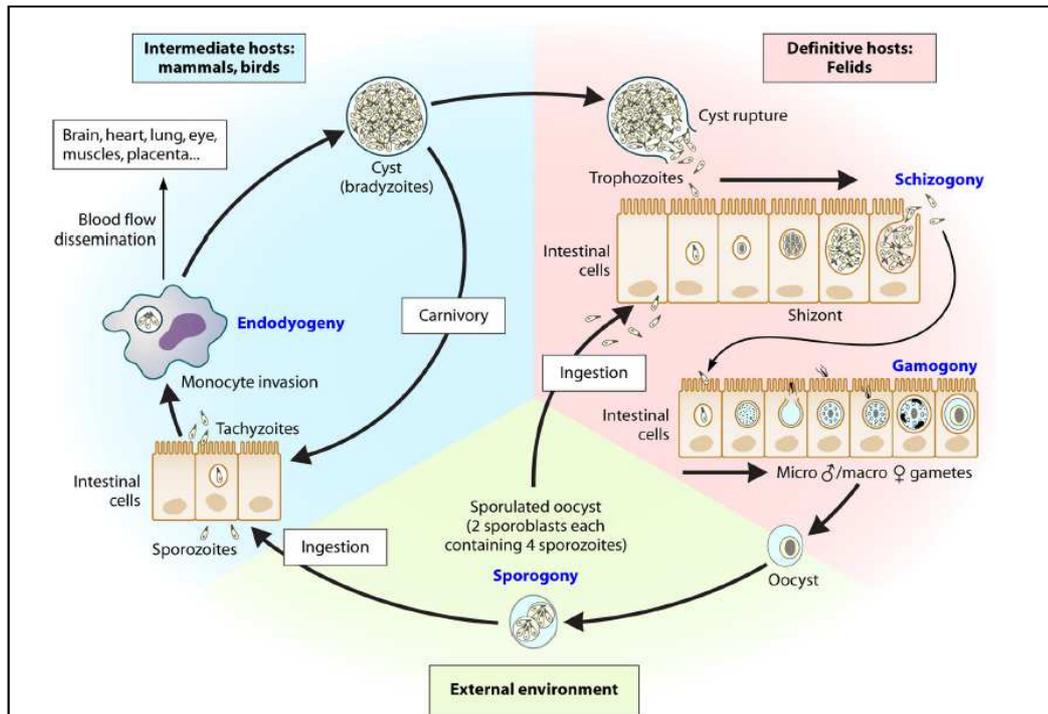


Figura 1. O ciclo biológico do protozoário *Toxoplasma gondii* em hospedeiros intermediários e definitivos (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

Taquizoítos

O taquizoíto é a forma de multiplicação rápida (Gross et al. 1996; Montoya e Liesenfeld 2004) produzida pelo ciclo assexuado do parasito em hospedeiros intermediários. Apresenta forma de arco com uma extremidade afilada e outra arredondada medindo, aproximadamente, 4 a 8 μm de comprimento por 2 a 4 μm de diâmetro (Garrido 1978; Montoya e Liesenfeld 2004). Constitui a forma menos resistente do parasito, sendo facilmente destruída pelas condições ambientais adversas como desidratação e variáveis osmóticas. Esta forma do parasito é menos resistente a tripsina ou pepsina (Jacobs et al. 1996), contudo, apresentam um papel principal na transmissão vertical da toxoplasmose (Tenter et al. 2000).

Bradizoítos

Os bradizoítos são formas assexuadas, com metabolismo lento, medindo cerca de 7 a 9 μm por 1,5 a 2 μm . Estão presentes nos cistos teciduais, os quais variam em tamanho de 5 a 70 μm (Gross et al. 1996; Dubey 1998) podendo chegar em alguns casos a 300 μm de diâmetros com centenas a milhares de bradizoítos (Montoya e Liesenfeld 2004). Os cistos possuem membrana dupla sendo resistentes às enzimas proteolíticas (Jacobs et al. 1996) e ao resfriamento à 4°C por 30 dias. De acordo com alguns autores, esta forma de apresentação do parasito é a principal responsável pela transmissão da zoonose através da ingestão de carne crua ou mal cozida (Dubey 1998; Bonametti et al. 1997; Skjerve et al. 1998; Tenter et al. 2000; El-On e Peiser 2003).

Oocistos

É a forma infectante proveniente da reprodução sexuada do parasito (gametogonia) no interior das células do epitélio intestinal dos felídeos. São esféricos com aproximadamente 12 μm de diâmetro (Dubey 1998) e podem sobreviver por longos períodos em condições ambientais adversas, apresentando viabilidade por meses ou anos em solo úmido (Dubey e Beattie 1988). Esta é a forma de resistência e de disseminação ambiental da parasitose, podendo ser transportada mecanicamente por moscas, baratas, besouros e outros artrópodes ou ser veiculados pela água ou vegetais usados para consumo.

1.3. Mecanismos de transmissão

Devido a capacidade adaptativa de *T. gondii* aos seus diversos hospedeiros homeotérmicos bem como suas diferentes formas infectantes, a prevalência da infecção por *T. gondii* não é limitada à presença de certa espécie de hospedeiro. O seu ciclo (Figura 2) pode continuar indefinidamente por transmissão de hospedeiro intermediário para definitivo, de hospedeiro definitivo para intermediário, entre hospedeiros intermediários (até mesmo na ausência de hospedeiros definitivos) e entre hospedeiros definitivos (até mesmo na ausência de hospedeiros intermediários). Vários autores têm atribuído à ingestão de carne infectada crua ou mal cozida como uma fonte importante para ocorrência de toxoplasmose humana dentro do contexto epidemiológico da doença (Dubey 1998; Bonametti et al. 1997; Skjerve et al. 1998; Cook et al. 2000; Tenter et al. 2000; El-On e Peiser 2003; Dubey 2009). Surtos de toxoplasmose também têm sido

atribuídos à inalação (Teutsh et al. 1979) ou à ingestão de água contaminada com oocistos (Bowie et al. 1997; De Moura et al. 2006).

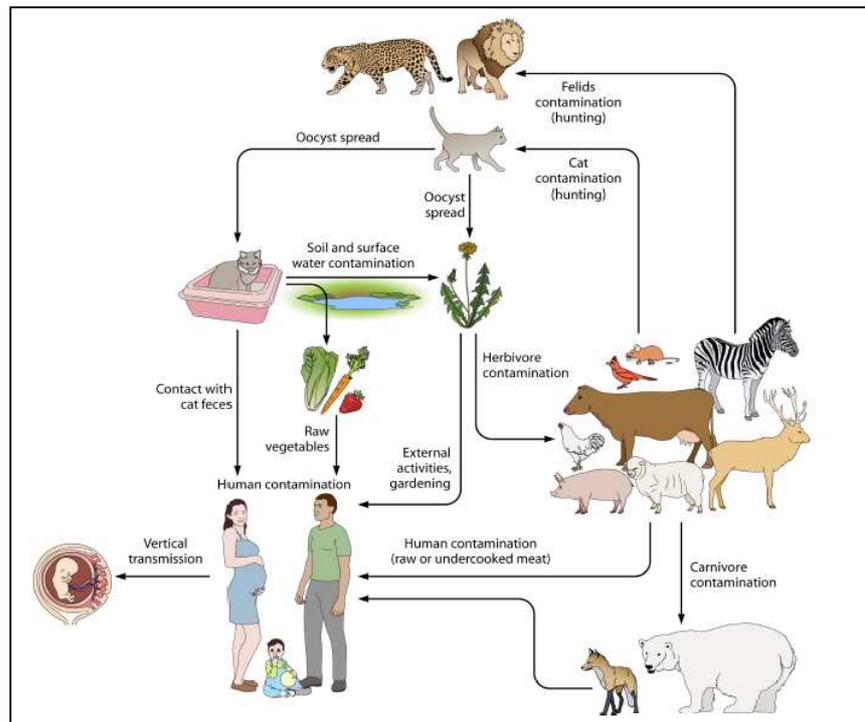


Figura 2. Esquema ilustrando as várias fontes de transmissão do protozoário *Toxoplasma gondii* para humanos e animais (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

Todos os três estágios (taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos) são infectantes, tanto para os hospedeiros intermediários como para os hospedeiros definitivos, os quais podem adquirir a infecção por *T. gondii* principalmente através de uma das seguintes rotas: (a) horizontalmente, por ingestão de oocistos presentes no ambiente ou por ingestão de cistos encontrados em carne e vísceras cruas ou mal cozidas; e (b) verticalmente, por transmissão transplacentária de taquizoítos (Dubey 1994; Dubey 1996; Allain et al. 1998; Mozzatto e Procianoy 2003; Dubey 2004; Montoya e Liesenfeld 2004; Sawadogo et al. 2005; Sukthana 2006; Dubey 2009) ou através do leite materno (Dubey 1998). A transmissão pode ainda ocorrer, com menor frequência, através de transfusão sanguínea e transplante de órgãos (Dubey 1994). Além destas rotas, foram descobertos taquizoítos em outros fluidos do corpo, inclusive saliva, perdigotos, urina, lágrimas e sêmen (Dubey e Beattie 1988), mas não há atualmente evidências de transmissão horizontal de *T. gondii* para humanos por estes mecanismos (Tenter et al. 2000), portanto, até o momento, sem importância epidemiológica.

1.4. Interação parasito-hospedeiro

Por ser um parasito intracelular obrigatório, *T. gondii* infecta uma grande variedade de células em muitos diferentes hospedeiros, sendo considerada uma das mais extraordinárias células eucarióticas. A invasão ocorre através de movimentos ativos do próprio parasito e pela extrusão do conóide. O conóide é uma organela altamente dinâmica localizada na extremidade apical desse protozoário por onde se faz o reconhecimento dos ligantes celulares dando início ao processo de invasão. Além disso, esta organela permite que ocorra a secreção sequencial de proteínas contidas nas organelas micronemas e roptrias (Carmen et al. 2009). Estas organelas associadas aos grânulos densos são cruciais para a invasão e formação do vacúolo parasitóforo na célula hospedeira.

O taquizoíto, forma invasiva e com rápida multiplicação, se prolifera dentro desse vacúolo parasitóforo, e uma vez instalado na célula hospedeira, o vacúolo interage com os filamentos intermediários e microtúbulos dessa célula, se associando também a mitocôndria e ao reticulo endoplasmático. A estabilidade dessa interação está relacionada à presença de proteínas liberadas pelos grânulos densos. Esta interação estável serve para aquisição e passagem de nutrientes do citoplasma para o lúmen do vacúolo parasitóforo. A membrana que delimita o vacúolo tem 70% da sua composição oriunda de componentes da membrana celular do hospedeiro, sendo o restante formado por proteínas secretadas pelo parasito (Muñiz-Hernández et al. 2011). Esta estrutura gera um ambiente adequado para a multiplicação do parasito, impedindo a fusão com lisossomas e acidificação do vacúolo.

Um dos principais mecanismos de defesa empregado pela célula hospedeira é a morte celular programada (apoptose) em resposta às infecções e danos. No entanto, o parasito inibe a maquinaria de sinalização intracelular interferindo em moléculas sinalizadoras de apoptose. Desta forma, *T. gondii* utiliza como fonte contínua os nutrientes da célula hospedeira e sobrevive aos ataques da resposta imune (Nelson et al 2008).

Como todo esporozoário, *T. gondii* apresenta um ciclo biológico com uma fase sexuada e outra assexuada. A fase sexuada ocorre apenas em felinos, enquanto que a fase assexuada pode ocorrer em mamíferos e aves. Na fase assexuada, o parasito permuta entre duas diferentes formas de desenvolvimento: bradizoíto e taquizoíto (Kurokama et al. 2011). Os taquizoítos se multiplicam rapidamente por meio de

endodiogenia/endopoligenia. Por esses processos o parasito multiplica suas organelas de forma que duas ou, como ocorre comumente, dezenas de células filhas emergem da célula mãe – sendo que cada célula mãe dará origem a duas células filhas e estas darão origem a duas células netas e assim sucessivamente. O remanescente da célula mãe é denominado corpo residual. Em uma subsequente multiplicação dentro do mesmo vacúolo, os taquizoítos se organizam em torno desse corpo residual formando uma roseta. A ausência desse corpo residual afeta a organização intravacuolar dos taquizoítos bem como a sua exteriorização (Muñiz-Hernández et al. 2011).

O taquizoíto, após evadir a célula hospedeira, se dissemina através do sangue ou linfa pelo organismo, sendo responsável pela infecção de outras células. Em animais saudáveis, a infecção aguda é controlada pelo sistema imune, onde a resposta imunológica mediada por célula dependente de citocinas do tipo Th1, como interferon gama (IFN- γ), elimina muitos taquizoítos. Entretanto, em alguns locais, em sua maioria no sistema nervoso central e músculo (incluindo o coração), os taquizoítos invadem as células e se convertem a bradizoíto (forma de multiplicação lenta), estabelecendo a infecção crônica da toxoplasmose. Os bradizoítos residem em cistos que estão alojados na célula hospedeira e persistem por um longo tempo em um estado de relativa dormência. A reativação, ou seja, a ruptura do cisto com liberação dos bradizoítos que se convertem em taquizoítos, pode ocorrer em indivíduos imunocomprometidos e dependem dos níveis de IFN- γ e óxido nítrico, principalmente (Skariah et al. 2010). Se não controlados pelo sistema imune, os taquizoítos, altamente virulentos, causam a toxoplasmose generalizada, geralmente fatal (Frenkel 1988).

Como descrito anteriormente, os oocistos são formados durante a fase sexuada, que ocorre apenas no intestino de membros da família Felidae. Nessa fase, após uma série de esquizogonias, acontece a diferenciação de gametas, fecundação e formação de oocistos. Os felídeos eliminam em suas fezes oocistos imaturos (não esporulados), que encontrando condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (temperatura, umidade e oxigenação) se tornam infectantes após 2 – 4 dias. Os oocistos esporulados infectantes contém dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. Como são formas ambientais resistentes, os oocistos podem permanecer por meses ou anos no ambiente e contaminam a água ou vegetais, infectando novos hospedeiros definitivos ou intermediários (Dubey 1998).

As células do epitélio intestinal são provavelmente as primeiras células infectadas por *T. gondii*. As quimiocinas liberadas por essas células realizam um papel crítico na

iniciação e na modulação da resposta imune a vários patógenos (Pérez et al. 2001) e são responsáveis pela quimioatração dos neutrófilos, células dendríticas, macrófagos e linfócitos (Mackay 2001).

1.5. Toxoplasmose em portadores de HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), disseminado em todo o mundo, é o agente responsável pela síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A elevada variabilidade genômica do HIV apresenta importantes implicações para o diagnóstico, tratamento e prevenção, bem como nas investigações epidemiológicas (Requejo 2006). O Brasil é um dos mais afetados países da América Latina pelo HIV, com mais de 600 mil pessoas vivendo com esta infecção (Ministério da Saúde 2005).

Como descrito anteriormente, a infecção por *Toxoplasma gondii* em indivíduos imunocompetentes é geralmente subclínica ou está associada com sintomas não específicos. Entretanto, a infecção em pacientes imunocomprometidos, como aqueles infectados pelo HIV, pode resultar em encefalite e ser fatal. A encefalite toxoplásmica tem se tornado uma das mais frequentes infecções oportunistas que complicam o quadro de pessoas infectadas por HIV, e é a causa mais comum de lesão cerebral, coma e morte (Osunkalu et al. 2011). No entanto, em países em desenvolvimento, a introdução da terapia antiretroviral tem reduzido consideravelmente a incidência da toxoplasmose cerebral em pacientes com HIV (D'Arminio et al. 2004).

Em todo o mundo, estimativas na década de 90 mostravam que *T. gondii* causa encefalite grave em mais de 40% dos pacientes com AIDS, e destes pacientes 10 a 30% morrem devido às complicações da doença (Luft e Remington, 1992). Lanjewar e colaboradores (1998) diagnosticaram encefalite aguda por *Toxoplasma* em 10 (20,4%) dos 49 pacientes autopsiados, concluindo que o grande número de casos de toxoplasmose cerebral em pacientes com AIDS mostra a necessidade da inclusão da doença nos diagnósticos diferenciais. No sul do Brasil, 80% dos pacientes com HIV apresentaram sorologia positiva para toxoplasmose, e destes 4,8% e 1,6% apresentaram toxoplasmose cerebral e ocular, respectivamente (Xavier et al. 2013). A literatura mostra que o risco de reativação da infecção está associado ao baixo número de células TCD4⁺ (Gomides et al. 2002), cujo valor de referência para um indivíduo adulto normal é de 508 – 2480 mm³ (Pardini 2002). Pacientes com neurotoxoplasmose do estado de Pelotas, RS, apresentaram 116 células TCD4⁺/mm³ (Xavier et al. 2013) e graus mais severos de imunodepressão foram observados no Irã, onde os pacientes apresentaram

um valor equivalente a 66,4 células/mm³. Em revisão recente realizada por Ahmadpour e colaboradores (2014) foi observado que mais da metade de pacientes imunodeficientes no Irã estão sob o risco de reativação de toxoplasmose e desenvolvimento de uma doença grave naquele país.

Embora para o diagnóstico definitivo da toxoplasmose cerebral seja necessária a demonstração do parasito na biópsia do cérebro ou necropsia, na prática clínica, o tratamento é iniciado a partir de um diagnóstico presuntivo, o qual é baseado nas características clínicas e radiológicas. Na última década um avanço significativo no diagnóstico tem sido realizado com o uso da técnica de PCR, que tem se mostrado uma ferramenta valiosa no diagnóstico de toxoplasmose cerebral. Para a análise são utilizadas principalmente duas sequências-alvo do parasito devido a sensibilidade e especificidade. Uma é a sequencia de 529pb, a qual está presente em 200-300 cópias no genoma de *T. gondii*. A outra é o gene B1, que tem 35 cópias no genoma e é conservado em diferentes linhagens do parasito (Homam et al. 2000). Nos últimos anos, a PCR e outros métodos têm sido usados juntos para detectar *T. gondii* em liquido amniótico, humor aquoso, líquido cerebrospinal e sangue (Vidal et al. 2004).

1.6. Toxoplasmose Congênita

As mulheres grávidas que adquirem a infecção por *T. gondii* permanecem geralmente assintomáticas, embora possam ainda transmitir a infecção a seus fetos com consequências graves (Kravetz e Federman 2005).

O parasito atinge o concepto por via transplacentária causando danos de diferentes graus de gravidade, o qual dependerá da virulência da cepa do parasito, da capacidade da resposta imune da mãe e da idade gestacional em que a mulher se encontra. Durante o primeiro trimestre da gestação, a infecção pode levar à morte fetal. No segundo trimestre, pode ocasionar a chamada tríade de Sabin, em que o feto apresenta retinocoroidite, calcificações cerebrais, retardo mental ou perturbações neurológicas e hidrocefalia, com macro ou microcefalia. Se a gestante adquire a infecção no terceiro trimestre de gestação, a criança pode nascer normal ou apresentar evidências da doença alguns dias, semanas ou meses após o parto (Souza et al. 2010).

Um estudo realizado durante 15 anos em Chicago mostrou que um ou mais sinais clínicos graves ocorreram em 84% dos recém-nascidos. Os sinais clínicos observados foram lesão ocular (92,2%), calcificações cerebrais (79,6%) e hidrocefalia (67,7%), com 61,1% dessas crianças apresentando esses três sintomas em seu quadro clínico. Porém

esses resultados contrastam com aqueles na Europa, onde raramente a toxoplasmose congênita causa sinais clínicos graves nos recém-nascidos (Olariu et al. 2011). Na França, a incidência anual estimada da infecção aguda em mulheres durante a gravidez é de 6-7/1000 e de toxoplasmose congênita é de aproximadamente 0,1% dos nascimentos (Perkins 1973). Dos infantes com infecção congênita 70% mostram cicatriz coriorretinal (Sterkers et al. 2009).

No Brasil, a infecção congênita varia de 5 a 23 entre 10.000 nascimentos (Dubey et al. 2012). Em Goiânia se encontra o maior número de mulheres em idade reprodutiva (65,8%) com sorologia positiva para a toxoplasmose (Avelino et al. 2004), além disso, as mulheres apresentam uma das maiores taxas de soroconversão do mundo (Avelino et al. 2003). Em Porto Alegre, nos três estudos envolvendo grandes populações de mulheres grávidas foram detectadas prevalências variando entre 54,3% e 61,1% (Neves et al. 1994; Varella et al. 2003; Reis et al. 2006). Entre 2003 e 2004 foi realizado em Belo Horizonte um estudo de triagem pós natal que identificou 20 (entre 31.000) crianças com toxoplasmose congênita resultando em uma proporção de 1 recém-nascido infectado para 1.590 nascidos vivos (Queiroz et al. 2006). Posteriormente este estudo foi ampliado para todo o estado de Minas Gerais, sendo observado um bebê com toxoplasmose congênita para cada 770 nascidos vivos (Vasconcelos-Santos et al. 2009). Em Natal, Barbosa e colaboradores (2009), mostraram que 66,3% das mulheres grávidas analisadas apresentaram sorologia positiva para a infecção por *T. gondii*, indicando também uma alta porcentagem (33,1%) de mulheres que se encontra suscetível a primoinfecção, podendo transmitir a toxoplasmose ao seu feto (Barbosa et al. 2009).

A prevenção da toxoplasmose congênita e das suas sequelas pode ser feita por meio de uma ou de combinações das seguintes estratégias: educação das gestantes não imunes ou suscetíveis sobre comportamentos preventivos, tratamento das gestantes com infecção aguda, tratamento dos fetos infectados e tratamento precoce dos recém-nascidos, mesmo que assintomáticos (Reis et al. 2006). O diagnóstico precoce, assim como o tratamento antiparasitário adequado da mãe, tem demonstrado ser capaz de reduzir a taxa de transmissão para o feto e, por consequência, o número de sequelas nos casos em que a infecção intrauterina já ocorreu, permitindo que os cuidados do recém-nascido sejam otimizados a fim de melhorar o prognóstico dessas crianças (Couto e Leite 2004).

Desde que a Áustria e a França estabeleceram a triagem pré-natal, a prevalência da toxoplasmose caiu de 50% para 35% e de 84% para 44%, respectivamente. Outros países, como o Reino Unido, adotam práticas educativas para reduzir o risco de infecção em gestantes soronegativas. No Brasil, a triagem pré-natal é realizada de forma sistemática, pelos SUS, nos estados do Mato Grosso do Sul e Minas Gerais e nas cidades de Curitiba e Porto Alegre (Lopes-Mori et al. 2011).

É imprescindível que cada país ou cada região tenha sua própria informação epidemiológica para o estabelecimento de programas de controle, particularmente para as gestantes, pois a incidência e a prevalência da toxoplasmose variam de região para região dentro do próprio país. Essa variação está relacionada com os hábitos alimentares, contato com a terra, presença de gatos, ruralização das moradias e outros fatores de menor risco ou fatores determinantes. Com os dados epidemiológicos, pode-se avaliar o custo-benefício das medidas, incluindo os gastos sanitários diretos e indiretos, frente às infecções fetais e neonatais evitadas. Recentemente, o Ministério da Saúde aprovou a portaria 2.472, de 31 de agosto de 2010, que estabelece a Lista de Notificação Compulsória em Unidades Sentinelas (LNCS), incluindo a Notificação da toxoplasmose aguda gestacional e congênita, que permitirá avaliar os programas de controle existentes e fornecerá dados para a implantação de um programa em nível nacional (Lopes-Mori et al. 2011).

1.7. Diagnóstico e tratamento

O primeiro teste disponível para detectar anticorpos específicos anti-*T. gondii* foi a reação de Sabin-Feldman (*dye test*). Mais de cinquenta anos depois da sua descrição, ainda é considerado um teste de referência com altas taxas de sensibilidade e especificidade. Entretanto, a sua utilização tem sido restrita pelo uso obrigatório de parasitos vivos o que traz graves problemas de biossegurança (Reiter-Owona, 1999).

A revisão de Bonfioli e Oréfice (2005) sobre toxoplasmose destaca que a infecção adquirida recente se caracteriza pelo aumento de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, baixa avididade de IgG, além do aumento dos anticorpos IgM, IgA e IgE específicos para *T. gondii*. Desta forma, o diagnóstico da infecção por *T. gondii* baseia-se frequentemente nos resultados sorológicos.

A descoberta de que os anticorpos específicos aumentam sua afinidade a um antígeno ao longo do tempo (Brown et al. 1984) permitiu sua aplicação clínica no

diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas (Hedman et al. 1993), inclusive na toxoplasmose, onde se tornou uma ferramenta complementar para estimar o tempo de infecção. A aplicação mais frequente da avidéz dos anticorpos tem sido na identificação de infecções recentes e crônicas, e esta ferramenta tem se mostrado bastante relevante em gestantes assintomáticas, pois o tratamento depende do tempo de infecção *versus* o tempo da concepção (Liesenfeld et al. 2001). Para gerar o índice de avidéz (AI = *avidity index*), a técnica requer um agente dissociante de ligações fracas entre antígenos e anticorpo, como a ureia, e por ser de fácil aplicação muitos laboratórios tem desenvolvido seus próprios protocolos (*in house*), o que gera variações nos valores do AI. Alguns autores descrevem que valores de AI iguais ou superiores a 50% são indicadores de infecção crônica enquanto que valores abaixo são indicadores de infecção recente (Holliman et al. 1994; Robert-Gangneux et al. 1998; Mechain et al. 2000; Colombo et al. 2005; Montoya 2002; Mattos et al. 2011).

A detecção de anticorpos IgM anti-*T. gondii* também é utilizada com o objetivo de determinar o tempo de infecção. Um resultado IgM negativo com um IgG positivo indica geralmente uma infecção de pelo menos seis meses. Entretanto, os resultados IgM positivos para *T. gondii* não são facilmente interpretados pois há a persistência de anticorpos IgM até 18 meses após a infecção, além de ocorrer reações falso-positivas em testes comerciais (Wilson et al. 1997).

A pesquisa de IgM têm sido usada para o diagnóstico da infecção aguda. Esse anticorpo não atravessa a placenta e, por isso, quando encontrado no sangue de neonatos, é de origem fetal. Trata-se de um teste no qual os resultados têm que ser analisados com cautela, porque os títulos podem persistir por anos e a confiabilidade dos testes existentes varia consideravelmente. Os métodos utilizados para detecção de IgM são IFI, ELISA e ISAGA. Os anticorpos IgM surgem na segunda semana após a primo-infecção, atingindo níveis máximos no fim do primeiro mês, e desaparecem em 6 a 12 meses. Conclui-se, portanto, que após o desaparecimento dos anticorpos IgM, o indivíduo encontra-se na fase crônica ou latente da infecção por *T. gondii*, visto que apenas os anticorpos IgG estarão presentes nessa fase. Já a persistência de IgM na ausência de IgA indica imunidade estabilizada (Oréface et al. 2010).

O diagnóstico laboratorial também pode ser utilizado no caso da toxoplasmose ocular, onde a produção local de anticorpos tem sido usada com sucesso no diagnóstico. O coeficiente de Goldman-Witmer demonstra a produção intraocular de anticorpos anti-*T. gondii*, constituindo uma prova indireta da presença do parasito dentro do olho. A

detecção do DNA do parasito por intermédio da técnica de PCR no humor aquoso e corpo vítreo tem demonstrado bons resultados para o diagnóstico de toxoplasmose ocular (Montoya e Liesenfeld 2004). No caso dos pacientes imunocomprometidos, o diagnóstico presuntivo pode ser confirmado pela detecção do DNA do parasito por meio de PCR, isolamento do parasito e histologia (Oréfica et al. 2010).

A infecção não tem cura devido a habilidade do parasito de se diferenciar do estágio replicativo (taquizoíta) para o estágio latente (bradizoíta), onde este último não consegue ser destruído pela imunidade e nem pelas drogas de referência usadas na rotina (Olguin-Lamas et al. 2011). O tratamento da toxoplasmose consiste no uso de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico. Quando há intensa reação inflamatória na infecção ocular, indica-se o uso de corticosteróides via sistêmica (Ronday 1995). Em Goiânia, o tratamento de mulheres grávidas apenas com espiramicina apresentou uma redução da possibilidade de transmissão de *T. gondii* para o feto, indicando que a falta de tratamento apropriado se mostrava associado a forma neuro-óptica da infecção congênita. A ocorrência de formas graves em mulheres grávidas demonstra a necessidade de expandir o programa profilático primário a todas as grávidas, independentemente do seu estado imunológico contra *T. gondii* (Avelino et al. 2014).

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma doença descrita em todo o mundo e apresenta seu maior impacto em indivíduos imunocomprometidos e naqueles com infecção congênita. Embora as medidas profiláticas simples possam reduzir a transmissão, *Toxoplasma gondii* apresenta alta soroprevalência especialmente na América do Sul (Furtado et al. 2011). Em virtude da grande importância de *T. gondii* como um agente causador de zoonose, as organizações de saúde pública, tais como a Organização Mundial de Saúde, recomendam o levantamento preciso de dados epidemiológicos deste parasito. Tais dados são essenciais para explicar a importância relativa das várias fontes de infecção para os seres humanos, controlar a doença, e impedir a redução na qualidade de vida causada por este protozoário. Entretanto, poucos países monitoram regularmente a toxoplasmose nos seres humanos e em animais (Tenter et al. 2000). O reconhecimento da origem da infecção e o diagnóstico da doença sistêmica pós-natal são essenciais para o entendimento dos mecanismos básicos da infecção, principalmente para a proteção dos pacientes de risco, para o planejamento de programas de prevenção e para orientação quanto às consequências terapêuticas (Bosch-Driessen e Rothova 1999).

Estudos relacionados a soroprevalência e epidemiologia da toxoplasmose nos estados do Nordeste são poucos. Nenhum trabalho neste sentido foi encontrado na literatura no que concerne à região do Trairí no estado do Rio Grande do Norte. Esta região abrange 11 municípios e dentre eles a cidade de Santa Cruz. Esta cidade se mostra carente em informações relacionadas a parasitoses de uma forma geral, e isto parece explicar o fato de que os maiores índices de morbidade hospitalar nesse município sejam atribuídos às infecções parasitárias. Assim, este estudo pretende contribuir com a saúde pública deste município através de uma abordagem soropidemiológica buscando identificar os fatores associados à infecção por *T. gondii* nessa região.

Em estudos epidemiológicos, animais podem ser utilizados como bioindicadores para investigar a contaminação ambiental com oocistos. Cães e galinhas são ótimas sentinelas, indicando por meio da soroprevalência a situação em que se encontra o ambiente. Além disso, estes animais podem estar envolvidos no mecanismo de transmissão deste protozoário, seja pelo consumo da carne contendo cistos ou pelo carreamento deste parasito em seu pêlo (Frenkel e Parker 1996; Lindsay et al. 1997).

Esses animais, naturalmente infectados, em especial as galinhas e gatos, também são utilizados para tentativa de isolamento em bioensaios para identificação dos genótipos deste parasito. A América do Sul e África têm uma maior variedade de genótipos de *T. gondii* do que a América do Norte e Europa (Mercier et al. 2010), sugerindo que esta variabilidade genética possa contribuir para a maior prevalência de toxoplasmose ocular (Khan et al. 2006), uma vez que na América do Sul, a prevalência de doença ocular parece ser mais alta do que em muitas outras partes do mundo (Furtado et al. 2011).

A maioria dos indivíduos imunocompetentes permanece assintomático ao longo da vida, porém tanto aqueles imunocompetentes como imunossuprimidos podem desenvolver a doença, especialmente retinocoroidite. Além do genótipo do parasito, a suscetibilidade ao desenvolvimento da lesão ocular também mostra associação com o polimorfismo de genes envolvidos na resposta imunológica (Albuquerque et al. 2009). Portanto, a pesquisa por fatores que levam a predisposição ao desenvolvimento da doença é importante, uma vez que a lesão provocada pelo parasito é irreversível. Assim, a abordagem imunogenética e análise de citocinas realizada nesse estudo poderão contribuir com outros trabalhos que vem relacionando os elementos imunológicos ao desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica.

CAPÍTULO 1

**SOROPREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* NA
POPULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE SANTA CRUZ – RN.**

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. Soroepidemiologia da toxoplasmose humana

A toxoplasmose é uma das doenças parasitárias mais comuns em todo o mundo. As estimativas de soroprevalência para populações humanas variam extremamente entre diferentes países, entre diferentes áreas geográficas de um país, e entre diferentes grupos étnicos que vivem na mesma área. Em 1948, a introdução do teste com corante azul de metileno por Sabin e Feldman permitiu estudos epidemiológicos em seres humanos revelando a presença de anticorpos para *T. gondii* em 0 a 100% dos indivíduos em várias populações humanas adultas (Zuber e Jacquier, 1995).

A análise sorológica já foi realizada em muitos países sendo observada alta prevalência de toxoplasmose na América Latina, parte da Europa central e oriental, Oriente Médio e partes do sudeste da Ásia e África (Papas et al. 2009). No passado, a soroprevalência na França foi considerada como uma das mais altas com até 90% de indivíduos infectados, enquanto nos EUA essa soroprevalência era de 15% (Frenkel 1991). Em 1990, a soroprevalência em países da Europa Central como Áustria, Bélgica, Alemanha, e Suíça, foi estimada variar entre 37 e 58% nas mulheres em idade fértil. Dados semelhantes foram observados em populações na Croácia, Polônia, Eslovênia, Austrália e África do Norte. A soroprevalência para toxoplasmose se mostrou mais elevada em países latino-americanos, incluindo Argentina, Brasil, Cuba, Jamaica, Venezuela (51-72%), e em países da África Ocidental (54-77%) (Tenter et al. 2000).

Analisando a presença de anticorpos para *T. gondii* na população brasileira sem distinção de sexo e idade foi observada na região sudeste uma prevalência de 36% em Minas Gerais (Maia et al. 2012), 78,7% no Rio de Janeiro (Coutinho et al. 1981) e 73% em São Paulo (Gomes et al. 1975). Na região sul, os dados para a soroprevalência foram de 41,9% em Santa Catarina, 79,1% no Paraná (Filho et al. 2012) e 82% no Rio Grande do Sul (Melamed et al. 1981). No Centro-Oeste a soroprevalência foi de 80,4% no Mato Grosso (Amendoeira et al. 2003), 79,4% no Mato Grosso do Sul (Marques 2008) e 60% em Goiás (Rodrigues, 2007). Na região norte a prevalência observada foi de 54% em Roraima (Ferraroni et al, 1980), 65,8% no Acre (Ferreira et al. 2009) e 78% no Pará (Bichara et al. 2012). Em populações indígenas brasileiras foi detectada a soroprevalência de 57,3% para Tiriyo do estado do Pará, 73,5% na Amazônia (Bóia et al. 2008), 78,8% para Enawenê-Nawê do Mato Grosso e 57,7% para Waiãpi do Amapá (Sobral et al. 2005).

Nos estados do nordeste, existem poucos trabalhos que relacionam a prevalência da toxoplasmose sem distinguir o sexo e a idade. Na cidade de São Luis – MA um estudo do tipo transversal foi realizado em um hospital universitário e a soroprevalência encontrada foi de 66,38% (Costa et al. 2010). Em Recife – PE, a análise sorológica realizada em doadores de sangue mostrou uma prevalência maior, com 75% dos voluntários apresentando anticorpos para *T. gondii* (Coelho et al. 2003). Na Grande João Pessoa – PB, embora a análise sorológica tenha sido realizada em usuários do LACEN/PB (Laboratório Central da Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba), encontrou-se 87,4% das pessoas soropositivas para a infecção (Junior e Monteiro 2010).

As fontes de infecção por *T. gondii* são múltiplas e a prevalência da toxoplasmose varia de acordo com as regiões, o que reforça a importância da identificação de fatores epidemiológicos regionais.

3.1.2. Fatores de risco de transmissão de toxoplasmose

Dado a natureza assintomática da maioria das infecções, se torna tecnicamente difícil determinar a fonte original da infecção. A toxoplasmose é uma doença transmitida principalmente pelo consumo de carne crua ou mal passada contendo cistos e pela ingestão de vegetais ou água contendo oocistos esporulados de *T. gondii* (Tenter et al. 2000). É importante notar que os estudos epidemiológicos recentes não mostram a posse do gato como um fator de risco consistente para a infecção por *T. gondii*. O risco de infecção não está relacionado a possuir um gato, mas sim à exposição às fezes do gato contendo oocistos. Quando os gatos se infectam com *T. gondii*, geralmente, liberam oocistos por algumas semanas durante sua vida. Os gatos de estimação que não caçam e não são alimentados com carne crua são poucos susceptíveis a infecção e conseqüentemente geram pouco risco (Jones et al. 2003). A transmissão de toxoplasmose através do toque em um gato é considerada mínima ou inexistente (Dubey 1994). Por outro lado, a ingestão de oocistos pela água é comum. Em 2001 (no período de novembro de 2001 a janeiro de 2002) teve início um surto de toxoplasmose em Santa Isabel do Ivaí, no Paraná, onde 294 moradores apresentaram sorologia sugestiva de infecção aguda por *T. gondii* e 155 apresentaram sintomas compatíveis com a toxoplasmose aguda. A fonte de infecção para este protozoário foi a água de consumo da cidade que se encontrava contaminada com oocistos (De Moura et al. 2006).

Em animais de fazenda, a infecção por *T. gondii* não resulta somente na perda reprodutiva e econômica, mas também tem implicações para a saúde pública, uma vez

que o consumo de carne ou leite contaminado pode levar a transmissão da toxoplasmose (Jittapalapong et al. 2005). No Brasil, milhões de animais de produção são abatidos anualmente para o consumo humano. Inquéritos sorológicos indicaram que até 90% dos animais domésticos e selvagens no Brasil apresentavam anticorpos para *T. gondii*, e foi possível isolar o parasito viável a partir de uma variedade desses animais (Dubey et al. 2012). Entre rebanhos animais, as cabras e ovelhas se mostram mais contaminadas do que o gado (Dubey e Beattie 1988). Em Lages, município do Rio Grande do Norte, uma das principais atividades econômicas é a pecuária ovina, e 29,41% do rebanho se mostraram contaminados por *T. gondii* (Clementino et al. 2007). Mais recentemente, Andrade e colaboradores (2013) observaram que a prevalência de toxoplasmose ovina no Rio Grande do Norte foi de 22,1%, sendo 26,3% e 17,8% de animais positivos nas regiões Leste Potiguar (clima úmido) e Central Potiguar (clima semiárido), respectivamente.

A toxoplasmose é um grande desafio para a indústria de porcos e seu consumo é uma fonte de infecção importante. Na Europa e EUA, a carne suína tem sido considerada a maior fonte de infecção por *T. gondii* em humanos (Dubey 1994). No Brasil, a maior prevalência encontrada em porcos foi em Minas Gerais, onde 90,4% dos suínos analisados apresentaram sorologia positiva para a toxoplasmose (Guimarães et al 1992). Em São Paulo a prevalência encontrada nesses animais foi de 9,6% (Suaréz-Aranda, 2000). Nos estados do nordeste foram encontradas prevalências variando de 18,2% na Bahia (Bezerra et al. 2009) a 59,4% no Ceará (Do Amaral et al. 1978).

A ocorrência de toxoplasmose no gado também é um desafio para a indústria de carne bovina. A soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em bovinos no Brasil varia de 1,03 a 71,0%. A importância da transmissão do gado para o homem está relacionada principalmente ao consumo de carne mal passada, uma vez que cistos se mostram viáveis nestes animais até a idade do abate (Dubey 1983; Cook et al. 2000).

Um novo fator de risco para infecção por *T. gondii* é a ingestão de ostras, moluscos ou mexilhões crus. Esses animais são filtradores e concentram oocistos de *T. gondii* como demonstrado em condições experimentais (Lindsay et al. 2004). As lontras marinhas na Califórnia foram encontradas infectadas por *T. gondii*, e a provável fonte são os moluscos contaminados. A água do mar da Califórnia provavelmente é contaminada por oocistos originados de fezes de gatos, que sobrevivem ao tratamento da água de esgoto, e chegam à costa marítima através dos sistemas de rio (Conrad et al. 2005).

3.2. OBJETIVOS

- Estimar a prevalência da infecção por *T. gondii* na população do município de Santa Cruz-RN.
- Investigar os fatores associados a infecção por *T. gondii*, incluindo os fatores individuais, comportamentais e socioeconômicos na população estudada.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Área de Estudo

Este estudo, do tipo transversal, de base populacional, foi conduzido no município de Santa Cruz localizado a 111 km de Natal, capital do estado do Rio Grande do Norte. Este estado, situado na região nordeste do Brasil, apresenta uma extensão territorial de 52.811,126 Km², o que representa 3,41% de área da região nordeste e cerca de 0,62% do território nacional (IBGE 2010). A temperatura média anual do estado é em torno de 25,5 °C, com máxima de 31,3 °C e mínima de 21,1 °C, sendo sua pluviometria bastante irregular. No estado predomina o clima semi-árido (IDEMA 2007), e de acordo com o IBGE (2007) se mostra dividido em quatro mesorregiões geográficas: Agreste Potiguar, Leste Potiguar, Central Potiguar e Oeste Potiguar (Figura 3).



Figura 3. Mapa do Rio Grande do Norte dividido em mesorregiões. Fonte: www.google.com.br

O município de Santa Cruz (Figura 4) está situado no agreste potiguar, em uma região denominada Trairí. Apresenta uma área territorial de 624,356 km², e uma população de 38.538 habitantes (IBGE 2014). A cidade de Santa Cruz ficou conhecida nacionalmente após a construção de um monumento de 56 metros em homenagem a padroeira Santa Rita de Cássia. A estátua é considerada a maior imagem católica do mundo, e tem atraído fiéis e curiosos de todo o Brasil, se firmando como um dos principais destinos turísticos religiosos do país. Além disso, em 2008, foi implantada nesse município a Faculdade de Ciências da Saúde do Trairí (FACISA/UFRN). Esta

faculdade foi resultado de um grande programa de reestruturação e expansão das instituições de ensino superior (REUNI). O laboratório da FACISA/UFRN deu suporte para a realização dos experimentos iniciais desse estudo.

A cidade se organiza em oito bairros, os quais são agrupados em áreas de acordo com as Unidades Básicas de Saúde (UBS) em que são atendidos. Assim, este município apresenta cinco áreas (Figura 5), sendo elas: Centro (que abrange os moradores do bairro Centro), Paraíso (que abrange os moradores do bairro Paraíso), Maracujá (que abrange os moradores dos bairros Maracujá e Aluisio Bezerra), DNER (que abrange os moradores dos bairros DNER, Barro Vermelho e Miguel Pereira Maia) e Cônego Monte (que abrange os moradores do bairro Cônego Monte).

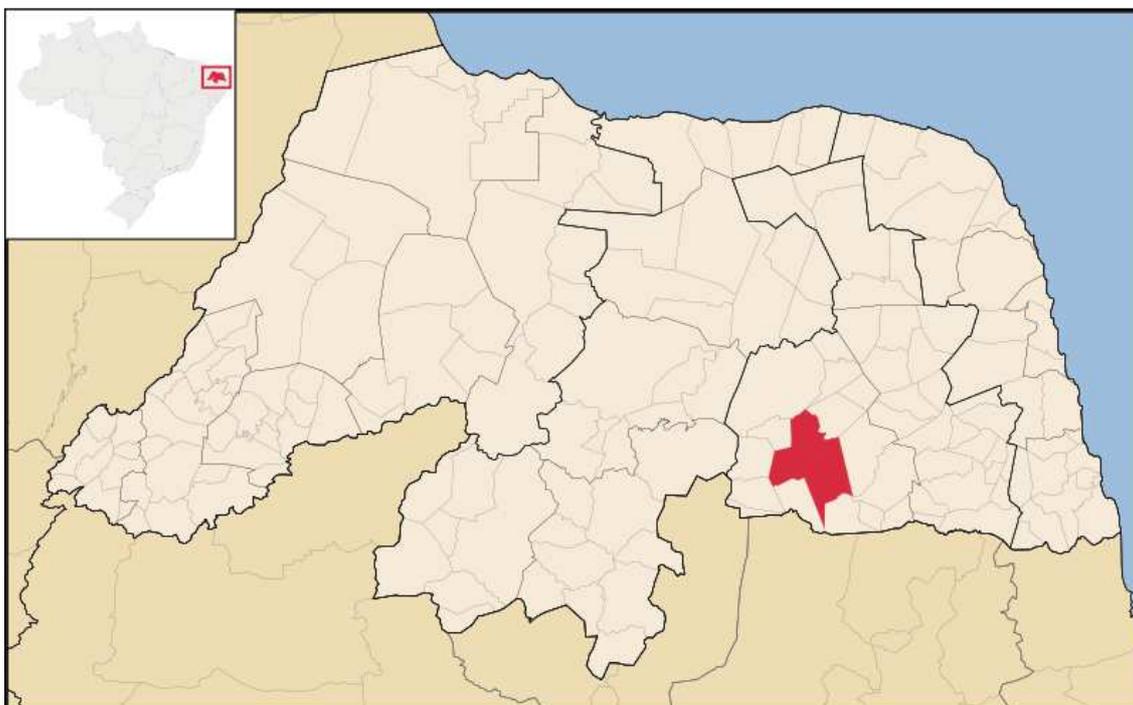


Figura 4. Mapa do Rio Grande do Norte com o município de Santa Cruz destacado em vermelho. (Disponível em:[http://pt.wikipedia.org/wiki/Santa_Cruz_\(Rio_Grande_do_Norte\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Santa_Cruz_(Rio_Grande_do_Norte)))

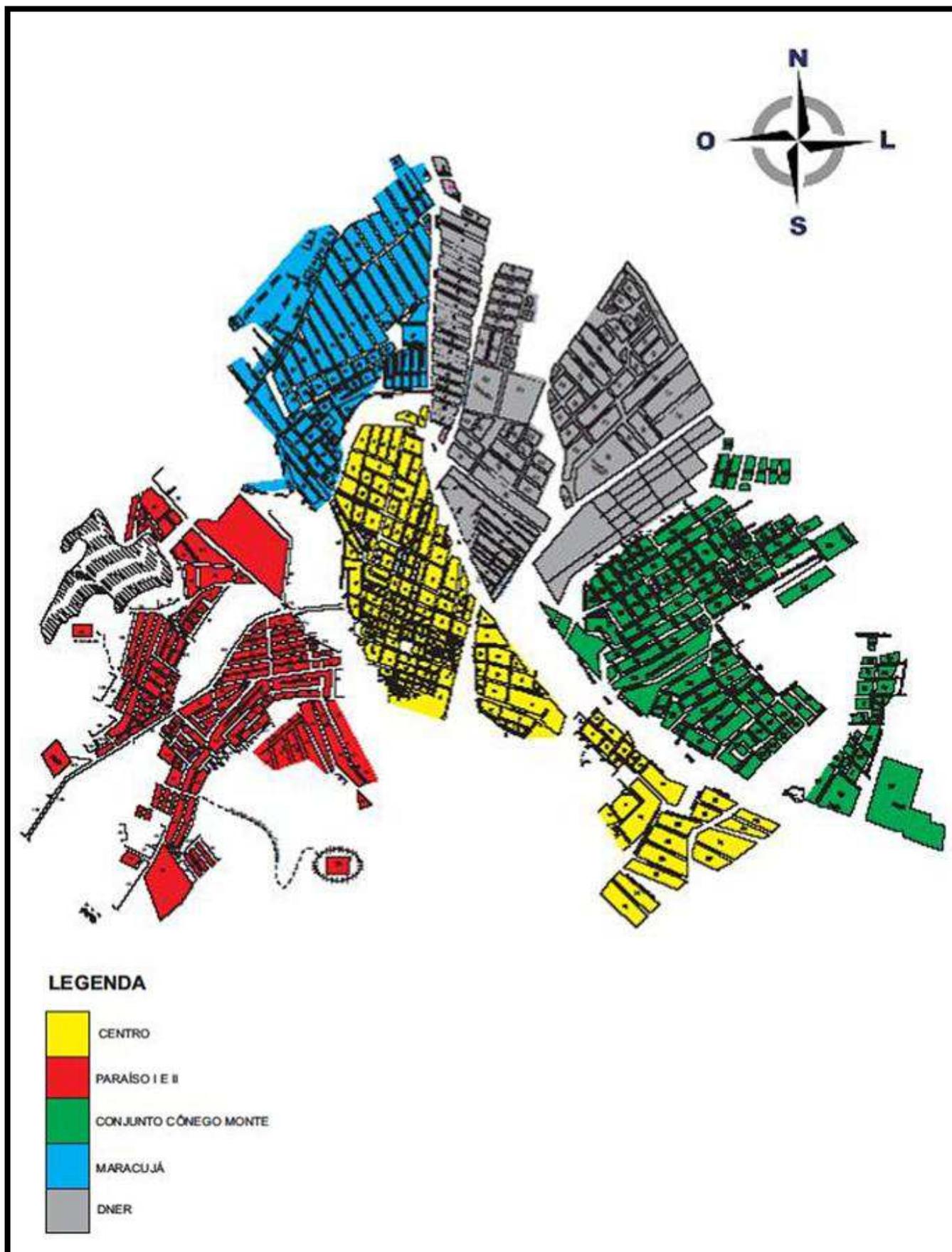


Figura 5. Mapa do município de Santa Cruz - RN mostrando a disposição das cinco áreas. (Mapa elaborado pelo agente de combate às endemias, Nicolas Kelps em 2015).

