Sylvia Regina Temer Cursino

**Evidências sorológicas e experimentais da resposta autoimune
humoral contra a retina em uveítes causadas por *Toxoplasma
gondii***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de
Andrade Junior

**São Paulo
2007**

Cursino, Sylvia Regina Temer

Evidências sorológicas e experimentais da resposta auto-imune humoral contra a retina em uveítes causadas por *Toxoplasma gondii* / Sylvia Regina Temer Cursino. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Heitor Franco de Andrade Junior.

Descritores: 1.*TOXOPLASMA* 2.ARRESTINA 3.RETINA/imunologia 4.UVEÍTE POSTERIOR 5.VACINAS ATENUADAS 6.FORMAÇÃO DE ANTICORPOS/imunologia 7.MODELOS ANIMAIS

A toxoplasmose ocular é atribuída ao parasita, mas a auto-imunidade pode participar do processo. Soros humanos com IgG positiva para *T. gondii* mostraram níveis altos de IgG anti-retina para diferentes antígenos, se comparados com soros negativos para *T. gondii*, uveítes de outras origens também tiveram títulos elevados. Hamsters imunizados e/ou infectados não mostraram estes anticorpos sem mimetismo antigênico. A retinocoroidite por *Toxoplasma* induz resposta humoral auto-imune contra antígenos da retina, provavelmente piorando o efeito direto do agente. Estes anticorpos podem ser usados como marcadores de doença ocular em pacientes soropositivos para toxoplasmose pela triagem de lesão ocular.

Experimental and serological evidence of humoral autoimmune response against retina in *Toxoplasma gondii* uveitis

Ocular toxoplasmosis is attributed to the parasite, but autoimmunity could have a role in this process. Human sera, positive of anti-*T. gondii* IgG, show high levels of anti-retina IgG, measured by several antigens, as compared to *T. gondii* seronegative samples. Sera from patients with uveitis from other origins also had higher anti-retina abs levels. Challenged and/or immunized hamsters showed low anti-retina abs levels, without antigen mimicry. Toxoplasmic retinochoroiditis presents a humoral anti-retina abs, probably worsening the parasite direct effect. Those antibodies could be used as markers of eye involvement in toxoplasmosis seropositive patients, as a screening for eye examination.

Descriptors: 1.*TOXOPLASMA* 2.ARRESTIN 3.RETINA/immunology 4.UVEITIS POSTERIOR 5.VACCINES ATTENUATED 6.ANTIBODY FORMATION/immunology 7.MODELS ANIMALS

Dedicatória

Dedico

Aos meus queridos e amados pais

José Wilson Cursino e Celeste Regina Temer Cursino, cuja união gerou dois frutos criados com muito amor, carinho e orgulho. Sempre nos ensinando a nunca abaixar a cabeça frente a uma dificuldade na vida, mas sim, a enfrentá-las com força e amor, espelhando-se neles. Ensinaram-me a buscar meus objetivos, confiando nos meus passos, sem medo de desviar meu caminho. Pessoas batalhadoras que superaram todas as dificuldades, mostrando a cada dia que são especiais e abençoadas. Pessoas maravilhosas, importantes e fundamentais em minha vida e formação – acadêmica, profissional e social. Isso me permitiu alcançar mais um fruto, mais uma conclusão de um propósito da minha vida.

Pai e Mãe, este é mais um fruto que estão colhendo.

Muito obrigada por todo amor e carinho.

Dedico, in memoriam

Aos meus avós paternos Benedicto

Cursino dos Santos e Maria Laura Carvalho e maternos José Maria Temer e Celeste Campaneli Temer e também a minha avó “preta” Eugenia Santiago, que com muita dedicação, amor e carinho auxiliaram meus pais nos momentos de dificuldade, sempre mantendo a força de nossa família, permitindo que a esperança e a determinação nunca estivessem ausentes em seus filhos e netos.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha grande amiga Professora Dra. Maria Antonieta Longo Galvão da Silva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, sempre amiga e profissional, possuidora de amplo conhecimento. Agradeço-lhe pelas conversas e experiência de vida compartilhadas, além das oportunidades profissionalmente abertas e da amizade sincera constituída desde a residência.

Agradeço a minha irmã Ana Cristina e ao meu cunhado Antonio Manuel, que sempre estiveram ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso.