3.3.2. Cálculo da amostra e processo amostral

Para se estabelecer o número mínimo amostral foi utilizado o programa OpenEpi versão 3.03a. Para o cálculo considerou-se a prevalência média da toxoplasmose de 60% (revisto por Dubey et al. 2012), tamanho da população de 38.538 habitantes (IBGE 2014), intervalo de confiança de 95% e erro de 5%. O resultado mostrou que o tamanho mínimo da amostra necessária para esse estudo é de 366 famílias.

Com o auxílio dos agentes comunitários de saúde foi realizado um levantamento sobre a distribuição da população no município. Com base na informação do número de famílias por área, o processo para amostragem ocorreu, de forma proporcional, no período de 2013 a 2014. Para cada rua de cada bairro foi calculada a porcentagem de casas/famílias que seriam amostradas, seguindo procedimento semelhante àquele realizado pelo IBGE. Dependendo do tamanho da quadra, as casas/famílias escolhidas apresentavam um intervalo de, aproximadamente, 5 a 15 casas de distância entre elas.

As famílias foram escolhidas aleatoriamente, porém obedecendo aos critérios de inclusão, onde o voluntário deve ter idade igual ou superior a 13 anos e ser morador de Santa Cruz, sendo excluídos os voluntários com idade inferior a 13 anos e também aqueles que não são moradores de Santa Cruz. A idade mínima estabelecida neste estudo está relacionada à faixa etária reprodutiva na qual já pode ocorrer a toxoplasmose congênita. Os participantes foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo, a importância de sua colaboração, os possíveis benefícios e os riscos. Aqueles que aceitaram participar assinaram um *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido* (Anexos A e B) de acordo com a resolução nº 466/12 do conselho nacional de saúde do Ministério de Saúde – Brasília – DF, e responderam a um questionário epidemiológico. Aqueles que não aceitaram participar foram contabilizados por meio do termo de recusa (Anexo C). Todo o procedimento foi aprovado pelo comitê de ética da UFRN (nº parecer 244.560 - Anexo D). O resultado do exame foi impresso e entregue a todos os voluntários por meio dos agentes comunitários de saúde de cada área.

3.3.3. Coleta de dados

As informações foram coletadas por meio de entrevistas, utilizando-se um questionário desenhado para o estudo (Anexo E). A entrevista foi realizada por uma equipe previamente treinada e a partir do questionário foram obtidos dados sobre:

- Variáveis individuais: demográficas (sexo, idade, escolaridade), socioeconômicas (renda familiar e ocupação) e comportamentais (manipulação

inadequada do solo, ingestão de saladas cruas, carne mal passada, água não tratada e leite cru).

- Características da residência (piso da casa e do quintal, presença de caixa d'água e de animais no domicílio e peridomicílio).

Foram ainda incluídas questões sobre transplantes de órgãos, transfusão sanguínea, ocorrência de aborto e conhecimento sobre a doença.

3.3.4. Coleta da amostra de sangue

O sangue (4mL) foi coletado por punção da veia periférica, usando tubos tipo *vacutainer*[®] sem anticoagulante. Após a coleta, os tubos foram levados para o Laboratório Multidisciplinar localizado na FACISA/UFRN, onde foram centrifugados para a obtenção do soro. O soro foi aliquotado e armazenado em microtubos a -20^oC até a realização do ensaio imunoenzimático para IgG anti *T. gondii*.

3.3.5. Análise sorológica

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado no Laboratório de Toxoplasmose localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os soros foram testados através do ELISA para a detecção de anticorpos IgG (Buery et al. 2014). Para avaliar a reprodutibilidade do ELISA-IgG, amostras de aproximadamente 10% dos soros estudados foram selecionadas aleatoriamente e processadas em duplicata.

3.3.5.1. Preparo de antígeno solúvel total de T. gondii (STAg)

O antígeno utilizado para sensibilizar a placa de poliestireno de 96 poços foi preparado no laboratório de Toxoplasmose do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) seguindo o protocolo descrito por Buery e colaboradores (2014). O antígeno foi adquirido a partir de taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH), os quais foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal de camundongos previamente infectados. Para essa lavagem foi utilizada uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2, e o material resultante da lavagem foi centrifugado durante 20 segundos a 800g para eliminação de células contaminantes do camundongo. O sobrenadante foi coletado e centrifugado por 10 minutos a 1400g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo os taquizoítos foi ressuspendido em PBS, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 1400g. Os

taquizoítos foram lavados três vezes com PBS, por centrifugações a 1400g, por 10 minutos. Em seguida os parasitos foram contados em câmara hemocitométrica e a concentração acertada para 1×10^9 taquizoítos/mL. A suspensão de parasitos foi então processada por ultra-som (Ultrasonic Homogeneizer – 4710; Coler-Palmer Instrument Co.) em 5 ciclos de 40 hertz (em banho de gelo) durante 1 minuto e com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo, sendo o rompimento dos parasitos acompanhado em microscópio óptico. Após a sonicação, o material foi centrifugado a 15000g/4°C durante 30 minutos. O sobrenadante (STAg) foi então estocado a -80°C até o uso. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

3.3.5.2. Ensaio imunoenzimático para anticorpos IgG

As placas de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Sarstedt) foram sensibilizadas com 100µL do antígeno (STAg), o qual foi adicionado em cada poço na concentração de 5µg/mL diluído em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6). As placas foram incubadas *overnight* a 4°C . No dia seguinte, a solução contendo o antígeno foi desprezada e a placa foi lavada duas vezes com solução salina contendo Tween 20 a 0,05% (SST).

Após secagem das placas por inversão sobre papel de filtro absorvente, 100 µL de uma solução contendo PBS/Caseína 2% foi adicionado em cada poço, sendo a placa incubada por 30 minutos a 37°C . Após esse intervalo de tempo, a solução foi desprezada e a placa foi lavada duas vezes com SST. Após secar a placa por inversão sobre papel de filtro absorvente, 100 µL do soro previamente diluído em PBS-T/Caseína 0,25% (Tween 20 a 0,05% em PBS pH 7,2) na proporção de 1:100, foi adicionado em cada poço da placa. Os soros foram analisados em duplicada e, para cada placa, foi utilizado como controles duas amostras positivas e seis amostras negativas. Após incubar a placa contendo os soros por 45 minutos a 37°C , os soros foram desprezados e a placa foi lavada quatro vezes com SST.

Em cada poço foram adicionados 100µL do conjugado humano anti-IgG marcado com peroxidase (Sigma – Aldrich: human anti IgG – A6029). Este conjugado foi previamente diluído em PBS / Caseína 0,25% / Tween 20 a 0,05% na proporção 1:5000. Após a adição do conjugado, a placa foi incubada por 45 minutos a 37°C . Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com SST. Uma solução substrato composta por 3µg de σ -phenylnediamine (Sigma), 15 mL de solução de ácido cítrico e 3µL de H_2O_2

foi preparada e 100µL dessa solução foi adicionada em cada poço da placa. Após 20 minutos a reação foi interrompida com a adição de 25µL de H₂SO₄ (4N) em cada poço. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (BIO RAD® Modelo 3550) com filtro de 490nm.

Cada placa teve seu ponto de corte (*cut off*) calculado pela média das absorbâncias das seis amostras de soro negativo para *T. gondii* mais três desvios-padrões. A média da absorbância dos soros testados em duplicata foi dividido pelo valor do *cut off* da placa com o objetivo de determinar o índice de reatividade (IR). Os soros que apresentaram os valores de IR > 1,1 foram considerados positivos. Aqueles que apresentaram um valor indeterminado, ou seja, com o valor de IR entre 0,9 e 1,1 foram testados novamente para confirmação do resultado.

3.3.6. Análise estatística

Utilizando-se o programa Epidata (versão 3.1), um banco de dados foi gerado com base nas informações obtidas nos questionários e nos resultados sorológicos. Para análise dos dados foram utilizados os programas STATA versão 10.0 e Epi-Info (versão 3.2.). A análise seguiu as seguintes etapas:

- Estimativa da prevalência da infecção por *T. gondii*.
- Análise descritiva das variáveis coletadas no questionário.
- Análise univariada: comparações de frequências entre infectados e não infectados, utilizando-se o teste do qui-quadrado.
- O efeito de covariáveis em relação à infecção por *T. gondii* foi realizada através de regressão logística multinível. A medida de associação utilizada foi a *Odds* Relativa (OR) e intervalo de confiança 95%. A regressão logística multinível foi realizada utilizando-se a função “xtmelogit” do STATA. Este modelo considera em um nível a influência da casa e em outro nível, as características do indivíduo, permitindo controlar o grau de dependência de variáveis de diferentes níveis hierárquicos.
- Análise multivariada: as variáveis que na análise univariada apresentaram nível de significância $p < 0,25$ e algumas variáveis que não apresentaram diferenças significativas, mas que são consideradas relevantes como fatores de risco para infecção por *T. gondii* foram selecionadas para análise logística multivariada multinível. Partiu-se do modelo completo, com descarte sucessivo das variáveis não significativas, até

obtenção do modelo final. Permaneceram no modelo final somente as variáveis com nível de significância $p < 0,05$.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Distribuição da amostra por área

A partir de uma consulta realizada à Secretaria Municipal de Saúde de Santa Cruz, no período de 2012 a 2014, obteve-se a distribuição do número de famílias nas cinco áreas deste município (Tabela 1).

Tabela 1. Número total de famílias (n=8965) distribuído por área no município de Santa Cruz – RN, em 2014.

Área	Número de famílias	Número de casas (%)
Centro	2.148	24,0
Paraíso	2.803	31,2
Cônego Monte	1.708	19,1
Maracujá	1.303	14,5
DNER	1.003	11,2

Utilizando os dados da tabela 1 e sabendo que o tamanho mínimo da amostra necessária é de 366 famílias, foi estipulado o número da amostra para esse estudo e sua distribuição por área (Tabela 2). Além disso, com o auxílio dos Agentes Comunitários de Saúde (ACS) de cada Unidade Básica de Saúde, foi possível obter o número de famílias por rua de cada área, o que tornou a amostragem ainda mais homogênea. O tamanho da amostra estimada foi de 800 famílias, entretanto, devido à facilidade operacional do recrutamento e grande envolvimento da comunidade, um total de 1217 famílias e 1540 indivíduos foram incluídos no estudo. Sete pessoas recusaram participar da pesquisa cujo motivo estava relacionado ao medo de agulha.

Tabela 2. Número de famílias (n=1217) e de pessoas voluntárias do estudo (n=1540) distribuídas por área no município de Santa Cruz – RN.

Área	Nº de famílias observadas	Nº de famílias esperadas	Nº de pessoas
Centro	256	292	325
Paraíso	439	379	581
Cônego	216	232	251
Maracujá	150	176	187
DNER	156	136	196

3.4.2. Características dos voluntários

A amostra foi composta por 1540 voluntários (cerca de 4 vezes maior que a amostra mínima) onde 75,1% eram do sexo feminino e 24,9% do sexo masculino (Tabela 3). Os participantes apresentaram idade entre 13 e 95 anos. O grau de escolaridade foi distribuído em categorias onde se observou maior frequência (26,3%) na categoria “analfabeto”. A profissão dos voluntários foi bem diversificada, destacando-se as ocupações de “dona de casa” e “aposentado/pensionista”. Poucos voluntários (10,8%) trabalhavam diretamente manipulando o solo. Apenas 419 participantes (27,2%) mostraram ter algum conhecimento sobre a toxoplasmose (Tabela 3).

Tabela 3. Características dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características dos voluntários	N = 1540	%
Sexo		
Feminino	1156	75,1
Masculino	384	24,9
Área		
Centro	325	21,2
Paraíso	581	37,7
Cônego	251	16,3
Maracujá	187	12,1
DNER	196	12,7
Idade (anos)		
≥ 13 e < 15	60	3,8
≥ 15 e < 30	365	23,7
≥ 30 e < 45	449	29,2
≥ 45 e < 60	348	22,6
≥ 60	318	20,7
Grau de escolaridade		
Analfabeto	405	26,3
Até a 4ª série Fundamental	340	22,1
Até a 8ª série Fundamental	320	20,8
2º grau completo	387	25,1
3º grau	88	5,7
Já ouviu sobre toxoplasmose		
Sim	419	27,2
Não	1121	72,8
Profissão		
Do lar (dona de casa)	381	24,7
Aposentado/Pensionista	269	17,5
Autônomo	203	13,2
Empregado Rural	167	10,8
Estudante	156	10,1
Servidor Público	142	9,2

Desempregado	80	5,2
Empreg. Empresa privada	72	4,7
Professor	29	1,9
Doméstica / Cuidador	25	1,7
Empresário / Prod. rural	16	1,0

3.4.3. Características das residências

A visita foi realizada em 1217 residências cuja renda familiar predominante foi de até 2 salários mínimos. Quase todas as casas apresentaram um piso revestido por cerâmica ou cimento. Esse mesmo piso também pode ser observado na maioria dos quintais das casas. Das residências que possuíam caixa d'água, 42,8% tinham alguma estrutura que funcionava como tampa, mantendo-as cobertas. Em relação aos animais presentes no domicílio e/ou peridomicílio foi observada a presença de 1 a 2 gatos em 24,5% das residências. Os cães e galináceos foram encontrados em 36,6% e 13,8% das residências, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Características das residências dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características das residências	N (1217)	%
Renda familiar		
Até 2 salários	963	79,6
Entre 2 e 7 salários	232	19,2
Acima de 7 salários	14	1,2
Piso da casa anterior *		
Cimento, cerâmica	962	87,5
Barro, terra, areia	138	12,5
Piso da casa atual		
Cimento, cerâmica	1207	99,2
Barro, terra, areia	10	0,8
Quintal		
Sim	1071	88,0
Não	146	12,0
Piso do quintal		
Cimento ou cerâmica	548	45,0
Terra	391	32,1
Misto	132	10,9
Não se aplica	146	12,0
Limpeza do quintal		
Diariamente	741	60,9
Semanalmente	248	20,4
Esporadicamente	79	6,5
Nunca	3	0,3
Não se aplica	146	11,9
Tem caixa d'água		
Sim	1063	87,4
Não	154	12,6

A caixa d'água é coberta		
Sim	521	42,8
Não	412	33,9
Não sabe	130	10,7
Não se aplica	154	12,6
Tem cão		
Sim	445	36,6
Não	772	63,4
Tem galinha		
Sim	168	13,8
Não	1049	86,2
Tem ou teve gato		
Sim	623	51,2
Não	594	48,8
Quantos gatos têm atualmente		
Nenhum	238	19,5
1 – 2	298	24,5
> 3	87	7,2
Não se aplica	594	48,8

* Para 1100 pessoas que relataram ter morado em outra residência.

3.4.4. Variáveis relacionadas à ingestão de oocistos

A ingestão de salada crua foi relatada por 82,9% dos voluntários (Tabela 5), dos quais 48,8% tinham o hábito de ingerir essa salada fora de casa em uma frequência de menos de uma vez por semana, como relatado por 22,6% dos indivíduos. Poucos trabalhavam manipulando o solo e, em geral, não usavam luvas (22,4%). Em relação a fonte de água para consumo, 64,4% dos voluntários bebiam água de torneira sem nenhum tipo de tratamento (fervura ou filtração), e antes da implantação da Adutora Monsenhor Expedito (ocorrida em 1998), que leva água tratada para o município, a maioria dos participantes já havia consumido água de poço (76,4%), rio (45,1%), caminhão pipa (66,8%) e açude (58,8%).

Tabela 5. Aspectos comportamentais relacionados à ingestão de oocistos pelos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características comportamentais	N = 1540	%
Come salada crua		
Sim	1277	82,9
Não	263	17,1
Come salada crua fora de casa		
Sim	752	48,8
Não	525	34,1
Não se aplica	263	17,1

Freq. come salada fora de casa		
Uma vez	208	13,5
Mais de uma vez	175	11,4
Menos de uma vez	348	22,6
Não lembra	21	1,4
Não se aplica	788	51,2
Manipula terra		
Sim	401	26,0
Não	1139	74,0
Como manipula a terra		
Com luvas	35	2,3
Sem luvas	345	22,4
Com/Sem luvas	21	1,4
Não se aplica	1139	74,0
Água que bebe		
Torneira	992	64,4
Sem tratamento	260	16,9
Mineral	288	18,7
Bebe/Bebeu água de poço		
Sim	1177	76,4
Não	323	21,0
Não sabe	40	2,6
Bebe/bebeu água de rio		
Sim	695	45,1
Não	806	52,3
Não sabe	39	2,5
Bebe/bebeu água de caminhão pipa		
Sim	1029	66,8
Não	475	30,8
Não sabe	36	2,3
Bebe/bebeu água de açude		
Sim	906	58,8
Não	597	38,8
Não sabe	37	2,4

A maioria dos voluntários (46,5%) que tinha gato relatou que seu animal ficava dentro e fora de casa, e que dormia em cadeiras e sofá (32,5%). Quase todos os participantes relataram ver gatos na vizinhança e 41,2% destes participantes (que tinham ou não gato) declararam que esses animais entravam em suas casas. Os gatos, geralmente, defecavam na rua e aqueles que defecavam numa caixa de areia dentro de casa tinham suas fezes retiradas pelos donos que frequentemente não usavam luvas (Tabela 6).

Tabela 6. Aspectos comportamentais dos voluntários em relação a gatos dentro e fora das residências do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características comportamentais dos voluntários em relação a gatos	N = 1540	%
Onde o gato ficava/fica*		
Dentro de casa	40	3,3
Dentro/fora de casa	566	46,5
Fora de casa	17	1,4
Não se aplica	594	48,8
O gato dormia/dorme na cama*		
Sim	193	15,9
Não	430	35,3
Não se aplica	594	48,8
O gato dormia/dorme na cadeira/sofá*		
Sim	396	32,5
Não	227	18,7
Não se aplica	594	48,8
Você brincava/brinca com o gato		
Sim	468	30,4
Não	345	22,4
Não se aplica	727	47,2
As fezes do gato eram/são recolhidas		
Com luvas	26	1,7
Sem luvas	268	17,4
Não se aplica	1246	80,9
O gato defecava/defeca na rua*		
Sim	511	42,0
Não	111	9,1
Não lembra	1	0,1
Não se aplica	594	48,8
Ver gatos na vizinhança		
Sim	1399	90,8
Não	117	7,6
Não sabe	24	1,6
Os gatos entram na sua casa*		
Sim	501	41,2
Não	429	35,3
Não sabe	287	23,5

* Análise realizada por residência.

3.4.5. Variável relacionada à ingestão de taquizoítos

A ingestão de leite cru / não pasteurizado de gado foi relatada por 12,8% dos voluntários (Figura 6).

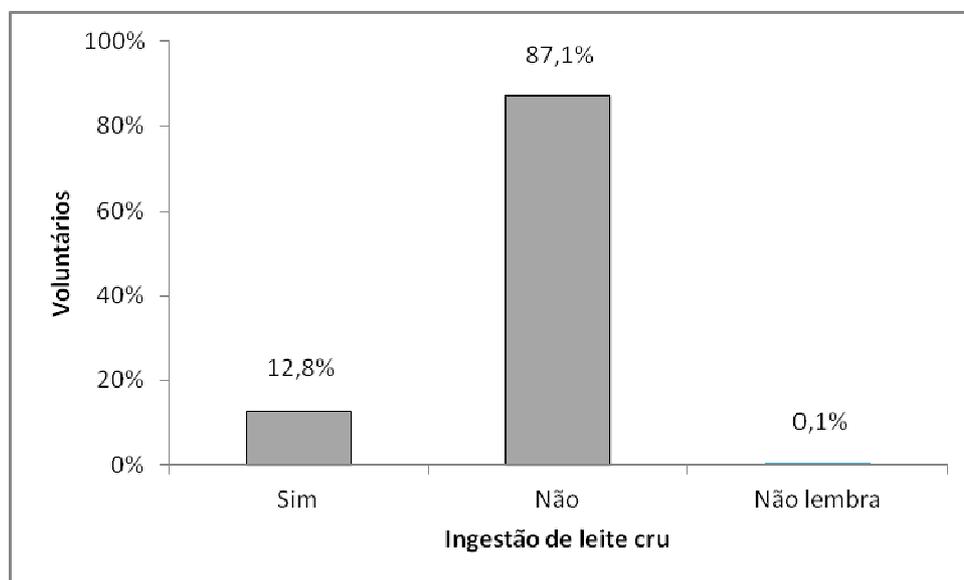


Figura 6. Frequência dos voluntários que tem o hábito de ingerir leite cru / não pasteurizado de gado no município de Santa Cruz – RN

3.4.6. Variáveis relacionadas à ingestão de cistos

A ingestão de carne crua ou mal passada foi relatada por apenas 22,4% dos voluntários e a maioria estocava a carne em freezer antes do consumo. A carne bovina foi a mais citada, sendo consumida por quase todos os participantes que relataram ter esse comportamento alimentar (Tabela 7).

Tabela 7. Aspectos comportamentais relacionados a ingestão de cistos de *Toxoplasma gondii* pelos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características comportamentais	N = 1540	%
Costuma comer carne crua/mal passada		
Sim	345	22,4
Não	1195	77,6
Como prepara a carne (apenas crua)		
Congela antes do preparo	128	37,1
Prepara no dia que compra	48	13,9
As duas opções	93	27,0
Não sabe	76	22,0

Costuma comer carne bovina crua/mal passada		
Sim	339	22,0
Não	6	0,4
Não se aplica	1195	77,6
Costuma comer carne suína crua/mal passada		
Sim	120	7,8
Não	225	14,6
Não se aplica	1195	77,6
Costuma comer carne de bode ou carneiro crua/mal passada		
Sim	93	6,0
Não	252	16,4
Não se aplica	1195	77,6
Costuma comer carne de frango crua/mal passada		
Sim	144	9,4
Não	201	13,0
Não se aplica	1195	77,6

3.4.7. Outras variáveis relacionadas à infecção pelo protozoário *T. gondii*

Queixa na visão foi relatada por 466 (30,3%) participantes. Esses indivíduos foram encaminhados para exame oftalmológico. Desses participantes, seis foram diagnosticados com toxoplasmose ocular. Poucos voluntários relataram ter realizado transplante (0,4%) ou transfusão sanguínea (6,9%). Das 1156 mulheres voluntárias nesse estudo 289 (18,8%) relataram aborto espontâneo (Tabela 8).

Tabela 8. Ocorrência de problemas de visão, transplantes de órgãos, transfusão de sangue e aborto nos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Ocorrência	N = 1540	%
Tem queixas na visão		
Sim	466	30,3
Não	1074	69,7
Fez algum transplante		
Sim	6	0,4
Não	1529	99,3
Não respondeu	5	0,3
Fez transfusão		
Sim	106	6,9
Não	1428	92,7

Não respondeu	6	0,4
Teve algum aborto*		
Sim	289	18,8
Não	867	56,3
Não se aplica	384	24,9

* Para as 1156 mulheres.

3.4.8. Soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii*

A análise por ELISA-IgG mostrou que dos 1540 voluntários 66,2% apresentaram sorologia positiva e 33,8% sorologia negativa para toxoplasmose. Os nove voluntários que, mesmo após repetição do teste, apresentaram sorologia classificada como indeterminada (0,58%) não tiveram seus dados inseridos em qualquer uma das análises de prevalência da toxoplasmose. A reprodutibilidade do ELISA-IgG foi avaliada em ensaio mascarado. Aproximadamente 10% das amostras (153 soros) foram testadas, observando-se uma concordância de 100%, onde o índice *kappa* foi igual a 1, o que indica excelente reprodutibilidade.

Quando analisada a soroprevalência de IgG anti *T. gondii* por sexo foi observado que 70,3% dos homens e 64,9% das mulheres apresentaram sorologia positiva para toxoplasmose (Tabela 9). As mulheres soronegativas (35,1%) diagnosticadas nesse estudo se encontravam, em sua maioria, em idade reprodutiva (Figura 7). Nesse estudo observou-se também que 74,7% das mulheres com sorologia positiva para toxoplasmose relataram aborto espontâneo. A análise da idade dos participantes mostrou que o aumento da faixa etária resultou em um aumento na prevalência da toxoplasmose. De forma inversa, quanto maior o grau de escolaridade, menor a prevalência da toxoplasmose. A prevalência da infecção não apresentou associação com a renda familiar (Tabela 9).

Tabela 9. Características dos voluntários do município de Santa Cruz – RN associadas à soroprevalência da toxoplasmose, 2013 – 2014.

Características dos voluntários (N = 1540)	Prevalência % (IC 95%)
Sexo	
Feminino	64,9 (62,1 – 67,6)
Masculino	70,3 (65,6 – 74,7)
Área	
DNER	59,2 (52,2 – 65,8)
Maracujá	61,5 (54,4 – 68,2)
Cônego	64,1 (58,1 – 69,8)
Centro	67,7 (62,5 – 72,5)
Paraíso	70,2 (66,4 – 73,9)
Idade (anos)	
≥ 13 e < 15	41,7 (29,7 – 54,3)
≥ 15 e < 30	47,4 (42,3 – 52,5)
≥ 30 e < 45	62,4 (57,8 – 66,7)
≥ 45 e < 60	75,9 (71,2 – 80,1)
≥ 60	87,4 (83,4 – 90,6)
Grau de escolaridade	
Analfabeto	84,7 (80,9 – 87,9)
Até a 4ª série Fundamental	70,6 (65,6 – 75,2)
Até a 8ª série Fundamental	59,4 (53,9 – 64,6)
2º grau completo	52,2 (47,2 – 57,1)
3º grau	51,1 (40,7 – 61,3)
Renda familiar	
Acima de 7 salários	64,3 (37,6 – 83,7)
Entre 2 e 7 salários	62,1 (55,7 – 68,1)
Até 2 salários	68,2 (65,2 – 71,1)

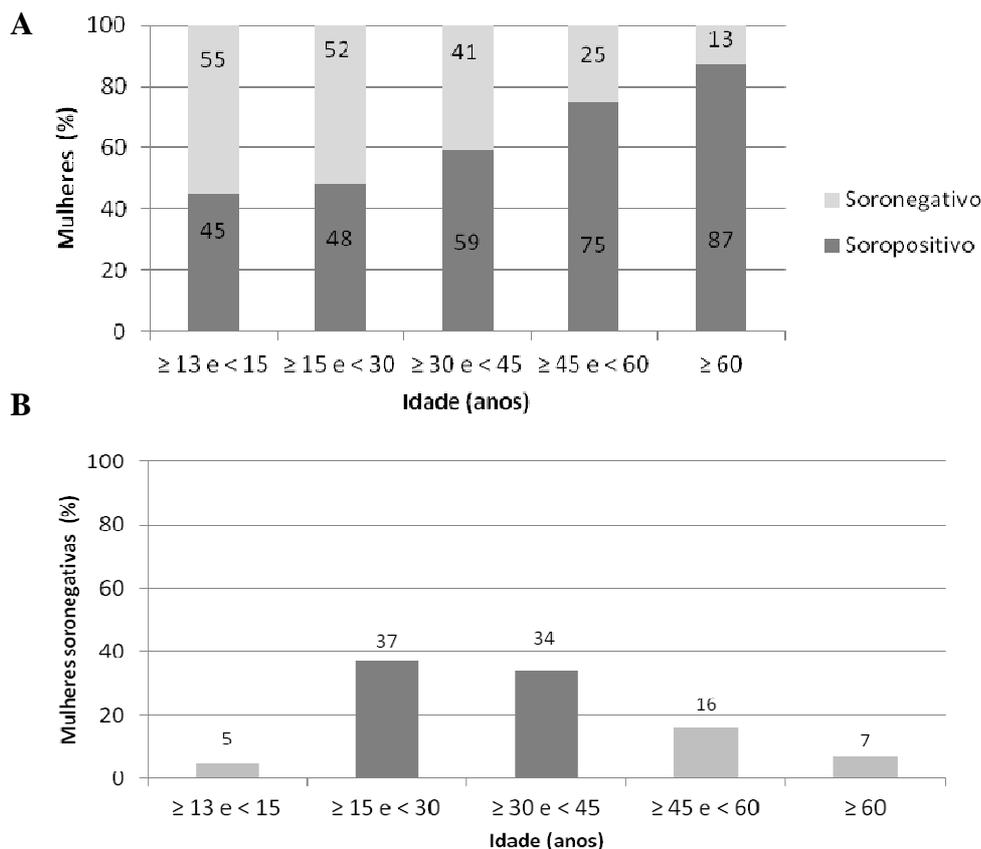


Figura 7. Relação entre idade e sorologia das mulheres voluntárias do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014. **A.** Proporção, por faixa etária, de mulheres soropositivas e soronegativas para toxoplasmose. **B.** Distribuição, por faixa etária, apenas das mulheres soronegativas.

Uma análise comparativa entre as cinco áreas do município de Santa Cruz (Tabela 9) mostrou que Paraíso apresentou uma maior prevalência da infecção (70,2%) enquanto a área DNER apresentou a menor frequência de pessoas com a toxoplasmose (59,2%). As informações sobre a renda familiar e o grau de escolaridade das 5 áreas podem ser observados na tabela 10. A renda familiar de até 2 salários mínimos predomina na área Paraíso (42,7%), enquanto que essa mesma renda tem sua menor frequência (10,5%) na área DNER. Analisando essa variável nas 5 áreas observa-se que 68,2% dos voluntários com renda de até 2 salários mínimos apresentavam sorologia positiva para essa doença (Tabela 9).

Em relação ao grau de escolaridade 40,4% dos voluntários da área Paraíso se encontram na categoria “analfabeto”, enquanto que na área DNER essa categoria é representada por 11,4% dos voluntários (Tabela 10). A análise dessa variável permitiu observar uma redução na soroprevalência à medida que os voluntários de Paraíso

apresentavam grau de escolaridade mais avançado (Tabela 9), aspecto não observado na área DNER.

Tabela 10. Renda familiar e grau de escolaridade das cinco áreas do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Renda familiar	Áreas				
	Centro N (%)	Paraíso N (%)	Cônego Monte N (%)	Maracujá N (%)	DNER N (%)
Acima de 7 salários	7 (50,0)	1 (7,1)	2 (14,3)	0 (0,0)	4 (28,6)
Entre 2 e 7 salários	74 (32,0)	25 (10,8)	58 (25,0)	26 (11,2)	49 (21,0)
Até 2 salários	173 (18,0)	411 (42,7)	153 (15,8)	125 (13,0)	101 (10,5)
Grau de Escolaridade					
Analfabeto	70 (21,6)	131 (40,4)	46 (14,2)	40 (12,4)	37 (11,4)
Até a 4ª série Fundamental	33 (11,7)	141 (50,0)	50 (17,7)	38 (13,5)	20 (7,1)
Até a 8ª série Fundamental	32 (13,5)	99 (41,6)	53 (22,3)	28 (11,7)	26 (10,9)
2º grau completo	90 (29,5)	63 (20,7)	54 (17,7)	39 (12,8)	59 (19,3)
3º grau	31 (45,6)	7 (10,3)	10 (14,7)	6 (8,8)	14 (20,6)

3.4.9. Análise Univariada

3.4.9.1. Características dos voluntários

Na análise univariada, considerando as variáveis relacionadas às características dos voluntários, observou-se maior proporção da infecção no sexo masculino. Além disso, foi observado que as faixas de idade acima de 30 anos apresentaram maiores proporções de positivos para toxoplasmose. A análise comparativa entre as áreas mostrou que os voluntários que residem no Paraíso têm mais chance de adquirir a toxoplasmose do que moradores da área do DNER (Tabela 11). Nesse estudo, o grau de escolaridade apresentou diferença significativa entre as categorias, mostrando que indivíduos com ensino superior (completo ou não) e 2º grau completo têm menos chance de adquirir a toxoplasmose (Tabela 11).

Tabela 11. Análise univariada da positividade para toxoplasmose e características dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características dos voluntários (N = 1540)	ELISA		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Sexo				
Feminino	750 (64,88)	406 (35,12)	1	0,05
Masculino	270 (70,31)	114 (29,69)	1,3 (0,9 – 1,6)	
Área				
DNER	116 (59,2)	80 (40,8)	1	0,05
Maracujá	115 (61,5)	72 (38,5)	1,1 (0,7 – 1,7)	
Cônego	161 (64,1)	90 (35,9)	1,2 (0,8 – 1,8)	
Centro	220 (67,7)	105 (32,3)	1,4 (1,0 – 2,1)	
Paraíso	408 (70,2)	173 (29,8)	1,6 (1,2 – 2,3)	
Idade (anos)				
≥ 13 e < 15	25 (41,67)	35 (58,33)	1	0,00
≥ 15 e < 30	173 (47,40)	192 (52,60)	1,3 (0,7 – 2,2)	
≥ 30 e < 45	280 (62,36)	169 (37,64)	2,3 (1,3 – 4,0)	
≥ 45 e < 60	264 (75,86)	84 (24,14)	4,4 (2,4 – 7,7)	
≥ 60	278 (87,42)	40 (12,58)	9,7 (5,3 – 17,9)	
Grau de escolaridade				
Analfabeto	343 (84,7)	62 (15,3)	1	0,00
Até a 4ª série	240 (70,6)	100 (29,4)	0,4 (0,3 – 0,6)	
Fundamental	190 (59,4)	130 (40,6)	0,3 (0,2 – 0,4)	0,00
Até a 8ª série	190 (59,4)	130 (40,6)	0,3 (0,2 – 0,4)	
Fundamental	190 (59,4)	130 (40,6)	0,3 (0,2 – 0,4)	
2º grau completo	202 (52,2)	185 (47,8)	0,2 (0,1 – 0,3)	0,00
3º grau	45 (51,1)	43 (48,9)	0,2 (0,1 – 0,3)	
Já ouviu sobre toxoplasmose				
Sim	259 (61,8)	160 (38,2)	1	0,03
Não	761 (67,9)	360 (32,1)	1,3 (1,0 – 1,6)	

3.4.9.2. Características das residências

Em relação às características das habitações, indivíduos que residiam anteriormente em casa com piso composto por barro/terra/areia apresentaram maior chance de infecção do que aqueles que viviam em casa com piso revestido por cimento ou cerâmica. Não houve associação entre o tipo de piso da casa atual. Outra característica que apresentou diferença significativa foi a presença ou não de caixa d'água, revelando maior risco de infecção para quem não a possuía em sua residência. Em relação aos animais observou-se que a presença de gatos aumentava a chance de adquirir a infecção (Tabela 12).

Tabela 12. Análise univariada das características das residências dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características das residências (N = 1217)	ELISA		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Renda familiar				
Acima de 7 salários	9 (64,3)	5 (35,7)	1	
Entre 2 e 7 salários	144 (62,1)	88 (37,9)	0,9 (0,3 – 2,8)	0,87
Até 2 salários	657 (68,2)	306 (31,8)	1,2 (0,4 – 3,6)	0,75
Piso da casa anterior *				
Cimento, cerâmica	644 (66,9)	318 (33,1)	1	
Barro, terra, areia	110 (79,7)	28 (20,3)	1,9 (1,3 – 3,0)	0,00
Piso da casa atual				
Cimento, cerâmica	808 (66,9)	399 (33,1)	1	
Barro, terra, areia	7 (70,00)	3 (30,00)	1,2 (0,3 – 4,5)	0,84
Quintal				
Não	101 (69,2)	45 (30,8)	1	
Sim	714 (66,7)	357 (33,3)	1,1 (0,8 – 1,5)	0,53
Piso do quintal				
Cimento ou cerâmica	374 (68,2)	174 (31,8)	1	
Terra	252 (64,4)	139 (35,6)	0,84 (0,6 – 1,1)	0,22
Misto	88 (66,7)	44 (33,3)	0,93 (0,6 – 1,4)	0,73
Limpeza do quintal				
Diariamente	502 (67,8)	239 (32,2)	1	
Semanalmente	159 (64,1)	89 (35,9)	0,85 (0,6 – 1,2)	0,30
Esporadicamente/Nunca	53 (64,6)	29 (35,4)	0,87 (0,5 – 1,4)	0,57
Tem caixa d'água				
Sim	696 (65,5)	367 (34,5)	1	
Não	119 (77,3)	35 (22,7)	1,2 (1,1 -1,4)	0,00
A caixa d'água é coberta				
Sim	345 (66,2)	176 (33,8)	1	
Não	270 (65,5)	142 (34,5)	1,0 (0,7 – 1,3)	0,83
Não sabe	81 (62,3)	49 (37,7)	0,84 (0,6 – 1,3)	0,40
Tem cão				
Sim	298 (66,97)	147 (33,03)	1	
Não	517 (66,97)	255 (33,03)	1,0 (0,8 – 1,3)	0,10
Tem galinha				
Sim	124 (73,81)	44 (26,19)	1	
Não	691 (65,87)	358 (34,13)	0,7 (0,5 – 1)	0,04
Tem ou teve gato				
Não	367 (61,78)	227 (38,22)	1	
Sim	448 (71,91)	175 (28,09)	1,6 (1,3 – 2,0)	0,00
Quantos gatos têm atualmente				
Nenhum	164 (68,9)	74 (31,1)	1	
1 – 2	214 (71,8)	84 (28,2)	1,1 (0,8 – 1,7)	0,46
≥ 3	70 (80,5)	17 (19,5)	1,9 (1 – 3,4)	0,04

* Para pessoas que relataram ter morado em outra residência.

3.4.9.3. Aspectos comportamentais dos voluntários relacionados à ingestão de oocistos/taquizoítos

O comportamento dos voluntários em beber água sem tratamento mostrou um aumento no risco da infecção quando comparada ao consumo de água mineral. Para aqueles voluntários que relataram ter bebido água de poço, de caminhão pipa, água de rio e açude foi observado maior chance quando comparado com os voluntários que não beberam dessa água. Um risco maior de adquirir a infecção também foi observado em voluntários que faziam a ingestão do leite cru/não pasteurizado de vaca (Tabela 13).

Tabela 13. Aspectos comportamentais relacionados à ingestão de oocistos/taquizoítos pelos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características comportamentais dos voluntários	ELISA		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Come salada crua				
Não	180 (68,4)	83 (31,6)	1	
Sim	840 (65,8)	437 (34,2)	0,8 (0,7 – 1,2)	0,40
Come salada crua fora de casa				
Não	359 (68,4)	166 (31,6)	1	
Sim	481 (64,0)	271 (36,0)	0,8 (0,6 – 1,0)	0,10
Frequência que come salada fora de casa				
Menos de uma vez	228 (65,5)	120 (34,5)	1	
Uma vez	124 (59,6)	84 (40,4)	0,8 (0,5 – 1,1)	0,16
Mais de uma vez	110 (62,9)	65 (37,1)	0,9 (0,6 – 1,3)	0,55
Manipula terra				
Não	726 (63,7)	413 (36,3)	1	
Sim	294 (73,3)	107 (26,7)	1,0 (0,5 – 2,3)	0,90
Como manipula a terra				
Com luvas	26 (74,3)	9 (25,7)	1	
Sem luvas	268 (73,2)	98 (26,8)	0,9 (0,4 – 2,1)	0,89
Água que bebe				
Mineral	167 (58,0)	121 (42,0)	1	
Torneira	672 (67,7)	320 (32,3)	1,5 (1,2 – 2,0)	0,00
Sem tratamento	181 (69,6)	79 (30,4)	1,7 (1,2 – 2,4)	0,00
Bebe/Bebeu água de poço				
Não	174 (54,0)	149 (46,0)	1	
Sim	820 (69,7)	357 (30,3)	2,0 (1,5 – 2,5)	0,00
Bebe/bebeu água de rio				
Não	488 (60,6)	318 (39,4)	1	
Sim	507 (72,9)	188 (27,1)	1,7 (1,4 – 2,2)	0,00
Bebe/bebeu água de caminhão pipa				

Não	280 (58,9)	195 (41,1)	1	
Sim	717 (69,7)	312 (30,3)	1,6 (1,3 – 2,0)	0,00
Bebe/bebeu água de açude				
Não	336 (56,3)	261 (43,7)	1	
Sim	659 (72,7)	247 (27,3)	2,0 (1,7 – 2,6)	0,00
Costuma beber leite cru/não pasteurizado				
Não	869 (64,7)	473 (35,3)	1	
Sim	150 (76,1)	47 (23,9)	1,7 (1,2 – 2,4)	0,00

Nenhuma relação foi observada entre a infecção por *Toxoplasma* e o comportamento dos voluntários em relação a gatos, com exceção do hábito de brincar com eles (Tabela 14).

Tabela 14. Análise univariada de aspectos comportamentais dos voluntários em relação a permanência de gatos dentro e fora das residências do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características comportamentais dos voluntários em relação a gatos	ELISA		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Onde o gato ficava/fica *				
Dentro de casa	26 (65,0)	14 (35,0)	1	
Dentro/fora de casa	411 (72,6)	155 (27,4)	1,4 (0,7 – 2,8)	0,30
Fora de casa	11 (64,7)	6 (35,3)	1 (0,3 – 3,2)	0,98
O gato dormia/dorme na cama*				
Não	310 (72,1)	120 (27,9)	1	
Sim	138 (71,5)	55 (28,5)	1,0 (0,8 – 1,5)	0,75
O gato dormia/dorme na cadeira*				
Não	176 (77,5)	51 (22,5)	1	
Sim	272 (68,7)	124 (31,3)	0,8 (0,6 – 1,0)	0,13
Você brincava/ brinca com o gato				
Não	260 (75,4)	85 (24,6)	1	
Sim	320 (68,4)	148 (31,6)	0,7 (0,5 – 1,0)	0,03
As fezes do gato eram/são recolhidas				
Com luvas	18 (69,2)	8 (30,8)	1	
Sem luvas	198 (73,9)	70 (26,1)	1,3 (0,5 – 3,0)	0,60
O gato defecava/defeca fora de casa*				
Não	76 (68,5)	35 (31,5)	1	
Sim	371 (72,6)	140 (27,4)	1,3 (0,9 – 1,9)	0,16
Ver gatos na vizinhança				
Não	85 (72,6)	32 (27,4)	1	
Sim	916 (65,5)	483 (34,5)	0,7 (0,5 – 1,1)	0,12
Os gatos entram na sua				

casa *					
Não	290 (67,6)	139 (32,4)	1		
Sim	327 (65,3)	174 (34,7)	1,0 (0,7 – 1,2)	0,70	

* Análise realizada por residência (N = 1217)

3.4.9.4. Aspectos comportamentais dos voluntários relacionados à ingestão de cistos

Embora os voluntários tenham relatado ingerir carne mal passada de porco, galinha, bode/carneiro e, principalmente, de boi, nenhuma relação com a infecção para toxoplasmose foi identificada pela análise univariada (Tabela 15).

Tabela 15. Análise univariada dos aspectos comportamentais relacionados a ingestão de carne crua/mal passada, possivelmente contaminada com cistos de *Toxoplasma gondii*, pelos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características comportamentais	ELISA		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Costuma comer carne crua/mal passada				
Não	784 (65,6)	411 (34,4)	1	
Sim	236 (68,4)	109 (31,6)	1,1 (0,9 – 1,5)	0,33
Como prepara a carne (apenas crua)				
Congela	86 (67,2)	42 (32,8)	1	
Prepara no dia que compra	33 (68,7)	15 (31,3)	1,1 (0,5 – 2,2)	0,84
As duas opções	66 (72,0)	27 (28,0)	1,2 (0,7 – 2,1)	0,60
Costuma comer carne bovina crua/mal passada				
Não	790 (65,8)	411 (34,2)	1	
Sim	230 (67,8)	109 (32,2)	1,9 (0,8 – 1,4)	0,48
Costuma comer carne suína crua/mal passada				
Não	943 (66,2)	482 (33,8)	1	
Sim	82 (68,3)	38 (31,7)	1,1 (0,7 – 1,6)	0,61
Costuma comer carne de bode crua/mal passada				
Não	938 (66,1)	482 (33,9)	1	
Sim	64 (68,1)	30 (31,9)	1,0 (0,7 – 1,7)	0,75
Costuma comer carne de frango crua/mal passada				
Não	919 (65,8)	477 (34,2)	1	
Sim	101 (70,1)	43 (29,9)	1,2 (0,8 – 1,7)	0,30

3.4.9.5. Análise de outros fatores relacionados à infecção por *Toxoplasma gondii*

Para as pessoas que relataram queixa na visão observou-se uma diferença significativa entre os participantes com e sem a toxoplasmose. Das 1156 mulheres

analisadas 289 relataram aborto espontâneo, e destas mulheres 74,7% apresentaram sorologia positiva para a toxoplasmose (Tabela 16).

Tabela 16. Análise univariada das ocorrências de problemas de visão, transplantes de órgãos, transfusão de sangue e aborto nos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Ocorrência	ELISA		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Tem queixas na visão				
Não	686 (63,9)	388 (36,1)	1	0,00
Sim	334 (71,7)	132 (28,3)	1,4 (1,1 – 1,8)	
Fez algum transplante				
Não	1,013 (66,3)	516 (33,7)	1	0,40
Sim	5 (83,3)	1 (16,7)	2,5 (0,3 – 21,8)	
Fez transfusão				
Não	942 (66,0)	486 (34,0)	1	0,31
Sim	75 (70,7)	31 (29,3)	1,3 (0,8 – 2,0)	
Teve algum aborto				
Não	534 (61,6)	333(38,4)	1	0,00
Sim	216 (74,7)	73 (25,3)	1,8 (1,4 – 2,5)	

3.4.10. Análise Multivariada

Após selecionar as variáveis com $p < 0,25$, a análise logística multivariada foi realizada. Permaneceram no modelo final associada a infecção por *T. gondii*, os seguintes fatores para o município de Santa Cruz: idade, grau de escolaridade, ter três ou mais gatos na residência, ausência de caixa d'água e ingestão de leite cru/não pasteurizado (Tabela 17).

Para a variável idade foi observado que a infecção por *T. gondii* aumenta com o decorrer do tempo de vida, indicando que indivíduos com idade igual ou superior a 45 anos têm 7,4 vezes mais chances de ser infectado pelo parasito do que aqueles com 13 a 15 anos. O grau de escolaridade indicou que indivíduos caracterizados como analfabetos tem 2,8 vezes mais chances de adquirir a toxoplasmose do que aqueles com 3º grau completo ou não. Em relação ao número de gatos presentes na residência, a análise mostrou um aumento na exposição ao parasito, uma vez que as residências com mais de 3 gatos expõe o dono a infecção duas vezes mais do que aquelas que não possuem esse

animal. A exposição a toxoplasmose também aumenta duas vezes quando o indivíduo bebe leite cru/não pasteurizado ou não tem caixa d'água em sua residência (Tabela 17).

Tabela 17. Análise multivariada dos aspectos relacionados a infecção por *Toxoplasma gondii* no município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Variável	Multivariada OR (IC95%)	P
Idade		
≥ 13 e < 15	1	
≥ 15 e < 30	1,84 (1,0 – 3,4)	0,06
≥ 30 e < 45	3,4 (1,8 – 6,6)	0,00
≥ 45	7,4 (3,7 – 14,8)	0,00
Grau de escolaridade		
Analfabeto	2,8 (1,6 – 5,0)	0,00
Até a 4ª série Fundamental	1,6 (0,9 – 2,8)	0,07
Até a 8ª série Fundamental	1,6 (0,9 – 2,8)	0,07
2º grau completo	0,9 (0,6 – 1,6)	0,96
3º grau	1	
Quantidade de gatos		
Nunca teve	1	
Nenhum	1,4 (1,0 – 2,0)	0,03
1 – 2	1,5 (1,1 – 2,1)	0,05
> 3	2,0 (1,2 – 3,5)	0,01
Presença de caixa d'água		
Sim	1	
Não	2,0 (1,4 – 3,1)	0,01
Bebe leite cru/não pasteurizado		
Não	1	
Sim	2,0 (1,3 – 3,0)	0,01

3.5. DISCUSSÃO

No Brasil, especialmente nos estados do nordeste, existem poucos trabalhos que relatam a prevalência da toxoplasmose, geralmente sem associar a prevalência ao sexo ou idade. No presente estudo foi encontrada uma soroprevalência de 66,2% para anticorpos IgG na população do município de Santa Cruz – RN. Prevalência semelhante foi encontrada por Costa e colaboradores (2010) na cidade de São Luis – MA (66,38%). Em Recife-PE a análise sorológica mostrou uma prevalência maior, com 75% dos voluntários apresentando anticorpos para *T. gondii* (Coelho et al. 2003). E na Grande João Pessoa – PB, Junior e Monteiro (2010) encontraram uma soroprevalência mais elevada, com 87,4% dos indivíduos analisados apresentando sorologia positiva para a infecção.

O estudo na população de Santa Cruz incluiu 1540 voluntários sendo essa amostragem composta principalmente por mulheres (75,1%). Essa discrepância na amostragem em relação ao sexo pode ser explicada pelo fato dos homens se encontrarem geralmente ausentes das residências, trabalhando durante o horário em que foram realizadas as visitas domiciliares, e quando presentes se recusavam por receio do procedimento invasivo da coleta de sangue. Além disso, como descrito na tabela 1, a profissão dos voluntários que se destacou foi a de dona de casa, uma ocupação predominantemente feminina, o que leva a mulher a ser encontrada mais facilmente em casa. Apesar dos resultados terem sido obtidos com um maior número de mulheres que de homens na amostra, foi testada a possibilidade do viés nesses resultados. Porém, não se observou diferença significativa após o teste, não sendo necessário o ajuste do modelo final com base nessa variável.

Comparando a prevalência da toxoplasmose entre os sexos observou-se uma diferença significativa entre homens e mulheres. Nesse estudo, a análise sorológica mostrou que 70,3% dos homens apresentavam anticorpos para *T. gondii* enquanto que estes anticorpos estavam presentes em 64,9% das mulheres. Um estudo realizado por Coelho e colaboradores (2003) em Recife encontrou resultado semelhante, apontando soroprevalência maior nos homens (79,0%) do que nas mulheres (63,4%). No Acre foram identificados 66,5% e 65,1% de homens e mulheres com sorologia positiva, respectivamente (Ferreira et al. 2009) e no Mato Grosso a análise sorológica positiva foi encontrada em 86,1% dos homens e 75,9% das mulheres (Amendoeira et al. 2003). Nossos resultados sugerem que a maior frequência da toxoplasmose em homens do que em mulheres está provavelmente associada as atividades profissionais ou

comportamentais desenvolvidas pelos homens na cidade de Santa Cruz, pois ao contrário do que se observou em nosso estudo, em índios do Alto Xingu (Baruzzi, 1970), em Goiás (Rodrigues 2007) e no Maranhão (Costa et al. 2010) houve uma maior prevalência da toxoplasmose em mulheres do que em homens. Esses dados sugerem que a presença de anticorpos para *T. gondii* não está associada ao sexo e sim as características comportamentais desenvolvidas pelos voluntários.

Alguns trabalhos realizados no Brasil tem mostrado uma associação entre a sorologia positiva para a toxoplasmose e as condições socioeconômicas (Bahia-Oliveira et al. 2003; Barbosa et al. 2009; Carellos et al. 2014). Esses dados são corroborados com os nossos onde as áreas (Paraíso e Centro) em que predominam a renda de até 2 salários mínimos e baixo nível de escolaridade apresentaram o maior número de pessoas com sorologia positiva quando comparada com as outras áreas da cidade.

No modelo final obtido pela análise multivariada observou-se cinco fatores de riscos associados a infecção por *T. gondii*. Dois fatores relacionam-se com as características individuais dos voluntários (idade e grau de escolaridade), duas estão relacionadas às características das residências (ausência de caixa d'água e quantidade de gatos) e uma ao comportamento alimentar (ingestão de leite cru/não pasteurizado).

Nesse estudo a soroprevalência aumentou linearmente com a idade e esse resultado foi similar a outros trabalhos realizados no Brasil (Rey e Ramalho, 1999; Bahia-Oliveira et al. 2003; Mandai et al. 2007; Ferreira et al. 2009; Silva et al. 2014). O aumento da prevalência da infecção por *T. gondii* com a idade pode ser justificada pelo fato da população ficar com o passar do tempo mais exposta a fatores de risco tais como: contaminação ambiental, alimentação, grau de desenvolvimento da região e infraestrutura hídrica e sanitária (Remington et al. 1995).

A associação do grau de escolaridade com a toxoplasmose indica uma necessidade em investir em educação nesse município, uma vez que 84,7% dos voluntários caracterizados como analfabetos foram soropositivos para a doença. Além disso, observou-se que uma alta porcentagem (67,9%) dos voluntários que não tinham conhecimento algum sobre a doença apresentou sorologia positiva para a toxoplasmose. Um estudo realizado em Natal mostrou uma prevalência menor (21,5%) em estudantes cujas mães tinham curso superior do que naqueles estudantes (53,2%) cujas mães eram analfabetas ou não tinham o ensino fundamental completo (Garcia et al. 2004). A associação entre grau de escolaridade e toxoplasmose também foi observada em Pernambuco (Porto et al. 2008), em Tocantins (Silva et al. 2014) e no Paraná (Dias et al.

2011), onde a frequência de sorologia positiva foi maior em mães com menos de 8 anos de estudo do que naquelas com 8 anos ou mais de estudo.

A educação em saúde é uma abordagem que pode realmente prevenir a infecção por *T. gondii*, pois busca promover uma mudança no comportamento humano, sendo esta abordagem bastante relevante especialmente para as gestantes. Nesse estudo, a análise univariada mostrou que muitas mulheres (35,1%) com sorologia negativa se encontravam em idade reprodutiva, e a maioria tinha entre 15 e 45 anos de idade. Um estudo realizado em Minas Gerais mostrou que mães jovens, incluindo adolescentes, são significativamente mais afetadas pela doença (Carellos et al. 2014).

O principal impacto social da infecção por toxoplasmose está associado a transmissão vertical. Neste caso, o parasito pode infectar o feto e causar desde um comprometimento sistêmico assintomático a um quadro clínico grave. Um estudo realizado em Goiânia com 246 gestantes identificou que 74 apresentavam sorologia negativa para a doença e destas 16,2% apresentaram soroconversão durante a gestação. Dos 162 recém-nascidos analisados 40,7% foram seriamente infectados por *T. gondii*, apresentando um ou mais sinais clínicos. A lesão ocular foi observada em 30,8% delas, e em 76% dessas crianças com lesão ocular também foram observadas complicações neurológicas (Avelino et al. 2014). Nesse estudo, das 1156 mulheres voluntárias 25% (289) que relataram aborto espontâneo foram soropositivas para a toxoplasmose, contudo nenhuma análise para investigar as causas do aborto foi realizada. Este aspecto epidemiológico, onde há uma maior prevalência de toxoplasmose em pacientes com história obstétrica de abortamentos também foi observada no México (Galván-Ramírez et al. 1995). No município de Santa Cruz não existem estudos relacionados a transmissão vertical da toxoplasmose nem tampouco um programa de educação em saúde voltado para as gestantes, reforçando a necessidade de priorizar essas mulheres na política de educação em saúde para prevenir a doença.

Outro fator de risco associado à infecção por *T. gondii* observado nesse estudo foi a ausência de caixa d'água nas residências. O município de Santa Cruz sofre constantemente com a falta de água em suas casas fazendo com que a população economize e armazene a água que chega a suas residências. Aqueles que não têm caixa d'água costumam armazenar a água em tanques semi-abertos com o intuito de aproveitar também a água da chuva que escorre pelo telhado da casa. Porém esses tanques ficam sujeitos a contaminação ambiental. Os voluntários desse estudo que possuíam gato relataram que seu animal defecava fora de casa (42%), e inclusive em

cima dos telhados. Os oocistos presentes nas fezes que se encontram no telhado podem ser carregados pela chuva e ser depositados nestes tanques, o que pode torná-lo uma fonte de infecção caso essa água venha a ser consumida sem tratamento adequado pelo indivíduo. No Paraná, o consumo de água não originada do sistema de abastecimento público implicou em um maior risco de infecção por *T. gondii* (Dias et al. 2011), e resultado semelhante também foi encontrado em São Paulo, onde a falta de tratamento (filtração) da água para consumo aumentou em 4,5 vezes o risco de adquirir a infecção (Galisteu et al. 2007).

Nesse estudo, a análise multivariada não mostrou associação entre a toxoplasmose e a presença de gatos nas residências e, tal resultado, se encontra de acordo com outros estudos realizados no Brasil (Porto et al. 2008; Cook et al. 2000; Brisighelli, 1998; Silva et al. 2014). Entretanto a quantidade de gatos presentes na residência mostrou valores significativos, aumentando o risco de infecção por *T. gondii*, principalmente, quando existem mais de 3 gatos na casa. Nossos dados são similares a um estudo realizado nos EUA, onde o aumento no risco de infecção associado à exposição a gatos foi limitado aos entrevistados que tiveram três ou mais animais (Jones et al. 2009). Existem poucos trabalhos que relacionam o número de gatos com a toxoplasmose em humanos. Porém, em fazendas de caprinos, onde há o costume de criar gatos para evitar a infestação de roedores, foi observado que a infecção é 1,7 vezes mais frequente no rebanho quando existem mais de 10 gatos na fazenda (Cavalcante et al. 2008). Da mesma forma, em fazendas de gado foi observado que a infecção duplica no rebanho quando existem mais de 3 gatos (Albuquerque et al. 2011). O mesmo foi observado em fazendas de suínos onde a alta prevalência ocorria em solos altamente contaminados com oocistos. O estado de contaminação do solo foi significativamente influenciado pela densidade de população de gatos (Du et al. 2012). O maior número de gatos pode estar associado ao maior número de oocistos liberados no domicílio e peridomicílio, que pode refletir em um aumento no risco de infecção. Medidas de higiene apropriadas tais como eliminação correta das fezes dos gatos, limpeza frequente das caixas de areia e alimentar os gatos com produtos industrializados ou carne cozida reduzem risco de infecção (Jones et al. 2001).

O consumo de leite cru / não pasteurizado parece não ser um hábito comum no município de Santa Cruz, uma vez que apenas 12,8% dos voluntários relataram ter esse hábito alimentar. Contudo, 76,1% desses voluntários que costumam beber leite cru mostraram sorologia positiva para a toxoplasmose, apresentando uma associação

significativa com a infecção por *T. gondii* após análise multivariada. É provável que nestes casos ocorra infecção pela ingestão de taquizoítos (contaminação do leite de ruminantes em fase aguda de toxoplasmose) ou de oocistos no leite devido à contaminação externa do leite por falta de higiene pelos profissionais responsáveis pela ordenha.

A transmissão de *T. gondii* pela ingestão de leite cru/não pasteurizado de cabras com toxoplasmose por seres humanos já foi descrita na literatura (Riemann et al. 1975; Sacks et al. 1982; Chiari e Neves, 1984). Entretanto o parasito também já foi isolado do leite de cabras experimentalmente infectadas com até 434 dias de infecção (Vitor et al. 1991). Em São Paulo, a ingestão de leite de vaca não pasteurizado foi observada em 19,4% da população estudada, e a exposição para este fator mostrou diferenças estatísticas significantes entre as mulheres infectadas e não-infectadas (Galisteu et al. 2007). Resultados semelhantes também foram encontrados em Tocantins (Silva et al. 2014) e no Rio de Janeiro (Moura et al. 2013) e tais dados observados em diferentes estados servem de alerta para a vigilância sanitária melhorar a inspeção do leite comercializado. Em metanálise publicada recentemente foi observado que a ingestão de leite de bovinos não está diretamente associada à aquisição de toxoplasmose. Por outro lado, o autor observou associação entre toxoplasmose e ingestão de leite de caprinos (Boughattas 2015).

Nosso estudo, pioneiro na região, e outros trabalhos realizados no Brasil com abordagem semelhante mostram a importância da toxoplasmose na saúde pública. Os dados obtidos nesse trabalho poderão contribuir com a saúde pública do município de Santa Cruz permitindo estabelecer programas de controle, particularmente para as gestantes.

CAPÍTULO 2

INCIDÊNCIA DA TOXOPLASMOSE NO MUNICÍPIO DE SANTA CRUZ – RN NO PERÍODO DE 2014 A 2015.

4.1. INTRODUÇÃO

Em epidemiologia, as medidas de frequência de uma doença mais comumente utilizadas enquadram-se em duas grandes categorias: prevalência e incidência. A prevalência determina a proporção de indivíduos que estão acometidos de uma doença em um determinado momento do tempo. É, portanto, uma medida estática relacionada a um ponto no tempo, mesmo que a coleta de dados ocorra em dias, meses ou até anos. Já a incidência é dinâmica e refere-se ao número de novos eventos ou casos novos que ocorrem em uma população de indivíduos em risco durante um determinado período de tempo (Wagner 1998).

Em estudos observacionais é comum que os indivíduos em seguimento não sejam acompanhados por períodos uniformes de tempo. Alguns são seguidos por meses, outros por anos e outros ainda podem ser perdidos do seguimento. Assim, para levar em conta os períodos variáveis do seguimento e aproveitar o máximo de informação disponível utiliza-se uma medida específica chamada taxa de incidência, também conhecida como densidade de incidência. Essa medida é considerada como a taxa instantânea de desenvolvimento da doença por unidade de tempo. Para ser calculada temos no numerador o número de novos casos em um determinado tempo e no denominador a soma do tempo em que cada indivíduo foi observado se encontrando livre da doença (Wagner 1998).

Como descrito anteriormente, a toxoplasmose é uma infecção que, geralmente, se apresenta assintomática em indivíduos imunocompetentes e pode induzir uma resposta imune em longo prazo a qual é suficiente para prevenir a transmissão transplacentária do parasito (Petersen 2007). Para analisar a taxa de incidência dessa infecção, as informações sorológicas dos indivíduos podem ser utilizadas. Anticorpos IgM são produzidos durante o início da infecção e diminuem mais rapidamente do que o IgG e são frequentemente a primeira classe de anticorpos detectada após infecção primária (Motoya 2002). Assim, se a soroconversão for detectada em amostras seriadas de soro, a infecção primária é confirmada no período entre a última amostra negativa e a primeira amostra positiva.

No entanto, um resultado positivo para IgM pode ser interpretado como um verdadeiro-positivo em infecção aguda, um verdadeiro-positivo em infecção crônica ou como um falso-positivo, isto é, positivo para IgM (a IgM detectada é inespecífica para *T. gondii*) mas negativo para IgG específica para *T. gondii* (IgM⁺/IgG⁻). Neste último caso o resultado pode ser influenciado pela presença do fator reumatóide ou

autoanticorpo. Esses autoanticorpos circulantes, que podem ser da classe IgM ou IgG, são reativos contra a porção Fc (e raramente porção Fab) de suas próprias moléculas de IgG (Laurent et al. 2015), o que leva a alteração nos resultados em ensaios sorológicos. Assim, a remoção desse fator pode mostrar a real presença de anticorpos IgM específicos para *T. gondii*. Além da pesquisa de IgM, a baixa avidéz encontrada para anticorpos IgG pode complementar a informação sobre a infecção, uma vez que esta propriedade do anticorpo também é considerado marcador de toxoplasmose recente.

A incidência é bastante utilizada em estudos que avaliam a associação entre uma doença e potenciais fatores de risco, podendo ser aplicada para avaliar a efetividade de programas de prevenção e controle de doenças (Wagner 1998). A Áustria e a França foram os primeiros países a estabelecer programas de triagem pré-natal da toxoplasmose, em 1975, com monitoramento sorológico trimestral e, em 1976, com o monitoramento sorológico mensal (Aspöck e Pollack 1992; Gilbert e Gras 2003), ambos com o objetivo de instituir medidas preventivas para mulheres soronegativas e assegurar tanto o diagnóstico como o tratamento precoce da infecção adquirida durante a gestação (Lopes-Mori et al. 2011).

Outros países, como a Eslovênia, a Alemanha, a Suíça, a Itália e a Bélgica, também realizam uma extensa triagem durante a gravidez, mas tal triagem não se estende a todo o território desses países (Lebech et al. 1999). O mesmo acontece no Brasil, onde a triagem pré-natal é sugerida como política pública não obrigatória devido à elevada prevalência da toxoplasmose materna (superior a 40%), sendo oferecida gratuitamente em algumas regiões (como Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Curitiba – PR e Porto Alegre – RS), com experiência isolada e protocolos próprios, mas sem uniformidade nas ações (Lopes-Mori et al. 2011).

A análise da incidência de toxoplasmose por meio de pesquisa de anticorpo IgM, soroconversão e/ou baixa avidéz de IgG tem sido mostrada em diferentes regiões do Brasil. Usando a pesquisa de avidéz de IgG, associado com PCR em líquido amniótico, Varella e colaboradores (2009) observaram que, em 44.112 gestantes, a prevalência de toxoplasmose aguda foi de 4,8/1000 mulheres do Rio Grande do Sul. Em outro estudo, das 1151 gestantes do Estado do Paraná, positivas para IgG anti *T. gondii*, 29 (1,3%) delas também apresentavam IgM. Entretanto, todas as gestantes IgM positivas apresentavam IgG de alta avidéz; indicativo de infecção tardia (Lopes-Mori et al. 2011). Um estudo realizado em gestantes de Porto Alegre – RS mostrou que os recém-nascidos, cujas mães tinham alta avidéz de IgG, apresentaram sorologia negativa para

IgM. Entretanto aqueles cujas mães tinham baixa avidéz de IgG e alto índice de IgM se mostraram infectados por *T. gondii*, onde o IgM presente no neonato tornou-se o marcador sorológico da transmissão transplacentária (Reis et al. 2006). Embora a presença do IgM seja um parâmetro usado para infecção aguda, algumas mulheres podem ser falso-positivas e ser submetidas, desnecessariamente, ao tratamento antiparasitário (Reis et al. 2006). Uma elevada avidéz do anticorpo IgG no 1º trimestre de gravidez exclui infecção recente, dispensando o tratamento. Por outro lado, uma baixa avidéz de IgG anti – *T. gondii* não é conclusivo de toxoplasmose aguda (Petersen 2007).

Como a incidência e a prevalência da toxoplasmose variam entre diferentes regiões em um mesmo país, torna-se imprescindível obter dados epidemiológicos regionais para implantação de programas de controle.

4.2. OBJETIVOS

- Estimar a prevalência da infecção recente por *T. gondii* através da pesquisa de anticorpos IgM e avidéz de IgG em voluntários do município de Santa Cruz – RN;
- Determinar a taxa da incidência da toxoplasmose no município por soroconversão de IgG;
- Determinar a presença de associação da soroconversão de IgG com os fatores de riscos relacionados à infecção por *T. gondii* encontrados na população deste município de acordo com o Capítulo 1.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. Área de estudo

Os voluntários residem no município de Santa Cruz, estado do Rio Grande do Norte. As características tanto do município como do estado se encontram descritas no capítulo 1.

4.3.2. Processo amostral

Após determinar a soroprevalência da toxoplasmose no município de Santa Cruz através da pesquisa por IgG (descrito no capítulo 1), uma triagem por soros positivos para IgM foi realizada em todas as amostras. Também foi realizada uma avaliação da avidéz do anticorpo IgG em todas amostras positivas para IgG (identificadas conforme o capítulo 1). Aqueles voluntários positivos apenas para IgM (IgM^+/IgG^-) e aqueles que apresentaram sorologia negativa tanto para IgG como para IgM (IgM^-/IgG^-) foram acompanhados por um ano. Durante esse período foram realizadas mais duas coletas com intervalo de aproximadamente 6 meses. Estes participantes soronegativos para IgG (IgM^-/IgG^- e IgM^+/IgG^-) foram esclarecidos sobre os objetivos e importância do acompanhamento, bem como dos benefícios e riscos. Aqueles que aceitaram participar assinaram um *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido* (Anexos F e G) de acordo com a resolução nº 466/12 do conselho nacional de saúde do Ministério de Saúde – Brasília – DF, e responderam a um questionário relacionado aos fatores de risco. As pessoas que não aceitaram participar foram contabilizadas pelo Termo de Recusa (Anexo C). Todo o procedimento foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (parecer nº 1.206.336 – Anexo H).

4.3.3. Coleta de dados

As informações foram obtidas por meio de entrevistas utilizando-se um questionário (Anexo I) adaptado daquele aplicado aos voluntários do capítulo 1. A aplicação do questionário foi restrita aos voluntários soronegativos para IgG (IgM^- / IgG^- e IgM^+ / IgG^-). O questionário continha questões sobre:

- Variáveis individuais (comportamentais): manipulação do solo, ingestão de salada crua, de carne mal passada e de leite cru.
- Características da residência: aquisição de felinos durante o período de acompanhamento.

Questões sobre transplantes de órgãos, transfusão sanguínea e ocorrência de aborto também foram mantidas no questionário.

4.3.4. Coleta da amostra de sangue

A coleta de sangue foi realizada como descrita no capítulo 1 (item 3.3.4) e ocorreu apenas nos voluntários soronegativos (para analisar a incidência) e IgM⁺/IgG⁻ (para confirmar ou descartar uma possível infecção). O procedimento foi realizado duas vezes durante um ano para cada voluntário resultando, no máximo, em três amostras de soro por participante. O soro obtido foi armazenado a -20°C até a realização do ensaio imunoenzimático para análise de IgM e IgG anti – *T. gondii*.

4.3.5. Análise sorológica

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram realizados no Laboratório de Toxoplasmose localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os 1540 soros dos participantes, descritos no capítulo anterior, foram testados através do ELISA para a detecção de anticorpos IgM específicos para *T. gondii* (padronizado neste trabalho). Com intuito de diferenciar as infecções recentes e crônicas foi realizado um ELISA para avaliar a avidéz do anticorpo IgG. Tal ensaio sorológico foi realizado apenas nas amostras IgG positivas. A soroconversão foi avaliada usando o ELISA IgG já descrito no Capítulo 1.

4.3.5.1. Teste de ELISA indireto para avaliação de anticorpos IgM

Para a pesquisa de anticorpos IgM foi usada a metodologia de ELISA indireto, semelhante ao descrito para pesquisa de anticorpos IgG no capítulo 1, exceto pelo uso de conjugado anti IgM humano. Para se determinar a concentração ideal para os soros e o conjugado, foi realizada uma avaliação prévia de duas diluições de soro (1:50 e 1:100) e três diluições de conjugado anti – IgM marcado com peroxidase (Sigma – Aldrich: human anti IgM - A6907) - 1:500, 1:1000 e 1:2000. O ELISA-IgM foi padronizado utilizando soros de recém nascidos, com e sem toxoplasmose congênita (Vasconcelos-Santos et al 2009). Das 190 amostras de soro IgM positivos foram selecionadas oito como controle positivo para padronizar o ELISA-IgM deste estudo. Entre os 45 recém nascidos, em que foi descartada a toxoplasmose congênita, amostras de soro de sete crianças positivas para IgG e negativas para IgM foram usadas como controle negativo na padronização do ELISA-IgM. Nestes 45 recém nascidos ocorreu apenas a

transmissão de IgG materna pela placenta pois, após 12 meses de vida, todos eram soronegativas para toxoplasmose e não apresentavam sinais clínicos da doença (Vasconcelos-Santos et al. 2009).

Os dados absolutos de absorvância, à 490nm, em duplicata dos oito soros positivos e sete negativos foram transformados em média. O “signal-to-ratio” (razão S/N), foi calculado pela divisão da média de absorvância dos soros positivos pela média de absorvância dos soros negativos (Rajasekariah et al. 2001). Considerou-se como ponto ótimo os valores de S/N mais elevados obtidos nas diferentes diluições de soro e conjugado.

O ELISA-IgM realizado nas amostras de soro dos 1540 voluntários, de forma semelhante ao ELISA-IgG, teve seu *cut off* calculado pela média das absorvâncias de seis amostras de soro negativo para IgM anti-*T. gondii* mais três desvios-padrões em cada placa. A média da absorvância das amostras testadas em duplicata foi dividido pelo valor do *cut off* da placa com o objetivo de determinar o índice de reatividade (IR). Os soros que apresentaram os valores de $IR > 1,1$ foram considerados positivos. Àqueles que apresentaram um valor indeterminado, ou seja, com o valor de IR entre 0,9 e 1,1 foram testados novamente para confirmação do resultado.

4.3.5.2. Pesquisa de Fator Reumatóide

Para analisar a presença de fator reumatóide nas amostras de soros dos participantes positivos para IgM foi utilizado o kit Biolátex FR da marca Bioclin. O protocolo seguiu aquele descrito pelo fabricante, onde 20 μ L do soro do participante foram adicionados a 20 μ L do reagente (suspensão de látex revestida com IgG humana) presente no cartão-teste. Após 2 minutos em movimento circular foi realizada a leitura do cartão-teste.

4.3.5.3. Teste de ELISA para avaliação da avidéz de anticorpos IgG

Para avaliar a avidéz foi utilizada a uréia (6M) como agente dissociante da ligação antígeno-anticorpo. A técnica foi realizada de acordo com protocolo descrito por Colombo (2005), com algumas modificações.

As placas foram sensibilizadas e lavadas como descrito para ELISA-IgG no capítulo 1. Após secagem das placas, os soros previamente diluídos em PBS-T/Caseína 0,25% (diluição 1:100), foram distribuídos nos poços da placa. Os soros foram organizados em duas séries duplicadas na mesma placa, de tal forma que a metade da

placa (colunas 1 a 6) foi uma réplica idêntica da outra metade (colunas 7 a 12). Após adicionar os soros, a placa foi incubada por 45 minutos a 37°C. Em seguida, os soros foram desprezados e a placa foi submetida a uma série de quatro lavagens. A primeira lavagem foi realizada em todos os poços utilizando SST. Na segunda lavagem foram utilizadas duas soluções, uma composta por PBS-T/Caseína 0,25% a qual foi adicionada as colunas de 1 a 6 (100µL/poço), e outra composta por uréia 6M (em PBS-T/Caseína 0,25%), a qual foi adicionada as colunas de 7 a 12 (100µL/poço). Essa lavagem ocorreu sob agitação (300rpm) por 5 minutos. As outras duas lavagens também ocorreram sob agitação por 5 minutos, porém em todos os poços foi adicionada a solução PBS-T/Caseína 0,25%.

Após as lavagens, foi adicionado em cada poço da placa 100µl do conjugado humano anti-IgG marcado com peroxidase (Sigma – Aldrich: human anti IgG - A6029). O conjugado foi previamente diluído em PBS-T/Caseína 0,25%, na proporção de 1:5000. A partir da adição do conjugado o procedimento foi idêntico ao descrito anteriormente para o teste de ELISA convencional descrito no capítulo 1.

A avidéz do anticorpo IgG foi calculada como a razão entre a absorbância média para cada soro obtida nos poços tratados com uréia (AU) pela absorbância média dos poços não tratados (A) expressos em porcentagem: $AU/A \times 100$ (Cozon et al. 1998). Segundo Buery e colaboradores (2014), valores de avidéz $\geq 50\%$ indicam toxoplasmose crônica, enquanto valores $< 50\%$ sugerem infecção recente. Outros autores também tem utilizado este ponto de corte (50%) na interpretação da avidéz de anticorpos IgG (Holliman 1994; Robert-Gangneux 1998; Mechain et al. 2000; Colombo et al. 2005; Montoya 2002; Mattos et al. 2011).

4.3.5.4. Ensaio imunoenzimático para avaliar a soroconversão de anticorpos IgG

Para analisar a soroconversão dos participantes acompanhados nesse estudo foi realizado um ensaio sorológico para detecção de IgG. Seguiu-se o mesmo protocolo descrito no capítulo 1.

4.3.6. Análise estatística

O programa Epidata (versão 3.1) foi utilizado para gerar um banco de dados com base nas informações obtidas nos questionários e nos resultados sorológicos. Para análise dos dados foi utilizado o programa STATA versão 10.0. Para a análise epidemiológica do tipo longitudinal foi utilizado o modelo de regressão de Cox, que permite a análise de dados provenientes de estudos de tempo de vida, em que a resposta é o tempo até a ocorrência de um evento de interesse (Colosimo e Giolo 2006). Este modelo fornece as estimativas das razões de risco. O tempo de sobrevivência foi contado a partir do estudo transversal, considerado tempo zero. Na análise univariada, foram comparadas todas as variáveis do estudo, sendo selecionadas para compor o modelo inicial aquelas que apresentaram associação estatística ($p < 0,25$). Para análise multivariada utilizou-se o nível de significância de 0,05, isto é, as variáveis que apresentaram $p > 0,05$ foram retiradas do modelo passo a passo. As taxas de incidência foram estimadas para cada momento de avaliação da coorte. Nos denominadores das taxas foram utilizados pessoa-tempo de acompanhamento e intervalo de confiança de 95%.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Análise da prevalência da infecção por *T. gondii* através da pesquisa de IgM

Para padronizar o ELISA-IgM foram utilizados soros de oito crianças com toxoplasmose congênita (IgM positivas pelo teste ELFA-VIDAS) e sete soros de crianças sem toxoplasmose congênita (IgM negativas). Após testar as diferentes diluições (Figura 8) concluiu-se que as melhores concentrações de soro e de conjugado com capacidade de melhor distinguir os soros IgM positivos dos IgM negativos foi de 1:50 e 1:500, respectivamente (S/N = 9,1).

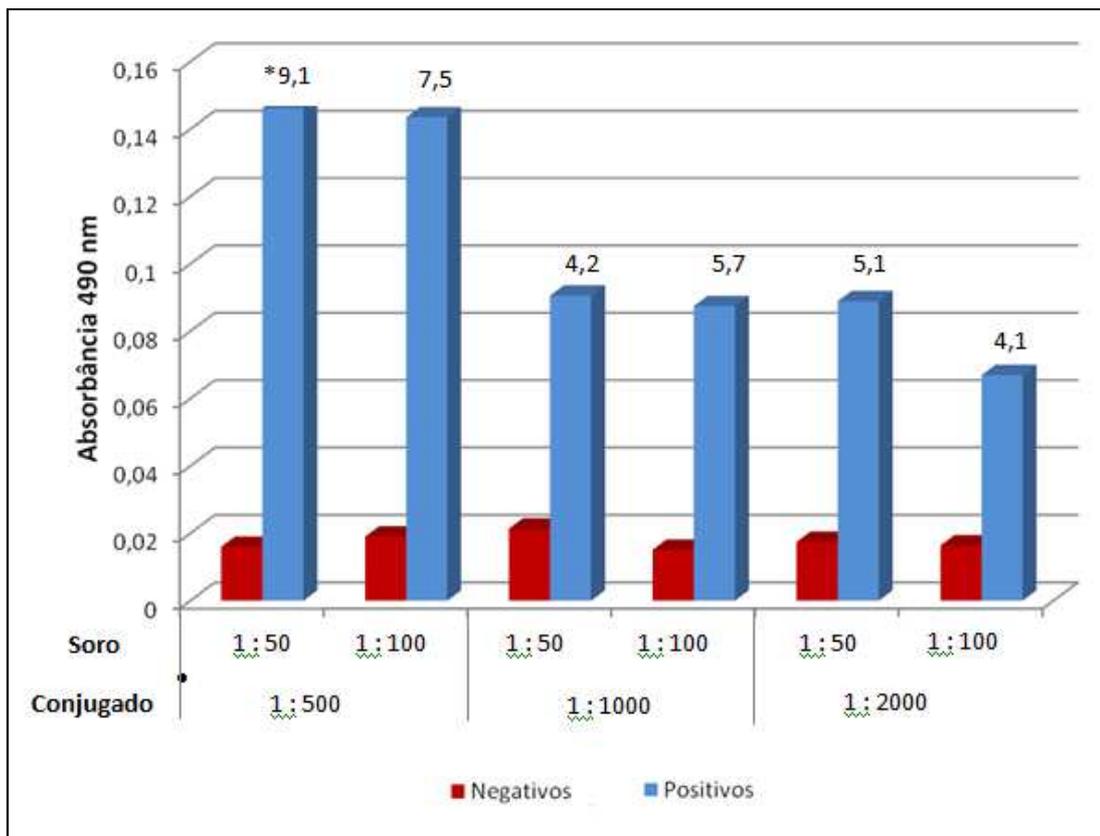


Figura 8. Concentração ideal de soro e de conjugado utilizados no ELISA-IgM. Os valores acima das colunas (**signal-to-ratio* - S/N) indicam a razão entre a média de absorbância de oito soros positivos (azul) pela média da absorbância de sete soros negativos (vermelho). Optou-se pelas diluições com maior valor S/N, ou seja, S/N = 9,1.

Após padronização do ELISA para detectar anticorpos IgM anti-*T. gondii* e aplicação desse protocolo nas amostras de soro, observou-se que dos 1540 voluntários, 70 (4,5%) foram positivos para ELISA-IgM. Destes, nove também foram positivos para o fator reumatóide, sendo excluídos das análises de prevalência. Todos os nove voluntários positivos para o fator reumatóide eram provenientes da área Paraíso (Tabela 18). Soros de 55 (3,6%) dos 1540 voluntários apresentaram resultado inconclusivo pelo ELISA-IgM (IR entre 0,9 e 1,1) mesmo após repetição do teste e não tiveram seus dados inseridos em qualquer uma das análises de prevalência de anticorpos IgM anti-*T. gondii*. Sendo assim, 61 voluntários (4,0%) apresentaram sorologia conclusiva positiva para IgM, onde o IR foi superior a 1,1. Desses voluntários, 26,2% (16/61) apresentaram resultado IgM positivo e IgG negativo, e 73,8% (45/61) apresentaram sorologia positiva tanto para IgM como para IgG (Tabela 18).

Tabela 18. Distribuição dos voluntários IgM⁺ por área no município de Santa Cruz – RN. A presença do fator reumatóide foi observada em 9 amostras.

Área / Sorologia	IgM ⁺ / IgG ⁺	IgM ⁺ / IgG ⁻	Presença do Fator Reumatóide
Centro	13	2	0
Paraíso	24	8	9
DNER	3	1	0
Maracujá	0	2	0
Cônego Monte	5	3	0
TOTAL	45	16	9

Daqueles 16 participantes com sorologia positiva apenas para IgM, três aceitaram o acompanhamento sorológico por um ano para detecção de IgG, permitindo confirmar a infecção por *T. gondii*, isto é, todos os três voluntários apresentaram conversão sorológica para IgG após um ano de avaliação. A avidéz de IgG nessas amostras mostrou uma variação de 68,9% a 86,4% (alta avidéz, compatível com toxoplasmose crônica). Esses soros tinham um intervalo de 6 meses entre a primeira amostra negativa e a segunda positiva para IgG. Após 12 meses da primeira coleta, o IgM ainda se mostrava presente nesses três voluntários. Quando caracterizados em relação aos cinco fatores de risco identificados no capítulo 1, observou-se que os três voluntários

acompanhados tinham em suas residências caixa d'água (apenas um voluntário relatou ausência de tampa na caixa d'água), não possuíam gatos em suas residências e não ingeriam leite cru. Porém esses voluntários apresentavam baixo grau de escolaridade e idade superior a 30 anos, o que aumenta significativamente a chance de adquirir a infecção (Tabela 19). Os três voluntários eram do sexo feminino.

Tabela 19. Características dos três voluntários IgM⁺ / IgG⁻ (acompanhados por um ano para confirmação da soroconversão de IgG) e de suas respectivas residências em relação aos fatores de risco identificados no município de Santa Cruz – RN.

Voluntário	Idade (anos)	Grau de escolaridade	Presença de caixa d'água	Quantidade de gatos	Ingestão de leite cru
1	51	Até a 8 ^a série	Sim	Nenhum	Não
2	39	Até 4 ^a série	Sim	Nenhum	Não
3	45	Analfabeto	Sim	Nenhum	Não

4.4.2. Identificação, pela análise da avidéz de IgG, das infecções recentes e crônicas causadas por *Toxoplasma gondii*

A classificação da infecção por *T. gondii* em recente e crônica nos voluntários com sorologia IgM/IgG⁺ baseou-se na avidéz do anticorpo IgG. A análise mostrou que 2% dos voluntários apresentaram indícios de infecção recente, ou seja, a avidéz de IgG foi inferior a 50%. A maioria dos voluntários (69%) apresentou avidéz superior a 81% (Figura 9), indicando que um número significativo de participantes se encontra em estado crônico da infecção.

Dos 45 voluntários que apresentaram sorologia positiva tanto para IgM como para IgG (IgM⁺/IgG⁺), apenas 2% apresentaram características de infecção recente, ou seja, além da presença de IgM a avidéz do anticorpo IgG foi inferior a 50% (Figura 10).

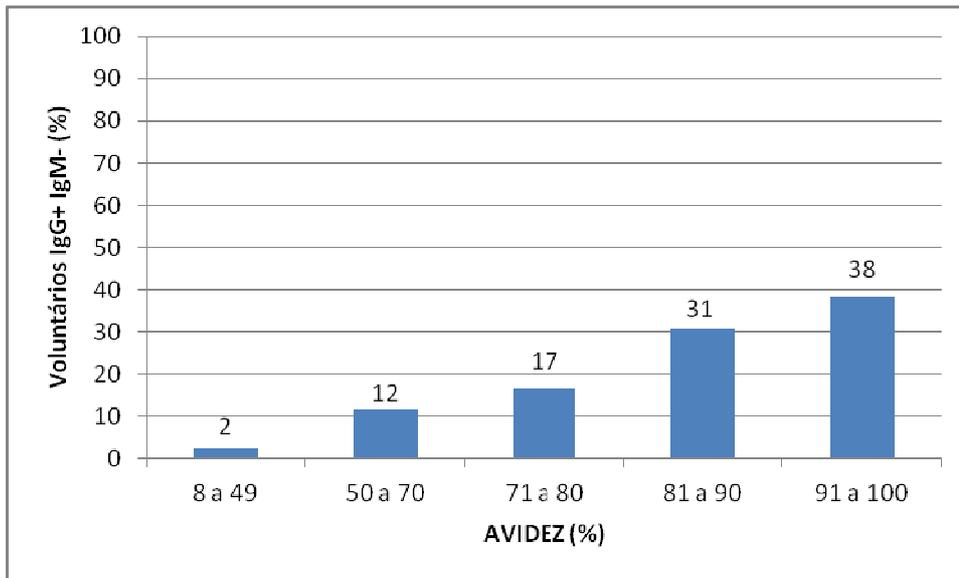


Figura 9. Frequência de voluntários IgG⁺/IgM⁻ que se encontra com infecção recente (avidez < 50 %) e com infecção crônica (avidez ≥ 50%) por *Toxoplasma gondii*.

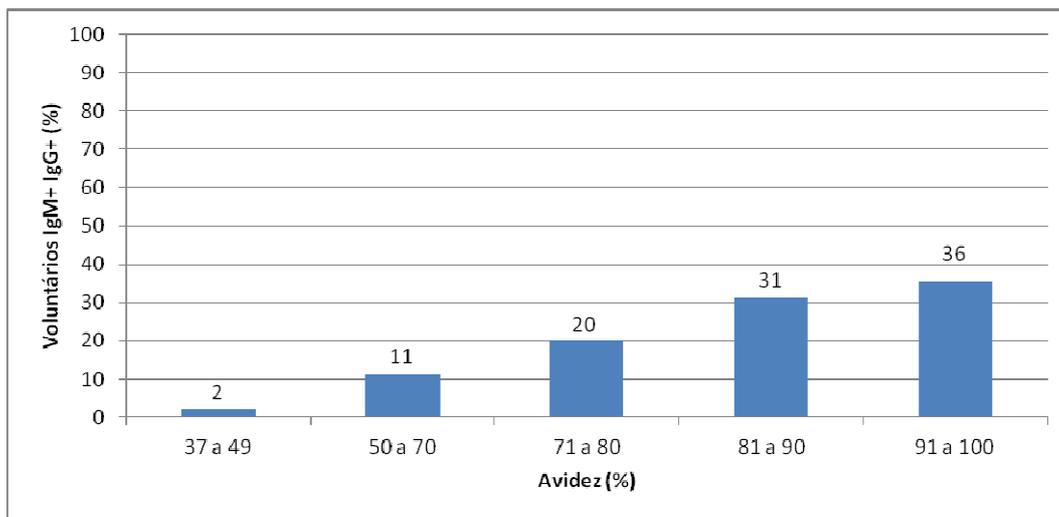


Figura 10. Frequência de voluntários IgG⁺/IgM⁺ que se encontra com infecção recente (avidez < 50 %) e com infecção crônica (avidez ≥ 50%) por *Toxoplasma gondii*.

4.4.3. Análise da incidência da toxoplasmose pela soroconversão de IgG

4.4.3.1. Distribuição dos voluntários soronegativos por área e por coleta

Para análise da taxa de soroconversão foram selecionados 520 voluntários soronegativos para ELISA-IgG cujas informações sorológicas foram obtidas a partir dos resultados do capítulo 1. Desses voluntários, 387 (74,4%) aceitaram o acompanhamento sorológico, porém, apenas 237 participantes se encontravam em suas residências no momento das visitas domiciliares, possibilitando a segunda coleta (Figura 11; Tabela 20).

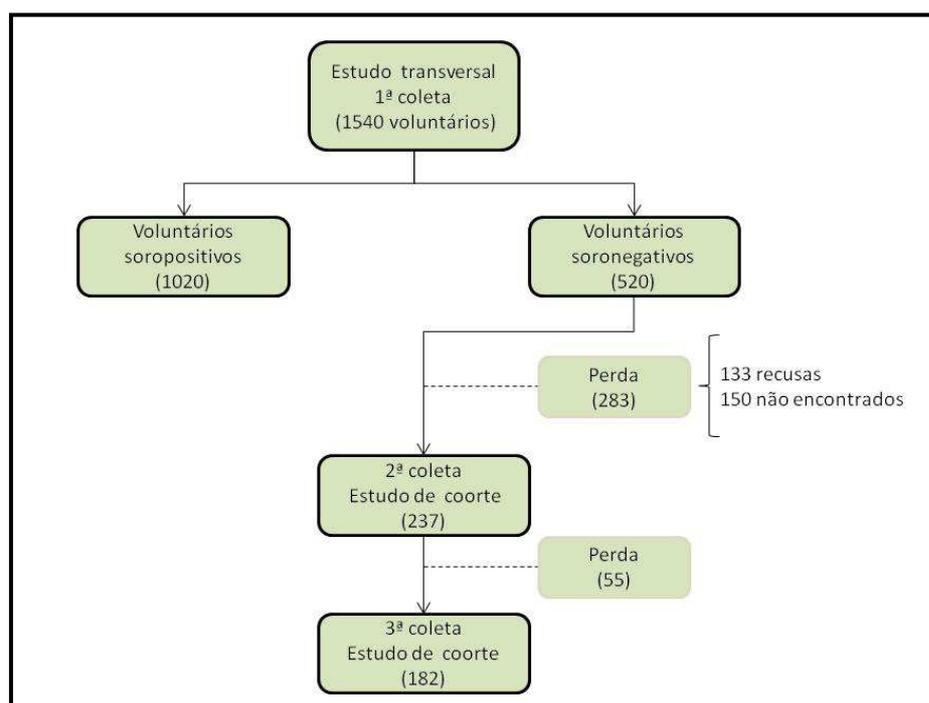


Figura 11. Delineamento do estudo para análise de soroconversão de IgG

Tabela 20. Distribuição dos voluntários soronegativos por área e pelo número de coletas posteriores no município de Santa Cruz – RN.

Área	Número de pessoas (%)		
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Centro	48 (12,4)	32 (13,5)	31 (17,0)
Paraíso	169 (43,7)	72 (30,4)	60 (33,0)
Cônego Monte	60 (15,5)	57 (24,0)	35 (19,2)
Maracujá	43 (11,1)	40 (16,9)	26 (14,3)
DNER	67 (17,3)	36 (15,2)	30 (16,5)
Total	387	237	182

4.4.3.2. Características dos voluntários acompanhados (N = 237)

A amostra foi composta por 80,6% de voluntários do sexo feminino e 19,4% do sexo masculino. A maioria (58,2%) apresentou idade igual ou superior a 30 anos e 63,7% dos voluntários tinham grau de escolaridade inferior a 8ª série do ensino fundamental. Para a análise estatística, as cinco áreas do município de Santa Cruz foram reorganizadas em duas categorias de acordo com a prevalência da toxoplasmose. Assim, 43,9% dos voluntários residiam na área Centro / Paraíso (prevalência de toxoplasmose entre 67,7% a 70,2%) e 56,1% residiam na área Cônego / Maracujá / DNER (prevalência de toxoplasmose entre 59,2% a 64,1%) (Tabela 21).