Agradeço aos meus lindos sobrinhos Lucas e Laura, por existirem e trazerem tanto amor e alegria às nossas vidas. Espero ter servido de exemplo para vocês. Sempre sigam seus corações. Amo vocês.

Agradeço aos meus tios, tias e primos, que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso profissional, com muito carinho e amor.

Agradeço ao Tio Lessa e a Tia Norma, a Márcia Di Si, a Maria Aparecida e ao Gilberto, ao Sergio Canineo, pessoas tão especiais, que sempre trouxeram uma palavra amiga e muita luz em muitos momentos da minha vida.

Agradeço a Dora, secretária do meu lar, que sempre tomou conta de nós com carinho, correndo atrás de mim para arrumar a minha bagunça.

Agradeço às amigas da Pós-graduação Miriam Macre, Maria Marciano, Sônia Mioranza, pelos momentos convividos juntos. Pessoas especiais que permanecem em meu coração, as quais sempre poderão contar comigo.

Agradeço a minha grande amiga Érika de Abreu Costa, uma amiga que serviu de espelho, principalmente durante a residência, pela sua capacidade de tomar decisões adequadas nos momentos certos, pelo seu caráter investigativo, que a caracteriza como excelente profissional e pesquisadora. Além de ser uma pessoa que pude contar em todos os momentos, fossem estes de alegria ou tristeza, é uma excelente profissional e pessoa maravilhosa.

Agradeço aos amigos Guilherme Palácio, Viviane Oliveira da Costa, Munira Murad, Luis Otavio Guarnieri, Daniel

Nogueira, amigos contemporâneos de graduação e residência, que sempre torceram pelo meu sucesso assim como eu pelo deles.

Agradeço ao Dr. José Vital Filho, que me ensinou boa parte de meus conhecimentos cirúrgicos e a ser um profissional especial; vendo os pacientes como um todo e antes de tudo como seres humanos.

Agradeço ao Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pelo incentivo e compreensão.

Agradeço a Dra. Luciana Regina Meireles pela intensa ajuda na elaboração desta tese, não só com os animais, mas também com a parte laboratorial. Agradeço ainda pelos comentários e críticas.

Agradeço aos colegas Roberto Hiramoto e Andrés Galisteu pela ajuda com os animais de experimentação, pois sem a ajuda deles, boa parte da tese estaria comprometida.

Agradeço a Tais B. da Costa pela padronização da parte experimental, realização da sorologia de ELISA.

Agradeço ao Professor Dr. Raymundo Azevedo, Pós-graduação do Departamento de Patologia da Faculdade de

Medicina da Universidade de São Paulo-USP, por todo esforço e dedicação em ajudar os seus alunos.

Agradeço ao Professor Dr. Fernando Oréfice pela contribuição e experiência profissional compartilhada, estando sempre disposto a sanar qualquer dúvida. Agradeço ainda, o entusiasmo com o qual me contagiou e serviu como combustível para que eu procurasse mais respostas.

Agradeço aos pós-graduandos, graduandos e funcionários do Laboratório de Protozoologia, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela amizade e realização de parte dos experimentos.

Agradeço ao Professor Dr. Narcing Rao pelo carinho com que me recebeu em seu laboratório- Doheny Eye Institute – University of Southern Califórnia – e também por me mostrar que dedicação, competência, amizade e humildade fazem de você um grande vencedor em qualquer parte do mundo.

Agradeço a todos do Laboratório de Patologia Ocular e do Departamento de Oftalmologia do Doheny Eye Institute – USC pela acolhida carinhosa, por poder desfrutar do que há de mais moderno na medicina e pesquisa no mundo, junto a grandes nomes, que, ao mesmo tempo, são pessoas humildes, com grande vontade de transmitir o que sabem e contribuir para um mundo mais igual e feliz.

Agradeço a Professora Dra. Joyce Yamamoto, do Departamento de Oftalmologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, por ter gentilmente cedido os antígenos purificados de retina. Sou muito agradecida.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo conferida a mim para que este projeto pudesse ser realizado, sob o número 2992-05-1

Agradeço a todos meus amigos e familiares que sempre estiveram ao meu lado, onde quer que estivessem, torcendo e vibrando pelas minhas conquistas e por novos desafios.

Aos demais, que por um fatídico lapso de memória não foram citados, peço desculpas, mas tenham certeza de minha profunda gratidão.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Objetivos.....	4
1.2	Estado da arte em toxoplasmose.....	6
1.2.1	Histórico.....	6
1.2.2	Aspectos biológicos, ciclo de vida e transmissão.....	8
1.2.3	Classificação das cepas de <i>T. gondii</i>	9
1.2.4	Modelos Experimentais de toxoplasmose.....	11
1.2.5	Prevalência da toxoplasmose.....	12
1.2.6	Toxoplasmose adquirida em imunocompetentes.....	13
1.2.7	Toxoplasmose congênita.....	15
1.2.8	Toxoplasmose em imunodeprimidos.....	16
1.2.9	Prevenção da toxoplasmose.	18
1.2.10	Toxoplasmose ocular.....	20
1.2.11	Imunidade na toxoplasmose ocular.....	22
2	MATERIAIS MÉTODOS.....	25
2.1	Amostras de soros humanos.....	25

2.2 Modelo experimental e Parasita.....	26
2.2.1 Parasita.....	26
2.2.2 Modelo experimental.....	26
2.2.3 Parasita, imunização e modelo experimental.....	27
2.3 Histologia.....	28
2.4 Antígenos de retina.....	29
2.5 ELISA de triagem com extrato total.....	30
2.6 ELISA de alta especificidade para antígenos retinianos.....	31
2.7 ELISA de IgG anti- <i>T. gondii</i> em hamsters.....	32
2.8 Análise estatística.....	32
3 RESULTADOS.....	34
3.1 Preparação de extrato total de retina humana WHRE.....	34
3.2 Estudo sorológico de triagem de presença de anticorpos anti-retina.....	35
3.3 ELISA de alta eficiência para anticorpos anti-retina.....	38
3.4 Origem da resposta anti-retina em modelos experimentais.....	43
3.5 Histologia ocular dos animais experimentais.....	45
3.5.1 Histologia ocular de animais imunizados.....	45
3.5.2 Histologia ocular de animais desafiados.....	46
3.5.3 Histologia de hamsters imunizados e desafiados.....	49
4 DISCUSSÃO.....	52
5 CONCLUSÃO.....	62
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE AREVIATURAS

Sigla	Significado
AgS	Antígeno S
Aids/Sida	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CAPPesq	Comissão de Ética em Pesquisa do Complexo HCFMUSP
ELISA	Ensaio imunoenzimático
G	Gravidade
Gy	Gray
H&E	Hematoxilina e Eosina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMTSP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
i.p.	Intraperitoneal
IRBP	Proteína ligadora de retinóide do interfotoreceptor ou Interphotoreceptor retinoid-binding protein
OS	Oftalmia simpática
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PBST	Salina Tamponada com Fosfato e Tween 20
SNC	Sistema Nervoso Central
VKH	Síndrome de Vogt, Koyanagi & Harada
WHRE	Extrato total de retina humana

RESUMO

Cursino ST. *Evidências sorológicas e experimentais da resposta auto-imune humoral contra a retina em uveítes causadas por Toxoplasma gondii*. 2007. [tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O envolvimento ocular na toxoplasmose é geralmente atribuído somente ao parasito, mas recentemente uma possível ação de auto-imunidade tem sido sugerida. Nesta tese estuda-se a resposta humoral auto-imune contra a retina em pacientes portadores de toxoplasmose e/ou uveíte. A resposta ocular humoral ao *T. gondii* é também analisada experimentalmente em hamsters imunizados com taquizoítos irradiados e, posteriormente, desafiados com injeção intravítrea de taquizoítos viáveis por sorologia e histologia. A resposta humoral contra a retina é estudada utilizando-se soro estocado de pacientes com toxoplasmose crônica (384), com uveíte por toxoplasmose (30), com uveíte por outras causas (50) e sem afecções (250). IgG específica foi detectada por ELISA, utilizando-se extrato Total de Retina Humana (WHRE), antígeno S ocular bovino e proteína ligadora de retinóide do interfotoreceptor (IRBP).