4.4.3.3. Características das residências dos voluntários (N = 219)

A visita foi realizada em 219 residências cuja renda familiar predominante foi de até 2 salários mínimos. As residências apresentavam, em sua maioria, piso revestido por cerâmica ou cimento, e 89,9% das residências apresentavam quintal cuja limpeza era realizada diariamente. O quintal com piso misto, ou seja, parte composto por areia/barro/terra e parte por cimento/cerâmica, foi observado em 50,2% das casas. A presença de caixa d'água foi observada em 92,4% das residências, das quais 58,6% eram cobertas. Em relação ao número de gatos foi observada a presença de 1 a 2 gatos em 48,7% dos domicílios visitados (Tabela 22).

Tabela 21. Características individuais dos voluntários acompanhados no município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.

Variáveis	N = 237	%
Sexo		
Feminino	191	80,6
Masculino	46	19,4
Área		
Centro / Paraíso	104	43,9
Cônego / Maracujá / DNER	133	56,1
Idade		
≥ 13 e < 30	99	41,8
≥ 30	138	58,2
Grau de escolaridade		
< 8ª série do ensino fundamental	151	63,7
≥ 8ª série do ensino fundamental	86	36,3

Tabela 22. Características das residências dos voluntários acompanhados no município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.

Variáveis	N = 219	%
Renda familiar		
Até 2 salários	171	78,3
Acima de 2 salários	48	21,7
Piso da casa anterior *		
Cimento, cerâmica	185	84,4
Barro, terra, areia	17	7,8
Não se aplica	17	7,8
Quintal		
Sim	196	89,9
Não	23	10,1
Piso do quintal		
Cimento ou cerâmica	109	49,8
Misto	110	50,2
Limpeza do quintal		
Diariamente	158	72,3
Semanalmente	52	23,5
Esporadicamente	9	4,2
Tem caixa d'água		
Sim	202	92,4
Não	17	7,6
A caixa d'água é coberta		
Sim	129	58,6
Não	90	41,1
Tem ou teve gato		
Sim	115	48,5
Não	104	51,5
Quantos gatos têm atualmente		
Nenhum	46	40
1 – 2	56	48,7
> 3	13	11,3

* Para quem relatou ter morado em outra casa.

4.4.3.4. Aspectos comportamentais e alimentares dos voluntários (N = 237)

A ingestão de salada crua foi relatada por 85,6% dos voluntários, dos quais 47,3% tinham o hábito de ingerir essa salada fora de casa. A manipulação do solo foi relatada por 19,4% dos voluntários, e destes, 16,4% não usavam luvas durante a atividade. Em relação a fonte de água para consumo, 63,3% dos voluntários bebiam água sem nenhum tipo de tratamento (fervura ou filtração), e a maioria dos participantes (69,2%) já havia consumido água proveniente principalmente de poço. Poucos relataram ter utilizado para consumo água de rio (3,4%), de caminhão pipa (2,5%) e de açude (3%). A ingestão de leite cru / não pasteurizado de gado foi relatada por 6,3% voluntários (Tabela 23).

A ingestão de carne crua ou mal passada foi relatada por 19,8% dos voluntários, os quais preparavam a carne no mesmo dia em que compravam. A carne bovina crua ou mal passada foi a mais citada, sendo consumida por todos os participantes que relataram ter esse comportamento alimentar (Tabela 23).

A maioria dos 115 voluntários que tinha gato relatou que seu animal ficava dentro e fora de casa, e que dormia em sua cama (15,5%) e na cadeira/sofá (36,1%). Os gatos (40,6%), geralmente, defecavam na rua e 45,6% dos participantes (que tinham ou não gato) declararam que esses animais entravam em suas casas. Aqueles gatos (11,9%) que defecavam numa caixa de areia dentro de casa tinham suas fezes retiradas pelos proprietários, que frequentemente não usavam luvas (Tabela 23).

Tabela 23. Características comportamentais e alimentares dos voluntários soronegativos acompanhados no município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.

Variáveis	N = 237	%
Variáveis relacionadas a ingestão de oocistos e taquizoítos		
Come salada crua		
Sim	203	85,6
Não	34	14,4
Come salada crua fora de casa		
Sim	112	47,3
Não	91	38,4
Não se aplica	34	14,3
Freq. come salada fora de casa		
Uma vez ou mais	32	1,0
Menos de uma vez	21	8,7
Não lembra	59	24,9
Não se aplica	125	52,7
Manipula terra		
Sim	46	19,4
Não	191	80,6

Como manipula a terra		
Com luvas	7	3,0
Sem luvas	39	16,4
Não se aplica	191	80,6
Água que bebe		
Torneira	150	63,3
Filtrada/Fervida	45	19,0
Mineral	42	17,7
Bebe/Bebeu água de poço		
Sim	164	69,2
Não	6	2,5
Não sabe	67	28,3
Bebe/bebeu água de rio		
Sim	78	3,4
Não	8	32,9
Não sabe	151	63,7
Bebe/bebeu água de caminhão pipa		
Sim	144	2,5
Não	6	60,8
Não sabe	87	36,7
Bebe/bebeu água de açude		
Sim	121	3,0
Não	7	51,0
Não sabe	109	46,0
Costuma beber leite cru/não pasteurizado		
Sim	15	6,3
Não	222	93,7
Variáveis relacionadas a ingestão de cistos		
Costuma comer carne crua		
Sim	47	19,8
Não	190	80,2
Como prepara a carne (apenas crua)		
Congela	27	11,4
Prepara no dia que compra	112	47,3
As duas opções	39	16,5
Não sabe	59	24,9
Costuma comer carne bovina crua/mal passada		
Sim	47	19,8
Não	0	0,0
Não se aplica	190	80,2
Costuma comer carne suína crua/mal passada		
Sim	14	5,9
Não	33	13,9
Não se aplica	190	80,2
Costuma comer carne de bode ou carneiro crua/mal passada		
Sim	10	4,2

Não	37	15,6
Não se aplica	190	80,2
Costuma comer carne de frango crua/mal passada		
Sim	19	8,0
Não	28	11,8
Não se aplica	190	80,2
Características comportamentais dos voluntários em relação a gatos		
Onde o gato ficava/fica*		
Dentro de casa	10	4,5
Dentro/fora de casa	105	48,0
Não se aplica	104	47,5
O gato dormia/dorme na cama*		
Sim	34	15,5
Não	81	37,0
Não se aplica	104	47,5
O gato dormia/dorme na cadeira*		
Sim	79	36,1
Não	36	16,4
Não se aplica	104	47,5
Você brincava/brinca com o gato		
Sim	76	34,7
Não	39	17,8
Não se aplica	104	47,5
As fezes do gato eram/são recolhidas		
Com luvas	5	2,5
Sem luvas	21	9,5
Não se aplica	193	88,0
O gato defecava/defeca na rua*		
Sim	89	40,6
Não	26	11,9
Não se aplica	104	47,5
Ver gatos na vizinhança		
Sim	222	93,7
Não	10	4,2
Não sabe	5	2,1
Os gatos entram na sua casa*		
Sim	100	45,6
Não	80	36,7
Não sabe	39	17,7

* Análise realizada por residência (N=219)

4.4.3.5. Sinais clínicos relatados pelos voluntários

A queixa na visão foi relatada por 76,4% dos voluntários. Nenhum participante realizou transplante de órgãos, porém 15 voluntários realizaram transfusão sanguínea (Tabela 24).

Tabela 24. Ocorrência de problemas de visão, transplantes de órgãos e transfusão de sangue nos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.

Ocorrência	N = 237	%
Tem queixas na visão		
Sim	181	76,4
Não	56	23,6
Fez algum transplante		
Sim	0	0,0
Não	237	100
Não respondeu	0	0,0
Fez transfusão		
Sim	15	6,3
Não	222	93,7
Não respondeu	0	0

4.4.3.6. Acompanhamento: segunda coleta

A obtenção da segunda amostra de sangue ocorreu 4 a 7 meses após a primeira coleta. Dos 387 voluntários, 237 (61,2%) se encontravam em suas residências possibilitando o acompanhamento sorológico. O ensaio imunoenzimático realizado identificou a soroconversão de IgG em 12 voluntários (5,1%). Um voluntário apresentou soroconversão após 4 meses e outro 5 meses após a primeira análise. A avidéz do anticorpo IgG nessas duas amostras foi de 27,6% e 40,5%, respectivamente, indicando infecção recente. No intervalo de tempo de 6 – 7 meses, após a primeira coleta, foi identificada a soroconversão em outros nove voluntários, cuja avidéz variou de 75,6% a 100%. Dos 12 voluntários, sete apresentaram sorologia positiva para IgM (Tabela 25). Apenas um participante, o voluntário 3 da tabela 25, apresentou soroconversão de IgM identificada na 2ª coleta de sangue, apesar de IgG negativa. Sua soroconversão foi confirmada posteriormente na 3ª coleta pela positividade para IgG.

Tabela 25. Características sorológicas dos voluntários do município de Santa Cruz – RN que apresentaram soroconversão no intervalo de 4 – 6 meses após a primeira análise.

Voluntário	Soroconversão	ELISA – IgM	Avidez - IgG (%)	Perfil sorológico
1	4 meses	Sim	27,6	Fase aguda
2	5 meses	Não	40,5	Fase aguda
3	6 meses	Sim	-	Fase aguda
4	6 meses	Não	75,6	Fase crônica
5	6 meses	Sim	80,7	Fase crônica
6	6 meses	Sim	86,2	Fase crônica
7	6 meses	Sim	86,5	Fase crônica
8	6 meses	Não	89,0	Fase crônica
9	6 meses	Sim	90,5	Fase crônica
10	6 meses	Não	90,8	Fase crônica
11	6 meses	Não	94,6	Fase crônica
12	6 meses	Sim	100	Fase crônica

4.4.3.7. Acompanhamento: terceira coleta

A terceira coleta da amostra de sangue ocorreu 6 meses após a segunda coleta e o acompanhamento sorológico continuou mesmo em pacientes que apresentaram soroconversão na segunda coleta. Participaram dessa última etapa 182 voluntários (47%) e o ensaio imunoenzimático realizado nessas amostras identificou a soroconversão em um voluntário (0,5%). O ELISA não detectou IgM no soro desse participante o qual apresentou IgG de alta avidéz (99,6%). O voluntário que apresentou sorologia positiva apenas para IgM na segunda coleta (voluntário 3 da tabela 25) também foi acompanhado nesse terceiro momento, e o ELISA identificou a presença de IgG cuja avidéz foi de 100%. Os outros voluntários que apresentaram soroconversão na coleta anterior exibiram nessa terceira análise a avidéz do IgG variando de 91% a 100% e o IgM ainda pôde ser detectado no soro de 2 desses voluntários. Ao final do estudo foram identificadas, portanto, 13 soroconversões.

4.4.3.8. Taxa de incidência

Avaliando os voluntários acompanhados, a incidência de infecção por *T. gondii* estimada foi de 8,2/1000 pessoas/mês no início do acompanhamento (0 a 7 meses). Na terceira coleta (acima de 7 meses) a incidência de infecção reduziu para 2,3/1000 pessoas/mês. A incidência geral, observada durante o estudo, foi de 6,8/1000 pessoas/mês (Tabela 26).

Tabela 26. Taxa de incidência da infecção por *Toxoplasma gondii* no município de Santa Cruz – RN.

Tempo (meses)	Tempo em risco (pessoa/mês)	Evento: soroconversão	Incidência x1000/mês	IC 95%
0 – 7	1458,5	12	8,2	4,6 – 14,5
> 7	228,9	1	2,3	0,3 – 16,5
Total	1887,4	13	6,8	4,0 – 11,9

4.4.4. Soroconversão associada aos fatores de risco relacionados à infecção por *T. gondii*

4.4.4.1. Características dos voluntários

Dos voluntários que apresentaram soroconversão 7 (53,8%) residiam na área Paraíso, 3 (23,1%) na área Cônego Monte, 2 (15,4%) na área Centro e 1 (7,7%) na área Maracujá. Desses voluntários, 11 (84,6%) eram do sexo feminino, 10 (77%) apresentavam idade superior a 30 anos, 10 (77%) cursaram até a 4ª série do ensino fundamental e apenas 1 (7,7%) relatou ingerir leite cru. Em relação as características das residências, 4 (31%) não tinham caixa d'água e 4 (31%) possuíam gatos, inclusive um das residências possuía 3 gatos (Tabela 27).

Tabela 27. Características dos voluntários que apresentaram soroconversão para anticorpos IgG anti – *Toxoplasma gondii* e de suas respectivas residências em relação aos fatores de risco identificados no município de Santa Cruz – RN.

Voluntário	Idade (anos)	Grau de escolaridade	Presença de caixa d'água	Quantidade de gatos	Ingestão de leite cru
1	20	Até a 8ª série	Não	1	Não
2	21	Até a 4ª série	Sim	Nenhum	Não
3	27	Até a 8ª série	Sim	Nenhum	Sim
4	34	Até a 4ª série	Sim	Nenhum	Não
5	40	Até a 4ª série	Sim	1	Não
6	50	Até a 4ª série	Não	Nenhum	Não
7	57	Analfabeto	Sim	Nenhum	Não
8	60	2º grau	Sim	Nenhum	Não
9	63	Até a 4ª série	Sim	Nenhum	Não
10	64	Analfabeto	Não	1	Não
11	71	Analfabeto	Não	3	Não
12	75	Analfabeto	Sim	Nenhum	Não
13	85	Analfabeto	Sim	Nenhum	Não

4.4.4.2. Modelo de Cox

4.4.4.2.1. Análise univariada das características individuais dos voluntários

Para esta análise foram selecionadas, inicialmente, as variáveis que tiveram nível de significância ($p < 0,25$) para compor o modelo inicial. Considerando as variáveis relacionadas às características dos voluntários, não se observou diferença entre os sexos, porém entre as áreas analisadas foi encontrada uma associação ($p < 0,25$) entre os voluntários que residem na área DNER / Maracujá / Cônego Monte e aqueles que residiam na área Centro / Paraíso. Associação também foi observada entre as categorias do grau de escolaridade, mostrando uma menor proporção de indivíduos infectados quando estes tinham, no mínimo, até a 8ª série do ensino fundamental. Além disso, foi observado que indivíduos com idade igual e acima a 30 anos apresentaram maior risco de adquirir a infecção quando comparados com aqueles cuja faixa etária era inferior a 30 anos (Tabela 28).

Tabela 28. Análise univariada das características dos 237 voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.

Variáveis	Univariada HR (IC95%)	P
Sexo		
Feminino		
Masculino	1,0 (0,2 – 4,7)	0,96
Área		
Centro / Paraíso		
DNER / Maracujá / Cônego	0,6 (0,3 – 1,1)	0,13
Idade (anos)		
≥ 13 e < 30		
≥ 30	1,5 (0,8 – 2,8)	0,24
Grau de escolaridade		
< 8ª série do ensino fundamental		
≥ 8ª série do ensino fundamental	0,5 (0,3 – 1,0)	0,05

4.4.4.2.2. Análise univariada das características das residências dos voluntários

Em relação às características das habitações, observou-se associação ($p < 0,25$) entre aquelas residências que possuíam quintais cujo piso era revestido por cimento ou cerâmica e aquelas que apresentavam um quintal com piso misto (Tabela 29).

Tabela 29. Análise univariada das características das 219 residências dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.

Variáveis	Univariada HR (IC95%)	P
Renda familiar		
Até 2 salários	1,0 (0,3 – 3,6)	0,96
Acima de 2 salários		
Piso da casa anterior *		
Cimento, cerâmica		
Barro, terra, areia	1,0 (0,1 – 7,4)	0,96
Quintal		
Não		
Sim	1,3 (0,3 – 6,0)	0,73
Piso do quintal		
Cimento ou cerâmica		
Misto	0,3 (0,0 – 1,3)	0,09
Limpeza do quintal		
Diariamente		
Semanalmente	0,3 (0,03 – 2,4)	0,26
Esporadicamente/Nunca	0,9 (0,1 – 8,8)	0,96

A caixa d'água é coberta		
Sim		
Não	0,7 (0,2 – 2,3)	0,55
Tem ou teve gato		
Não		
Sim	0,7 (0,2 – 2,0)	0,46
Quantos gatos têm atualmente		
Nenhum		
1 – 2	2,8 (0,3 – 26,6)	0,38
> 3	3,7 (0,2 – 58,5)	0,36

* Para quem relatou ter morado em outra residência.

4.4.4.2.3. Análise univariada dos aspectos comportamentais e alimentares dos voluntários

O comportamento dos voluntários em beber água sem tratamento mostrou um aumento no risco da infecção quando ocorria a ingestão de água proveniente do caminhão pipa. A análise também mostrou um maior risco quando voluntários faziam a ingestão do leite cru/não pasteurizado de vaca. Com relação a infecção por *Toxoplasma* e o comportamento dos voluntários em relação a gatos se observou valores significativos ($p < 0,25$) entre aqueles voluntários que brincavam com seu animal e permitiam que o gato dormisse em sua cama e aqueles que não tinham esse comportamento. Outra variável que mostrou nível de significância foi o comportamento invasivo dos gatos nas residências (Tabela 30).

Tabela 30. Análise univariada das características comportamentais e alimentares dos voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.

Variáveis	Univariada HR (IC95%)	P
Variáveis relacionadas a ingestão de oocistos/taquizoítos		
Come salada crua		
Não		
Sim	0,9 (0,2 – 3,9)	0,84
Come salada crua fora de casa		
Não		
Sim	0,6 (0,2 – 2,0)	0,37
Manipula terra		
Não		
Sim	1,3 (0,3 – 4,6)	0,72
Água que bebe		
Mineral		
Torneira	1,9 (0,4 – 8,9)	0,40
Torneira/Filtrada/Fervida	0,5 (0,04 – 5,8)	0,60
Bebe/Bebeu água de poço		
Não		
Sim	0,8 (0,3 – 2,8)	0,80
Bebe/bebeu água de rio		
Não		
Sim	1,8 (0,5 – 5,8)	0,34
Bebe/bebeu água de caminhão pipa		
Não		
Sim	3,2 (0,7 – 14,5)	0,14
Bebe/bebeu água de açude		
Não		
Sim	1,4 (0,5 – 4,5)	0,55
Costuma beber leite cru/não pasteurizado		
Não		
Sim	1,4 (0,2 – 10,8)	0,75
Variáveis relacionadas a ingestão de cistos		
Costuma comer carne crua/mal passada		
Não		
Sim	0,8 (0,2 – 3,9)	0,84
Como prepara a carne (apenas crua)		
Congela		
Prepara no dia que compra	1,0 (0,2 – 3,9)	0,95
As duas opções	0,5 (0,0 – 2,5)	0,40
Costuma comer carne bovina crua/mal passada		

Não		
Sim	0,9 (0,2 – 3,9)	0,84
Costuma comer carne suína crua/mal passada		
Não		
Sim	1,6 (0,2 – 12,5)	0,65
Costuma comer carne de bode crua/mal passada		
Não		
Sim	1,9 (0,3 – 15,4)	0,51
Costuma comer carne de frango crua/mal passada		
Não		
Sim	1,0 (0,12 – 7,5)	0,98

Características comportamentais dos voluntários em relação a gatos

O gato dormia/dorme na cama*

Não		
Sim	3,5 (0,6 – 20,9)	0,17

O gato dormia/dorme na cadeira*

Não		
Sim	1,7 (0,2 – 15,4)	0,63

Você brincava/ brinca com o gato

Não		
Sim	2,9 (0,5 – 17,3)	0,25

As fezes do gato eram/são recolhidas

Com luvas		
Sem luvas	0,2 (0,0 – 3,3)	0,26

O gato defecava/defeca na rua*

Não		
Sim	2,0 (0,34 – 12,2)	0,43

Os gatos entram na sua casa *

Não		
Sim	2,3 (0,6 – 8,7)	0,22

* Análise realizada por residência (N=219).

4.4.4.2.4. Análise univariada da ocorrência dos sinais clínicos

A análise logística univariada multinível mostrou associação significativa ($p < 0,25$) entre os participantes que relataram queixa na visão e aqueles que não relataram (Tabela 31).

Tabela 31. Análise univariada das ocorrências de sinais clínicos relacionados a infecção por *T. gondii* em voluntários do município de Santa Cruz – RN, 2014 – 2015.

Ocorrência	Univariada HR (IC95%)	P
Tem queixas na visão		
Não		
Sim	2,3 (0,7 – 7,2)	0,16
Fez transfusão		
Não		
Sim	1,3 (0,1 – 11,2)	0,83

4.4.4.2.5. Análise multivariada

Após selecionar as variáveis com $p < 0,25$, a análise logística multivariada foi realizada, contudo nenhuma variável permaneceu no modelo final associada a infecção por *T. gondii*.

4.5. DISCUSSÃO

O principal problema no diagnóstico da toxoplasmose aguda usando a pesquisa de IgM é o longo período de permanência destes anticorpos no organismo humano (Bobic et al. 1991). Como consequência, a simples presença de anticorpos IgM específicos para *T. gondii* não indica necessariamente uma infecção aguda (Petersen 2007). A pesquisa de anticorpos IgA é uma ferramenta mais adequada na identificação de toxoplasmose aguda por ser detectada mais precocemente que IgM (Decoster et al, 1992, Paul et al. 2001). Além disto a pesquisa de IgA sofre pouca ou nenhuma interferência quando pesquisada em pacientes com fator reumatoide ou anticorpos antinúcleo. A pesquisa deste anticorpo nos voluntários de Santa Cruz, RN, poderá, no futuro, auxiliar na compreensão dos resultados obtidos pela pesquisa de IgM.

A pesquisa de anticorpos IgM para *T. gondii* identificou 4,0% de voluntários positivos no município de Santa Cruz, RN, nos anos de 2014 a 2015. Silva e colaboradores (2014) observaram que a prevalência para IgM anti – *T. gondii* em Gurupi, no estado de Tocantins foi de 5,7%. Estes autores também observaram que a prevalência para IgG anti – *T. gondii* na mesma população foi de 68,7%, resultado compatível aos 66,2% observados no presente estudo (capítulo 1). Em contrapartida, os resultados da pesquisa de IgM devem ser analisados com cautela considerando que a análise da prevalência da infecção recente por *T. gondii* através da pesquisa deste anticorpo não é uma ferramenta adequada para estudos epidemiológicos, uma vez que IgM, além de apresentar uma redução relativamente rápida da sua concentração no sangue de alguns pacientes, pode também apresentar uma persistência por vários meses ou anos em outros pacientes já em fase crônica de toxoplasmose. Este fato foi observado nesse estudo, onde três voluntários apresentaram sorologia positiva para IgM mesmo após períodos superiores a 12 meses de infecção. Portanto, a presença de IgM nem sempre é um indicativo de infecção recente (Marcolino et al. 2000). Uma análise mais apropriada consiste em associar a presença de IgM com a presença de outro anticorpo, como o IgG (Montoya 2002). Em nosso estudo foram identificados 16 indivíduos com sorologia positiva apenas para IgM. A confirmação da infecção ocorreu após acompanhamento sorológico desses voluntários o que permitiu detectar, durante o acompanhamento, o surgimento de anticorpos IgG anti- *T. gondii* indicando soroconversão nos participantes acompanhados.

A determinação da avidéz do anticorpo IgG é uma poderosa ferramenta utilizada para distinguir infecções recentes e crônicas. Também é utilizada por alguns autores

para determinar a incidência da toxoplasmose. Rodrigues e colaboradores (2015), utilizando essa ferramenta encontraram uma incidência de 1,6% em estudantes da cidade de Assis – SP, com projeção anual da incidência de 3,2% na população estudada. Baseado na avidéz do anticorpo IgG, associada ou não a presença do IgM, encontramos em nossa análise 2% dos voluntários apresentando quadro sugestivo de toxoplasmose recente, ou seja, apresentaram uma avidéz de IgG inferior a 50%.

Para determinar a incidência da toxoplasmose por soroconversão de IgG anti – *T. gondii* em Santa Cruz, foi realizado o acompanhamento sorológico dos voluntários soronegativos durante, aproximadamente, um ano. A soroconversão foi detectada em 5,1% dos voluntários, com as duas primeiras ocorrências de soroconversão observadas com 4 meses e 5 meses após a primeira análise sorológica. Ambas as amostras apresentaram predomínio de IgG de baixa avidéz. No intervalo de tempo de 6-7 meses, após a primeira coleta, foi identificada soroconversão em mais nove voluntários. A avidéz de IgG foi alta (75,6% a 100%) sugerindo toxoplasmose crônica e reafirmando a interpretação estabelecida nesse estudo.

Avaliando a soroconversão nos voluntários acompanhados, a incidência geral de infecção por *T. gondii* encontrada no município de Santa Cruz foi de 6,8/1000 pessoas/mês. No Espírito Santo, Buery e colaboradores (2014) observaram taxa de soroconversão equivalente a 6,2 por 100 pessoas/ano. Em uma comunidade rural na Amazônia foi encontrada uma incidência de 9 por 100 pessoas/ano (Ferreira et al. 2009). Na Alemanha a soroconversão anual encontrada foi de 1099 por 100.000 pessoas (Wilking et al. 2016).

A determinação contínua da prevalência da toxoplasmose é fundamental para avaliar a eficácia de intervenções que visem reduzir o número de casos novos da infecção numa população. Um estudo realizado na Itália durante um período de 4 anos, mostrou uma tendência decrescente na soroprevalência global, reduzindo de 31%, em 2007, para 24,4%, em 2010. Para as mulheres em idade reprodutiva a prevalência de anticorpos IgG foi de 30,2% em 2007 e 23,6% em 2010 (Mosti et al. 2013). Tais dados permitem destacar a importância de sistemas nacionais e regionais de vigilância, a fim de implementar intervenções que visem a coleta contínua de dados sobre a soroprevalência da toxoplasmose ao longo do tempo na população em geral e, em particular, em mulheres em idade reprodutiva (Mosti et al. 2013).

CAPÍTULO 3

SOROPREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM ANIMAIS PRESENTES NAS RESIDÊNCIAS DO MUNICÍPIO DE SANTA CRUZ – RN E SUA ASSOCIAÇÃO COM A PREVALÊNCIA EM HUMANOS.

5.1. INTRODUÇÃO

As fontes de infecção por *T. gondii* podem apresentar grande variação entre os diferentes grupos étnicos e localizações geográficas, portanto, o conhecimento regional sobre as prováveis rotas de transmissão horizontal para os seres humanos e as prováveis fontes de infecção é fundamental para elaboração de programas de prevenção da infecção em grupos de risco (Tenter et al. 2000). O ambiente em várias áreas do Brasil se mostra altamente contaminado com oocistos, tornando difícil a identificação das fontes de infecção por *T. gondii* (Robert-Gangneux e Dardé 2012). Assim, a soroprevalência em animais tem sido utilizada como uma alternativa para avaliar a presença desse protozoário, e nesse estudo as galinhas e os cães foram utilizados como animais bioindicadores de contaminação ambiental e o gato como fator de risco.

5.1.1. Aspectos epidemiológicos da toxoplasmose em galinhas

O Brasil é o segundo maior consumidor de frango do mundo, com 2.220.000 toneladas desta ave sendo consumidas anualmente. A criação de galinhas em escala industrial tem pequena importância na transmissão da toxoplasmose para humanos, pois esse sistema de criação é altamente tecnificado e não permite o contato com felinos (Araújo et al. 1989). Esses dados são corroborados com um estudo realizado por Literak e Hejlícek (1993) os quais verificaram uma prevalência de 0,01% em galinhas criadas em escala industrial e 5,1% em galinhas criadas em pequena escala. A maior prevalência da toxoplasmose observada em criação de pequena escala pode ser associada ao convívio dessas aves no mesmo ecossistema durante meses ou anos (Araújo et al. 1989). No Brasil, estudos sobre prevalência da toxoplasmose nessas aves revelam uma grande proporção desses animais com anticorpos anti – *T. gondii* (Da Silva et al. 2003; Dubey et al. 2007; Dubey 2010; Beltrame et al. 2012; Casartelli-Alves et al. 2014).

Por se alimentarem principalmente no chão, as galinhas criadas nos domicílios podem fornecer informações sobre o solo. Assim, galinhas têm sido utilizadas para avaliar a contaminação do solo com oocistos de *T. gondii* bem como isolar e caracterizar as cepas deste protozoário presentes no ambiente (Dubey 2009). De Oliveira e colaboradores (2009) analisaram as características biológicas de isolados de *T. gondii* parasitando galinhas presentes em sete estados do nordeste (Pernambuco, Rio Grande do Norte, Maranhão, Bahia, Ceará, Sergipe e Alagoas). Através do teste de aglutinação modificado (MAT) foram identificadas 53,3% das aves com resultado

positivo para a toxoplasmose, e em cada estado foi encontrada pelo menos uma ave positiva. Além disso, foi observado que 5 das 23 cepas de *T. gondii* isoladas foram letais para camundongos. Em galinhas analisadas no Espírito Santo, Beltrame e colaboradores (2012) encontraram 38,8% das aves com sorologia positiva, e das 48 cepas isoladas, 44 foram letais para camundongos indicando que cepas virulentas para camundongos circulam em hospedeiros assintomáticos no Brasil. De forma semelhante, Andrade e colaboradores (2013) observaram que 92% (12/13) dos isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas positivas no RN eram virulentas para camundongos.

Os bioensaios para isolamento e caracterização das cepas de *T. gondii* utilizam vários tecidos do animal. Em 149 galinhas infectadas, cujos tecidos individuais foram testados, foram encontrados parasitos em 89,5% dos corações, 49,2% de cérebros, 44,1% de músculos da perna e 18,6% de músculo peitoral (Dubey 2010). Apesar de ser considerado um parasito neurotrópico (baseados em estudos em roedores), existem amplos dados em galinhas e em outros animais mostrando que *T. gondii* encista de forma mais eficiente no músculo do que no cérebro (Dubey e Beattie 1988). As galinhas raramente apresentam sintomas clínicos para a toxoplasmose, entretanto os sinais clínicos relatados como anorexia, emagrecimento, diarreia, cegueira e morte súbita foram observados em aves com infecção (Liu et al. 1983; Li e Chen 1990; Ostendorf e Henderson 1962). Recentemente foi observado um alto grau de similaridade entre genótipos dos isolados de *T. gondii* infectando seres humanos e galinhas no estado de Minas Gerais (Silva et al. 2014).

5.1.2. Aspectos epidemiológicos da toxoplasmose em cães

Os cães de rua podem ser usados como sentinelas para estudar a contaminação ambiental por *T. gondii* em áreas urbanas. Esses animais são os melhores bioindicadores disponíveis para estudos nessas áreas, pois circulam por diversos ambientes e são geralmente capturados por serviços sanitários públicos para o controle da raiva. A soroprevalência em cães de rua pode servir como uma alternativa para estudos epidemiológicos uma vez que os resultados sorológicos permitem estimar a contaminação do meio por *T. gondii*. Para fornecer dados relevantes é fundamental que os cães sejam expostos a todas as formas de transmissão do parasito, seja na água ou no alimento (Meireles et al. 2004).

Os cães de rua são expostos igualmente às mesmas circunstâncias que os gatos de rua, mas são geralmente caçadores menos eficazes para presas vivas do que os felinos,

alimentando-se na maioria das vezes do lixo humano. Em alguns lugares, a predominância de *T. gondii* se mostra mais elevada em cães de rua do que em gatos, e provavelmente isso ocorre devido às diferenças dos hábitos alimentares, uma vez que os gatos são normalmente mais seletivos, bebem menos água e comem quantidades menores de alimento. Esta ingestão reduzida implica em uma relativa redução da exposição ao parasito. Tal circunstância pode ser observada em animais analisados em São Paulo onde a prevalência de toxoplasmose em cães de rua foi de 50,5% enquanto que em gatos foi menor, com 40% desses felinos soropositivos para a toxoplasmose (Meireles et al. 2004).

Vivendo no mesmo ambiente, os cães e os seres humanos são expostos similarmente à infecção por *T. gondii* e apesar de seus comportamentos higiênicos diferentes, a toxoplasmose canina pode ser um importante indicador epidemiológico do risco de infecção para o homem (Meireles et al. 2004). Na Suécia foram encontrados 23% dos cães com anticorpos para *T. gondii* (Uggla et al. 1990), enquanto que em Trinidad e Tobago o número de cães positivos foi de 32% (Ali et al. 2003). No Brasil, foi encontrado uma prevalência de 30,3% de cães da cidade de Uberlândia – MG (Mineo et al. 2004) e 63,8% na cidade de Botucatu – SP (Salata et al. 1985).

Ainda não se sabe como cães se tornam infectados com *T. gondii*, porém a alta prevalência observada em cães de rua ou de fazenda quando comparada a cães de estimação sugere que a ingestão de presas ou alimentos contaminados são importantes fontes para adquirir a toxoplasmose (De Souza et al. 2003). Apesar de ter uma alimentação mais selecionada, os cães de estimação também podem ser utilizados como bioindicadores não apenas em áreas privativas, mas também em bairros por onde circulam com seus proprietários. Estudos realizados em clínicas veterinárias mostram uma prevalência relativamente alta em cães de estimação. Em Minas Gerais e em Pernambuco foram encontrados, respectivamente, 60,7% e 57,6% dos cães analisados apresentando anticorpos para *T. gondii* (Guimarães et al. 2009; Figueredo et al. 2008). Beckett e Flym (1953) relataram um caso de toxoplasmose congênita em cuja residência havia um cão com sintomas neurológicos da doença. De forma semelhante ao observado para galinhas, Silva e colaboradores (2014) também identificaram similaridade entre genótipos dos isolados de *T. gondii* infectando seres humanos e cães no estado de Minas Gerais.

Poucos trabalhos descrevem sinais clínicos em animais infectados por *T. gondii*, e sintomas em cães são raros (Dubey et al. 2010). Hoffmann e colaboradores (2012)

observaram que em dois cães com toxoplasmose disseminada ocorreram manifestações cutâneas após tratamento com imunossupressor, e o quadro evoluiu com complicações pulmonares e neurológicas (Hoffman et al. 2012). Manifestações semelhantes foram relatadas por Webb e colaboradores (2005) onde um cão com 3,5 anos de idade apresentou dermatite pustulosa e, após necropsia do animal, foram encontrados cistos no tecido cutâneo, cardíaco, pancreático e pulmonar. Cabe ressaltar a importância da diferenciação de infecção de cães por *T. gondii* e *Neospora caninum*, coccídio também capaz de causar sintomas clínicos em cães (Giraldi et al. 2002; Figueredo et al. 2008).

5.1.3. Aspectos epidemiológicos da toxoplasmose em gatos

Os felídeos são importantes no ciclo de vida de *T. gondii* por serem hospedeiros definitivos e, portanto, os únicos que podem contaminar o meio ambiente com oocistos (Dubey et al. 2004). Os felinos podem eliminar cerca de 360 milhões de oocistos em um dia, sendo extremamente resistentes às influências do meio ambiente, podendo esporular e sobreviver em ambientes úmidos (inclusive na água do mar) por vários meses (Dubey 2002). Entre novembro de 2001 e janeiro de 2002, o Brasil registrou um dos maiores surtos de toxoplasmose do mundo, ocorrido no Município de Santa Isabel do Ivaí, no Paraná, com 462 pessoas apresentando sorologia sugestiva de toxoplasmose (IgM reagente). A investigação epidemiológica concluiu que a fonte de infecção foi um dos reservatórios de água da cidade contaminado com fezes de gato (De Moura et al. 2006). Dubey e colaboradores (2004) observaram que 84,4% dos gatos obtidos a partir de 51 casas do município de Santa Isabel do Ivaí apresentavam anticorpos para *T. gondii* (Cruz et al. 2011).

Ao ingerir carne contendo cistos de *T. gondii*, os gatos começam a excretar fezes contendo oocistos no prazo de 10 dias, e este processo ocorre por 1 a 2 semanas (Dubey e Frenkel 1972). Entretanto, quando a infecção primária ocorre pela ingestão de oocistos, os esporozoítos iniciam uma fase assexuada (semelhante ao desenvolvimento em hospedeiros intermediários) e depois migram para as células intestinais, iniciando uma fase sexuada. Após um período pré-patente de 18 a 49 dias, oocistos são encontrados nas fezes dos gatos (Freyre et al. 1989; Dubey 1996). A ingestão de um grande número de taquizoítos (≥ 1000) pode resultar em eliminação de oocistos após 15-19 dias da infecção (Dubey 1998).

Durante este período de eliminação de oocistos, os gatos não apresentam anticorpos para *T. gondii* e raramente apresentam sintomas. Desta forma, pode-se dizer

que a maioria dos gatos com sorologia positiva já eliminaram oocistos, o que torna os dados epidemiológicos sobre a prevalência mais significativos do que a análise da prevalência de oocistos nas fezes (Dubey et al. 2012), uma vez que, baseado em inúmeros levantamentos coprológicos, acredita-se que em um determinado momento aproximadamente 1% dos gatos possa estar eliminando oocistos (Dubey 2010).

Os gatos geralmente eliminam no ambiente uma grande quantidade de oocistos após uma infecção primária por *T. gondii*. A imunidade adquirida pode persistir por toda a vida e está associada à interrupção da eliminação de oocistos. Porém a imunidade pode não persistir levando a eventuais eliminações de oocistos nas fezes, mesmo sem re-infecção (Dubey 1996). Atualmente não se sabe quais os fatores que induzem essa re-eliminação de oocistos em condições naturais (Tenter et al. 2000). A re-excreção de oocistos de *T. gondii* pode ocorrer em gatos co-infectados pelo vírus da imunodeficiência felina ou animais tratados com corticosteróides (Dubey 2010). Em condições ambientais com arejamento, umidade e temperatura adequados os oocistos esporulam e se tornar infecciosos dentro de 1-5 dias (Dubey 1986; Dubey 1996).

A manutenção de gatos dentro de casas e apartamentos não necessariamente fornece um risco de contrair a infecção por *T. gondii*, basta adotar medidas de prevenção como remover diariamente e de forma adequada as fezes do ambiente (Tenter et al. 2000). No entanto, a infecção por *T. gondii* tem uma importância maior em gatos de rua. Esses vagueiam geralmente por toda parte e realizam um importante papel na transmissão da toxoplasmose a outros animais e a seres humanos. Estudos realizados na China mostraram soroprevalência da toxoplasmose maior em gatos de rua (45%) do que em gatos domésticos (15%) (Wu et al. 2011; Lee et al. 2010). Resultado semelhante foi observado em Curitiba - PR, onde 16,3% de gatos domésticos atendidos em uma clínica veterinária mostraram anticorpos anti- *T. gondii* (Cruz et al. 2011). Em São Paulo (nas cidades de Botucatu, Bauru e São Paulo) foram encontrados 19,4% dos gatos soropositivos para *T. gondii* (Langoni et al. 2001). Essa prevalência menor observada em gatos domésticos pode ser atribuída ao hábito de uma alimentação restrita baseada em alimentos industrializados, com acesso restrito a rua e sem acesso a caça (Cruz et al. 2011).

5.2. OBJETIVOS

- Determinar a frequência da toxoplasmose em galinhas, cães e gatos presentes no domicílio e no peridomicílio do município de Santa Cruz - RN.
- Testar correlação da toxoplasmose desses animais com os resultados sorológico dos voluntários humanos do município de Santa Cruz - RN.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. Área de estudo

Para este estudo transversal, os animais analisados residiam no município de Santa Cruz, no estado do Rio Grande do Norte. As características do município e do estado se encontram descritas no capítulo 1.

5.3.2. Processo amostral e coleta de dados

Os animais incluídos nesse estudo residem no domicílio e/ou peridomicílio daqueles voluntários que participaram do estudo “Soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* na população do município de Santa Cruz-RN” (Capítulo 1). Assim, aqueles voluntários que possuíam animais como cão, gato e ave (galinha/galo) responderam a um questionário que permitiu obter informações referentes ao sexo, idade, raça e comportamento do(s) animal(is) (Anexo J). Após aplicação do questionário foi realizada a coleta da amostra de sangue. O procedimento realizado neste trabalho foi aprovado pelo comitê de ética (CEUA 76/2015 – Anexo K).

5.3.3. Coleta da amostra de sangue

O sangue (aproximadamente 2mL) foi coletado dos animais (cão, gato, ave) presentes na residência. Após imobilização do animal, o procedimento ocorreu por punção venosa com auxílio de uma seringa e o sangue foi depositado em tubos tipo *vacutainer*[®] sem anticoagulante. Após a coleta, os tubos foram levados para o Laboratório Multidisciplinar localizado na FACISA/UFRN, onde foram centrifugados para a obtenção do soro. O soro foi alíquotado e armazenado a -20⁰C até a realização do ensaio imunoenzimático.

5.3.4. Análise sorológica

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado no Laboratório de Toxoplasmose localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os soros foram testados através do ELISA para a detecção de anticorpos IgG específicos para *T. gondii*.

5.3.4.1. Preparo de antígeno solúvel total de T. gondii (STAg)

O antígeno utilizado para sensibilizar a placa de poliestireno de 96 poços foi preparado no laboratório de Toxoplasmose do Instituto de Ciências Biológicas da

Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) da mesma forma como descrito no capítulo 1.

5.3.4.2. *Teste imunoenzimático*

O protocolo de ELISA foi o mesmo utilizado para humanos, com exceção da diluição dos conjugados (Sigma-Aldrich®). O conjugado foi previamente diluído em solução contendo PBS / Caseína 0,25% / Tween 20 a 0,05%. Porém cada conjugado foi diluído de acordo com padronização prévia para cada espécie animal analisada. Assim, para o gato foi utilizado conjugado na diluição 1:15.000 (produto SAB3700059), para o cão a diluição foi 1:6000 (produto A9042) e para a ave 1:4000 (produto A9046). Cada placa teve seu ponto de corte (*cut off*) calculado pela média das absorbâncias das seis amostras de soro negativo para *T. gondii* mais três desvios padrões (Andrade et al. 2013). A média dos soros testados em duplicata foi dividido pelo valor do *cut off* da placa com o objetivo de determinar o índice de reatividade (IR). Os soros que apresentaram os valores de $IR > 1,1$ foram considerados positivos (Cavalcante et al. 2008).

5.3.5. **Análise estatística**

Com base nos questionários e nos resultados sorológicos, um banco de dados foi gerado utilizando o programa Epidata (versão 3.1). Para análise univariada foram feitas comparações de frequências entre animais infectados e não infectados, utilizando-se o teste do qui-quadrado no programa STATA versão 10.0. O efeito de covariáveis em relação à infecção por *T. gondii* foi realizada através de regressão logística. A medida de associação utilizada foi a *Odds Relativa* (OR). Para avaliar possíveis associações entre a soroprevalência encontradas nos animais e dos seus respectivos proprietários utilizou-se a correlação de Spearman.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. População de animais por residência

A visita foi realizada em 1217 residências, entretanto nem todas possuíam animal e, além disso, alguns animais apresentaram características inadequadas para a coleta de sangue como, por exemplo, o tamanho e a agressividade. Das residências cujos animais tiveram análise sorológica realizada 22,1% tinham cão e gato, 9,8% tinham gato e galinha, 8,5% tinham cão e galinha, e 6,5% das residências possuíam os três animais.

5.4.2. Características das galinhas/galos

Foram identificadas 168 residências que possuíam galinha, entretanto, por não apresentarem características adequadas ou por dificuldades na captura foram excluídas 92 aves/casas. A amostra estudada foi, então, composta por 76 aves onde 61,8% eram fêmeas e 38,2% machos. A metade dessas aves residia na área Paraíso, e a maioria (93,4%) foi caracterizada como sem raça definida. A idade aproximada variou de 2 a 60 meses predominando as aves com, aproximadamente, 6 meses de idade (52,6%). Durante aplicação do questionário, 93,4% dos proprietários relataram que suas aves compartilhavam o domicílio e peridomicílio e 84,2% delas foram criadas desde filhote (Tabela 32).

Tabela 32. Características das aves do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características das aves	N = 76	%
Sexo		
Fêmea	47	61,8
Macho	29	38,2
Área		
Centro	8	10,5
Paraíso	38	50,0
Cônego	12	15,8
Maracujá	11	14,5
DNER	7	9,2
Idade aproximada (meses)		
≤ 12	54	71,0
> 12	22	29,0
Onde fica		
Domicílio/Peridomicílio	71	93,4
Peridomicílio/Extradomicílio	5	6,6
Cria a ave desde filhote		
Sim	64	84,2
Não	12	15,8

5.4.3. Características dos cães

Foram identificadas 445 residências que possuíam cães, no entanto, muitos cães (271) se mostraram agressivos ou muito pequenos impedindo a realização das coletas, sendo excluídos das análises. Assim, a amostra foi composta por 174 cães onde 40,8% eram fêmeas e 59,2% machos. A maioria desses cães (38,5%) residia na área Paraíso, e 95,4% deles foram caracterizados como sem raça definida. A idade dos cães variou de 1 a 16 anos, predominando aqueles com idade entre 2 e 3 anos (39,1%). A maioria dos cães (64,9%) tinha acesso ao ambiente intradomiciliar e 86,2% dos proprietários relataram ter o cão desde filhote (Tabela 33).

Tabela 33. Características dos cães do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características dos cães	N = 174	%
Sexo		
Fêmea	71	40,8
Macho	103	59,2
Área		
Centro	27	15,5
Paraíso	67	38,5
Cônego	33	18,5
Maracujá	22	12,6
DNER	26	14,9
Idade (anos)		
< 8	153	87,9
≥ 8	21	12,1
Onde fica		
Domicílio	133	64,9
Domicílio/peridomicílio	59	33,9
Peridomicílio	2	1,2
Cria o cão desde filhote		
Sim	150	86,2
Não	24	13,8

5.4.4. Características dos gatos

Foram identificadas 385 residências que possuíam gatos, entretanto, 232 animais/casas foram excluídos das análises em virtude da agilidade natural ou da agressividade da maioria dos gatos (além de alguns apresentarem tamanho inadequado). Assim, a amostra estudada foi composta por 153 gatos onde 36,6% eram fêmeas e 63,4% eram machos. A maioria desses animais (43,7%) residia na área Paraíso e 95,4% foram classificados como animal sem raça definida. A idade variou de menos de um ano

a 20 anos predominando aqueles com um a dois anos de idade (55,6%). Os proprietários relataram que seus gatos (96,1%) tinham acesso livre a casa, ao quintal e a rua, e 83,7% deles defecavam fora de casa (Tabela 34).

Tabela 34. Características dos gatos do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características dos gatos	N = 153	%
Sexo		
Fêmea	56	36,6
Macho	97	63,4
Área		
Centro	35	22,9
Paraíso	67	43,8
Cônego	22	14,4
Maracujá	17	11,1
DNER	12	7,8
Idade (anos)		
≤ 5	118	77,1
>5	35	22,9
Onde fica		
Intradomicílio	6	3,9
Intra/Peri/Extradomicilio	147	96,1
O gato defeca na rua		
Sim	128	83,7
Não	22	14,4
Não se aplica	3	2,0

5.4.5. Análise univariada da prevalência da infecção por *T. gondii* em galinhas

A análise sorológica identificou 47,4% das aves positivas para toxoplasmose sendo observada prevalência de 58,6% em machos e 40,4% em fêmeas (diferença não significativa). O maior número de aves infectadas foi encontrado na área do Centro (62,5%), seguida do Paraíso (47,4%), porém não houve diferença significativa entre as áreas estudadas na cidade. Em relação a idade, a maior frequência da toxoplasmose foi encontrada em aves com idade superior a 12 meses, indicando que há mais chance de adquirir a infecção quando alcançam essa faixa etária (Tabela 35).

Tabela 35. Análise univariada da prevalência da toxoplasmose associada às características das aves presentes no município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características das aves	ELISA		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Soro reatividade total	36 (47,4)	40 (52,6)		
Sexo				
Fêmea	19 (40,4)	28 (59,6)		
Macho	17 (58,6)	12 (41,4)	2,1 (0,8 – 5,3)	0,13
Área				
Cônego Monte	5 (41,7)	7 (58,3)		
Centro	5 (62,5)	3 (37,5)	2,3 (3,7 – 14,6)	0,37
Paraíso	18 (47,4)	20 (52,6)	1,3 (0,3 – 4,7)	0,73
Maracujá	5 (45,5)	6 (54,5)	1,2 (0,2 – 6,1)	0,86
DNER	3 (42,9)	4 (57,1)	1,0 (0,1 – 6,9)	0,96
Idade (meses)				
≤ 12	20 (37,0)	34 (63,0)		
> 12	16 (72,7)	6 (27,3)	4,5 (1,5 – 13,5)	0,00
Onde fica				
Domicílio/Peridomicílio	32 (45,1)	39 (54,9)		
Peri/Extradomicílio	4 (80,0)	1 (20,0)	4,8 (0,5 – 45,8)	0,20
Cria a ave desde filhote				
Sim	33 (51,6)	31 (48,4)		
Não	3 (25,0)	9 (75,0)	0,3 (0,7 – 1,3)	0,10

5.4.6. Análise univariada da prevalência da toxoplasmose em cães

O ensaio imunoenzimático identificou 75,8% dos cães com sorologia positiva para a toxoplasmose, com prevalência semelhante em machos (77,3%) e em fêmeas (73,2%). A menor soroprevalência foi encontrada em cães que residiam na área do Maracujá (59,1%), mas não foi observado aumento na chance de infecção em relação às outras áreas, exceto na área Paraíso, onde 85,1% desses animais eram positivos para toxoplasmose. A soroprevalência da infecção por *T. gondii* foi maior em cães com idade acima de 8 anos, onde 95,2% desses animais foram soropositivos. Daqueles cães que não foram criados desde filhote, 87,5% apresentaram sorologia positiva para a doença. Não houve diferença significativa entre as raças nem entre os locais por onde circulavam esses animais (Tabela 36).

Tabela 36. Análise univariada da prevalência da toxoplasmose associada às características dos cães presentes no município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características dos cães	ELISA		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Soro reatividade total	132 (75,8)	42 (24,2)		
Sexo				
Fêmea	52 (73,2)	19 (26,8)		
Macho	80 (77,7)	23 (22,3)	1,3 (0,6 – 2,6)	0,50
Área				
Maracujá	13 (59,1)	9 (40,9)		
Cônego	21 (65,6)	11 (34,4)	1,3 (0,4 – 4,0)	0,63
DNER	19 (73,1)	7 (26,9)	1,9 (0,5 – 6,3)	0,31
Centro	22 (81,5)	5 (18,5)	3,0 (0,8 – 11,0)	0,09
Paraíso	57 (85,1)	10 (14,9)	3,9 (1,3 – 11,7)	0,01
Idade (anos)				
< 8	112 (73,2)	41 (26,8)		
≥ 8	20 (95,2)	1 (4,8)	7,3 (1,0 – 56,3)	0,06
Onde fica				
Domicílio	84 (74,3)	29 (25,7)		
Domicílio/Peridomicílio	46 (78,0)	13 (22,0)	1,2 (0,6 – 2,6)	0,60
Peridomicílio	2 (100,0)	0 (0,0)		
Cria o cão desde filhote				
Sim	111 (74,0)	39 (26,0)		
Não	21 (87,5)	3 (12,5)	2,5 (0,7 – 8,7)	0,16

5.4.7. Análise univariada da prevalência da toxoplasmose em gatos

A análise sorológica identificou 60,1% dos gatos soropositivos para a toxoplasmose sendo observada uma diferença não significativa entre machos (64,9%) e fêmeas (51,8%). A maior soroprevalência (68,6%) foi encontrada em gatos que residiam na área do Centro, porém não houve diferença significativa entre as áreas. A soroprevalência aumentou com a idade onde 80,0% dos gatos com idade superior a 5 anos eram soropositivos para a toxoplasmose. A análise univariada mostrou que gatos nessa faixa etária tinham mais chances de adquirir a infecção quando comparado aqueles com idade igual ou inferior a 5 anos. Não houve diferença significativa entre as raças dos gatos ou lugares por onde circulavam. Dos gatos que defecavam na rua 61,0% apresentaram anticorpos para *T. gondii* (Tabela 37).

Tabela 37. Análise univariada da prevalência da toxoplasmose associada as características dos gatos presentes no município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Características dos gatos	ELISA		Univariada OR (IC95%)	P
	Positivo (%)	Negativo (%)		
Soro reatividade total	92 (60,1)	61 (39,9)		
Sexo				
Fêmea	29 (51,8)	27 (48,2)		
Macho	63 (64,9)	34 (35,1)	1,7 (0,9 – 3,4)	0,11
Área				
Centro	24 (68,6)	11 (31,4)		
Paraíso	39 (58,2)	28 (41,8)	0,6 (0,3 – 1,5)	0,30
Cônego	13 (59,1)	9 (40,9)	0,7 (0,2 – 2,0)	0,47
Maracujá	9 (52,9)	8 (47,1)	0,5 (0,2 – 1,7)	0,28
DNER	7 (58,3)	5 (41,7)	0,6 (0,2 – 2,5)	0,52
Idade (anos)				
≤ 5	64 (54,2)	54 (45,8)		
> 5	28 (80,0)	7 (20,0)	3,4 (1,4 – 8,3)	0,00
Onde fica				
Intradomicílio	3 (3,3)	3 (4,9)		
Intra/Peri/Extradomicílio	89 (96,7)	58 (95,1)	1,5 (0,3 – 7,9)	0,61
O gato defeca na rua				
Sim	78 (61,0)	50 (39,0)		
Não	11 (50,0)	11 (50,0)	0,6 (0,3 – 1,6)	0,33

5.4.8. Associação entre a prevalência da toxoplasmose em humanos e animais

Quando comparado os resultados sorológicos dos humanos e dos animais presentes no domicílio e peridomicílio, observou-se uma maior frequência da infecção em humanos e animais residentes nas áreas Centro e Paraíso (Tabela 38). Porém a análise estatística realizada através da correlação de Spearman mostrou associação entre a prevalência em humanos e animais apenas na área Cônego Monte (Tabela 39).

Tabela 38. Soroprevalência da toxoplasmose em humanos e em animais nas diferentes áreas do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Área	Prevalência da toxoplasmose (IC 95%) por ELISA-IgG			
	Humanos	Aves	Cães	Gatos
DNER	59,2 (52,2 – 65,8)	42,9	73,1	58,3
Maracujá	61,5 (54,4 – 68,2)	45,5	59,1	52,9
Cônego	64,1 (58,1 – 69,8)	41,7	65,6	59,1
Centro	67,7 (62,5 – 72,5)	62,5	81,5	68,6
Paraíso	70,2 (66,4 – 73,9)	47,4	85,1	58,2

Tabela 39. Associação através do teste de Spearman da infecção por *Toxoplasma gondii* entre humanos e animais nas diferentes áreas do município de Santa Cruz – RN, 2013 – 2014.

Área	IC (95%)	P
DNER	- 0,2 – 0,5	0,40
Maracujá	- 0,2 – 0,5	0,31
Cônego	0,1 – 0,6	0,00
Centro	0,2 – 0,3	0,61
Paraíso	- 0,1 – 0,2	0,40

5.5. DISCUSSÃO

Uma forma indireta de investigar a contaminação do ambiente com oocistos de *T. gondii* é realizando uma análise sorológica em animais cujo alimento se encontra no solo. Nesse estudo a galinha foi utilizada como bioindicador ambiental, e além de informar a situação do ambiente, essas galinhas infectadas também podem servir como fonte de infecção. Em geral o abate dessas aves ocorre em casa e as vísceras quando não descartadas adequadamente podem ser consumidas por outros animais, infectando-os. A galinha também pode ser uma fonte de infecção para o homem quando ocorre a ingestão da carne de frango mal passada contendo os cistos (Dubey et al 2012). Este fator de risco foi observado em Fortaleza - CE, onde a regressão logística multivariada mostrou que o consumo de frango mais de duas vezes na semana estava significativamente associado com a sorologia positiva das gestantes (Sroka et al. 2010). Em Santa Cruz foi observado que 70,1% das pessoas que comem frango mal passado eram soropositivas para a toxoplasmose, porém a análise univariada mostrou que esse comportamento não representava um fator de risco na cidade, pois não houve diferença significativa quando comparada àquelas que não tinham esse hábito.

A prevalência da toxoplasmose em galinhas varia de 2 a 100% dependendo da origem/País da ave (Dubey 2010). No Rio Grande do Norte a prevalência da toxoplasmose observada por De Oliveira e colaboradores (2009) mostrou uma variação de 14,8% a 100% nas aves analisadas em 4 municípios. No Oeste potiguar, um estudo realizado por Santos (2012) encontrou uma prevalência de 50,6% nas galinhas presentes nessa região. Em nosso estudo foram observadas 47,4% das aves do município de Santa Cruz – RN, apresentando anticorpos anti-*T. gondii*. Tais resultados, de uma forma geral, indicam que o solo do Rio Grande do Norte se encontra amplamente contaminado com oocistos.

Em relação ao sexo das aves não foi observada associação significativa em relação à prevalência da toxoplasmose. Um trabalho realizado em fazendas do Rio Grande do Norte mostrou resultados divergentes dos nossos, com prevalência maior em fêmeas do que em machos (Santos 2011).

Por ser difícil determinar, com precisão, a idade dos galináceos, foi utilizado nesse estudo um tempo de vida aproximado. A faixa etária das aves foi organizada em duas categorias, uma agrupando animais de até 12 meses e outra agrupando aqueles com

idade acima de 12 meses. A análise sorológica mostrou uma maior prevalência em aves com idade acima de 12 meses, apresentando um risco de infecção maior quando comparado àquelas mais jovens. A maior prevalência observada em aves adultas também foi encontrada em outros estudos indicando que aves mais velhas tem maior probabilidade de infecção, pois permanecem um tempo maior expostas ao agente (Santos 2011; Moré et al. 2012).

A análise sorológica dos cães também pode ser utilizada para investigar a contaminação ambiental, uma vez que esses animais, assim como as galinhas, são considerados ótimas sentinelas para a infecção. Azevedo e colaboradores (2005) encontraram na Paraíba prevalência de 45,1% dos cães com sorologia positiva para toxoplasmose. Nesse estudo foi encontrada prevalência de 75,1% e tal prevalência foi semelhante a mais alta (76,4%) encontrada no Brasil (Cañón-Franco et al. 2004), o que reflete um alto nível de dispersão de *T. gondii* em áreas urbanas e consequentemente uma maior exposição da população do município a infecção por este protozoário.

A maior prevalência observada em cães machos (77,3%) não mostrou diferença significativa quando comparada àquela encontrada em fêmeas (73,2%). Sendo assim, o sexo não influenciou na infecção, fato também observado por outros autores (Garcia et al. 1999; Ali et al. 2003; Valadas et al. 2010).

A soroprevalência apresentou valores significativos em relação à idade, mostrando uma maior proporção de cães positivos com idade acima de 8 anos do que os mais jovens. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo realizado na Paraíba, mostrando que cães nessa faixa etária tinham 4,2 vezes mais chance de adquirir a doença (Azevedo et al. 2005). Como observado em aves, pode-se concluir que quanto mais tempo de vida tem o animal, maior é a exposição ao agente e maior é a chance de infecção.

As áreas que apresentaram baixas condições socioeconômicas e que refletiram em uma maior prevalência da toxoplasmose na população humana de Santa Cruz também influenciaram na presença de anticorpos anti-*T. gondii* em cães. Nesse estudo, as áreas Paraíso e Centro tiveram 85,1% e 81,5% dos seus cães soropositivos para a toxoplasmose, respectivamente. A análise univariada mostrou que o risco de infecção de cães do Paraíso pode ser maior quando comparada a áreas com condições socioeconômicas melhores. A maior prevalência observada tanto em humanos como em aves e cães no Paraíso e no Centro pode ser reflexo da maior proporção de gatos

soropositivos encontrada nessas áreas. Dos gatos que apresentaram anticorpos para *T. gondii* 42,4% se encontravam na área Paraíso e 26,1% na área Centro.

A análise sorológica realizada em gatos da cidade de Santa Cruz revelou uma prevalência geral de 60,1%, semelhante àquela encontrada em Fernando de Noronha, onde 66,6% dos gatos analisados foram soropositivos (Costa et al. 2012). Em Natal, um estudo realizado em dois parques de importância ecológica e social mostrou que 52,8% dos gatos que circulavam por esses ambientes apresentavam anticorpos para *T. gondii* (Fournier et al. 2014). A prevalência encontrada nos felinos da cidade de São Luis – MA (Braga et al. 2012) e em São Paulo (Sobrinho et al. 2012) foram, respectivamente, 50,5% e 20,3%. Entretanto, maiores prevalências foram encontradas em gatos analisados no Paraná (Dubey 2004) e em Rondônia (Cavalcante et al. 2006), onde 84,4% e 87,3% dos gatos, apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, respectivamente.

Nesse estudo, 64,9% dos gatos machos e 51,8% das fêmeas apresentaram anticorpos para *T. gondii*. Da mesma forma como Garcia et al. (1999); Langoni et al. (2001) e Rosa et al. (2010), não observou-se diferença significativa entre os sexos, indicando que machos e fêmeas tem o mesmo risco de infecção por este parasito.

Para analisar a relação entre a idade e a sorologia dos gatos, a faixa etária desses felinos foi organizada em 2 categorias. A análise univariada mostrou que os gatos com idade superior a 5 anos tinham mais chance de adquirir a infecção do que aqueles com idade igual ou inferior a 5 anos. O tempo de vida dos felinos associada a prevalência da toxoplasmose também foi observada em outros trabalhos sugerindo que com a idade o risco de exposição a *T. gondii* aumenta (Abdou et al. 2013; Cardia et al. 2013). Por outro lado, a prevalência da toxoplasmose em gatos independe do local de circulação ou hábito de defecar na rua. Segundo Dubey (2010), os fatores que interferem na prevalência da toxoplasmose em gatos ainda não são totalmente compreendidos e necessitam estudos mais aprofundados.

Embora tenha sido observada uma maior frequência da toxoplasmose em animais (aves, gatos e cães) que residiam nas áreas Centro e Paraíso, nenhuma correlação foi encontrada entre a prevalência de toxoplasmose entre os animais da mesma residência e entre esses animais e seus proprietários nessas áreas. Porém uma associação foi encontrada entre animais residentes na área Cônego Monte e seus proprietários, o que pode indicar que nessa área pode haver mesma fonte de infecção para humanos e animais. Em Atayal, uma comunidade do estado do Taiwan, observou-se prevalência semelhante entre os cães de caça e seus proprietários, os quais tinham a mesma fonte

alimentar, não havendo evidências de que a ingestão de oocistos seja uma importante fonte de transmissão da toxoplasmose naquela comunidade, pois a prevalência em gatos naquela região é baixa e, além disso, naquela comunidade, cães são mais comuns como animal de estimação do que gatos, o que refuta a possibilidade de transmissão de *T. gondii* através do solo (Chia-Wung et al. 1998).

A ecologia de *T. gondii*, com seu complexo ciclo de vida, está suscetível a mudanças ambientais principalmente nos aspectos relacionados ao tempo de sobrevivência e infectividade de oocistos, bem como ao comportamento e densidade populacional dos hospedeiros (Meerburg et al. 2009). No entanto, os mecanismos pelos quais esses fatores afetam a propagação de *T. gondii* não são totalmente compreendidos (Yan et al. 2016). Assim, uma abordagem molecular baseada na técnica de PCR se mostra como poderosa ferramenta para investigação epidemiológica permitindo monitorar e identificar as fontes de infecção e os genótipos envolvidos, bem como permite acompanhar a rota de transmissão ambiental a partir das matrizes ambientais (Polley et al. 2009).

CAPÍTULO 4

ANÁLISE IMUNOGENÉTICA EM PACIENTES COM TOXOPLASMOSE OCULAR DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

6.1. INTRODUÇÃO

Os desafios para entender a biologia de *Toxoplasma gondii* se estendem até os dias de hoje, e muitos aspectos sobre este protozoário ainda não estão completamente elucidados. A infecção toxoplásmica em humanos é frequentemente subclínica, ou seja, apresenta-se assintomática ou com sintomas inespecíficos. No entanto pode se tornar clinicamente evidente, evoluindo, por exemplo, para uma retinocoroidite em indivíduos imunossuprimidos ou não (Cordeiro et al. 2010). A retinocoroidite toxoplásmica é reconhecida como a causa mais comum de uveíte posterior e pode deixar sequelas graves, incluindo a perda completa da visão (Bonfioli e Oréfice 2005). As uveítes são caracterizadas por uma inflamação do trato uveal, que é composto pela íris, corpo ciliar e coróide, podendo também designar inflamações que acometem a retina, o nervo óptico e o corpo vítreo (Atacama et al. 2004). Esta forma clínica é bastante heterogênea, onde alguns pacientes podem apresentar episódio de inflamação mínima, enquanto outros têm múltiplas recorrências de uveíte grave, levando à perda da visão (Vallochi 2002).

A toxoplasmose ocular pode ser de origem congênita ou adquirida. A forma congênita pode se apresentar de duas maneiras: na forma neonatal, quando a lesão já está presente ao nascimento, e no período pós-natal, no qual as lesões se manifestam durante a segunda e terceira década de vida do indivíduo. A toxoplasmose ocular adquirida também pode ocorrer de duas formas: a lesão pode ser concomitante com a infecção sistêmica, ou a lesão pode se manifestar de forma tardia, onde há um intervalo entre a doença sistêmica e a lesão ocular (Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005).

Por várias décadas, a retinocoroidite toxoplásmica foi considerada uma doença apenas dos neonatos, porém, nos anos 50, a suspeita de que a toxoplasmose ocular podia ocorrer também nos adultos cresceu em muitos países e, em 1952, foi confirmada a presença de toxoplasmose ocular em uma série de pacientes adultos com lesões na retina. Por muito tempo, se pensou que essa patologia em adultos era sempre um sintoma tardio da infecção congênita (Holland 2009).

O risco de envolvimento ocular, assim como a gravidade da doença ocular quando esta ocorre, varia entre grupos de idade diferentes. Estudos sugerem que pessoas idosas tenham realmente um risco mais elevado de desenvolver lesões oculares seguida de uma infecção recente por *T. gondii* do que pessoas mais jovens. Em um estudo retrospectivo na área de Erechim – RS, o risco de desenvolver lesões na retina durante os primeiros dois anos após a infecção por *T. gondii* se mostrou maior entre pacientes com idade acima de 40 anos do que entre aqueles mais jovens (Holland 2009). Pacientes idosos (69

a 82 anos) podem ser mais suscetíveis a uma infecção ocular grave devido a um declínio da resposta imunológica (Jonhson et al. 1997), uma vez que o envelhecimento está associado a mudanças complexas em ambos os mecanismos da imunidade inata e adquirida, aumentando a prevalência e gravidade de muitas infecções neste grupo (Pawelec et al. 1998).

Entretanto, na prática clínica, as recorrências são observadas com menor frequência entre pacientes idosos com cicatrizes de retinocoroidite toxoplásmica do que entre pacientes jovens com as mesmas cicatrizes. Garweg e colaboradores (2008) estudaram as características de recorrência da toxoplasmose ocular em uma população europeia e concluíram que pacientes jovens (com idade inferior a 30 anos) apresentam um maior risco de desenvolver recorrência do que pacientes mais velhos. Esta aparente contradição pode ser explicada pela interação complexa entre a idade do primeiro episódio de toxoplasmose ocular e a idade do episódio subsequente, uma vez que o risco de recorrência declina 72% a cada 10 anos de intervalo desde o primeiro episódio (Holland 2009); Embora tenha sido encontrada maior ocorrência de recidivas nos dois primeiros anos após o primeiro episódio da retinocoroidite ativa (Aleixo et al. 2016).

Os fatores que controlam a ocorrência, a gravidade e a recorrência da doença ocular não são bem compreendidos, embora uma variedade de componentes incluindo o estado nutricional e do sistema imune, a susceptibilidade genética do hospedeiro, a carga parasitária e o genótipo do parasito têm sido sugeridos como possivelmente envolvidos no desenvolvimento da infecção (Sibley et al. 2002).

6.1.1. Imunopatologia da toxoplasmose ocular

O olho é um órgão imunologicamente privilegiado devido a existência de uma estreita barreira sangue-órgão, ausência de drenagem linfática e escassez das clássicas células apresentadoras de antígenos. Contudo, este dogma está aberto a desafios uma vez que existem indicações para uma ativa comunicação entre o sistema imune e os olhos, bem como apresentação ocular de antígenos exógenos e endógenos (Caspi 2006). A retina é uma estrutura complexa tanto na arquitetura como em sua constituição antigênica. Como se desenvolve da extensão do tubo neural, a retina compartilha com o cérebro muitos antígenos citoplasmáticos e de membrana (Garweg e Candolfi 2009).

O diagnóstico para a toxoplasmose ocular é baseado geralmente em resultados da fundoscopia e na apresentação clínica. O parasito multiplica-se na retina e a inflamação ocorre principalmente na coróide. As lesões oculares iniciais de toxoplasmose adquirida

são desconhecidas porque os olhos não são frequentemente examinados até que a infecção seja sintomática (Dubey et al. 2012). A lesão é frequentemente necrótica, destruindo a arquitetura da retina neural e algumas vezes envolvendo a coróide, causando a retinocoroidite (Vallochi 2002). As lesões podem ser classificadas em três categorias: (a) lesões do tipo A que apresentam uma borda bem definida e geralmente rodeada por um halo pigmentado com destruição extensa da retina; (b) lesões do tipo B que apresentam um halo hipopigmentado com menor grau de destruição tecidual quando comparado a lesão do tipo A; (c) e lesões do tipo C que são, basicamente, áreas de hiperplasia ou atrofia do epitélio pigmentar da retina com um menor grau de destruição tecidual quando comparado aos tipos A e B (Oréfice e Bahia-Oliveira 2005).

Algumas complicações relacionadas a partir da infecção pelo parasito são: catarata, glaucoma, opacificação do corpo vítreo (comprometendo a acuidade visual), hemorragias vítreas, hemorragias retinianas, deslocamento de retina, edema cistóide de mácula, oclusão vascular e atrofia do nervo óptico (Bosch-Driessen et al. 2000).

Os principais aspectos patológicos associados a fase inicial da toxoplasmose são linfadenopatia e febre, a qual ocorre simultaneamente com ativação do sistema imunológico e presença de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Denkers e Gazzinelli 1998).

O papel das citocinas na retinocoroidite toxoplásmica tem sido estudado em modelos animais, nos quais tem sido proposto que essas moléculas apresentam um importante papel no controle da doença. Em camundongos infectados por *T. gondii* observou-se inflamação ocular focal e envolvimento do epitélio pigmentar da retina, e quando esses animais eram tratados com anti-IFN- γ ou anti-TNF- α observou-se um aumento das lesões oculares, associadas principalmente com a proliferação dos taquizoítos (Gazzinelli et al. 1994).

Alguns estudos sustentam a ideia de que *T. gondii* manipula a resposta imune do hospedeiro. O parasito simultaneamente estimula a secreção de citocinas protetoras (IFN- γ e IL-12) e paradoxalmente inibe esta resposta (Denkers et al. 2004; Gaddi e Yap 2007). Esta dupla capacidade do parasito se mostra benéfica e permite que se estabeleça uma interação parasito-hospedeiro estável. Falhas no balanço dessa resposta imune têm consequências negativas para ambos, tanto a nível sistêmico como no globo ocular (Vallochi 2008).

6.1.2. *Toxoplasma gondii* e resposta imunológica

A resposta imune provavelmente apresenta um papel relevante na evolução da infecção e, possivelmente, na resposta à terapia convencional (Vallochi 2002). *T. gondii*, induz uma resposta imunológica consistente e duradoura que busca o controle da proliferação dos taquizoítos. A infecção assintomática é resultante de uma rápida e poderosa resposta imune mediada por células, com a presença de altos níveis de IFN- γ produzidos por NK, CD4⁺ e CD8⁺ durante fase aguda e crônica da infecção (Miller et al. 2009). O IFN- γ é importante tanto na fase aguda, para conversão de taquizoíto em bradizoíto, como na fase crônica, impedindo a conversão de bradizoíto em taquizoíto (Suzuki et al. 1988).

A produção de IFN- γ é induzida principalmente pela IL-12, a qual é produzida por células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e monócitos. Estas duas citocinas direcionam um fenótipo Th1 nas células CD4⁺ e CD8⁺. Células de perfil Th1 secretam preferencialmente IL-2 e IFN- γ , contribuindo para a resistência aos patógenos intracelulares (Mosmann e Coffman 1989). A IL-2 induz as células NK ou células T CD8, que são citotóxicas, contra células-alvo infectadas por *T. gondii*. A atividade protetora das células T CD8 é mediada parcialmente através da produção de citocinas, como IFN- γ , porém um efeito citotóxico direto contra o parasito também foi relatado (Roberts e McLeod 1999). Parâmetros imunológicos na resposta a *T. gondii* foram avaliados em pessoas infectadas com e sem lesão ocular, sugerindo que a resistência ao desenvolvimento dessa patologia esteja associada com a habilidade de montar uma resposta duradoura de perfil Th1, com produção de IL-2 e IFN- γ (Yamamoto 2000).

Nagineni e colaboradores (1996) realizaram um estudo com células do epitélio pigmentar da retina humana, uma importante célula regulatória dentro da retina e uma das células infectadas por *T. gondii*. Os autores mostraram que IFN- γ promove a depleção do L-triptofano por meio da ativação da enzima 2,3-desoxigenase indolamina, resultando na inibição da replicação de *T. gondii*. O IFN- γ também ativa diferentes mecanismos de defesa intracelular que incluem a produção de radicais tóxicos de oxigênio e intermediários do nitrogênio em células T, células apresentadoras de antígeno, NK, macrófagos e neutrófilos. Estes radicais tóxicos conduzem a um estresse oxidativo que interfere no metabolismo do parasito (Fujigaki et al. 2002).

Entretanto, *T. gondii* também mostra uma eficiente habilidade de silenciar a cascata de sinalização IFN γ /Stat1 podendo ser um fator importante na capacidade do parasito em persistir mesmo na presença de uma vigorosa resposta Th1 *in vivo* (Kim et

al. 2007). *T. gondii* também pode evadir da resposta imune atuando na estrutura da cromatina do hospedeiro e inibindo a ligação dos fatores de transcrição ao promotor dos genes de citocinas, como observado em um estudo com TNF- α (Leng et al. 2009).

O parasito aparentemente tem a capacidade de determinar seu próprio destino, maximizando a sua persistência e minimizando a imunopatologia no hospedeiro através da indução de citocinas com propriedades anti-inflamatórias como TGF- β , IL-27 e IL-10. Esta última citocina tem grande importância imunorregulatória durante a infecção por *T. gondii* (Gazzinelli et al. 1996), sendo produzida, muitas vezes, concomitante com IFN- γ e IL-17, prevenindo a destruição tecidual por meio do balanceamento da resposta Th1/Th2 (Damsker et al. 2010).

Um distinto grupo de células Th, as células Th17, produtoras de IL-17, apresentam um papel crucial na indução de injúria tecidual autoimune. A IL-17 pode induzir o rompimento das junções endoteliais que forma a barreira sangue-cérebro e, em consequência, os linfócitos Th17 podem atravessar o endotélio vascular e destruir neurônios, promovendo uma inflamação no sistema nervoso central (Kebir et al. 2007). No entanto, a citocina IL-27, a qual é constitutivamente expressa no gânglio retinal e em células fotorreceptoras, em resposta ao IFN- γ pode reduzir a duração da resposta imune, agindo como potente inibidor do desenvolvimento das células Th17. Casos de manifestação clínica de vasculites e vitrites, os quais são indicativos de toxoplasmose ocular ativa, são atribuídos a um desequilíbrio entre a produção de citocinas IL-17/IL-27 que parece ser pré-requisito para resposta inflamatória e hipersensibilidade tecidual (Garweg e Candolfi 2009). No estudo de Carneiro e colaboradores (2016) foi observado um padrão pró inflamatório com produção de IFN- γ e IL17 associado a lesões oculares inflamatórias ativas em recém nascidos com toxoplasmose congênita.

A recorrência observada em pacientes com toxoplasmose ocular mostrou relação com os níveis de IL-5. Esta citocina tem um papel importante na indução de uma resposta do tipo Th2 e na produção de anticorpos, aumentando a produção de IgA específico, o qual tem sido descrito como preditor de recorrência em casos de toxoplasmose ocular (Takatsu et al. 2009). Já o tamanho e número de lesões mostraram relação com os níveis de IL-13 e IL-4 (De-la-Torre et al. 2014). IL-4 também é importante no direcionando da resposta do tipo Th2, sendo capaz de inibir a secreção de IFN γ e IL-2 e estimular produção de IL-10 pelos macrófagos (Sher et al. 1993). Roberts e colaboradores (1996) observaram que camundongos *knockout* para IL-4 tinham maior suscetibilidade à infecção aguda que o grupo controle, porém, durante o curso de

infecção por *T. gondii* a IL-4 pode desempenhar tanto função protetora (reduzindo a inflamação) como de desenvolvimento da doença (permitindo reativação).

IL-4 tem demonstrado suprimir tanto diretamente como indiretamente a produção de TNF- α pelos macrófagos (Economou et al 1989; Essner et al. 1989). TNF- α é uma citocina pleiotrópica com funções fisiológicas e patológicas que incluem regulação da inflamação, câncer e neurogênese (Marin e Kipnis 2013). Esta citocina pró-inflamatória está diretamente envolvida com a regulação do crescimento dos taquizoítos e quando em sinergia com IFN γ promovem funções efetoras contra *T. gondii* tanto na fase aguda como crônica da infecção (Denkers e Gazzinelli 1998). Em respostas inflamatórias vasculares, TNF- α atua diretamente sobre vários mediadores inflamatórios secundários através de ligação com os receptores de TNF- α (principalmente TNFR1), resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação do fator nuclear – κ B (NF – κ B) (Donath e Shoelson, 2011; Kakumu et al. 1997). NF- κ B regula a transcrição de genes envolvidos na patogênese das lesões inflamatórias, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Didonato et al. 2012).

A resposta imune humoral é iniciada pela produção de anticorpos específicos para *T. gondii* (IgM e IgG). A produção do anticorpo IgM ocorre no início da infecção, desaparecendo dentro de algumas semanas ou meses, enquanto picos de produção do anticorpo IgG ocorrem dentro de 1 a 2 meses após a infecção e permanece elevado por toda a vida (Subauste e Remington 1993). Souza e Silva (2013), observaram que recém-nascidos com toxoplasmose ocular apresentavam maiores níveis de IgG2 e IgG4 para rMIC3 de *T. gondii* quando comparados com crianças sem lesões oculares. A ocorrência de calcificações intracranianas também está associada à maior prevalência de IgG2 e IgG4 anti-rMIC3.

6.1.3. Imunogenética e toxoplasmose ocular

A variação na apresentação clínica e gravidade da doença em indivíduos suscetíveis têm sido atribuídas a vários fatores, incluindo a heterogeneidade genética do hospedeiro e o genótipo do parasito (Boothroyd e Grigg 2002). Em relação ao genótipo de *T. gondii*, é importante notar que *Toxoplasma* apresenta cepas de diferentes genótipos. Os isolados obtidos de humanos e animais oriundos da Europa e América do Norte permitiram identificar três principais grupos na população de *T. gondii*: tipo I, tipo II e tipo III. Estas linhagens compartilham 98% da identidade genética, porém diferem quanto a virulência e padrão epidemiológico. De fato, o tipo II é geneticamente

heterogêneo e o tipo III é apenas um subgrupo do tipo II (Dardé 2004). Estudos mostram que a linhagem tipo I é mais virulenta que as linhagens do tipo II e III. Como virulência é uma característica multigênica, o cruzamento das linhagens menos virulentas (tipo II e III) gera alguns descendentes cuja virulência se mostra realçada. Em outros continentes como Ásia, África e América do Sul a estrutura populacional apresenta uma maior diversidade genética, não se encaixando nessas três linhagens, sendo denominadas linhagens atípicas (Ferreira et al. 2006).

A composição genética de *T. gondii* é mais complexa do que se tem conhecimento e os genótipos do parasito contribuem com os resultados clínicos distintos observados na toxoplasmose em diferentes localidades (Vallochi et al. 2008). Ferreira e colaboradores (2011) observaram que em sete pacientes com toxoplasmose ocular no estado do Rio de Janeiro, o genótipo do parasito envolvido na infecção pertencia ao genótipo 65 (segundo o ToxoDB - <http://toxodb.org/toxo/>). Entretanto, Carneiro e colaboradores (2013) não observaram associação entre genótipo dos isolados obtidos de recém-nascidos infectados e a ocorrência de doença ocular.

Além da linhagem do parasito, o genótipo do hospedeiro pode influenciar na morbidade da patologia. O polimorfismo em regiões regulatórias de genes de citocinas bem como em receptores *Toll-like* (TLRs), realizam uma função chave na regulação do tipo e magnitude da resposta imune, e assim a natureza polimórfica desses genes pode conferir maior flexibilidade a resposta imunológica (Schroder e Schumann 2005).

Os receptores *Toll-like* realizam uma importante função junto a imunidade inata no reconhecimento de microorganismos invasores, conferindo certo grau de especificidade. Os TLRs reconhecem traços de componentes microbianos e ativam uma resposta inicial sinalizando através de uma proteína adaptadora, denominada MyD88, que é essencial na resposta a citocinas próinflamatórias diante de vários patógenos microbianos (Vallochi et al. 2008).

A invasão da célula hospedeira por *T. gondii*, além da interação com produtos microbicidas, resulta frequentemente na ativação de fatores de transcrição, entre eles os da família NF- κ B. Shapira e colaboradores (2002) demonstraram que *in vivo*, a infecção com *T. gondii* resulta na ativação de NF - κ B e que macrófagos de camundongos e linhagem fibroblástica humana infectados com esse parasito não apresentaram ativação desse fator de transcrição. Sabe-se que a enzima APE1/Ref-1 (*Apurinic apyrimidinic endonuclease 1/Redox factor-1*) participa na regulação de fatores de transcrição, inclusive do NF - κ B, controlando assim a resposta celular contra o parasito. A

APE1/Ref-1 é uma enzima multifuncional codificada pelo gene *APEX1* que apresenta região N-terminal envolvida com atividade redox e com a regulação de vários fatores de transcrição, e região C – terminal envolvida na atividade de reparo de DNA por excisão de bases (Pines et al. 2005). O polimorfismo gênico da *APEX1* (rs1130409) mostrou associação com a suscetibilidade para o câncer de mama (AlMutairi et al. 2015), e Silva e colaboradores (2011) encontraram associação estatisticamente significativa entre esse mesmo SNP e infecções bacterianas.

O polimorfismo em genes que codificam citocinas tem mostrado estar associado com a suscetibilidade a doenças parasitárias, como observado em indivíduos homocigotos para o gene que codifica o IFN- γ . Tais indivíduos homocigotos eram mais suscetíveis a toxoplasmose ocular do que aqueles indivíduos heterocigotos (Albuquerque et al. 2009). Em infecção por *T. gondii*, os SNPs em genes que codificam as citocinas IL-10, TNF- α , IL-1 α e IL-1 β foram descritos em indivíduos com retinocoroidite (Cordeiro et al. 2008). Desta forma os genes que codificam diversos componentes do sistema imunológico podem exibir polimorfismo em suas regiões codificadoras e reguladoras que afetam o nível e tipo de expressão em resposta aos estímulos, dirigindo a resposta imune para diferentes vias (Vallochi 2008).

Uma série de estudos confirma a relevância de elementos da resposta imune na patogênese da retinocoroidite toxoplásmica. Parece ser necessário um balanço controlado entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na determinação da ocorrência e da gravidade da doença. Além disso, evidências recentes demonstram que predisposição genética pode ser relacionada tanto com a ocorrência, quanto com a recorrência da doença (Cordeiro et al. 2010).

6.2. OBJETIVOS

- Correlacionar a toxoplasmose ocular com o perfil das citocinas plasmáticas: IL - 4, IL-5, IL-17A, IFN- γ e TNF- α ;
- Testar associação da toxoplasmose ocular com o polimorfismo dos genes: *APEX1* (rs1130409) e *MyD88* (rs7744).

6.3. MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1. Área do estudo

Os voluntários analisados nesse estudo residem no estado do Rio Grande do Norte. As características desse Estado se encontram descritas no capítulo 1.

6.3.2. Cálculo da amostra

6.3.2.1. Cálculo da amostra para análise genética

O programa de computador *Winpepi* foi utilizado para obter o tamanho mínimo da amostra (Abramson 2011; Silva et al. 2011). Para o cálculo foi utilizada a menor frequência alélica dos genes selecionados neste estudo (*MyD88* – rs7744; MIF=0,14). Utilizando um intervalo de confiança de 95%, admitindo-se um erro de 5% e poder de 80% obteve-se que o tamanho mínimo da amostra necessário para esse estudo é de 80 indivíduos. Como se trata de um estudo do tipo “caso-controle” (1:1), 40 indivíduos devem apresentar toxoplasmose ocular (casos) e 40 devem apresentar apenas toxoplasmose assintomática (controles). Para esse estudo se optou em fazer uma proporção de 1:2, ou seja, um caso para dois controles. Assim, utilizando um intervalo de confiança de 95%, admitindo-se um erro de 5% e poder de 80%, o programa *Winpepi* calculou uma amostra mínima de 93 indivíduos, onde 31 devem apresentar toxoplasmose ocular e 62 devem apresentar sorologia positiva para toxoplasmose, porém sem lesão ocular. Para a análise genética, os controles foram compostos, em sua maioria, por familiares dos pacientes.

6.3.2.2. Cálculo da amostra para a análise de citocinas plasmáticas

Uma vez que o fenótipo é a expressão do genótipo associado ao meio ambiente, utilizou-se a mesma amostra e o mesmo cálculo aplicado à análise genética. Para essa análise ainda foram incluídos pacientes com sorologia negativa para a toxoplasmose e, assim, três grupos foram formados: (1) controle positivo assintomático sem lesão ocular (denominado TOXO), (2) controle negativo (denominado NI) e (3) casos clínicos com lesão ocular (denominado Ocular TOXO).

6.3.3. Processo amostral

A amostra para esse estudo foi obtida no Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), localizado no município de Natal – RN, e em uma clínica particular (Oftalmed) localizada no município de Santa Cruz – RN. O Hospital Universitário recebe, em seu setor de oftalmologia, pacientes de todo o estado do Rio Grande do Norte, realizando cirurgias, exames e procedimentos oftalmológicos. O mesmo serviço é oferecido pela Clínica Oftalmed, que também tem parceria com o SUS, porém seus pacientes residem na região do Trairí do RN.

Para obter a amostra foram realizadas visitas mensais ao HUOL e a clínica Oftalmed no período de 2014 a 2015. Os critérios de diagnóstico para toxoplasmose ocular, utilizados nesse estudo, foram os mesmos da prática clínica, onde há uma associação entre o aspecto da lesão obtido pela oftalmoscopia e a sorologia reagente para *T. gondii*. Os pacientes com o diagnóstico de toxoplasmose ocular confirmado foram contatados e as coletas foram realizadas na residência dos próprios voluntários ou no HUOL. Durante o contato (por telefone e/ou pessoalmente) com o paciente, foram esclarecidos os objetivos bem como os riscos e benefícios desse estudo. Para compor a amostra controle foi solicitada a presença de dois parentes, com preferência para os genitores. No caso de impossibilidade, foi solicitada a presença de dois voluntários com idade igual ou superior a 12 anos, que tivesse interesse em participar da pesquisa. Aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexos L e M) e tiveram suas amostras de sangue coletadas. Todo o procedimento foi aprovado pelo comitê de ética da UFRN (Parecer nº 1.206.329 – Anexo N).

6.3.4. Coleta de dados

A entrevista foi realizada tanto em voluntários que apresentavam lesão ocular como nos indivíduos controle. A partir do questionário foram obtidas informações sobre a lesão e os fatores de risco (Anexo O).

6.3.5. Amostras de sangue e análise sorológica

Antes de realizar a análise do polimorfismo gênico e da expressão do perfil das citocinas, foi realizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o soro de todos os voluntários (pacientes e controle). O ELISA para anticorpos IgG seguiu o mesmo protocolo descrito no capítulo 1 e permitiu a confirmação dos pacientes com lesão ocular por *T. gondii* e a triagem dos controles positivos e negativos para o estudo.

Apenas para as amostras de soro dos pacientes com lesão ocular foram realizados os testes de avidéz de IgG e o ELISA para o anticorpo IgM. O teste do fator reumatóide também foi realizado para excluir falsos positivos para IgM. Os protocolos para as análises da avidéz do anticorpo IgG, ELISA- IgM e teste do fator reumatóide foram os mesmos descritos no capítulo 2. Alíquota de sangue de cada voluntário (pacientes e controles) foi utilizada para análise do perfil de citocinas (soro) e polimorfismo gênico (sangue total).

6.3.6. Análise genética

6.3.6.1. Extração de DNA

Para análise do polimorfismo gênico e sua correlação com o desenvolvimento da lesão ocular foi realizada a extração do DNA a partir das células sanguíneas (glóbulos brancos). Daqueles pacientes com toxoplasmose ocular confirmada e dos controles positivos foram coletados 4mL de sangue, por punção da veia periférica, usando tubos tipo *vacutainer*[®] contendo EDTA. Para a extração do DNA foi utilizado o kit *Wizard Genomic DNA Purification* da marca Promega. A extração seguiu o protocolo descrito pelo fabricante e o DNA foi diluído em água ultra-pura. Para a quantificação do DNA foi utilizado o equipamento Nanodrop N2000 (Thermo Scientific Waltham, EUA). Após quantificação das amostras, o DNA foi diluído a uma concentração final de 5ng/uL.

6.3.6.2. Caracterização dos genes-alvo

Para investigar a existência de uma associação entre o desenvolvimento da toxoplasmose ocular e polimorfismo gênico foram selecionados dois genes que se mostram envolvidos na resposta imunológica. As características desses genes foram obtidas no banco de SNPs do *National Center of Biotechnology Information* - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), no qual os polimorfismos dentro destes genes foram selecionados. No *Entrez Gene* (NCBI) foram obtidas todas as sequências gênicas.

- *MyD88 (Myeloid Differentiation primary response 88):*

Este gene, localizado no cromossomo 3 (3p22), codifica uma proteína adaptadora citosólica que realiza uma função central na resposta imune inata e adquirida. Pacientes com mutações neste gene tem um aumento da suscetibilidade a infecções por bactérias piogênicas (Suzuki et al., 2008). Para este gene foi selecionada a região polimórfica rs7744, uma região 3' não traduzida (3'UTR).

- *APEX1 (multifunctional DNA repair enzyme)*

A resposta inflamatória de muitas doenças infecciosas acaba acarretando a ativação de estresse oxidativo nas células devido a liberação de fatores (como espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio) pelas células de defesa na tentativa de conter o patógeno (Silva et al. 2011), e estes fatores danificam o DNA. Assim, este gene que participa do sistema de reparo de DNA por excisão de base (BER) foi selecionado. O gene *APEX1*, localizado no cromossomo 14 (14q11.2), codifica uma endonuclease (APE1/Ref-1) que participa na regulação de fatores de transcrição como NF-κB (Tell et al. 2009). A região selecionada para a análise foi rs1130409.

6.3.6.3. Análise do polimorfismo gênico (PCR em tempo real – qPCR)

As regiões polimórficas selecionadas de cada gene foram amplificadas através da técnica de qPCR. Utilizou-se o kit *TaqMan® Genotyping Master Mix* da marca *Applied Biosystems*. Como o ensaio é desenhado e padronizado para funcionar com os mesmos ciclos térmicos, um protocolo único foi aplicado para os dois genes. Assim, em cada poço da placa foram adicionados 10ng de DNA (cada poço correspondia a uma amostra/voluntário), *Taqman genotyping master mix (2X)* e a sonda específica para cada polimorfismo. A placa utilizada para este experimento foi a *Fast Optical 96-Well Reaction Plates*. Os dois SNPs selecionados foram amplificados em placas distintas. A amplificação e leitura das placas foram realizadas no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Systems*. Os procedimentos ocorreram com a colaboração das Dras. Fabrícia Lima Fonte, Lucymara Fassarella Agnez-Lima e Rita de Cássia Silva – Portela no Laboratório de Biologia Molecular e Genoma (LBMG) e no Instituto de Medicina Tropical, ambos situados na UFRN – Natal.

6.3.7. Análise do perfil das citocinas plasmáticas

6.3.7.1. Características das citocinas alvo

Para verificar a associação entre o padrão de citocinas pró e anti-inflamatórias produzidas pelos voluntários e o desenvolvimento da toxoplasmose ocular foram selecionadas cinco citocinas.

- Interleucina 4 (IL-4)

Essa citocina tem múltiplas funções na modulação da resposta inflamatória, como indução da produção de IgE e direcionamento para uma resposta imune do tipo Th2 (Nakayama et al. 2002).

- Interleucina 5 (IL-5)

Essa é uma citocina pró-inflamatória que, dentre outras funções, induz diferenciação dos eosinófilos. IL-5 é produzida por mastócitos, células endoteliais e, principalmente, por células Th2 (Takatsu et al. 2009).

- Interleucina 17 (IL-17)

Essa citocina, também chamada IL-17A, é produzida por célula T de memória, especialmente pelas células Th17. IL-17 induz ativação do fator nuclear κ B (NF κ B) que, por sua vez, ativa genes de diversas citocinas (Shalom-Barak et al. 1998).

- Interferon gama (IFN- γ)

Dentre as diversas funções dessa citocina podemos destacar sua importância em ativar a resposta imune inata aumentando produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, e também induzindo aumento da apresentação de antígenos por fagócitos mononucleares, como macrófagos (Hu e Ivashkiv 2009).

- Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)

Essa citocina, produzida por macrófagos, também apresenta propriedades pró-inflamatória se mostrando associada a várias doenças inflamatórias crônicas (Aggarwal et al. 2012).

6.3.7.2. Análise das citocinas através da técnica *Cytometric Bead Assay* (CBA)

A análise do perfil das citocinas foi realizada no Centro de Pesquisa René Rachou/CPqRR no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) em colaboração com Dr. Olindo Martins Filho. A quantificação das citocinas IL-4, IL-5, IL-17A, IFN- γ e TNF- α presentes no soro dos voluntários foi realizada através de citometria de fluxo, utilizando kits *Cytometric Bead Array* (CBA), específicos para citocinas humanas de acordo com as recomendações do fabricante (IL-4 cod. 561510; IL-5 cod. 561511; IL-17A cod. 562143; IFN- γ cod. 561515; TNF- α cod. 561516 - BD® Biosciences, USA).

As amostras de soro dos voluntários (mantida a -80C até a análise) foram descongeladas em banho-maria a 37°C e centrifugadas por 5 minutos, a 12000g, a

temperatura ambiente. Em resumo, os soros e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para cada citocina (3 μL), com volume final de 15 μL . Após três horas de incubação no agitador orbital, foi acrescentado 160 μl da solução de lavagem e o material centrifugado a 400 x g, 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as amostras foram resuspensas em 200 μl da solução de lavagem e a leitura foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo BD FACSverse™ (Becton Dickinson, EUA). Para análise dos resultados foram utilizados os dados obtidos através da Intensidade Média de Fluorescência (IMF) observada para cada analito.

6.3.8. Análise estatística

6.3.8.1. Análise do polimorfismo gênico

O equilíbrio de Hardy-Weinberg é a base da genética de populações que afirma que, dentro de determinadas condições, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações. Esta análise permite certificar se não houve desvio da frequência, uma vez que um desvio significativo nesse teste é interpretado como indicativo de erro de genotipagem. Então, antes das análises de associação, todos os dados de genotipagem foram verificados. A frequência alélica foi determinada pela contagem direta dos alelos. Para verificar a distribuição genotípica no equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado o teste qui-quadrado. Para analisar a associação entre o polimorfismo dos genes e lesão ocular foi realizada a regressão logística utilizando o programa STATA versão 10.0, e considerou-se o nível de significância estatística igual $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. Os efeitos das variáveis independentes foram avaliados a partir do cálculo da *Odds* Relativa (OR) com intuito de definir a probabilidade de risco e determinar o nível de influência de cada genótipo.

6.3.8.2. Análise do perfil das citocinas

Para a análise estatística foi utilizado o método Mann-Whitney. As comparações foram realizadas utilizando Kruskal-Wallis, seguido de um pós-teste de Dunn. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$). Todas as análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Características dos voluntários

Para a análise do perfil imunogenético foram analisados 48 voluntários com diagnóstico de toxoplasmose ocular confirmado. A amostra controle foi composta por 96 voluntários assintomáticos, mas positivos para IgG anti – *T. gondii*, e 15 voluntários negativos para toxoplasmose. Desta amostra controle, 64% tinham algum grau de parentesco com aqueles indivíduos que apresentavam uveíte.

Dos voluntários com lesão ocular 64,6% eram do sexo feminino e 35,4% do sexo masculino. Foram encontrados voluntários com toxoplasmose ocular provenientes das quatro mesorregiões do RN, porém 66,6% dos voluntários residiam no Leste potiguar. A idade variou de 13 a 65 anos (média de 27,2 anos) com a maioria apresentando idade igual ou superior a 30 anos, e 29,2% tinham até o 2º grau do ensino médio (Tabela 40). A amostra controle foi composta por 58,3% de voluntários do sexo feminino e 41,7% do sexo masculino, os quais também residiam em todas as mesorregiões do RN, exceto no oeste. A idade desses voluntários variou de 18 a 80 anos, com a maioria apresentando idade igual ou superior a 30 anos. Com relação ao grau de escolaridade, a maioria (43,8%) tinha até o 2º grau do ensino médio (Tabela 40).

Tabela 40. Características individuais dos controles e voluntários com toxoplasmose ocular do Rio Grande do Norte.

Variáveis	Voluntários soropositivos - IgG		Total (%)
	Com lesão (%)	Sem lesão (%)	
Sexo			
Feminino	31 (64,6)	56 (58,3)	87 (60,4)
Masculino	17 (35,4)	40 (41,7)	57 (39,6)
Mesorregiões			
Oeste	6 (12,5)	9 (9,4)	15 (10,4)
Central	2 (4,2)	0 (0,0)	2 (1,4)
Agreste	8 (16,7)	10 (10,4)	18 (12,5)
Leste	32 (66,6)	77 (80,2)	109 (75,7)
Idade			
≥ 11 e < 15	5 (10,4)	0 (0,0)	5 (3,5)
≥ 15 e < 30	13 (27,1)	17 (17,7)	30 (20,8)
≥ 30 e < 45	18 (37,5)	35 (36,5)	53 (36,8)
≥ 45 e < 60	11 (22,9)	22 (22,9)	33 (22,9)
≥ 60	1 (2,1)	22 (22,9)	23 (16,0)
Grau de escolaridade			
Analfabeto	2 (4,2)	11 (11,5)	13 (9,0)

Até a 4ª série do ensino fundamental	9 (18,8)	14 (14,6)	23 (16,0)
Até a 8ª série do ensino fundamental	10 (20,8)	9 (9,4)	19 (13,1)
Até 2º grau do ensino médio	14 (29,2)	42 (43,8)	56 (38,9)
Superior (completo ou não)	13 (27,0)	20 (20,8)	33 (23,0)

6.4.2. Características das uveítes nos voluntários com toxoplasmose ocular

A maioria dos casos de uveíte ocorreu no ano de 2014, e os voluntários apresentavam idade variando de 3 a 64 anos no momento do diagnóstico. A recorrência foi observada em 29,2% desses voluntários cuja idade variou entre 3 e 36 anos. A maioria dos voluntários relatou que a visão foi prejudicada em 50% ou mais. Lesão bilateral foi observada em 3 indivíduos (6,3%), e 50% daqueles com lesão unilateral relataram uveíte no olho esquerdo (Tabela 41).

Tabela 41. Aspectos relacionados a uveíte dos voluntários do Rio Grande do Norte com toxoplasmose ocular.

Variáveis	N = 48	%
Idade do 1º episódio de uveíte		
< 15	9	18,8
≥ 15 e < 30	19	39,6
≥ 30 e < 45	17	35,4
≥ 45 e < 60	2	4,2
≥ 60	1	2,1
Ano da uveíte		
1980 – 1990	5	10,4
1991 – 2000	8	16,7
2001 – 2010	8	16,7
2011 – 2015	27	56,2
Apresentou recorrência		
Sim	14	29,2
Não	34	70,8
Porcentagem da visão perdida		
< 21%	19	39,6
≥ 21 < 60%	12	25,0
≥ 60%	17	35,4
Lesão		
Unilateral	45	93,7
Bilateral	3	6,3
Olho afetado		
Direito	21	43,7
Esquerdo	24	50,0
Ambos	3	6,3

6.4.3. Características imunológicas dos voluntários com toxoplasmose ocular

Doença auto imune foi relatada por 3 voluntários, onde 1 apresentava lúpus e 2 artrite reumatóide. O tratamento com corticoides durante o episódio da inflamação foi relatado por 85,4% dos voluntários e 2 deles relataram linfadenopatia cervical. A análise da avidéz do IgG anti *T. gondii* mostrou que nenhum voluntário apresentava característica de infecção recente, ou seja, todos os voluntários apresentaram avidéz acima de 50%, e a maioria (70,8%) tinha avidéz acima de 91%. O anticorpo IgM foi detectado em 2 desses voluntários, e em nenhum deles foi detectada a presença do fator reumatóide (Tabela 42).

Tabela 42. Aspectos imunológicos dos voluntários do Estado do Rio Grande do Norte com toxoplasmose ocular.

Variáveis	N = 48	%
Apresentou linfadenopatia		
Sim	2	4,2
Não	44	91,6
Não lembra	2	4,2
Faz/Fez uso de corticoides		
Sim	41	85,4
Não	7	14,6
Avidéz (%)		
8 a 49	0	0,0
50 a 70	0	0,0
71 a 80	2	4,2
81 a 90	12	25,0
91 a 100	34	70,8
Presença de IgM		
Sim	2	4,2
Não	46	95,8

6.4.4. Perfil genético da amostra controle e dos voluntários com toxoplasmose ocular

Dos 144 voluntários (com e sem lesão) a análise através do qPCR identificou, para o gene *APEXI*, 30,1% dos indivíduos apresentando alelos homozigotos normais (TT), 26,3% apresentando alelos homozigotos polimórficos (GG), e 43,6% alelos heterozigotos (GT). Para este gene, 4 voluntários com lesão ocular e 7 controles não tiveram seus alelos determinados, sendo excluídos das análises. Para o gene *MyD88* foram identificados 78,5% dos indivíduos apresentando alelos homozigotos normais

(GG), 2,1% alelos homozigotos polimórficos (AA) e 19,4% apresentavam alelos heretozigotos (AG). Todos os 144 voluntários tiveram seus genótipos determinados para esse gene. A distribuição genotípica do gene *APEXI* e *MyD88* se encontrou em equilíbrio de acordo com a teoria de Hardy-Weinberg (Tabela 43).

Tabela 43. Frequência genotípica dos controles e dos voluntários com toxoplasmose ocular do estado do Rio Grande do Norte.

Genótipos e alelos	Voluntários com uveíte (%)	Controle (%)	N (%)
Gene <i>APEXI</i>			
TT	7 (17,5)	33 (82,5)	40 (30,1)
GG	14 (40,0)	21 (60,0)	35 (26,3)
GT	23 (39,7)	35 (60,3)	58 (43,6)
Gene <i>MyD88</i>			
GG	38 (33,6)	75 (66,4)	113 (78,5)
AA	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (2,1)
AG	8 (28,6)	20 (71,4)	28 (19,4)

6.4.5. Correlação entre a toxoplasmose ocular e o polimorfismo gênico

Na análise de regressão logística, considerando as variáveis relacionadas a frequência alélica do gene *APEXI*, foi encontrada diferença significativa entre aqueles voluntários com lesão ocular e seus controles. Para esse gene, indivíduos com o genótipo composto por alelos homozigotos polimórficos (GG) ou heterozigotos (GT) tinham mais chances de desenvolver uveíte, indicando uma associação entre o genótipo e o desenvolvimento de lesão ocular por toxoplasmose. Entretanto, para o gene *MyD88*, a análise não mostrou valores significativos entre os genótipos do grupo controle e do grupo com lesão ocular (Tabela 44).

Tabela 44. Análise univariada da frequência alélica dos genes *APEXI* e *MyD88* dos controles e voluntários com lesão ocular do estado do Rio Grande do Norte.

Genótipos e alelos	Voluntários com uveíte (%)	Controle (%)	Univariada OR (IC95%)	P
Gene <i>APEXI</i>				
TT	7 (17,5)	33 (82,5)		
GG	14 (40,0)	21 (60,0)	3,1 (1,1 – 9,0)	0,03
GT	23 (39,7)	35 (60,3)	3,1 (1,2 – 8,2)	0,02
Gene <i>MyD88</i>				
GG	38 (33,6)	75 (66,4)		
AA	2 (66,7)	1 (33,3)	3,9 (0,3 – 44,9)	0,27
AG	8 (28,6)	20 (71,4)	0,8 (0,3 – 2,0)	0,61

6.4.6. Associação entre a toxoplasmose ocular e o perfil das citocinas

Para esta análise foram utilizados dados obtidos através da Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de cada analito avaliado. Um modelo (diagrama) demonstrando o perfil panorâmico para cada indivíduo foi elaborado. Para cada citocina foi calculada a mediana global, a qual foi utilizada como ponto de corte para segregação de indivíduos caracterizados como baixo produtor e alto produtor de citocinas (Figura 12).

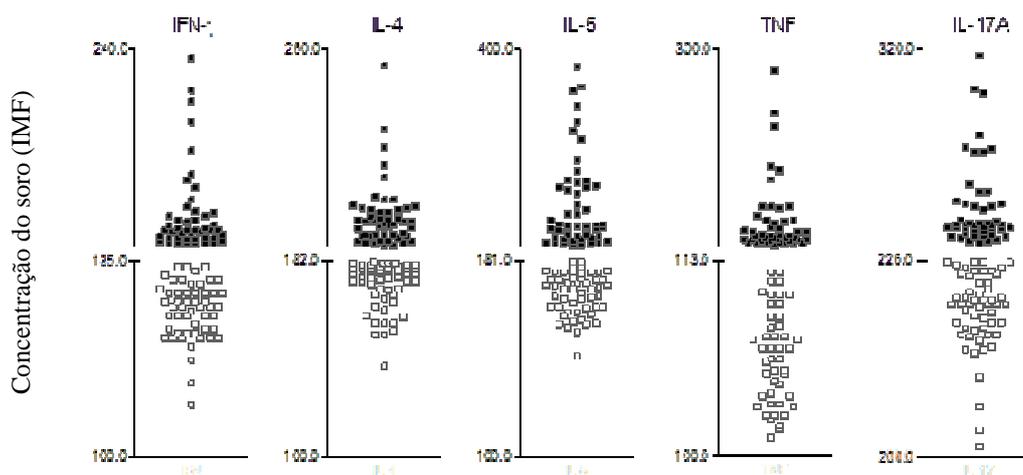
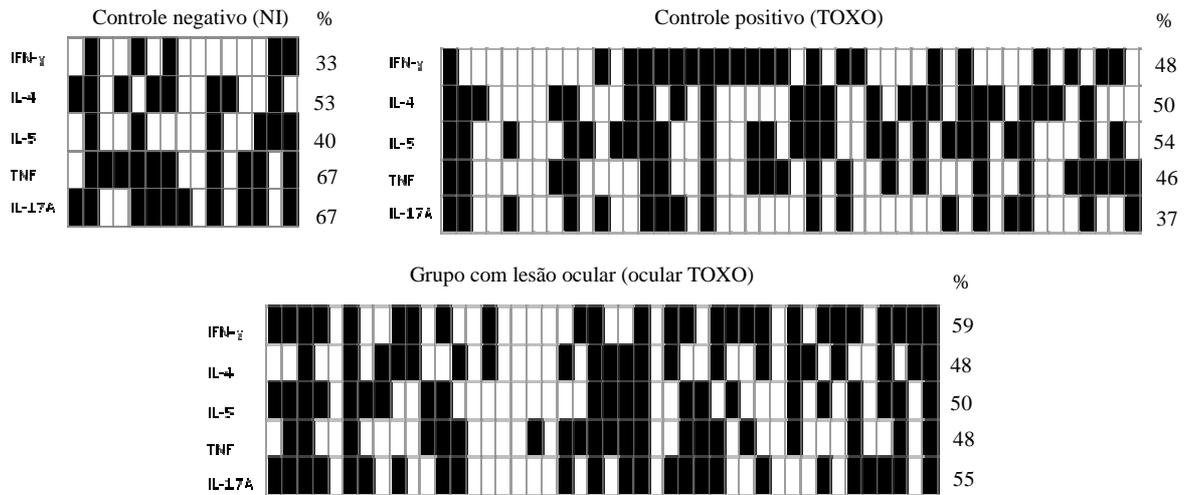


Figura 12. Estabelecimento da mediana global (ponto de corte), para cada citocina, baseado na Intensidade Média de Fluorescência (IMF).

Os indivíduos que apresentaram valores abaixo da mediana global (denominados “baixo produtor”) foram demonstrados, no diagrama, na forma de retângulos brancos e aqueles com valores acima da mediana (denominados “alto produtor”) foram demonstrados na forma de retângulos pretos (Figura 13A). A frequência dos indivíduos “alto produtor” para cada citocina se encontra ao final da sequência de retângulos. Essa frequência foi utilizada para gerar o gráfico em barras (Figura 13B) e mostrar, em cada grupo, apenas a frequência dos indivíduos com “alto” nível de citocinas no soro.

A



B

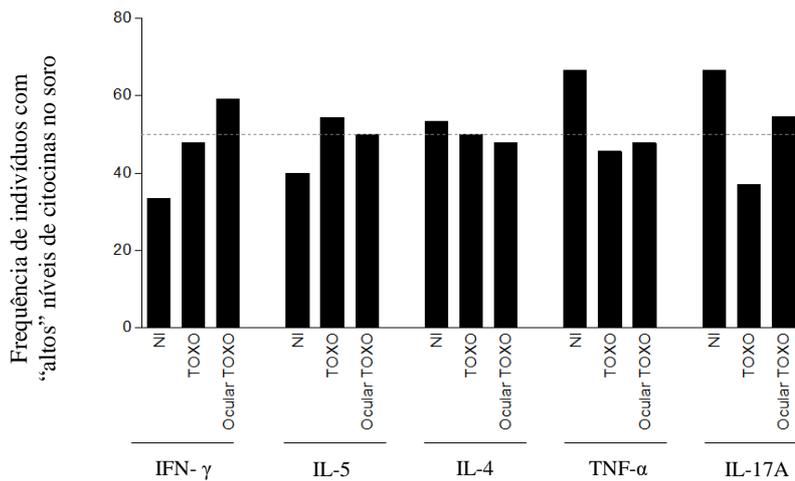


Figura 13. Análise do perfil das citocinas nos grupos controle e com lesão ocular. **A.** Categorização dos indivíduos de acordo com a mediana calculada a partir da Intensidade Média de Fluorescência de cada citocina. Indivíduos com valores abaixo da mediana são representados por retângulo branco e aqueles com valores acima são representados por retângulo preto. A frequência (%) de indivíduos denominados “alto produtores” (acima da mediana), para cada citocina, é mostrada ao final da sequência dos retângulos. **B.** Frequência de indivíduos “alto produtores” encontrada nos grupos controles e com lesão ocular. NI: controle negativo; TOXO: controle positivo sem lesão ocular; Ocular TOXO: com lesão ocular.

Para IFN- γ , valores de IMF maiores ou igual a 135 (ponto de corte) classificaram cinco (33%) indivíduos do grupo controle negativo (NI), 22 (48%) indivíduos do grupo controle positivo (TOXO) e 26 (59%) do grupo com lesão ocular (Ocular TOXO).

Para IL-4, valores de IMF maior ou igual a 182 (ponto de corte) classificaram oito (53%) indivíduos do grupo soronegativo, 23 (50%) indivíduos do grupo controle positivo e 21 (48%) do grupo com lesão ocular.

Para IL-5, valores maiores que 181 classificaram seis (40%) indivíduos do grupo controle negativo, 25 (54%) indivíduos do grupo controle positivo e 22 (50%) do grupo com lesão ocular.

Para TNF- α , valores maiores que 113 classificaram dez (77%) indivíduos do grupo controle negativo, 21 (46%) indivíduos do grupo controle positivo e 21 (48%) do grupo com lesão ocular.

Para IL-17A, valores maiores que 226 classificaram dez (77%) indivíduos do grupo controle negativo, 17 (37%) indivíduos do grupo controle positivo e 24 (55%) do grupo com lesão ocular.

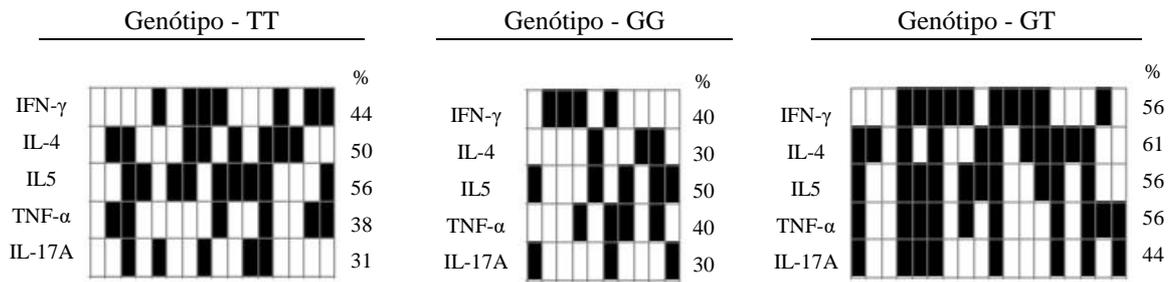
Para todas as citocinas a análise estatística não encontrou diferença significativa entre os grupos analisados.

Utilizando essa categorização dos indivíduos em alto e baixo produtor, um diagrama foi elaborado para verificar se houve associação entre o polimorfismo gênico e a produção de citocinas (Figuras 14A e 15A). Da mesma forma como descrito anteriormente, os retângulos brancos representam indivíduos considerados “baixo produtor” e os retângulos pretos representam aqueles “alto produtor”. Assim, os indivíduos do grupo controle positivo sem lesão ocular (TOXO) e do grupo com lesão ocular (Ocular TOXO) foram reorganizados de acordo com o seu genótipo. Para o gene *APEX1* (Figura 14) os indivíduos foram agrupados em homozigoto normal (TT), homozigoto polimórfico (GG) e heterozigoto (GT). Para o gene *MyD88* (Figura 15), a reorganização gerou dois grupos: homozigoto normal (GG) e heterozigoto (AG). Como apenas 3 indivíduos apresentavam alelos homozigotos polimórficos (AA), estes foram excluídos para evitar viés na análise. A frequência de “alto produtores” para cada citocina observada para cada genótipo se encontra no final da sequência dos retângulos (Figuras 14A e 15A). Utilizando apenas a frequência de “alto produtores”, um gráfico em barras foi elaborado (Figuras 14B e 15B). A análise estatística mostrou que não houve associação entre polimorfismo dos genes *APEX1* e *MyD88* e a produção de citocinas.

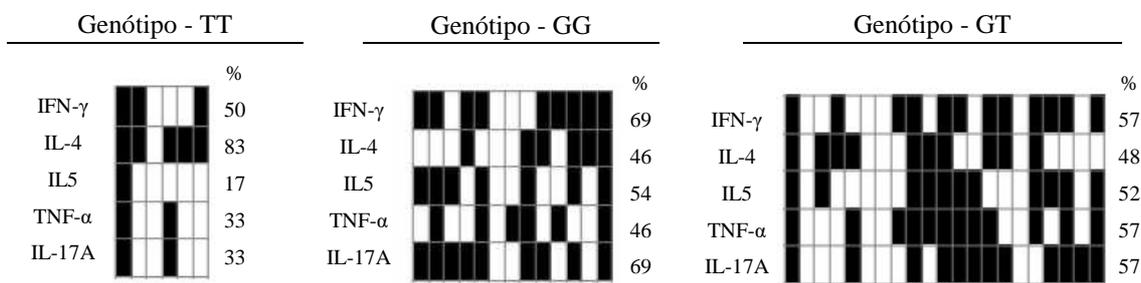
Para verificar se houve relação entre a produção de citocinas e o *status* de perda de visão, utilizou-se a mesma categorização dos indivíduos, ou seja, alto e baixo produtor de acordo com a mediana global encontrada (Figura 12). Um diagrama também foi elaborado (Figura 16A) da mesma forma como descrito anteriormente. O *status* de perda da visão foi organizado em três categorias: (a) 0 – 20%; (b) 21 – 59%; (c) \geq 60%. Os indivíduos do grupo controle positivo (TOXO) e do grupo com lesão ocular (Ocular TOXO) foram reorganizados de acordo com a porcentagem da visão perdida. A frequência de alto produtores para cada citocina observada para cada *status* da visão se encontra no final da sequência dos retângulos (Figura 16A). Essa frequência de “alto produtores” foi utilizada para gerar um gráfico em barras (Figura 16B). A análise estatística mostrou, entretanto, que não houve associação entre o *status* da perda da visão e a produção de citocinas.

A

Controle positivo sem lesão ocular (TOXO)



Grupo com lesão ocular (Ocular TOXO)



B

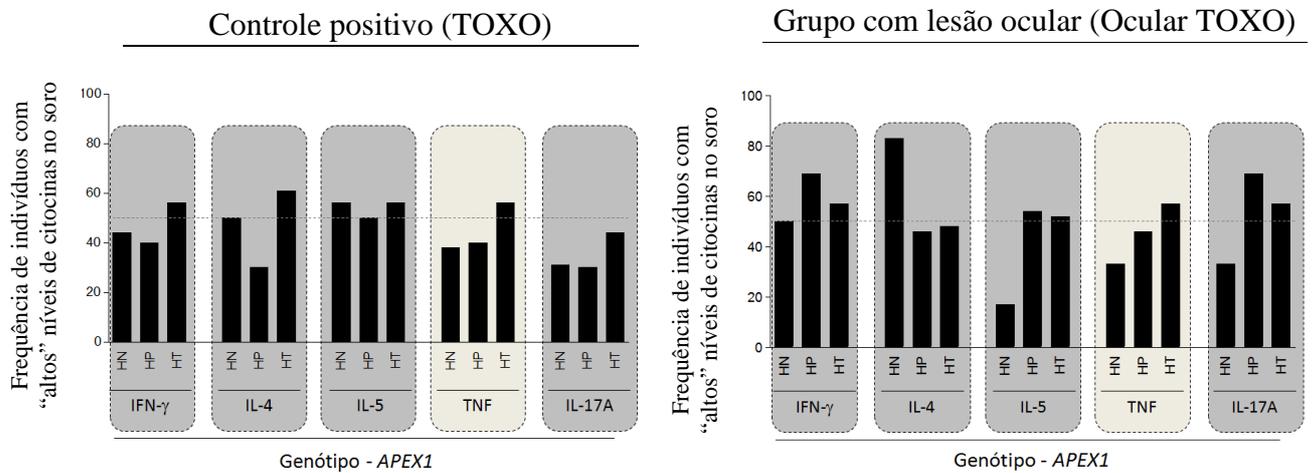
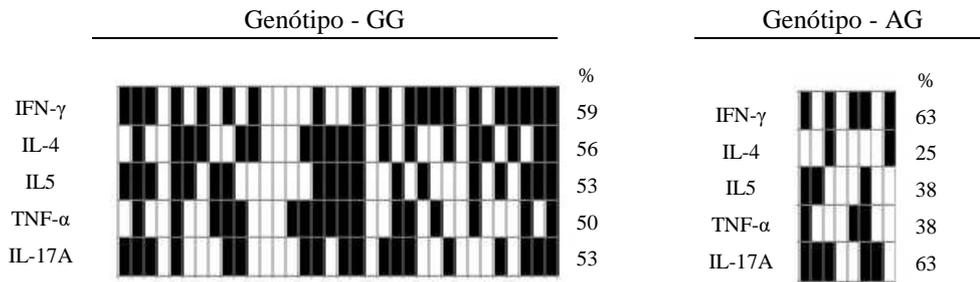


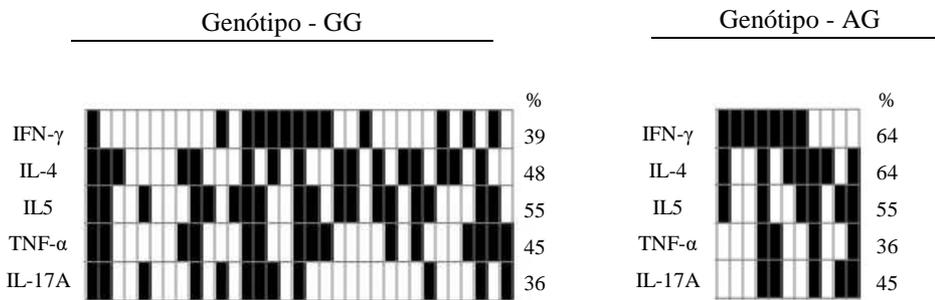
Figura 14. Influência do polimorfismo do gene *APEX1* na frequência de indivíduos com “altos” níveis de citocinas no soro. **A.** Diagrama categorizando os indivíduos “baixo produtores” (retângulos brancos) e “alto produtores” (retângulos pretos) em relação ao genótipo. **B.** Frequência de alto produtores para cada citocina observada para cada genótipo. . HN: homocigoto normal (TT); HP: homocigoto polimórfico (GG); HT: heterocigoto (GT).

A

Controle positivo sem lesão (TOXO)



Grupo com lesão ocular (Ocular TOXO)



B

Controle positivo (TOXO)

Grupo com lesão ocular (Ocular TOXO)

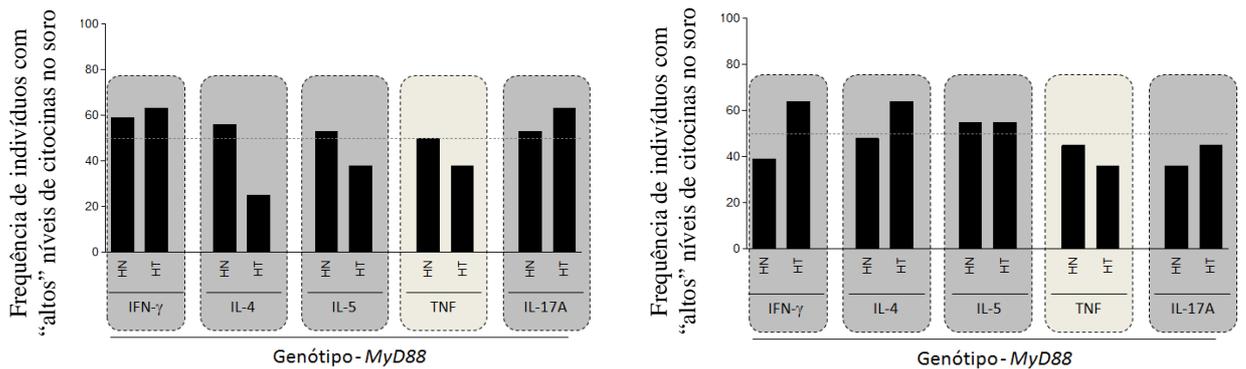
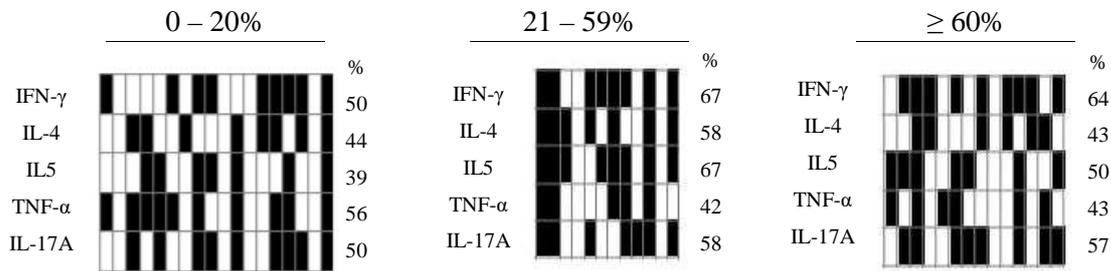


Figura 15. Influência do polimorfismo do gene *MyD88* na frequência de indivíduos com “altos” níveis de citocinas no soro. **A.** Diagrama categorizando os indivíduos baixo produtores (retângulos brancos) e alto produtores (retângulos pretos) em relação ao genótipo. **B.** Frequência de alto produtores para cada citocina observada para cada genótipo. HN: homocigoto normal (TT); HT: heterocigoto (GT).

A

Status de perda da visão



B

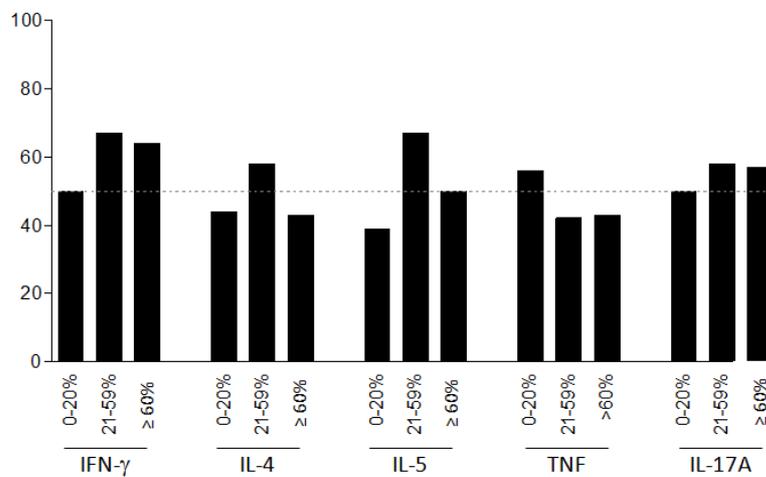


Figura 16. Influência dos níveis séricos de citocinas no *status* de perda de visão. **A.** Diagrama categorizando os indivíduos baixo produtores (retângulos brancos) e alto produtores (retângulos pretos) em relação ao *status* da perda da visão organizado em três categorias: perda de 0 a 20% de visão, perda de 21 a 59% de visão e perda de visão igual ou superior a 60%. **B.** Frequência de “alto produtores” observada para cada citocina em relação ao *status* de perda de visão.

6.5. DISCUSSÃO

Estudos na Colômbia e Brasil sugerem que a toxoplasmose ocular é mais comum na América do Sul que em outros continentes (Furtado et al. 2013). No Brasil aproximadamente 30% dos pacientes com diagnóstico de doenças oculares apresentam lesão ocular causada por *T. gondii*, e a prevalência dessa lesão parece ser alta, apresentando variações de acordo com a área estudada (Dubey et al. 2012). Em estudantes da cidade de Natal (RN), a prevalência encontrada foi de 1,2% (Garcia et al. 2004), já em Erechim, no sul do Brasil, foi de 17,7% (Glasner et al. 1992). Outros trabalhos no Brasil demonstraram prevalências dentro desta faixa de variação dependendo da área geográfica, condições ambientais e faixa etária estudada (Abreu et al. 1998; Portela et al. 2004). Em Maryland e no Estado do Alabama (EUA), a prevalência de lesões de retinocoroidite sugestivas de toxoplasmose na população em geral foi menor, sendo diagnosticada em 0,6% dos indivíduos analisados (Maetz et al. 1987).

A idade tem sido o fator de risco mais citado em estudos abordando a toxoplasmose ocular (Friedmann e Knox 1969, Gilbert et al. 1999, Bosch-Driessen et al. 2002) mostrando que a manifestação ocorre predominantemente da segunda para a quarta década de vida (Holland 2009). Tais dados são corroborados pelos nossos onde a maioria dos casos de lesão ocular foi diagnosticada em indivíduos com idade variando entre 15 e 45 anos, apresentando idade média de 27,2 anos. Bosch-Driessen e colaboradores (2002) também encontraram uma maior frequência de lesão ocular dentro dessa faixa etária, com idade média de 31,1 anos. Associação entre lesão ocular, idade e tempo de infecção mostrou que 2 a 3% dos indivíduos soropositivos poderão desenvolver lesão ocular, e a idade média encontrada para a manifestação dessa lesão foi de 29,9 anos para aqueles com características sorológicas de infecção tardia e 50,6 anos para aqueles com características sorológicas de infecção recente (Bosch-Driessen et al. 2002).

Mattos e colaboradores (2014) encontraram diferença significativa entre a média das idades dos pacientes soropositivos com toxoplasmose ocular e um grupo controle (composto por indivíduos com outra doença ocular além de serem soropositivos), indicando maior frequência da lesão em indivíduos cuja média de idade era mais baixa que do grupo controle. As diferenças metodológicas dificultam a comparação direta dos dados, mas o fato do mesmo padrão básico ter sido relatado sugere que há uma verdadeira relação entre os episódios de lesão e indivíduos jovens (Holland 2004). Uma

série de fatores pode contribuir para o padrão observado, como a hipótese de alterações hormonais durante a adolescência, faixa etária em que se observa maior taxa da lesão e também de recorrência da doença (Friedmann e Knox 1969).

Levando em consideração as observações de que a maioria dos indivíduos apresenta lesão ocular entre a segunda e quarta década de vida, e que a prevalência da doença sistêmica aumenta com a idade, alguns autores têm argumentado que, se há associação entre lesão ocular e infecção pós-natal, haveria então um número maior de indivíduos mais velhos com toxoplasmose ocular. Porém, o número de pacientes não reflete a prevalência, uma vez que indivíduos mais velhos desenvolvem a doença, entretanto a frequência com que eles desenvolvem em comparação aos indivíduos mais jovens não é conhecida. E ainda, um estudo do tipo transversal da prevalência da toxoplasmose não reflete necessariamente a idade em que a infecção ocorreu (Holland 2004).

Portela e colaboradores (2004) identificaram como fator de risco para toxoplasmose ocular a residência compartilhada, o que sugere uma fonte comum de infecção entre os membros da família. Estes familiares além de serem expostos e infectados por parasitos de mesmo genótipo, também podem herdar e compartilhar as características genéticas que resultem em uma predisposição a lesão.

Em nosso trabalho encontramos associação entre lesão ocular e polimorfismo gênico, indicando que indivíduos expressando alelos polimórficos (GG) ou heterozigotos (GT) para o gene *APEX1* tem mais chance de desenvolver a doença. Vale ressaltar que esse é o primeiro relato de associação entre polimorfismo gênico da *APEX1* com o desenvolvimento da toxoplasmose ocular. Silva e colaboradores (2011) analisando o mesmo SNP encontraram associação entre o polimorfismo e o desenvolvimento de meningite bacteriana, e Elingarami e colaboradores (2015) analisando outro SNP (rs2275008) desse mesmo gene observaram que o polimorfismo influencia na suscetibilidade ao câncer gástrico.

Um número de patologias humanas como câncer, doença neurodegenerativa e distúrbios cardiovasculares resultam de danos oxidativos ao DNA causados por agentes endógenos ou exógenos (Maynard et al. 2009). A via de reparo por excisão de bases é a principal ferramenta para reparar esse dano. A enzima APE1/Ref-1 participa junto com outras três enzimas dessa via sendo a principal endonucleaseapurínica/apurimidínica em células eucarióticas, com função central nessa via de reparo (Tell et al. 2009). A enzima APE1/Ref-1 também regula fatores de transcrição como NFkB que realiza uma função pleiotrófica em controlar a resposta celular pelo estresse oxidativo e também

está envolvido com a expressão de citocinas e morte celular (Tell et al. 2009). Além disso, esta enzima participa no processo de recombinação para troca de classe de anticorpo (Guikema et al. 2007). Ensaios de deleção demonstraram que o SNP rs1130409 está localizado numa região entre os domínios de atividades de reparo (AP endonuclease) e redox desta enzima (Xanthoudakis et al. 1994), influenciando na atividade multifuncional da proteína APE1/Ref-1.

Outro papel de APE1/Ref-1 tem sido observada em degeneração macular relacionada a idade e outras doenças relacionados ao olho. A neovascularização da retina é uma patologia importante em várias doenças oculares, como retinopatia diabética e retinopatia de prematuridade, sendo a principal causa de perda de visão. Estudos têm mostrado que APE1/Ref-1 é altamente expressa nas células endoteliais vasculares da retina e coróide em camundongos, e que a atividade redox de APE1/Ref-1 é necessária para uma eficiente proliferação de células endoteliais da retina (Chiarini e Linden 2000).

Com relação ao gene *MyD88* nenhuma associação foi encontrada entre o polimorfismo e o desenvolvimento da lesão ocular, sugerindo que o polimorfismo nesse SNP não é um fator de risco para ocorrência da toxoplasmose ocular nessa população estudada. Sánchez e colaboradores (2012) analisando o mesmo SNP também não encontraram associação com suscetibilidade a tuberculose na população da Colômbia, porém outras doenças se mostraram relacionadas. Matsunaga e colaboradores (2014) analisando o mesmo SNP encontraram associação entre o polimorfismo e colite ulcerativa, e Chen e colaboradores (2011) encontraram associação com a doença de Buerger (tromboangeíte obliterante).

O MyD88 é uma proteína localizada no citoplasma dos leucócitos e atua como uma proteína central na resposta inflamatória, funcionando como uma ponte entre os receptores e as proteínas kinases (Deguine e Barton 2014). Esses receptores, membros da família *Toll like* e receptor da família IL (IL-1R), estão localizados ou na membrana plasmática ou nos endossomos (Deguine e Barton 2014), e o reconhecimento dos patógenos por esses receptores é o passo chave tanto para a contenção precoce da infecção como para a indução de resposta imune adaptativa (Arnold-Schrauf et al. 2015). O tipo de antígeno reconhecido por eles influencia na sinalização intracelular mediada por MyD88, que pode induzir a expressão de genes de citocinas tanto pró-inflamatória como anti-inflamatórias (Akira 2003).

Das citocinas analisadas nos soros de voluntários com toxoplasmose ocular em nosso estudo observamos que nenhuma apresentou valores significativamente diferentes quando comparado aos grupos controles. Meira e colaboradores (2014) utilizando células mononucleares de sangue periférico estimuladas com antígeno de *T. gondii* observaram níveis mais baixos de IFN- γ em pacientes que apresentavam toxoplasmose ocular quando comparado ao grupo controle, e esses mesmos pacientes com lesão ocular apresentaram níveis de TNF- α maiores que do grupo controle. Dados conflitantes foram descritos por Khan e colaboradores (1994) os quais observaram que, em modelos animais, a replicação de *T. gondii* no olho é controlada por IFN- γ e por subpopulações de células T CD4⁺ e CD8⁺. Níveis elevados de IFN- γ e IL-13 foram observados em pacientes portadores de lesões oculares tipo C causadas por *T. gondii*, as quais são caracterizadas por danos teciduais mais brandos, em relação às lesões observadas em pacientes apresentando lesão ocular tipo A e B (Azevedo-Silva 2001). Carneiro et al (2016) observaram que células NK, CD4⁺ e CD8⁺ provenientes de sangue periférico de recém nascidos com toxoplasmose congênita e lesões oculares inflamatórias ativas, estimuladas com antígeno específico de *T. gondii*, produziram níveis mais elevados de IFN- γ que recém nascidos controle. Observaram ainda níveis significativamente reduzidos de TNF- α , comparativamente a recém-nascidos infectados, mas sem lesões oculares. A análise de TNF- α , em nosso estudo, mostrou o mesmo padrão de comportamento dessa citocina entre o grupo controle e o grupo com lesão ocular, não apresentando diferença significativa entre eles. Yamamoto e colaboradores (2000) analisando amostras de sangue de pacientes com toxoplasmose ocular encontraram níveis mais elevados de TNF- α no grupo com lesão quando comparado com indivíduos controle, mas a diferença também não foi estatisticamente significativa.

A caracterização das lesões oculares bem como a análise de citocinas após cultura de leucócitos de voluntários do estado do Rio Grande do Norte poderá, no futuro, contribuir com os estudos que vem relacionando o perfil imunológico aos diferentes tipos de lesão.

Apesar dos grandes avanços no campo da toxoplasmose ocular, grandes lacunas ainda existem em nosso conhecimento sobre a epidemiologia e fisiopatologia desta doença (Kijlstra e Peterson 2014). Em virtude da irreversibilidade das lesões oculares causadas por *T. gondii* é interessante a busca por ferramentas que permitam encontrar fatores associados à predisposição de desenvolvimento da lesão, pois mesmo com a

instituição da terapia específica, o atraso no diagnóstico e no tratamento pode agravar o quadro do paciente.

7. CONCLUSÕES

- A soroprevalência da infecção por *T. gondii* encontrada no município de Santa Cruz – RN é alta (66,2%) e compatível ao restante do Brasil;
- Os fatores de risco associados a infecção por *T. gondii* neste município foram a idade, grau de escolaridade, ausência de caixa d'água nas residências, presença de 3 ou mais gatos nas residências e ingestão de leite cru / não pasteurizado;
- A prevalência da infecção recente por *T. gondii* através da pesquisa de anticorpos IgM e avides de IgG encontrada foi de 2%;
- A taxa da incidência da toxoplasmose encontrada no município de Santa Cruz – RN foi de 6,8/1000pessoas/mês;
- A frequência de toxoplasmose encontrada em aves (47,4%), cães (75,8%) e gatos (60,1%) sugere um elevado grau de contaminação ambiental por *T. gondii* no município de Santa Cruz – RN;
- Ocorre associação entre a soropositividade de animais domésticos e dos voluntários residentes na área Cônego Monte;
- A análise do polimorfismo gênico mostrou associação entre o desenvolvimento da lesão ocular e a presença dos alelos polimórficos ou heterozigotos do gene *APEXI*;
- Nenhuma associação foi encontrada entre o polimorfismo do gene *MyD88* e desenvolvimento de lesão ocular.
- Não foi observada correlação da toxoplasmose ocular com o perfil de expressão das citocinas IFN- γ , IL -4, IL-5, IL-17A e TNF- α .

8. REFERÊNCIAS

- Abdou NE, Al-Batel MK, El-Azazy OM, Sami AM, Majeed QA 2013. Enteric protozoan parasites in stray cats in Kuwait with special references to toxoplasmosis and risk factors affecting its occurrence. *J Egypt Soc Parasitol.* 43(2): 303 – 314.
- Abramson JH 2011. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiologic Perspectives & Innovations* 8: 1 – 9.
- Abreu MT, Belfort JrR, Garcia AR, Muccioli C, Soriano E, Nussenblat R, Silveira C 1998. Toxoplasmose ocular em Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 61: 540 – 545.
- Adla SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick RS, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2012). The revised classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59 (5): 429 – 493.
- Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH 2012. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 119:651-65.
- Akira S 2003. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278: 38105-8.
- Albuquerque MC, Aleixo AL, Benchimol EI, Leandro AC, das Neves LB, Vicente RT 2009. The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(3): 451-455.
- Albuquerque GR, Munhoz AD, Teixeira M, Flausino W, Medeiros SM, Lopes CWG 2011. Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in dairy cattle, State of Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4): 287 – 290.
- Aleixo ALQC, Curi ALL, Benchimol EI, Amendoeira MRR 2016. Toxoplasmic Retinochoroiditis: clinical characteristics and visual outcome in a prospective study. *PLOS Neglected Tropical Diseases.*
- Allain JP, Palmer CR, Pearson G 1998. Epidemiological Study of Latent and Recent Infection by *Toxoplasma gondii* in Pregnant Women from a Regional Population in the U.K. *Journal of Infection* 36: 189 – 196.
- Ali CN, Harris JA, Watkins JD, Adesiyun A 2003. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in dogs in Trinidad and Tobago. *Veterinary Parasitology* 113: 179 – 187.
- Ahmadpour E, Daryani A, Sharif M, Sarvi S, Aarabi M, Mizani A, Rahimi MT, Shokri A 2014. Toxoplasmosis in immunocompromised patients in Iran: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Infection in Developing Countries* Available at: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/25500647>.
- Amendoeira MRR, Sobral CAQ, Teva A, Lima JN, Klein CH 2003. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in isolated Amerindians, Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(6): 671 – 676.

- Andrade MMC, Pinheiro BV, Cunha MM, Carneiro ACAV, Andrade-Neto V, Vitor RWA 2013. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. *Research in Veterinary Science* 587: 589 - 589.
- Araújo FAP, Silva NRS, Chaplin EL 1989. Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em frangos abatidos para consumo humano em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Arq Fac Vet UFRGS* 17: 23 – 28.
- Arnold-Schrauf C, Berod L and Sparwasser T 2015. Dendritic cell specific targeting of MyD88 signalling pathways in vivo. *Eur. J. Immunol.* 45: 32–39
- Aspöck H, Pollak A 1992. Prevention of prenatal toxoplasmosis by serological screening of pregnant women in Austria. *Scand J Infect Dis.* 84:32-77.
- Atamaca IS, Simsek T, Baatioglu F 2004. Clinical features and prognosis in ocular toxoplasmosis. *Jpn J Ophthalmol* 48: 386 – 391.
- Avelino MM, Campos D Jr, Barbosa JCB, Castro AM 2003. Pregnancy as a risk factor to acute toxoplasmosis seroconversion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 108: 19 – 24.
- Avelino MM, Campos DJr, Parada JB, Castro AM 2004. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age. *BJID* 8(2): 164 – 174.
- Avelino MM, Amaral WN, Rodrigues IMX, Rassi AR, Gomes MBF, Costa TL, Castro AM 2014. Congenital toxoplasmosis and prenatal care state programs. *BMC Infectious Diseases* 14: 33.
- AZEVEDO-SILVA J 2001. Avaliação da resposta imunológica contra antígenos de *Toxoplasma gondii* e *Ascaris lumbricoides* em pacientes residentes em áreas coendêmicas para ambos os parasitas em Campos dos Goytacazes/RJ. Tese de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Biologia do Reconhecer. pp109.
- Azevedo SS, Batista CSA, Vasconcellos SA, Aguiar DM, Ragozo AMA, Rodrigues AAR, Alves CJ, Gennari SM 2005. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, northeast region of Brazil. *Research in Veterinary Science* 79: 51–56.
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG 2003. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 9 (1):55-62.
- Barbosa IR, Holanda CMCX, Andrade-Neto VF 2009. Toxoplasmosis screening and risk factors amongst pregnant females in Natal, northeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 377 – 382.
- Baruzzi RG 1970. Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology. Serologic survey among the Indians of the Upper Xingu River, Central Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 12: 93 – 104.

- Beckett RS, Flym FJ 1953. Toxoplasmosis – report of two new cases, with a classification and with a demonstration of the organism in the human placenta. *New Engl. J. Med.* 249: 345.
- Beltrame MAV, Penab HFJ, Tona NC, Linoa AJB, Gennarib SM, Dubeyc JP, Pereirad FEL 2012. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 188: 225– 230.
- Bezerra RA, Paranhos EB, Del’Arco AE, Albuquerque GR 2009. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 18: 78 – 80.
- Bichara CNC, Canto GAC, Toste CL, Freitas JJS, Carmo EL, Póvoa MM, Silveira EC 2012. Incidence of congenital toxoplasmosis in the city of Belém, State of Pará, Northern Brazil, determined by a neonatal screening program: preliminary results. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(1): 122 – 124.
- Bobić B¹, Sibalić D, Djurković-Djaković O High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecol Obstet Invest.* 1991;31(3):182-4.
- Bóia, MN, Carvalho-Costa FA, Sodrê FC, Pinto GMT, Amendoeira MRR 2008. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauaretê, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 50(1): 17 – 20.
- Bonametti AM, Passos JN, Silva EMK, Bortoliero AL 1997. Surto de Toxoplasmose Aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30: 21 – 25.
- Bonfioli AA, Orefice F. Toxoplasmosis 2005. *Semin Ophthalmol.* 20: 129- 141.
- Boothroyd JC, Grigg ME 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 5: 438 – 442.
- Bosch-Driessen EH, Rothova A 1999. Recurrent ocular disease in postnatally acquired toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol.* 128: 421-425.
- Bosch-Driessen, L. H. et al. 2000. Retinal detachment in ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology*, [S.l.], v. 107, p. 36-40.
- Bosch-Driessen LE, Berendschot TT, Ongkosuwito JV, Rothova A 2002. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. *Ophthalmology* 109: 869-878
- Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* 350: 173–177.
- Braga MSCO, André MR, Jusi MMG, Freschi CR, Teixeira MCA, Machado RZ 2012. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in cats

with outdoor access in São Luís, Maranhão, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21 (2): 107 – 111.

Brisighelli Neto A 1998. Prevalência da toxoplasmose em gestantes da cidade de Bragança Paulista: São Paulo, *PhD thesis*, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

Brown SE, Howard CR, Zuckerman AJ, Steward MW 1984. Affinity of antibody responses in man to hepatitis B vaccine determined with synthetic peptides. *Lancet* 2: 184 – 187.

Brown CR, Hunter CA, Estes RA, Beckmann E, Forman J, David C, Remington JS, Mcleod R 1995. Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. *Immunology* 85: 419 – 428.

Buery JC, Fux B, Vitor RWA, Sartori F, Junior CC 2014. Analysis of Seroconversion Rate and Factors Associated with Toxoplasmosis in a Rural Area of an Extra-Amazonian Region in Brazil: A Cohort Study. *The Open Tropical Medicine Journal* 7: 1 – 10.

Cañón-Franco WA, Bergamaschi DP, Labruna MB, Camargo LMA, Silva JCR, Pinter A, Gennari SM 2004. Occurrence of Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. *Veterinary Research Communications* 28: 113 – 118.

Cardia DF, Camossi LG, Neto Lda S, Langoni H, Bresciani KD 2013. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. Infection in cats from Brazil. *Veterinary Parasitology* 197: 634– 637.

Carellos EVM, Andrade GMQ, Vasconcelos-Santos DV, Januário JN, Romanelli RMC, Abreu MNS, Silva FM, Loures IRC, Andrade JQ, Caiaffa WT 2014. Adverse Socioeconomic Conditions and Oocyst-Related Factors Are Associated with Congenital Toxoplasmosis in a Population-Based Study in Minas Gerais, Brazil. *Plos One* Volume 9: issue 2.

Carmen MGD, Mondragón M, González S, Mondragón R 2009. Induction and regulation of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology* 11(6): 967 – 982.

Carneiro ACAV, Andrade GMQ, Costa JGL, Pinheiro BV, Vasconcelos-Santos DV, Ferreira AM, Su C, Januário JN, Vitor RWA 2013. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis in Minas Gerais state, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 3901-3907.

Casartelli-Alves VC, Boechat R, Macedo-Couto LC, Ferreira J.L, Nicolau LB, Neves PR, Millar RT, Vicente RVC, Oliveira AG, Muniz ICF, Bonna MRR, Amendoeira RC, Silva H, Langoni TMP, Schubach RC, Menezes L 2014. Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of

Toxoplasma gondii infection in domestic chickens. *Veterinary Parasitology* 204: 346 – 351.

Caspi RR 2006. Ocular immunity: price of privilege. *Immunol Res.* 213: 23 –35.

Cavalcante GT, Aguiar DM, Chiebao D, Dubey JP, Ruiz VLA, Dias RA, Camargo LMA, Labruna MB, Gennari SM. 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural western Amazon, Brazil. *Journal of Parasitology* 92: 863–864.

Cavalcante ACR, Carneiro M, Gouveia AMG, Pinheiro RR, Vitor RWA 2008. Risk factors for infection by *Toxoplasma gondii* in herds of goats in Ceará, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60: 36-41.

Chen Z, Nakajima T, Inoue Y, Kudo T, Jibiki M, Iwai T, Kimura A 2011. A single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of MyD88 gene is associated with Buerger disease but not with Takayasu arteritis in Japanese. *J Hum Genet.* Jul;56(7):545-7.

Chiari, C.A.; Neves, D.P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.79, p.337-340, 1984.

Chiarini LB, Linden R 2000. Tissue biology of apoptosis. Ref-1 and cell differentiation in the developing retina. *Ann N Y Acad Sci* 926: 64–78.

Chia-Wung F, Kua-Eyre S, Wen-Cheng C, Yu-Jen T, Hung-Yi C, Chin-Forhg L, Chien-Tien S, Ming-Chuan T, Pan-Hua C 1998. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies among Atayal Aboriginal people and their hunting dogs in Northeastern Taiwan. *Jpn. J. Med.Sci. Biol.*51, 35 – 42.

Clementino MM, Souza MF, Andrade-Neto VF 2007. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. *Veterinary Parasitology* 146: 199 – 203.

Coelho RAL, Kobayashi M, Carvalho L B Jr 2003. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 45(4): 229 – 231.

Colombo FA, Vidal JE, Oliveira ACP, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL 2005. Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in AIDS Patients in Brazil: Importance of Molecular and Immunological Methods Using Peripheral Blood Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (10): 5044–5047.

Colosimo EA, Giolo SR 2006. *Análise de Sobrevivência Aplicada*. 1 ed., Edgard Blücher, São Paulo, 369 pp.

Conrad PA, Miller MA, Kreuder C 2005. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters and sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int J Parasitol* 35: 1155 – 1168.

Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zuffrey J, Petersen E, Jennum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre casecontrol study. *Brit. Med. J.* 321: 142 – 147.

- Cordeiro CA, Moreira PR, Andrade MS, Dutra WO, Campos WR, Oréface F, Teixeira AL 2008. Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 1979-1982.
- Cordeiro CA, Moreira PR, Dutra WO, Young L, Campos WR, Oréface F, Junior ALT 2010. Imunologia da retinocoroidite toxoplásmica. *Arq Bras Oftalmol* 73(6): 548 – 551.
- Costa MAS, Bezelga AL, Trindade CD, Neto JAF 2010. Soroprevalência da toxoplasmose no hospital universitário materno infantil de São Luís – MA, em 2008. *Cad. Pesquisas* 17, n. 3
- Costa DGC, Marvulo MFV, Silva JSA, Santana SC, Magalhães F JR, Lima Filho CDF, Ribeiro VO, Alves LC, Mota R A, Dubey JP, Silva JCR 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. *Journal of Parasitology* 98 (3): 679 – 680.
- Coutinho SG, De Souza WJS, Camillo-Coura L, Marzochi MCA, Amendoeira MRR 1981. Levantamento dos resultados das reações de imunofluorescência indireta para toxoplasmose em 6079 pacientes de ambulatório ou gestantes no Rio de Janeiro realizadas durante os anos de 1971 a 1977. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 23: 48 – 56.
- Couto JCF, Leite JM 2004. Sinais ultra-sonográficos em fetos portadores de toxoplasmose congênita. *Rev Bras Ginecol Obstet* 26: 377 – 382.
- Cozon GJN, Ferrandiz J, Nebhi H, Wallon, M; Peyron, 1998. Estimation of the Avidity of Immunoglobulin G for Routine Diagnosis of Chronic *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17: 32 - 36.
- Cruz, MA, Ullmann IS, Montañó PY, Hoffmann JL, Langoni H, Biondo AW 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cats from Curitiba, Paraná, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20 (3): 256 – 258.
- Current WL, Upton SJ, Long PL 1990. Taxonomy and Life Cycle. In: PL Long. *Coccidiosis of man and domestic animals*, CRC Press, Boston, p. 7-8.
- Da Silva DS, Bahia-Oliveira LM, Shen SK, Kwok OC, Lehman T, Dubey JP 2003. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in southern Brazil highly endemic to humans. *J. Parasitol.* 89: 394–396.
- D´armino MA, Cinque P, Mocroft A 2004. Changing incidence of central nervous system diseases in the euro SIDA Cohort. *Ann Neurol* 55: 320 – 328.
- Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR 2010. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci.* 1183: 211 – 21.
- Darde ML 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita* 40: 57 – 63.
- Deguine J and Barton GM 2014. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Reports* 6:97

- De-la-Torre A, Pfaff AW, Grigg ME, Villard O, Candolfi E, Gomez-Marin JE 2014. Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. *Cytokine* 68: 23–31.
- De Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada M, Jones JL 2006. Waterborne Toxoplasmosis in Brazil, from Field to Gene. *Emerging Infectious Diseases* 12: 326 – 329.
- De Oliveira LN, Costa LM, De Melo CB, Silva JCR, Bevilaqua CML, Azevedo SS, Muradian V, Araújo DAFV, Dubey JP, Gennari SM 2009. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the Northeast Region of Brazil. *Journal of Parasitology* 95: 235 – 237.
- De Souza SLP, Gennari SM, Yai LEO, Daúria SRN, Cardoso SMS, Guimarães Júnior JS, Dubey JP 2003. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 12: 1–3.
- Decoster A, Darcy F, Capron A, et al. Anti-P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital toxoplasma infection. *Clin Exp Immunol* 1992;87:310e5.
- Denkers EY, Gazzinelli RT 1998. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clinical microbiology reviews* 569–588.
- Denkers EY, Butcher BA, Del RL 2004. Manipulation of mitogenactivated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular *Toxoplasma gondii* infection. *Immunol Rev* 201: 191 – 205.
- Desmonts G, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J, Lelong M 1965. Etude epidemiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. *Rev Fr Etudes Clin Biol* 10: 952-958.
- Dias RCF, Lopes-Mori FMR, Mitsuka-Breganó R, Dias RAF, Tokano DV, Reiche EMV, Freire RL, Navarro IT 2011. Factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women attended in Basic Health Units in the city of Rolândia, Paraná, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 53(4): 185 - 191
- DiDonato, J. A., Mercurio, F. & Karin, M 2012. NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev* 246, 379–400.
- Do Amaral V, Santos SM, Redouças MM 1978. Considerações sobre a prevalência de anticorpos antiToxoplasma em soros de suínos provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina, Ceará e Piauí, Brasil. *O Biológico* 44: 117 – 120.
- Donath, M. Y. & Shoelson, S. E 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11, 98–107.
- Du F, Zhang Q, Yu Q, Hu M, Zhou Y, Zhao J 2012. Soil contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in pig farms in central China. *Vet Parasitol*. [Epub ahead of print]
- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK 1970. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 132: 636 – 662.

- Dubey JP, Frenkel JK 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *Journal of Protozoology* 19: 155–177.
- Dubey JP 1983. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pre-pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol.* 13: 199 – 211.
- Dubey JP, Beattie CP 1988. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: CRC Press, 220 p.
- Dubey JP 1994. Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc.* 205: 1593 –1598.
- Dubey JP 1996. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J Parasitol.* 82: 957 – 961.
- Dubey JP 1998. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitology.* 116: 43 – 50.
- Dubey JP 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. *Journal of Parasitology* 88 (4) 802 – 803.
- Dubey JP, Navarro I T, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, Vianna MCB, Kwok OCH, Shen SK, Thulliez P, Lehmann T 2004. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *Journal of Parasitology* 90: 721 – 726.
- Dubey JP, APPLEWHAITE L, SUNDAR N, VELMURUGAN GV, BANDINI LA, KWOK OCH, HILL R, SU C 2007. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America identified several unique and common parasite genotypes. *Parasitology* 134: 1–7.
- Dubey JP 2009. Toxoplasmosis in sheep – The last 20 years. *Veterinary Parasitology* 163: 1 – 14.
- Dubey JP 2010. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health.* 57(1): 60 – 73.
- Dubey JP, Rajendran C, Costa DG, Ferreira LR, Kwok OC, Qu D, Su C, Marvulo MF, Alves LC, Mota RA, Silva JC. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. *J Parasitol.* 2010 96(4):709-712.
- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL 2012: Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 139(11): 1375 – 1424.
- Elingarami S, Liu H, Kalinjuma AV, Hu W, Li S, He N 2015. Polymorphisms in NEIL-2, APE-1, CYP2E1 and MDM2 Genes are Independent Predictors of Gastric Cancer Risk in a Northern Jiangsu Population (China). *J Nanosci Nanotechnol.* Jul;15(7):4815-28.

- Economou, J. S., W. H. McBride, R. Essner, K. Rhoades, S. Golub, E. C. Holmes, and D. L. Morton. 1989. Tumour necrosis factor production by IL-2-activated macrophages in vitro and in vivo. *Immunology* 67:514–519.
- El-On J; Peiser J 2003. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Harefuah* 142: 48 – 55.
- Essner, R., K. Rhoades, W. H. McBride, D. L. Morton, and J. S. Economou. 1989. IL-4 downregulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J. Immunol.* 142:3857–3862.
- Esteban-Redondo I, Innes E 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *International Journal for Parasitology* 28: 1459 – 1466.
- Ferguson DJP 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(2): 133 – 148.
- Ferraroni JJ, Reed SG, Speer CA 1980. Prevalence of *Toxoplasma* Antibodies in Humans and Various Animals in the Amazon. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 47(1): 148 – 150.
- Ferreira A M, Vitor RW, Gazzinelli RT, Melo MN 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 6(1):22-31
- Ferreira UM, Hiramoto RM, Aureliano DP, Silva-Nunes M, Silva NS, Malafronte RS, Muniz PT 2009. A Community-based Survey of Human Toxoplasmosis in Rural Amazonia: Seroprevalence, Seroconversion Rate, and Associated Risk Factors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81(1): 171 – 176.
- Ferreira IMR, Vidal JE, De Mattos CCB, De Mattos LC, Qu D, Su C, Pereira-Chiocola VL. 2011. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp. Parasitol.* 129: 190 – 195.
- Figueredo, LA, De Faria EB, Mota RA, Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP, Simões-Mattos L, Gondim LFP 2008. *Veterinary Parasitology* 157(1-2): 9 – 13.
- Filho MFS, Tamekuni K, Toledo RS, Dias RCF, Lopis-Mori FMR, Mitsuka-Breganó R, Thomaz-Soccol V, Garcia JL, Freire RL, Vidotto O, Navarro IT 2012. Infecção por *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* spp. em humanos e cães de assentamentos rurais no Norte do Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias* 33 (2): 3251-3264.
- Fournier GFSR, Lopes MG, Marcili A, Ramirez DG, Acosta ICL, Ferreira JIGS; Cabral AD, Lima JTRL, Pena HFJ, Dias RA, Gennari SM 2014. *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from Forest fragments of the municipality of Natal, northeastern Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23 (4): 501-508.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL 1970. *Toxoplasma gondii* in cats fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* (167): 893 – 896.
- Frenkel JK 1988. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today* 4:273–278.

- Frenkel JK 1991. Toxoplasmose. In: Veronesi, R. - Doenças infecciosas e parasitárias. 8. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 734-749.
- Freyre A, Dubey JP, Smith DD, Frenkel JK 1989. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J Parasitol.* 75: 750 – 755.
- Friedmann CT, Knox DL 1969. Variations in recurrent active toxoplasmic retinochoroiditis. *Arch Ophthalmol* 81: 481-493.
- Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Yamada Y, Wada H 2002. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 70: 779-86.
- Furtado JM, Smith JR, Belfort R Jr, Gattey D, Winthrop KL. Toxoplasmosis: a global threat. *J Glob Infect Dis.* 2011 Jul;3(3):281-4.
- Furtado JM, Kevin LW, 1,2,3 Nicholas JB and Justine RS 2013. Ocular toxoplasmosis I: parasitology, epidemiology and public health. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 41: 82–94
- Gaddi PJ, Yap GS 2007. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol Cell Biol* 85: 155-159.
- Galisteu KJ, Mattos CB, Lelis AGL, Oliveira MP, Spejorim LF, Jordão P, Zago AP, Cury PM, Mattos LC, Rossit ARB, Cavasini CE, Ricardo Luiz Dantas Machado RLD 2007. Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. *Rev Panam Infectol* 9(4): 24 – 29.
- Galván-Ramírez ML, Soto MJL, Velasco CO, Pérez MR 1995. Incidence of antitoxoplasma antibodies in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. *Rev Soc Bras Med Trop* 28: 333 - 337.
- Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, De Oliveira RC 1999. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, estado do Paraná, Brasil. *Ciência Rural* 29 (1): 99 – 104.
- Garcia CAA, Orefice F, Oliveira IC, Gomes AB, Franca MG, Garcia FCAA 2004. Socioeconomic conditions as determining factors in the prevalence of systemic and ocular toxoplasmosis in Northeastern Brazil. *Ophthalmic Epidemiology* 11: 301-317.
- Garrido JA 1978. Toxoplasmosis. 1ª ed. Espanha, Editorial Marban, p. 15 – 18.
- Garweg JG, Scherrer JN, Halberstadt M, 2008. Recurrence characteristics in European patients with ocular toxoplasmosis. *Br. J. Ophthalmol.* 92: 1253 -1256.
- Garweg J G, Candolfi E 2009. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(2): 211 – 220.
- Gazzinelli RT, Li Q, Nussenblatt RB, Chan CC 1994. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Exp Parasitol.* 78(2): 217 – 229.

- Gazzinelli RT, Amichay DT, Scharon-Kersten E, Grunvald JM, Farber AS 1996. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219: 127 – 140.
- Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, Murray PI, Pavesio CE, Gormley PD, Masters J, Parker SP, Stanford MR 1999. Incidence of symptomatic *Toxoplasma* eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect* 123: 283-289.
- Gilbert R, Gras L 2003. European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis. Effect of timing and type of treatment on the risk of mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*. *Int J Obstet Gynaecol* 110:112-20.
- Giraldi JH, Bracarense APFRL, Vidotto O, Tudury EA, Navarro IT, Batista TN 2002. Serology and histopathology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs with neurologic disorders. *Semina: Ciências Agrárias* 23 (1): 9 – 14.
- Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins, MC, Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Török HP, Schmechel S, Tonenchi I, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S, Maier K, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Folwaczny M, Mussack T, Brand S 2007. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS One.* 5; 2(9): 819.
- Gomes UA, Teruel JR, Ferrioli FF, Nogueira J L 1975. Estudo comparativo das frequências de infecção por *Toxoplasma gondii* nas zonas urbana e rural. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 17: 355 – 360.
- Gomides MDA, Berbert ALCV, Mantese SAO, Rocha A, Ferreira MS, Borges AS 2002. Dermatoses em pacientes com Aids: estudo de 55 casos. *Rev Assoc Med Bras.* 48: 36 - 41.
- Gross U, Bohne W, Soête M, Dubremetz JF 1996. Developmental Differentiation between Tachyzoites and Bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Today* 12: 30 – 33.
- Guikema JE, Linehan EK, Tsuchimoto D, Nakabeppu Y, Strauss PR, Stavnezer J, Schrader CE 2007. APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination, *J. Exp. Med.* 204: 3017–3026.
- Guimarães AM, Ribeiro MFB, Lima JD, De Almeida TMB 1992. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da raça Piau. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 44, 69 – 71.
- Guimarães AM, Rocha CMBM, Oliveira TMFS, Rosado IR, Morais LG, Santos RRD 2009. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 18 (Suppl 1): 49 – 53.
- Hashemi-Fesharki R 1996 Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. *Veterinary Parasitology* 61: 1 – 3.
- Hedman K, Lappalainen M, So DM, Hedman L. 1993. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. *Rev Med Microbiol* 4: 123 – 129.

- Hoffmann AR, Cadieu J, Kiupel M, Lim A, Bolin SR, Mansell J 2012. Cutaneous toxoplasmosis in two dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24(3): 636–640.
- Holland GN 1999. Intraocular inflammatory reactions without focal necrotizing retinochoroiditis, in patients with acquired systemic toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 128: 413-420.
- 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.
- Holliman RE, Raymond R, Renton N, Johnson JD 1994. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. *Epidemiol. Infect.* 112: 399 – 408.
- Homan WL, Vercammenb M, De BJ, Verschueren H 2000. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Inter J Parasitol* 30: 69 – 75.
- Hu X, Ivashkiv LB 2009. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity.* 31(4):539–550.
- Hutchison WM, Dunachie JF, Work K, Siim JC 1971. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 380 – 399.
- Innes EA 1997. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 20: 131-8.
- Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong ZR, Schreiber DJE, Murphy KM 1995. Interleukin-12 signaling in T helper type 1 cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT) s and STAT 4. *J. Exp. Med.* 181: 1755–1762.
- Jittapalapong S, Sangvaranond A, Pinyopanunat N, Chimnoi I, Koizumi S, Maruyama S 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. *Veterinary Parasitology* 127: 17 – 22.
- Johnson LL, Dyer R, Hupe DJ 1998. Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol* 2: 466 – 471.
- Johnson MW, Greven GM, Jaffe GJ, Sudhalkar H, Vine AK 1997. Atypical, severe toxoplasmic retinochoroiditis in elderly patients. *Ophthalmology* 104: 48 – 57.
- Jones JL, Kruszon-Moran D, Wilson M, McQuillan G, Navin T, McAuley JB 2001. *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am J Epidemiol* 154: 357–65.

- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R 2003. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol* 56: 296 – 305.
- Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG 2009. Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in the United States. *CID* 49: 878 – 884.
- Junior CEOC, Monteiro CH 2010. Perfil Sorológico da Toxoplasmose na Grande João Pessoa/PB. *RBAC* 42(2): 149 – 154.
- Kakumu, S. et al 1997. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 109, 458–463.
- Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A 2007. Human T(H)-17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13: 1173-1175.
- Khan I. A., Ely K. H. AND Kasper L 1994. H. Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* 152 (4): 1856-60.
- Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort R, Jr, et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:942–9
- Kijlstra A and Petersen E 2014. *Ocular Immunology & Inflammation* 22(2): 138–147.
- Friedmann CT, Knox DL 1969. Variations in recurrent active toxoplasmic retinochoroiditis. *Arch Ophthalmol* 81: 481-493.
- Kim SK, Fouts AE, Boothroyd JC 2007. *Toxoplasma gondii* dysregulates IFN-gamma-inducible gene expression in human fibroblasts: insights from a genome-wide transcriptional profiling. *J Immunol.* 178: 5154–65
- Kravetz JD, Federman DG 2005. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am j med* 118(3): 212 – 216.
- Kurokawa H, Kato K, Iwanaga T, Sugi T, Sudo A, Kobayashi K, Gong H, Takemae H, Recuenco FC, Horimoto T, Akashi H 2011. Identification of *Toxoplasma gondii* cAMP Dependent Protein Kinase and Its Role in the Tachyzoite Growth. *PLoS ONE* 6(7): e22492. doi:10.1371/journal.pone.0022492.
- Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Cunha ELP, Cutolo AA 2001. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.* 38 (5): 243 – 244.
- Lanjewar DN, Surve KV, Maheshwari MB, Shenoy BP, Hira SK 1998. Toxoplasmosis in the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *Indian J Pathol Microbiol* 41: 147 – 151.
- Lebech M, Andersen O, Christensen NC, Hertel J, Nielsen HE, PeterLebech M, Andersen O, Christensen NC, Hertel J, Nielsen HE, Peter, Hertel J, Nielsen HE, Peter

- Hertel J, Nielsen HE, Petersen B 1999. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. Danish Congenital Toxoplasmosis Study Group. *Lancet* 353:1834-37.
- Lee S, Kim J, Kim Y, Cho S, Ahn, H, Woo, H, Lee W, Nam H 2010. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Stray and Household Cats in Regions of Seoul, Korea. *Korean J Parasitol*. Vol. 48 (3): 267 – 270.
- Leng J, Butcher BA, Egan CE, Abi Abdallah DS, Denkers EY 2009. *Toxoplasma gondii* prevents chromatin remodeling initiated by Toll-like receptor-triggered macrophages activation. *J Immunol*. 182: 489 – 97.
- Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet Parasitol*. 1997 Dec 15;73(1-2):27-33.
- Li JR, Chen XC 1990. An outbreak of toxoplasmosis in chickens.(in Chinese). *Chin. J. Prev. Vet. Med*. 9: 36.
- Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S, Press C, Remington JS 2001. Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. *J Infect Dis* 183: 1248 – 1253.
- Lindsay DS, Collins MV, Mitchell SM 2004. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J Parasitol* 90: 1054 – 1057.
- Literak I, Hejlíček K 1993. Incidence of *Toxoplasma gondii* in population of domestic birds in the Czech Republic. *Avian Pathology* 22: 275 – 281.
- Liu XJ, Zhang JL, Feng JX 1983. Diagnosis of toxoplasmosis in chickens.(In Chinese). *Chin. J. Prev. Vet. Med*. 9: 10–12.
- Lopes-Mori FMR, Regina M, Capobianco, JD, InoueIT, Reiche EMV, Morimoto HK, Casella AMB, Bittencourt IHFB, Freire RL, Navarro IT 2011. Programas de controle da toxoplasmose congênita. *Rev Assoc Med Bras* 57(5): 594 – 599.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265 – 275.
- Luft BJ, Remington JS 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*. 15: 211 – 222.
- Mackay CR 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol*, 2: 95–101.
- Maetz HM, Kleinstein RN, Federico D, Wayne J 1987. Estimated prevalence of ocular toxoplasmosis and toxocariasis in Alabama. *Journal of Infectious Diseases* 156: 414.
- Maia LP, Gómez-Hernández C, Oliveira KR, Nomeline QSS, Aidar FLM, Ferreira GLS, Ferreira LS 2012. Soroprevalência de toxoplasmose na região do pontal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil. *Revista de patologia tropical* 41 (4): 457 – 464.

- Mandai ON, Lopes FMR, Mitsuka-Breganó R 2007. Prevalência de anticorpos IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii* em gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde do município de Londrina – Paraná, no período de 2003 e 2004. *RBAC* 39(4): 247 – 249.
- Marcolino, P.T., D.A.O. Silva, P.G. Leser, M.E. Camargo, and J.R. Mineo. 2000. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by western blotting. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 384-389.
- Marin I and Kipnis J 2013. Learning and memory...and the immune system. *Immunity and cognition* 20:601–606.
- Marques JM 2008. Estudo da toxoplasmose em uma comunidade rural de Eldorado, PhD thesis, Universidade Paranaense, Umuarama.
- Mattos CCB, Spegiorin LCJF, Meira CS, Silva TC, Ferreira AIC, Nakashima F, Pereira-Chiocola VL, Mattos LC 2011. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. *Med J.*:129(4): 261 – 266.
- Matsunaga K, Tahara T, Shiroeda H, Otsuka H, Nakamura M, Shimasaki T, Toshikuni N, Kawada N, Shibata T and Arisawa T 2014. The *1244 A>G polymorphism of MyD88 (rs7744) is closely associated with susceptibility to ulcerative colitis. *Molecular medicine reports* 9: 28-32.
- Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA 2009. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30: 2–10.
- Mechain BYJ, Garin F, Robert-Gangneux J, Dupouy-Camet, Derouin F 2000. Lack of utility of specific immunoglobulin G antibody avidity for serodiagnosis of reactivated toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7: 703 – 705.
- Meerburg BG, Kijlstra A. Changing climate-changing pathogens: *Toxoplasma gondii* in North-Western Europe. *Parasitol Res.* 2009;105:17–24.
- Meira CS, Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, Mattos CCB, Motoie G, Costa-Silva TA, Gava R, Frederico FB, Mattos LC and Toxoplasma Groups 2014. Cytokines in ocular and cerebral toxoplasmosis. *Frontiers in Microbiology / Microbial Immunology* 5: 492.
- Meireles LR, Galisteo AJ Jr, Pompeu E, Andrade Jr HF 2004. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Tropical Medicine and International Health* 9 (8): 876–881.
- Melamed J, Raffin NN, Agnes MJ 1981. Toxoplasmose no Rio Grande do Sul - inquérito sorológico no interior do estado. *Rev. Pat. Trop.* 10(1): 1 – 7.
- Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls AL, Durand P, et al. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: Population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010

- Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 39: 23 – 39.
- Mineo TWP, Silva DAO, Näslund K, Björkman C, Uggla A, Mineo JR 2004. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.* 56 (3): 414-417.
- Ministério da Saúde, Brasil 2005. Programa Nacional de DST/AIDS BMoH. Epidemiologic bulletin - AIDS II: 1.
- Ministério da saúde / secretaria de vigilância em saúde 2006. Surto de Toxoplasmose no Município de Anápolis - GO.
- Montoya J G 2002. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 15 (Suppl. 1): S73 – S82.
- Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965 – 1976.
- Moré G, Maksimovc P, Pardinia L, Herrmann DC, Bacigalupea D, Maksimovc A, Bassoa W, Conrathsc FJ, Scharesc G, Venturinia MC 2012. *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. *Veterinary Parasitology* 184: 116– 121.
- Mosmann TR, Coffman RL 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145–73.
- Mosti M, Pinto B, Giromella A, Fabiani S, Cristofani R, Panichi M and Bruschi F 2013. *Epidemiol. Infect.* 141, 2192–2195
- Moura FL, Amendoeira MRR, Bastos OMP, Mattos DPBG, Fonseca ABM, Nicolau JL, Neves LB, Millar PR 2013. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection among pregnant and postpartum women attended at public healthcare facilities in the City of Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46 (2). Epub Apr 02, 2013
- Mozzatto L, Procianoy RS 2003. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45: 147 – 151.
- Muñiz-Hernández S, González CM, Mondragón M, Mercier C, Cesbron MF, Mondragón-González SL, González S, Mondragón R 2011. Contribution of the Residual Body in the Spatial Organization of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites within the Parasitophorous Vacuole. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* doi: 10.1155/2011/473983.
- Naginei C.N., Pardhasaradhi K., Martins M.C., Detrick B. & Hooks J.J. 1996. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infection and Immunity* 64, 4188–4196
- Nakayama EE, Meyer L, Iwamoto A, Persoz A, Nagai Y, Rouzioux C, Delfraissy JF, Debre P, Mellroy D, Theodorou I, Shioda T, Sero Study Group 2002. Protective

- effect of interleukin-4 -589T polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 disease progression relationship with virus load. *J Infect Dis* 185: 1183-1186.
- Nelson MM, Jones AR, Carmen JC, Sinai AP, Burchmore R, Wastling JM 2008. Modulation of the Host Cell Proteome by the Intracellular Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 76(2): 828.
- Neves JM, Nascimento LB, Ramos JGL, Martins-Costa SH 1994. Toxoplasmose na gestação. *RBGO* 16:197-202.
- Olariu TR, Remington JS, Mcleod R, Alam A, Montoya JG 2011. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *Pediatr Infect Dis J* 30: 1056–1061.
- Olguin-Lamas A, Madec E, Hovasse A, Werkmeister E, Callebaut I, Slomianny C, Delhay S, Mouveaux T, Schaeffer-Reiss C, Dorsselaer AV, Tomavo S 2011. A Novel *Toxoplasma gondii* Nuclear Factor TgNF3 Is a Dynamic Chromatin-Associated Component, Modulator of Nucleolar Architecture and Parasite Virulence. *PLoS Pathogens* 7, Issue 3.
- Oréface F, Bahia-Oliveira IMG 2005. Toxoplasmose. In: Oréface, F. Uveíte clínica e cirúrgica. 2. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, v.2, p.699-804.
- Oréface F, Filho RC, Barboza AL, Oréface JL, Calucci D 2010. Toxoplasmose ocular adquirida - Toxoplasmose ocular pós-natal. *Rev Bras Oftalmol.* 69 (3): 184-207.
- Ostendorf J, Henderson W 1962. Toxoplasmosis in chickens. Proc. XII World Poultry Congress, pp. 385–387. Sydney, Australia, Section paper 385.
- Osunkalu VO, Akanmu AS, Ofomah NJ, Onyiaorah IV, Adediran A A, Akinde R O, Onwuezobe IA 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* IgG antibody in HIV-infected patients at the Lagos University Teaching Hospital. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care* 3: 101–105.
- Overdulve JP 1970. The identity of *Toxoplasma* Nicolle, Manceaux, 1909 with *Isospora* Schneider, 1881 (I). *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. C*, 73: 129 – 151.
- Pardini, H. Manual de exames: Laboratório Hermes Pardini. Belo Horizonte, 2002. 408p.
- Paul M, Petersen E, Szczapa J. Prevalence of congenital *Toxoplasma gondii* infection among newborns from the Poznan region of Poland: validation of a new combined enzyme immunoassay for *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin A and immunoglobulin M antibodies. *J Clin Microbiol* 2001;39: 1912e6.
- Pawelec G, Solana R, Remarque E, Mariani E 1998. Impact of aging on innate immunity. *J Leukoc Biol* 64: 703-712.
- Petersen, E. Toxoplasmosis, *Semin. Fetal Neonatal Med.*, v. 12, n. 3, p. 214-223, 2007.

- Perez G, Maier H, Nieto E 2001. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 12: 1369 – 1382.
- Perkins E S 1973. Ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol.* 57(1): 1 – 17.
- Pines, A. et al 2005. Activation of APE1/Ref-1 is dependent on reactive oxygen species generated after purinergic receptor stimulation by ATP. *Nucleic Acids Res* 33, 4379–4394.
- Polley L, Thompson RC. Parasite zoonoses and climate change: molecular tools for tracking shifting boundaries. *Trends Parasitol.* 2009;25:285–91.
- Portela RW, Bethony J, Costa M, Gazzinelli A, Vitor RWA, Hermeto F, Correa-Oliveira R, Gazzinelli, RT 2004. A Multihousehold Study Reveals a Positive Correlation between Age, Severity of Ocular Toxoplasmosis, and Levels of Glycoinositolphospholipid-Specific Immunoglobulin A. *The Journal of Infectious Diseases* 190: 175 – 183.
- Porto AMF, Amorim MMR, Coelho ICN; Santos LC 2008. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes atendidas em maternidade. *R. Assoc. Med.Bras.*, 54 (3): 242-248.
- Rajasekariah GHR, Ryan JR, Hillier SR, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, Smithyman AM, Samuel K. Martin SK 2001. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *Journal of Immunological Methods* 252: 105–119.
- Reis MM, Tessaro MM, D’azevedo P 2006. A. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital público de Porto Alegre. *Rev Bras Ginecol Obstet* 28: 158 – 164, 2006.
- Reiter-Owona I 1999. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull World Health Organ* 77 (11): 929 – 35.
- Remington JS, McLeod R, Desmonts G 1995. Toxoplasmosis. In: *Infectious diseases of the fetus & newborn infant*. Remington JS KJ, ed. WB Saunders, Philadelphia: p. 947-1091.
- Requejo HIZ 2006. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saúde Pública* 40(2): 331- 345.
- Rey IC, Ramalho ILC 1999. Seroprevalence of toxoplasmosis in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 41 (3): 171-174.
- Riemann HP, Meyer ME, Theis JH, Kelso G, Behymer DE. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk 1975. *J Pediatr.* Oct; 87 (4): 573-6.
- Roberts F, McLeod R 1999. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol today* 15: 51 – 57.

- Robert-Gangneux F, Vieljeuf C, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J 1998. Apport de l'avidité des anticorps dans la datation d'une séroconversion toxoplasmique. *Ann. Biol. Clin.* 56: 586 – 589.
- Robert-Gangneux F, Dardé M 2012. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25(2): 264.
- Rodrigues 2007. *Perfil epidemiológico da toxoplasmose no município de anápolis no período de 2001 a 2005*, PhD thesis, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 72pp.
- Rodrigues JP, Frei F, Navarro IT, Silva LP, Marcelino MY, Andrade-Junior HF, Faria CA, Santos M, Ribeiro-Paes JT 2015. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 21:1.
- Ronday MJ 1995. Presumed acquired ocular toxoplasmosis. *Arch Ophthalmol* 113: 524 – 529.
- Rosa LD, Moura AB, Trevisani N, Medeiros AP, Sartor AA, Souza AP, Bellato V 2010. *Toxoplasma gondii* antibodies on domiciled cats from Lages municipality, Santa Catarina State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19 (4): 268 – 269.
- Sabin AB, Feldman HA 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108: 660 – 663.
- Sacks JJ, Roberto RR, Brooks NF 1982. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *J Am Med Assoc.* 248 (14): 1728–1732.
- Salata E, Yoshida ELA, Pereira EA, Corrêa FMA 1985. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 27: 20–22.
- Sanchez D, Lefebvre C, Rioux J, García LF, Barrera LF 2012. Evaluation of Toll-like receptor and adaptor molecule polymorphisms for susceptibility to tuberculosis in a Colombian population. *International Journal of Immunogenetics* 39, 216–223
- Santos MCF 2011. Frequência da infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas caipira e frangos de corte em regiões dos Estados do Rio Grande do Norte e Paraíba *PhD Thesis*, Programa de pós-graduação em ciência biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Sawadogo P, Mafio J, Belleste B, Sung RTM, Chakdi M, Flori P, Raberin H, Mamouni JB, Chait A, Dalal A 2005. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. *Veterinary Parasitology* 130: 89 – 92.
- Schroder NW, Schumann RR 2005. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis*, 5:156–64.
- Sheffield HG, Melton ML 1970. *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. *Science* 167: 892 – 893.

- Sher A, Oswald IO, Hieny S, Gazzinelli RT 1993. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-g response in NK cells which requires both adherent accessory cells and TNF- α . *J. Immunol.* 150: 3982–3989.
- Sibley ID, Mordue DG, Su C, Robben PM, Howe DK 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357, 81–88.
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG 1992. Interleukin-10 and interferon-g regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 175: 539–545.
- Silva TA, Fontesa FL, Coutinho LG, Souza FRS, Melo JTA, Souto JT 2011. SNPs in DNA repair genes associated to meningitis and host immune response. *Mutation Research* 713: 39–47.
- Silva CHS, Vasconcelos-Santos DV, Andrade GMQ, Carellos EM, Romanelli RM, Resende LM, Januário JN, Carneiro M, Carneiro ACAV, Vitor RWA 2013. Association between IgG Subclasses Against *Toxoplasma gondii* and Clinical Signs in Newborns With Congenital Toxoplasmosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 31: 13 – 16.
- Silva LA, Andrade RO, Carneiro ACAV, Vitor RWA 2014. Overlapping *Toxoplasma gondii* Genotypes Circulating in Domestic Animals and Humans in Southeastern Brazil. *Plos One* 9: e90237
- Silva MG, Câmara JT, Vinaud MC, Castro AM 2014. Epidemiological factors associated with seropositivity for toxoplasmosis in pregnant women from Gurupi, State of Tocantins, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47 (4).
- Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. 1998. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* 273: 27467–27473
- Shapira, S., Speirs, K., Gerstein, A., Caamano, J., Hunter, C.A., 2002. Suppression of NF-kappaB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 185 (Suppl. 1), S66–S72.
- Skariah S, Mcintyre MK, Mordue DG 2010. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res* 107:253–260.
- Skjerve E, Waldeland H, Nesbakken T, Kapperud G 1998. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Preventive Veterinary Medicine* 35: 219 – 227.
- Sobral CA, Amendoeira MRR, Teva A, Patel BN, Klein CH 2005. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 72: 37-41.
- Sobrinho LS, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AAD, De Lima VMF, Perri SHV, Generoso D, Langoni H, Leutenegger C, Biondo AW, Laurenti MD, Marcondes M 2012. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline

Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 187(1-2): 302-306.

Souza W, Damatta RA, Attias M 2009. Brazilian contribution for a better knowledge on the biology of *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(2): 149-154.

Souza CO, Tashima NT, Da Silva MA, Tumitan A RP 2010. Estudo transversal de toxoplasmose em alunas de um curso superior da região de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43: 59–61.

Souza-e-Silva CH, Vasconcelos-Santos DV, Andrade GQ, MD, Carellos EVM, Romanelli RMC, Resende LM, Januário JN, Carneiro M, Carneiro ACAV, Vitor RWA 2013. Association Between IgG Subclasses Against *Toxoplasma gondii* and Clinical Signs in Newborns With Congenital Toxoplasmosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 32 (1): 13 – 16.

Sroka S, Bartelheimer N, Winter A, Heukelbach J, Ariza L, Ribeiro H, Oliveira FA, Queiroz AJN, Jr. CA, Liesenfeld O 2010. Prevalence and Risk Factors of Toxoplasmosis among Pregnant Women in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(3): 528–533.

Sterkers Y, Varlet-Marie E, Marty P, Bastien P 2009. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a four years survey. *Clin Microbiol Infect.* Forthcoming 2009.

Suaréz-Aranda F, Galisteo JrAJ, Hiramoto RM, Cardoso RPA, Meireles IR, Miguel O, Andrade JrHF 2000. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Veterinary Parasitology* 91: 23 – 32.

Subauste CS, Remington JS 1993. Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Immunol.* 5(4): 532 – 537.

Sukthana Y 2006. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends in Parasitology* 22: 137 – 142.

Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240: 516 – 518.

Suzuki Y, Narita I, Aizawa M, Kihara M, Yamanaka T, Kanou T, Tsukaguchi H, Novak J, Horikoshi S, Tomino Y 2008. Toll-like receptor 9 affects severity of iga nephropathy. *J am soc nephrol.* 19(12): 2384 – 2395.

Szklo and Nieto 2012. *Epidemiology: Beyond the Basics*.

Takatsu K, Kouro T, Nagai Y 2009. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv Immunol* 101: 191–236.

Tell G, Quadrifoglio F, Tiribelli C, Kelley MR 2009. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. *Antioxid. Redox Signal.* 11: 601–620.

- Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 30(12-13): 1217–1258.
- Teutsch, S. M., Juranek, D. D., Sulzer, A., Dubey, J. P. & Sikes, R. K. 1979. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *N. Engl. J. Med.*, 300:695–699.
- Torres CM 1927. Sur une nouvelle maladie de l'homme, caractérisée par la présence d'un parasite intracellulaire, très proche du *Toxoplasme* et de l'encéphalitozoon dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelette, le tissu sous-cutané et le tissu nerveux. *C R Soc Biol* 97: 1778-1779.
- Uggla A, Mattson S, Juntti N 1990. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats, dogs and horses in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 31: 219–222.
- Valadas S, Minervino AHH, Lima VMF, Soares RM, Ortolani EL, Gennari SM 2010. Occurrence of antibodies anti-Neospora caninum, anti-*Toxoplasma gondii*, and anti-Leishmania chagasi in serum of dogs from Pará State, Amazon, Brazil. *Parasitol Res* 107: 453 – 457.
- Vallochi AL, Nakamura NV, Schlesinger D, Martins MC, Silveira C, Belfort R, Rizzo IV 2002. Ocular toxoplasmosis: more than just what meets the eye. *Scand. J. Immunol.* 55, 324-328.
- Vallochi AL, Goldberg AC, Falcai A, Ramasawmy R, Kalil J, Silveira C, Belfort R, Rizzo IV 2008. Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and guest behaving badly. *Clinical Ophthalmology* 2(4): 837 – 848.
- Varella, I.S., Canti, I.C.T., Santos, B.R., Coppini, A.Z., Argondizzo, L.C., Tonin, C. and Wagner, M.B. 2009. Prevalence of acute toxoplasmosis infection among 41,112 pregnant women and the mother-to-child transmission rate in a public hospital in south Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 383–388.
- Varella IS, Wagner MB, Darela AC, Nunes LM, Müller RW 2003. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *J Pediatr* 79: 69—74.
- Vasconcelos-Santos DV, Azevedo DOM, Campos WR, Oréfice F, Queiroz-Andrade GM, Carellos EVM 2009. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology* 116: 2199 – 2205.
- Vidal JE, Colombo FA, Oliveira ACP, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL 2004. PCR Assay Using Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 42 (10): 4765.
- Vitor, R.W.A.; Lima, Pinto, J.B.; Chiari, C.A. 1991. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.43, p.147-154.
- Wagner MB 1998. *Jornal de Pediatria* 74:157 – 162.
- Webb JA, Keller SL, Southorn EP 2005. Cutaneous manifestations of disseminated toxoplasmosis in an immunosuppressed dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 41:198–202.

- Wilder, H. C. 1952. A. M. A. Arch. Ophthal. (47) 425: 127 – 138.
- Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T, Seeber F 2016. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Scientific Report* 6:2255.
- Williams KAB, Scott JM, Macfarlane DE, Williams JM, Eliasjones TF, Willians H 1981. Congenital toxoplasmosis: a prospective survey in the west of Scotland. *The Journal of Infection* 3: 219 – 229.
- Wilson M, Remington JS, Clavet C, Varney G, Press C, Ware D 1997. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. *J Clin Microbiol* 35: 3112 – 3115.
- Wu S, Zhu X, Zhou D, Fu B, Chen J, Yang J, Song H, Weng Y, Ye D 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in household and stray cats in Lanzhou, northwest China. *Parasites & Vectors* 4: 214.
- Xanthoudakis S, Miao GG, Curran T 1994. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 23–27.
- Xavier GA, Cademartori BG, Cunha-Filho NA, Farias NAR 2013. Evaluation of seroepidemiological toxoplasmosis in HIV / Aids patients in the south of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 55(1): 25 – 30.
- Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, Filho JK, Robert B, Cunha-Neto NE, Gazzinelli RT, Belfort R, Rizzo IV 2000. Discrimination between Patients with Acquired Toxoplasmosis and Congenital Toxoplasmosis on the Basis of the Immune Response to Parasite Antigens. *The Journal of Infectious Diseases* 181: 2018 – 2022.
- Yan C, Liang L, Zheng K, Zhu X 2016. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. *Parasite and vectors* 9: 137.
- Zuber P, Jacquier P 1995. Épidémiologie de la toxoplasmose: situation au niveau mondial. *Schweiz Med Wochenschr.* 125 (Suppl 65): 19S – 22S.

9. ANEXOS

Anexo A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) fornecido aos voluntários residentes do município de Santa Cruz – RN.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DO TRAIRÍ
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar da pesquisa “*Soroprevalência do Toxoplasma gondii e polimorfismo gênico na população do município de Santa Cruz – RN.*” que é coordenada pela Prof^a Débora de Almeida Aloise. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Essa pesquisa tem por objetivo analisar a presença de um parasita, denominado *Toxoplasma gondii*, na população do município de Santa Cruz. Tal pesquisa se dá por meio do exame de sangue. O sangue que será coletado irá nos informar se você infectou-se além de fornecer dados sobre o seu sistema imunológico. Caso apresente algum comprometimento na visão precisará fazer um exame oftalmológico completo no Hospital de Olhos – OFTALMED. Os documentos necessários para autorização do referido exame serão de responsabilidade da coordenadora do projeto. Caso você tenha gato, cachorro ou galinha, e estes apresentem tamanho adequado para coleta de sangue, iremos fazer a análise neles também, se você permitir. Além da coleta de sangue, você irá responder a um questionário epidemiológico que permitirá identificar os possíveis fatores locais que levam a infecção por este parasita. Caso decida aceitar o convite, você irá responder a este questionário que inclui informações epidemiológicas, precisará doar uma pequena quantidade de sangue (aproximadamente 15mL) e autorizar a coleta de sangue nos animais que você possui, além de fazer o exame oftalmológico (caso necessário). Os riscos envolvidos com sua participação são mínimos, como desconforto na coleta de sangue e algum constrangimento ao responder o questionário epidemiológico. Entretanto salientamos que os problemas originados destes riscos serão prontamente resolvidos pelo pesquisador responsável pela pesquisa e seus colaboradores, garantindo que a entrevista e a coleta serão individuais e com a adequada segurança em seu local de moradia.

Você terá os seguintes benefícios ao participar da pesquisa: adquirir uma orientação preventiva sobre toxoplasmose, além de obter informações sobre sua própria

saúde e contribuir com a saúde pública do município. O resultado da análise será entregue pessoalmente. Todas as informações obtidas serão sigilosas. Os dados que você irá nos fornecer serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa lhe identificar. Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro e por um período de 5 anos. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização. Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para Prof^a Débora de Almeida Aloise, no endereço Rua Trairí, s/nº, Centro de Santa Cruz ou pelo telefone 3291-2411.

Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN no endereço Praça do Campus Universitário, s/n. Natal/RN. CEP: 59078-970 ou pelo telefone 3215-3135 .

Consentimento Livre e Esclarecido

Após ter sido esclarecido sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados nessa pesquisa, além de conhecer os riscos, desconfortos e benefícios que ela trará para mim e ter ficado ciente de todos os meus direitos, concordo em participar da pesquisa “*Soroprevalência do Toxoplasma gondii e polimorfismo gênico na população do município de Santa Cruz – RN*” e autorizo a divulgação das informações por mim fornecidas em congressos e/ou publicações científicas desde que nenhum dado possa me identificar.

Santa Cruz, _____ de _____ de _____

Participante da pesquisa:

NOME: _____

ASSINATURA: _____



Impressão Dactiloscópica

Pesquisadora responsável:

Débora de Almeida Aloise

Rua Trairi, s/n. Centro. Santa Cruz/RN. CEP: 59.200-000

Fone: (84) 3291 2411

Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) fornecido aos responsáveis daqueles voluntários cuja idade era inferior a 18 anos e que residiam no município de Santa Cruz – RN.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DO TRAIRÍ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos solicitando a você a autorização para que o (a) menor pelo qual você é responsável participe da pesquisa: “*Soroprevalência do Toxoplasma gondii e polimorfismo gênico na população do município de Santa Cruz – RN*”, que tem como pesquisador responsável a Prof^a Débora de Almeida Aloise. Esta pesquisa pretende analisar a presença de um parasita, denominado *Toxoplasma gondii*, na população do município de Santa Cruz. Tal pesquisa se dá por meio do exame de sangue. O sangue que será coletado dele (a) irá nos informar se ele (a) está infectado além de fornecer dados sobre o seu sistema imunológico. Caso apresente algum comprometimento na visão precisará fazer um exame oftalmológico completo no Hospital de Olhos – OFTALMED. Os documentos necessários para autorização do referido exame serão de responsabilidade da coordenadora do projeto. Além da coleta de sangue, será necessário responder a um questionário epidemiológico que permitirá identificar os possíveis fatores locais que levam a infecção por este parasita. Caso você decida autorizar, ele (a) deverá responder a este questionário que inclui informações epidemiológicas, precisará doar uma pequena quantidade de sangue (aproximadamente 15mL), além de fazer o exame oftalmológico, caso necessário. Os riscos envolvidos com sua participação são mínimos, como desconforto na coleta de sangue e algum constrangimento ao responder o questionário epidemiológico. Entretanto salientamos que os problemas originados destes riscos serão prontamente resolvidos pelo pesquisador responsável pela pesquisa e seus colaboradores, garantindo que a entrevista e a coleta serão individuais e com a adequada segurança em seu local de moradia.

Você terá os seguintes benefícios ao participar da pesquisa: adquirir uma orientação preventiva sobre toxoplasmose, além de obter informações sobre sua própria saúde e contribuir com a saúde pública do município. O resultado da análise será entregue pessoalmente a você. Todas as informações obtidas serão sigilosas. Os dados fornecidos por ele (a) serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa lhe

identificar. Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro e por um período de 5 anos. Se você tiver algum gasto que seja devido a participação dele (a) na pesquisa, ele (a) será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se ele (a) sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, ele (a) terá direito a indenização. Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para Prof^a Débora de Almeida Aloise, no endereço Rua Trairí, s/nº, Centro de Santa Cruz ou pelo telefone 3291-2411.

Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN no endereço Praça do Campus Universitário, s/n. Natal/RN. CEP: 59078-970 ou pelo telefone 3215-3135.

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, representante legal do menor _____, autorizo sua participação na pesquisa *“Soroprevalência do Toxoplasma gondii e polimorfismo gênico na população do município de Santa Cruz – RN”*.

Esta autorização foi concedida após os esclarecimentos que recebi sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados, por ter entendido os riscos, desconfortos e benefícios que essa pesquisa pode trazer para ele(a) e também por ter compreendido todos os direitos que ele(a) terá como participante e eu como seu representante legal. Autorizo, ainda, a publicação das informações fornecidas por ele(a) em congressos e/ou publicações científicas, desde que os dados apresentados não possam identificá-lo(a).

Santa Cruz, _____ de _____ de _____

NOME: _____

ASSINATURA DO REPRESENTANTE LEGAL:



Pesquisadora responsável:

Débora de Almeida Aloise

Rua Trairi, s/n. Centro. Santa Cruz/RN. CEP: 59.200-000 / Fone: (84) 3291 2411

Anexo C. Termo de recusa.

52. TERMO DE RECUSA	52.RECUSA
<p>Endereço:</p> <p>Rua/Av.: _____</p> <p>Nº: _____ Complemento: _____ Bairro: _____</p> <p>O responsável recusou-se a participar da pesquisa:</p> <p>1. Não permitiu a coleta da amostra</p> <p>Motivo: _____</p>	<p>_____</p>
Entrevistador _____ Data: ____/____/____	. ____/____/____

Anexo D. Parecer de aprovação do comitê de ética para pesquisa da soroprevalência da toxoplasmose no município de Santa Cruz-RN.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE /
UFRN CAMPUS CENTRAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* e polimorfismo gênico na população do município de Santa Cruz - RN.

Pesquisador: Débora de Almeida Aloise

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.)

Versão: 2

CAAE: 08922712.0.0000.5537

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi - UFRN

Patrocinador Principal: Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi - UFRN

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 244.560

Data da Relatoria: 05/04/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo epidemiológico para avaliar a soroprevalência de Toxoplasmose no município de Sta Cruz-RN, procurando estabelecer correlação entre a presença de lesão ocular pelo *Toxoplasma gondii* e a presença de polimorfismos genéticos. A pesquisa incluirá uma amostra de 800 voluntários oriundos de cinco bairros da cidade, nos quais será aplicado um questionário e coletada uma amostra de sangue para exame sorológico. Destes, 129 sujeitos serão submetidos a exame oftalmológico em busca de lesões oculares pelo *T. gondii* e posterior exame de polimorfismo e perfil de citocinas naqueles com lesões.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Avaliar a soroprevalência do protozoário *Toxoplasma gondii* no município de Santa Cruz-RN, bem como correlacionar a toxoplasmose ocular ao polimorfismo gênico dentro dessa população.

Objetivos secundários:

1. Determinar a frequência da toxoplasmose na população do município de Santa Cruz-RN;
2. Identificar os fatores de riscos relacionados à infecção pelo *T. gondii* na população deste

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

CEP: 59.075-970

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

Fax: (84)3215-3135

E-mail: cepufn@reitoria.ufrn.br

Anexo E. Questionário desenhado e utilizado neste estudo para obter informações sobre os voluntários residentes no município de Santa Cruz – RN.

Soroprevalência da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> no município de Santa Cruz e análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular do Estado do Rio Grande do Norte	CODIFICAÇÃO
1. Código da área <input type="checkbox"/> Centro (01) <input type="checkbox"/> Paraíso (02) <input type="checkbox"/> Barro Vermelho (07) <input type="checkbox"/> Cônego Monte (03) <input type="checkbox"/> Maracujá (04) <input type="checkbox"/> A. Bezerra (08) <input type="checkbox"/> DNER (05) <input type="checkbox"/> Miguel P. Maia (06)	AREA _____
Data da Entrevista: ____/____/____	
I - IDENTIFICAÇÃO	
1. Nome: _____ 2. Sexo: 0. <input type="checkbox"/> F 1. <input type="checkbox"/> M	SEXO _____
3. Endereço: _____ nº _____ 4. Complemento: _____ 5. Data de Nascimento: ____/____/____ 6. Contato para retorno do resultado do exame: _____	DTNAS ____/____/____
II - OUTROS DADOS	
7. Há quanto tempo mora neste domicílio? 1. <input type="checkbox"/> _____ anos 0. <input type="checkbox"/> Não Sabe 2. <input type="checkbox"/> Desde que nasceu 9. <input type="checkbox"/> Não Respondeu	TPODOM _____
8. Se não mora desde que nasceu, onde morava antes? 0. <input type="checkbox"/> Em outro domicílio no mesmo bairro 1. <input type="checkbox"/> Em outro bairro. Qual? _____ 8. <input type="checkbox"/> NA 2. <input type="checkbox"/> Em outro município. Qual? _____ UF: ____ 8. <input type="checkbox"/> NA 8. <input type="checkbox"/> Não se aplica (NA)	ONDMORA _____ BAIRRO _____ MUNICIP _____
9. O piso da casa anterior era de: 1. <input type="checkbox"/> Cimento, cerâmica, madeira 2. <input type="checkbox"/> Barro, terra, areia 8. <input type="checkbox"/> NA	PISCASAN _____
10. Marcar como é o piso atual: 1. <input type="checkbox"/> Cimento, cerâmica, madeira 2. <input type="checkbox"/> Barro, terra, areia	PISOCASA _____
III - DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS	
11. Grau de escolaridade:	GRAUESC

<p>0. () Analfabeto/até a 3ª série Fundamental/até a 3ª série do 1º grau (primário incompleto)</p> <p>1. () Até a 4ª série Fundamental/até a 4ª série do 1º grau (primário completo)</p> <p>2. () Fundamental completo/ 8ª série completa (1º grau completo)</p> <p>3. () Médio completo/ 2º grau completo (3ª ano científico completo)</p> <p>4. () Superior completo ou incompleto</p>	<p>_____</p>
<p>12. Qual é o tipo de profissão/ocupação?</p> <p>0. () Empresário / Produtor rural</p> <p>1. () Profissional liberal (Autônomo)</p> <p>2. () Servidor Público</p> <p>3. () Empregado de Empresa Privada</p> <p>4. () Empregado Rural</p> <p>5. () Desempregado</p> <p>6. () Do lar (dona de casa)</p> <p>7. () Empregada doméstica mensalista/ faxineira/ diarista/ babá/ cuidador de idoso.</p> <p>8. () Aposentado ou pensionista.</p> <p>9. () Professor</p> <p>10. () Estudante</p>	<p>TIPOPROF</p> <p>_____</p>
<p>13. Renda familiar</p> <p>7. () Até 1 salário mínimo (Correspondente no CCEB = R\$622)</p> <p>6. () Entre 1 e 2 salários mínimos (Correspondente no CCEB = R\$1.244)</p> <p>5. () Entre 2 e 3 salários mínimos (Correspondente no CCEB = R\$1.866)</p> <p>4. () Entre 3 e 4 salários mínimos (Correspondente no CCEB = R\$2.488)</p> <p>3. () Entre 4 e 7 salários mínimos (Correspondente no CCEB = R\$4.354)</p> <p>2. () Entre 7 e 10 salários mínimos (Correspondente no CCEB = R\$6.220)</p> <p>1. () Entre 10 e 20 salários mínimos (Correspondente no CCEB = R\$12.440)</p> <p>0. () Acima de 20 salários mínimos (Correspondente no CCEB = R\$13.062)</p> <p>8. () Não Sabe</p> <p>9. () Não Respondeu</p>	<p>RENDA</p> <p>_____</p>
<p>IV - CARACTERÍSTICAS DO PERIDOMICÍLIO</p>	
<p>14. Há quintal na residência?</p>	<p>QUINTAL</p>

<p>1. () Sim</p> <p>0. () Não. Se não, pular para pergunta numero 17.</p> <p>9. () Não Respondeu</p>	<p>_____</p>
<p>15. Marcar como é o piso do quintal:</p> <p>0. () Cimento ou piso com revestimento (cerâmica, pedra, etc.)</p> <p>1. () Terra</p> <p>2. () Misto (terra e cimento/cerâmica/pedra)</p> <p>7. () Não Sabe</p> <p>9. () Não Respondeu</p> <p>8. () Não se aplica</p>	<p>PISOQUINT</p> <p>_____</p>
<p>16. Com qual frequência o quintal é limpo?</p> <p>0. () Diariamente</p> <p>1. () Semanalmente</p> <p>2. () Esporadicamente</p> <p>3. () Nunca</p> <p>9. () Não sabe</p> <p>8. () Não se aplica</p>	<p>LIMPQUINT</p> <p>_____</p>
<p>17. Há caixa d'água na residência?</p> <p>1. () Sim 2. () Não 3. () Não sabe</p>	<p>TEMCAIXA</p> <p>_____</p>
<p>18. A caixa d'água é coberta? (Se for apenas com telha, colocar <u>NÃO</u>)</p> <p>1. () Sim 2. () Não 3. () Não sabe 4. () NA</p>	<p>CAIXA</p> <p>_____</p>
<p>V – FATORES DE RISCO</p>	
<p>19. Costuma comer saladas cruas (alface, tomate)?</p> <p>1. () Sim 2. () Não 0. () Não Respondeu</p>	<p>SALADA</p> <p>_____</p>
<p>20. Costuma comer saladas cruas fora de casa? (Se não, pule para a pergunta 20)</p> <p>1. () Sim 2. () Não 0. () Não Respondeu 8. () Não se aplica</p>	<p>SALFORA</p> <p>_____</p> <p>SANDUIC</p> <p>_____</p>
<p>21. Com que frequência come saladas cruas fora de casa?</p> <p>1. () Uma vez por semana 2. () Mais de uma vez por semana</p> <p>3. () Menos de uma vez por semana 0. () Não lembra</p>	<p>FREQSALD</p> <p>_____</p>

8. () Não se aplica	
22. Mexe com terra de jardim, vaso de flores ou horta? 1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra 8. () Não se aplica	MEXTERR _____
23. Como você mexe com a terra? 1. () Sempre com luvas 3. () Com e sem luvas 8. () Não se aplica 2. () Sempre sem luvas 0. () Não lembra	MANIPUL _____
24. De onde vem a água que consome? 0. () Não sabe 1. () Água da torneira 2. () Sem tratamento 3. () Engarrafada/Mineral	AGUA _____
25. Você bebeu alguma vez na vida água de: 1. Poço ou cisterna 1. () Sim 2. () Não 0.() NS 8. () NA 2. Lago, Rio ou Riacho 1. () Sim 2. () Não 0.() NS 8. () NA 4. Caminhão Pipa 1. () Sim 2. () Não 0.() NS 8. () NA 5. Açude 1. () Sim 2. () Não 0.() NS 8. () NA	Poço _____ Lago _____ Pipa _____ Açude _____
26. Costuma comer carne crua ou mal passada? 1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra	CARNECR _____
27. Ao comprar a carne e chegar em casa você: 1. () Congela e prepara depois 2. () Prepara e come no mesmo dia 3. () as duas opções anteriores 0. () Não sabe 8. () NA	CARNE _____
28. Preencher o quadro abaixo com o tipo de carne consumida <u>mal passada</u>: 1. Boi 1. () Sim 2.() Não 0. () Não lembra 8. () NA 2. Porco 1. () Sim 2.() Não 0. () Não lembra 8. () NA 3. Bode/Carneiro 1. () Sim 2.() Não 0. () Não lembra 8. () NA 4. Peixe 1. () Sim 2.() Não 0. () Não lembra 8. () NA 5. Galinha 1. () Sim 2.() Não 0. () Não lembra 8. () NA 6. Outros: _____	Boi _____ Porco _____ Bode/Carneiro _____ Galinha _____
29. Costuma beber leite cru ou fervido por pouco tempo? 1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra	LEITE

<p>30. Em caso afirmativo, preencher abaixo. Com que frequência você bebe leite cru?</p> <p>1. () Uma vez por semana 3. () Mais de uma vez por semana</p> <p>2. () Menos de uma vez por semana 0. () Não lembra 8. () NA</p>	<p>FREQLECR</p> <p>_____</p>
<p>31. Já ouviu falar sobre toxoplasmose antes?</p> <p>1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra</p>	<p>INFOTOXO</p> <p>_____</p>
<p>32. Já fez exame para saber se tem toxoplasmose?</p> <p>1. () Sim 2. () Não 3. () Não lembra</p>	<p>EXAMTOX</p> <p>_____</p>
<p>33. Tem ou Teve gato?</p> <p>1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra</p> <p>Quantos gatos têm atualmente? _____</p>	<p>GATO</p> <p>Quantos</p> <p>_____</p>
<p>34. Em caso afirmativo, preencher abaixo. Onde o gato ficava?</p> <p>1. () Dentro de casa 3. () Somente fora de casa</p> <p>2. () Dentro e fora de casa 0. () Não se lembra 8. () NA</p>	<p>GATOFICA</p> <p>_____</p>
<p>35. Qual o tipo de contato teve com o gato?</p> <p>Dormia na cama 1. () Sim 2. () Não 3. () Não lembra 8. () NA</p> <p>Dormia na cadeira/sofá 1. () Sim 2. () Não 3. () Não lembra 8. () NA</p> <p>Brincava 1. () Sim 2. () Não 3. () Não lembra 8. () NA</p> <p>Recolhia as fezes com luvas 1. () Sim 2. () Não 3. () Não lembra 8. () NA</p> <p>O gato fazia suas necessidades fisiológicas na rua</p> <p>1. Sim () 2. Não () 3. Não lembra () 8. Não se Aplica ()</p>	<p>CONTATO</p> <p>Dormia _____</p> <p>Brincava _____</p> <p>Luvas _____</p> <p>Rua _____</p>
<p>36. Costuma ver gatos na vizinhança?</p> <p>1. () Sim 2. () Não 0. () Não sabe</p>	<p>VIZINGAT</p> <p>_____</p>
<p>37. Os gatos da vizinhança entram na sua casa?</p> <p>1. () Sim 2. () Não 3. () Não sabe 8. () NA</p>	<p>GATENTR</p>
<p>38. Tem cachorro?</p> <p>1. () Sim 2. () Não</p>	<p>CAO</p> <p>_____</p>
<p>39. Tem galinha?</p> <p>1. () Sim 2. () Não</p>	<p>GALINHA</p> <p>_____</p>
<p>40. Fez exame oftalmológico recentemente?</p>	<p>EXOFTALM</p>

1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra	_____
41. Se queixa de problemas na visão? 1. () Sim Qual? _____ 2. () Não 0 () Não respondeu	VISAO _____
42. Já se submeteu a um transplante? 1. () Sim 2. () Não 3. () Não respondeu	TRANPLAS _____
43. Já teve algum aborto? 1. () Sim 2. () Não 8. () Não se aplica Motivo: _____	ABORTO _____
44. Já fez alguma transfusão sanguínea? 1. () Sim 2. () Não 3. () Não respondeu	TRANSFUS _____
45. Resultado do Teste de ELISA 0. () Negativo 1. () Positivo	Resultado _____

Anexo F. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) fornecido aos voluntários que permitiram acompanhamento sorológico por, aproximadamente, um ano.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DO TRAIRÍ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esclarecimentos

Este é um convite para você participar da pesquisa: **Análise da taxa de soroconversão e dos fatores de riscos associados com a toxoplasmose no município de Santa Cruz – RN**, que tem como pesquisador responsável a Prof^a Débora de Almeida Aloise.

Esta pesquisa pretende avaliar a taxa de soroconversão da toxoplasmose no município de Santa Cruz – RN, buscando identificar os fatores de risco associados a infecção pelo protozoário *T. gondii*.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é determinar a taxa de incidência anual desta doença bem como identificar as fontes de infecção por este protozoário.

Caso você decida participar, você deverá responder a um questionário que inclui informações epidemiológicas e precisará doar uma pequena quantidade de sangue (aproximadamente 5mL). Todo o procedimento irá durar cerca de 10 minutos. Assim, esta pesquisa se dá por meio da coleta de sangue, de onde será extraído o soro.

Durante a realização da coleta de sangue e aplicação do questionário a previsão de riscos é mínima, ou seja, o risco que você corre é semelhante àquele sentido num exame físico ou psicológico de rotina. Todo o procedimento ocorrerá em ambiente livre de contaminação e será realizado por uma equipe de profissionais treinados que irá minimizar os riscos durante o procedimento.

Pode acontecer um desconforto durante a coleta de sangue ou constrangimento ao responder o questionário, entretanto salientamos que os problemas originados destes riscos serão prontamente resolvidos pelo pesquisador responsável pela pesquisa e seus colaboradores, garantindo que a entrevista e a coleta serão individuais e com a adequada segurança e você terá como benefício adquirir informações sobre sua própria saúde e contribuir com a saúde pública do Estado, bem como contribuir com a comunidade científica.

Em caso de algum problema que você possa ter, relacionado com a pesquisa, você terá direito a assistência gratuita que será prestada pela equipe presente no local.

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas ligando para Débora de Almeida Aloise (84) 99603-9072.

Você tem o direito de recusar sua autorização, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para você e para ele (a).

Os dados que você irá nos fornecer serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa identificá-lo(a).

Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro e por um período de 5 anos.

Se você tiver algum gasto pela participação nessa pesquisa, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você.

Se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você será indenizado.

Qualquer dúvida sobre a ética dessa pesquisa você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi, telefone 3291-2411.

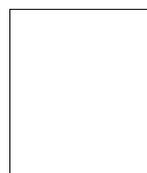
Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável Débora de Almeida Aloise.

Consentimento Livre e Esclarecido

Após ter sido esclarecido sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados nessa pesquisa, além de conhecer os riscos, desconfortos e benefícios que ela trará para mim e ter ficado ciente de todos os meus direitos, concordo em participar da pesquisa "**Análise da taxa de soroconversão e dos fatores de riscos associados com a toxoplasmose no município de Santa Cruz – RN**" e autorizo a divulgação das informações por mim fornecidas em congressos e/ou publicações científicas desde que nenhum dado possa me identificar.

Santa Cruz, / /

Assinatura do participante da pesquisa



Impressão
datiloscópica do
participante

Assinatura do pesquisador responsável

Anexo G. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) fornecido aos responsáveis daqueles voluntários cuja idade era inferior a 18 anos e teriam acompanhamento sorológico por, aproximadamente, um ano.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DO TRAIRÍ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esclarecimentos

Estamos solicitando a você a autorização para que o menor pelo qual você é responsável participe da pesquisa: **Análise da taxa de soroconversão e dos fatores de riscos associados com a toxoplasmose no município de Santa Cruz – RN**, que tem como pesquisador responsável o(a) Prof(a) Débora de Almeida Aloise.

Esta pesquisa pretende avaliar a taxa de soroconversão da toxoplasmose no município de Santa Cruz – RN, buscando identificar os fatores de risco associados a infecção pelo protozoário *T. gondii*.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é determinar a taxa de incidência anual desta doença bem como identificar as fontes de infecção por este protozoário.

Caso você decida autorizar, ele(a) deverá responder a um questionário que inclui informações epidemiológicas e precisará doar uma pequena quantidade de sangue (aproximadamente 5mL). Todo o procedimento irá durar cerca de 10 minutos. Assim, esta pesquisa se dá por meio da coleta de sangue, de onde será extraído o soro.

Durante a realização da coleta de sangue e aplicação do questionário a previsão de riscos é mínima, ou seja, o risco que ele (a) corre é semelhante àquele sentido num exame físico ou psicológico de rotina. Todo o procedimento ocorrerá em ambiente livre de contaminação e será realizado por uma equipe de profissionais treinados que irá minimizar os riscos durante o procedimento.

Pode acontecer um desconforto durante a coleta de sangue ou constrangimento ao responder o questionário, entretanto salientamos que os problemas originados destes riscos serão prontamente resolvidos pelo pesquisador responsável pela pesquisa e seus colaboradores, garantindo que a entrevista e a coleta serão individuais e com a adequada segurança e ele (a) terá como benefício adquirir informações sobre sua própria saúde e contribuir com a saúde pública do Estado, bem como contribuir com a comunidade científica.

Em caso de algum problema que ele (a) possa ter, relacionado com a pesquisa, ele (a) terá direito a assistência gratuita que será prestada pela equipe presente no local.

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas ligando para Débora de Almeida Aloise (84) 99603-9072.

Você tem o direito de recusar sua autorização, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para você e para ele (a).

Os dados que ele(a) irá nos fornecer serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa identificá-lo(a).

Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro e por um período de 5 anos.

Se você tiver algum gasto pela participação dele(a) nessa pesquisa, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você.

Se ele(a) sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, ele(a) será indenizado.

Qualquer dúvida sobre a ética dessa pesquisa você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi, telefone 3291-2411.

Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável Débora de Almeida Aloise.

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, representante legal do menor _____, autorizo sua participação na pesquisa **Análise da taxa de soroconversão e dos fatores de riscos associados com a toxoplasmose no município de Santa Cruz – RN**. Esta autorização foi concedida após os esclarecimentos que recebi sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados, por ter entendido os riscos, desconfortos e benefícios que essa pesquisa pode trazer para ele(a) e também por ter compreendido todos os direitos que ele(a) terá como participante e eu como seu representante legal.

Autorizo, ainda, a publicação das informações fornecidas por ele(a) em congressos e/ou publicações científicas, desde que os dados apresentados não possam identificá-lo(a).

Santa Cruz, / /

Assinatura do representante legal



Impressão
datiloscópica do
representante legal

Assinatura do pesquisador responsável

Anexo H. Parecer de aprovação do comitê de ética para acompanhamento sorológico por, aproximadamente, um ano dos voluntários do município de Santa Cruz-RN.

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DO TRAIRI - UFRN



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da taxa de soroconversão e dos fatores de riscos associados com a toxoplasmose no município de Santa Cruz - RN.

Pesquisador: Débora de Almeida Aloise

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46088015.8.0000.5568

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi - UFRN

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.206.336

Apresentação do Projeto:

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a taxa anual de incidência da toxoplasmose no município de Santa Cruz -RN, bem como identificar os fatores de riscos relacionados à infecção pelo *T. gondii* nesta população. Para isso será realizada uma análise sorológica, utilizando a técnica de ELISA, em aproximadamente 368 pessoas. Os voluntários que apresentarem sorologia negativa para toxoplasmose serão acompanhados por um ano. Durante esse período serão realizadas três coletas, no intervalo de aproximadamente 4 meses. Todos os voluntários desse estudo responderão a um questionário que inclui, além de informações epidemiológicas, questões sobre os fatores de risco para transmissão da toxoplasmose.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Avaliar a taxa de soroconversão da toxoplasmose no município de Santa Cruz - RN, buscando identificar os fatores de risco associados a infecção pelo *T. gondii*.

Objetivos Específicos

- Analisar a taxa anual da incidência da toxoplasmose no município de Santa Cruz - RN;

Endereço: Rua Trairi S/N

Bairro: S/B

CEP: 59.200-000

UF: RN

Município: SANTA CRUZ

Telefone: (84)3291-2411

E-mail: cep@facisa.ufm.br

Anexo I. Questionário utilizado para obter informações sobre os voluntários que consentiram acompanhamento sorológico.

<p align="center">Análise da taxa de soroconversão e dos fatores de riscos associados com a toxoplasmose no município de Santa Cruz – RN</p>	<p align="center">CODIFICAÇÃO</p>
<p>1. Código da área <input type="checkbox"/> Centro (01) <input type="checkbox"/> Paraíso (02) <input type="checkbox"/> Barro Vermelho (07) <input type="checkbox"/> Cônego Monte (03) <input type="checkbox"/> Maracujá (04) <input type="checkbox"/> A. Bezerra (08) <input type="checkbox"/> DNER (05) <input type="checkbox"/> Miguel P. Maia (06)</p>	<p align="center">ÁREA</p>
<p>Data da Entrevista: ____/____/____</p>	
<p align="center">I - IDENTIFICAÇÃO</p>	
<p>Nome: _____</p>	
<p align="center">II – FATORES DE RISCO</p>	
<p>1. Comeu saladas cruas (hortaliças, verduras) nesses últimos meses? 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não 0. <input type="checkbox"/> Não Respondeu 88. <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p align="center">SALADA _____</p>
<p>2. Comeu saladas cruas fora de casa nesses últimos meses? (Se não, pule para a pergunta 19) 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não 0. <input type="checkbox"/> Não Respondeu 88. <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p align="center">SALFORA _____</p>
<p>3. Com que frequência comeu saladas cruas fora de casa? 1. <input type="checkbox"/> Uma vez por semana 2. <input type="checkbox"/> Mais de uma vez por semana 3. <input type="checkbox"/> Menos de uma vez por semana 0. <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p align="center">FREQSALD _____</p>
<p>4. Mexeu com terra de jardim, vaso de flores ou horta nesses últimos meses? 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não 0. <input type="checkbox"/> Não lembra 88. <input type="checkbox"/> Não se aplica</p>	<p align="center">MEXTERR _____</p>
<p>5. Como você mexeu com a terra? 1. <input type="checkbox"/> Sempre com luvas 3. <input type="checkbox"/> Com e sem luvas 2. <input type="checkbox"/> Sempre sem luvas 0. <input type="checkbox"/> Não lembra</p>	<p align="center">MANIPUL _____</p>
<p>6. Comeu carne crua ou mal passada nesses últimos meses? 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não 0. <input type="checkbox"/> Não lembra</p>	<p align="center">CARNECRUA _____</p>
<p>7. Em caso afirmativo preencher o quadro abaixo o tipo de carne: 1. Boi 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não 0. <input type="checkbox"/> Não lembra 2. Porco 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não 0. <input type="checkbox"/> Não lembra 3. Bode/Carneiro 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não 0. <input type="checkbox"/> Não lembra</p>	<p align="center">TIPOCARN _____</p>

4. Galinha	1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra	
8. Bebeu leite não industrializado cru ou pouco fervido nesses últimos meses?		LEITE _____
1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra		
9. Adquiriu algum gato nesses últimos meses?		GATO _____
1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra		
Quantos gatos têm atualmente? _____		
10. Em caso afirmativo, preencher abaixo. Onde o gato fica/ficava?		GATOFICA _____
1. () Dentro de casa 3. () Somente fora de casa		
2. () Dentro e fora de casa 0. () Não se lembra		
11. Qual o tipo de contato teve com o gato?		
88. Não teve contato direto com o gato (Não se aplica)		
Dormia na cama	1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra	CONTATO _____
Dormia na cadeira/sofá	1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra	
Brincava	1. () Sim 2. () Não 0. () Não lembra	
Recolhia as fezes usando luvas	1. () Sim 2. () Não 0. () Não se aplica	
O gato faz/fazia suas necessidades fisiológicas na rua	()	
12. Fez transplante nesses últimos meses?		TRANPLAS _____
1. () Sim 2. () Não 3. () Não respondeu		
13. Fez alguma transfusão sanguínea nesses últimos 6 meses?		TRANSFUS _____
1. () Sim 2. () Não 3. () Não respondeu		
14. Resultado do Teste de ELISA		RESULTADO
0. () Negativo 1. () Positivo		

Anexo J. Questionário desenhado e aplicado neste estudo apenas em voluntários que possuíam animais (cão, gato e galinha) no domicílio ou peridomicílio.

Soroprevalência da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> no município de Santa Cruz e análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular do Estado do Rio Grande do Norte	CODIFICAÇÃO
1. Código da área <input type="checkbox"/> Centro (01) <input type="checkbox"/> Paraíso (02) <input type="checkbox"/> Barro Vermelho (07) <input type="checkbox"/> Cônego Monte (03) <input type="checkbox"/> Maracujá (04) <input type="checkbox"/> Aluizio Bezerra (08) <input type="checkbox"/> DNER (05) <input type="checkbox"/> Miguel P. Maia (06)	AREA _____
Data da Coleta: ____/____/____	
I - IDENTIFICAÇÃO	
Nome do dono: _____ Tipo de animal: 1. <input type="checkbox"/> Cão 2. <input type="checkbox"/> Gato 3. <input type="checkbox"/> Ave Sexo: 1. <input type="checkbox"/> F 2. <input type="checkbox"/> M Endereço: _____ nº _____ Complemento: _____ Idade: _____ Raça: _____	TIPANIM _____ SEXO _____ IDADE _____ RAÇA _____
1. Onde o animal fica? 1. <input type="checkbox"/> Dentro de casa 3. <input type="checkbox"/> Somente fora de casa 2. <input type="checkbox"/> Dentro e fora de casa 0. <input type="checkbox"/> Não se lembra 8. <input type="checkbox"/> NA	ONDFICA _____
2. Onde o animal morava antes? (Em caso de não ter o animal desde filhote) 1. <input type="checkbox"/> Domicílio no mesmo bairro 3. <input type="checkbox"/> Na rua 8. <input type="checkbox"/> NA 2. <input type="checkbox"/> Domicilio em outro bairro 0. <input type="checkbox"/> Não sabe	ONDEMOR _____
3. Qual o contato tem com o animal? 8. <input type="checkbox"/> Não teve contato direto – Não se aplica Dorme na cama 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não 0. <input type="checkbox"/> Não lembra 8. <input type="checkbox"/> NA Brincava 1. <input type="checkbox"/> Sim 2. <input type="checkbox"/> Não 0. <input type="checkbox"/> Não lembra 8. <input type="checkbox"/> NA	CONTATO _____
4. Resultado do Teste de ELISA 0. <input type="checkbox"/> Negativo 1. <input type="checkbox"/> Positivo	RESULTADO _____

ANEXO K. Parecer do Comitê de Ética para a realização da pesquisa em animais.

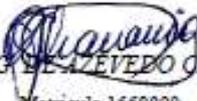


Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Natal (RN), 11 de maio de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto intitulado "SOROPREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM ANIMAIS PRESENTES EM RESIDÊNCIAS, MUNICÍPIO DE SANTA CRUZ/RN, E SUA ASSOCIAÇÃO COM A PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO EM HUMANOS", sob responsabilidade do professor Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto, foi submetido a esta Comissão para avaliação da sua execução em relação às questões éticas e legais. O referido projeto recebeu o "status" de Recomendação, faltando apenas a análise do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para APROVAÇÃO.


CYNTHIA G. DE AZEVEDO CHAVARRIA
Matricula 1668990
Pro Reitoria de Pesquisa
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

ANEXO L. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) fornecido aos voluntários com diagnóstico de toxoplasmose ocular.



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Esclarecimentos

Este é um convite para você participar da pesquisa: **Análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular do Estado do Rio Grande do Norte**, que tem como pesquisador responsável Débora de Almeida Aloise.

Esta pesquisa pretende correlacionar a toxoplasmose ocular com as características genéticas de cada indivíduo.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é entender como a resposta imunológica influencia no surgimento das lesões.

Caso você decida participar, você deverá responder a um questionário que inclui informações epidemiológicas e precisará doar uma pequena quantidade de sangue (aproximadamente 10mL). Todo o procedimento irá durar cerca de 10 minutos. Assim, esta pesquisa se dá por meio da coleta de sangue, de onde será extraído o DNA que irá permitir analisar a relação entre as características genéticas e a lesão ocular desenvolvida, além disso, suas células sanguíneas serão cultivadas e poderão nos fornecer dados sobre o seu sistema imunológico.

Durante a realização da coleta de sangue e aplicação do questionário a previsão de riscos é mínima. Caso ocorra algum acidente você será devidamente assistido por nossa equipe, e se necessário será levado ao serviço de saúde. Todo o procedimento ocorrerá em ambiente livre de contaminação e será realizado por uma equipe de profissionais treinados que irá minimizar os riscos durante o procedimento.

Pode acontecer um desconforto durante a coleta de sangue ou constrangimento ao responder o questionário, entretanto salientamos que os problemas originados destes riscos serão prontamente resolvidos pelo pesquisador responsável pela pesquisa e seus colaboradores, garantindo que a entrevista e a coleta serão individuais e com a adequada segurança e você terá como benefício adquirir informações sobre sua própria saúde e contribuir com a saúde pública do Estado, bem como contribuir com a comunidade científica. Além de receber os resultados dos seus exames, você também receberá uma cartilha explicando mais sobre a doença.

Em caso de algum problema que você possa ter, relacionado com a pesquisa, você terá direito a assistência gratuita que será prestada pela equipe presente no local.

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas ligando para Débora de Almeida Aloise (84) 996039072.

Você tem o direito de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para você.

Os dados que você irá nos fornecer serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa lhe identificar.

Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro e por um período de 5 anos.

Se você tiver algum gasto pela sua participação nessa pesquisa, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você.

Se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você será indenizado.

Qualquer dúvida sobre a ética dessa pesquisa você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi (FACISA), telefone 3291-2411.

Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável Débora de Almeida Aloise

Consentimento Livre e Esclarecido

Após ter sido esclarecido sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados nessa pesquisa, além de conhecer os riscos, desconfortos e benefícios que ela trará para mim e ter ficado ciente de todos os meus direitos, concordo em participar da pesquisa "**Análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular do Estado do Rio Grande do Norte**", e autorizo a divulgação das informações por mim fornecidas em congressos e/ou publicações científicas desde que nenhum dado possa me identificar.

Santa Cruz, / /

Assinatura do participante da pesquisa



Impressão
datiloscópica do
participante

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO M. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) fornecido aos responsáveis daqueles voluntários com toxoplasmose ocular cuja idade era inferior a 18 anos.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DO TRAIRÍ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esclarecimentos

Estamos solicitando a você a autorização para que o menor pelo qual você é responsável participe da pesquisa: **Análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular do Estado do Rio Grande do Norte** que tem como pesquisador responsável o(a) Prof(a) Débora de Almeida Aloise.

Esta pesquisa pretende correlacionar a toxoplasmose ocular com as características genéticas de cada indivíduo.

O motivo que nos leva a fazer este estudo é entender como a resposta imunológica influencia no surgimento das lesões.

Caso você decida autorizar, ele (a) deverá responder a um questionário que inclui informações epidemiológicas e precisará doar uma pequena quantidade de sangue (aproximadamente 10mL). Todo o procedimento irá durar cerca de 10 minutos. Assim, esta pesquisa se dá por meio da coleta de sangue, de onde será extraído o DNA que irá permitir analisar a relação entre as características genéticas e a lesão ocular desenvolvida, além disso, suas células sanguíneas serão cultivadas e poderão nos fornecer dados sobre o sistema imunológico dele (a).

Durante a realização da coleta de sangue e aplicação do questionário a previsão de riscos é mínima. Caso ocorra algum acidente, ele (a) será devidamente assistido por nossa equipe, e se necessário será levado (a) ao serviço de saúde. Todo o procedimento ocorrerá em ambiente livre de contaminação e será realizado por uma equipe de profissionais treinados que irá minimizar os riscos durante o procedimento.

Pode acontecer um desconforto durante a coleta de sangue ou constrangimento ao responder o questionário, entretanto salientamos que os problemas originados destes riscos serão prontamente resolvidos pelo pesquisador responsável pela pesquisa e seus colaboradores, garantindo que a entrevista e a coleta serão individuais e com a adequada segurança e ele (a) terá como benefício adquirir informações sobre sua própria saúde e contribuir com a saúde pública do Estado, bem como contribuir com a comunidade científica. Além de receber os resultados dos seus exames, você também receberá uma cartilha explicando mais sobre a doença.

Em caso de algum problema que você possa ter, relacionado com a pesquisa, você terá direito a assistência gratuita que será prestada pela equipe presente no local.

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas ligando para Débora de Almeida Aloise (84) 99603-9072.

Você tem o direito de recusar sua autorização, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para você e para ele (a).

Os dados que ele(a) irá nos fornecer serão confidenciais e serão divulgados apenas em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa identificá-lo(a).

Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro e por um período de 5 anos.

Se você tiver algum gasto pela participação dele(a) nessa pesquisa, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você.

Se ele(a) sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, ele(a) será indenizado.

Qualquer dúvida sobre a ética dessa pesquisa você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi, telefone 3291-2411.

Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável Débora de Almeida Aloise.

Consentimento Livre e Esclarecido

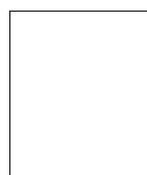
Eu, _____, representante legal do menor _____, autorizo sua participação na pesquisa **Análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular do Estado do Rio Grande do Norte.**

Esta autorização foi concedida após os esclarecimentos que recebi sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados, por ter entendido os riscos, desconfortos e benefícios que essa pesquisa pode trazer para ele(a) e também por ter compreendido todos os direitos que ele(a) terá como participante e eu como seu representante legal.

Autorizo, ainda, a publicação das informações fornecidas por ele(a) em congressos e/ou publicações científicas, desde que os dados apresentados não possam identificá-lo(a).

Santa Cruz, / /

Assinatura do representante legal



Impressão
datiloscópica do
representante legal

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO N. Parecer do comitê de ética para realização da análise imunogenética nos voluntários com toxoplasmose ocular.

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DO TRAIRI - UFRN



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular do Estado do Rio Grande do Norte

Pesquisador: Débora de Almeida Aloise

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 48145015.7.0000.5588

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi - UFRN

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.208.329

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado. O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório que infecta uma grande variedade de células em muitos diferentes hospedeiros (mamíferos e aves), sendo considerada uma das mais dinâmicas células eucarióticas. Os desafios para entender *T. gondii* se estendem até os dias atuais e dados mostram que a infecção toxoplásmica em humanos é frequentemente subclínica, no entanto pode tornar-se clinicamente evidente, evoluindo, por exemplo, com retinocoroidite em indivíduos imunossuprimidos ou não. Embora a lise da célula infectada por *T. gondii* seja provavelmente a principal causa da lesão tecidual em um indivíduo com imunodeficiência, os processos exacerbados de hipersensibilidade e inflamação podem gerar os mesmos danos em indivíduos imunocompetentes. A elucidação do mecanismo molecular que regula a resposta imune tem fornecido importantes indícios para entender a base da interação em longo prazo entre parasitos e seus hospedeiros. O polimorfismo em genes que codificam citocinas tem mostrado estar associado com a suscetibilidade a doenças parasitárias e a literatura mostra que os genes que codificam diversos componentes do sistema imunológico podem exibir polimorfismo em suas regiões codificadoras e reguladoras que afetam o nível e tipo de expressão em resposta aos estímulos, dirigindo a resposta imune para diferentes vias. Diante

Endereço: Rua Trairi S/N

Bairro: S/B

CEP: 59.200-000

UF: RN

Município: SANTA CRUZ

Telefone: (84)3291-2411

E-mail: cep@facisa.ufrn.br

ANEXO O. Questionário utilizado para obter informações sobre os voluntários com toxoplasmose ocular.

Análise imunogenética em pacientes com toxoplasmose ocular do estado do Rio Grande do Norte	CODIFICAÇÃO
Data da Entrevista: ___/___/___	
I - IDENTIFICAÇÃO	
Nome: _____ Sexo: 0. () F 1. () M Endereço: _____ n° _____ Complemento: _____ Data de Nascimento: ___/___/___ Contato para retorno do resultado do exame: _____	SEXO _____ IDADE _____
1. Grau de escolaridade: 0. () Analfabeto/até a 3ª série Fundamental/até a 3ª série do 1º grau (primário incompleto) 1. () Até a 4ª série Fundamental/até a 4ª série do 1º grau (primário completo) 2. () Fundamental completo/ 8ª série completa (1º grau completo) 3. () Médio completo/ 2º grau completo (3ª ano científico completo) 4. () Superior completo ou incompleto	GRAUESC _____
2. Há quanto tempo apresentou o primeiro episódio de uveíte? _____	UVEITE _____
3. Ano da uveíte: _____	ANOUEITE _____
4. Já apresentou alguma recorrência? 1. () Sim 2. () Não 3. () Não lembra Quantas? _____	RECORRE _____
5. Quantos por cento da sua visão foi perdida? _____	PERDAVISAO _____
6. A lesão foi : 1. () Unilateral 2. () Bilateral	LESAO _____
7. A lesão foi diagnosticada no olho: 1. () Direito 2. () Esquerdo 3. () Ambos	OLHO _____
8. Apresenta alguma doença do sistema imunológico? 1. () Sim _____ 2. () Não	IMUNE _____
9. Faz ou fez uso de medicamentos tipo corticoide?	CORTICOIDE

<p>1. () Sim 2. () 3. () Não lembra</p> <p>Qual o período de uso?</p> <p>_____</p>	<p>_____</p>
<p>10. Já apresentou linfadenopatia cervical?</p> <p>1. () Sim 2. () 3. () Não lembra</p>	<p>LINFOADENO</p> <p>_____</p>