As amostras de soro humanas IgG positivas para *T. gondii* mostraram níveis altos de IgG anti-retina se comparadas às amostras soronegativas para toxoplasmose. ELISA realizado para as amostras de WHRE, AgS e IRBP mostrou resultados semelhantes. Pacientes portadores de uveíte, causada ou não pela toxoplasmose, mostraram altos níveis de anticorpos anti-retina, mais altos que quando comparados aos portadores de toxoplasmose crônica, que também são mais altos aos sem afecções.

O modelo experimental evidenciou boa proteção e não apresentou reação cruzada. Observa-se que a imunização de hamsters com taquizoítos irradiados não induziu a nenhuma lesão ocular, apesar de altos níveis de anticorpos anti-*T. gondii*. Já o desafio com taquizoítos intra-oculares revelou uma proteção efetiva contra doença ocular grave, com evidente produção de anticorpos antiparasitários sem mimetismo antigênico, uma possível explicação para anticorpos anti-retina nesses pacientes.

Pode-se concluir que uveíte por *Toxoplasma* induz à resposta humoral auto-imune do hospedeiro contra antígenos da retina, o que, provavelmente, piora o efeito direto do agente. Esses anticorpos podem ser usados como marcadores de doença ocular em pacientes com sorologia positiva para toxoplasmose, como triagem de lesão ocular.

SUMMARY

Cursino ST. *Experimental and serological evidence of humoral autoimmune response against retina in Toxoplasma gondii uveitis* [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo (Brazil), 2007.

Eye involvement in toxoplasmosis is mainly attributed only to parasite, but recently a possible role of autoimmunity has been suggested. Here, we analyze humoral autoimmune response in toxoplasmosis uveitis using retina antigens serology in patients with toxoplasmosis and/or uveitis. Ocular immune response to *T. gondii* was also analyzed in hamsters immunized with irradiated tachyzoites and challenged with intraocular tachyzoites, by serology and histology. Anti-retina humoral response was studied in stored patients' sera with chronic toxoplasmosis (384), *Toxoplasma* uveitis (30), other uveitis causes (50), and not affected (250). Specific IgG was detected by ELISA using whole human retina extract (WHRE), bovine S antigen (AgS) and Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). *T. gondii* IgG positive human sera samples showed higher but overlapping levels of anti retina IgG than *T. gondii* seronegative ones. ELISA for WHRE, IRBP and S antigen were performed with similar results in our population. Uveitis patients presented higher mean levels of anti-retina antibodies, in both forms, *Toxoplasma* or other causes, higher than levels found in *T. gondii* seropositive population which was higher than seronegative population. We could observe that immunization of hamsters with irradiated tachyzoites did not induce any ocular lesion despite high levels of anti *T. gondii* IgG, and challenge with

intraocular tachyzoites revealed effective protection against severe eye disease, with clear anti-parasitic antibody production without antigen mimicry another way for anti-retina immune response.

Toxoplasma uveitis induces humoral immune host response against retinal antigens, probably worsening the direct effect of the agent. Those antibodies may be alternative markers of eye disease in asymptomatic patients with positive anti-*T. gondii* serology.

1.INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, uma das mais importantes zoonoses mundiais, que afeta quase 1/5 da população do mundo – mais de um bilhão de pessoas ⁵⁷, é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que é um parasito intracelular obrigatório ^{21,46}.

Sua importância é tanto médica quanto veterinária ⁶⁰. A toxoplasmose humana pode causar aborto, retardo mental, encefalite e cegueira em seres humanos ⁹¹. Já seu envolvimento veterinário pode causar perda de grande parte do rebanho, principalmente o caprino ⁸⁷, o que gera grande perda econômica.

A infecção pela toxoplasmose, na maioria das vezes, é assintomática, mas para os fetos e pacientes imunodeprimidos, com Aids ou receptores de órgãos transplantados, o parasita torna-se ativo e causa risco iminente para a vida ²¹. O envolvimento ocular, envolvimento órgão específico, pode estar presente em até 20% dos indivíduos infectados, independente do seu estado imunológico. O *T. gondii* é a causa mais freqüente de uveíte posterior associada ao embaçamento visual e à cegueira ⁴⁰ nos EUA e no Brasil. O diagnóstico, geralmente, é feito baseado na sua apresentação clínica e mediante achados fundoscópicos. A infecção extra-ocular não causa graves danos a indivíduos saudáveis. A retinocoroidite por toxoplasmose, entretanto, é uma doença progressiva e recorrente, que pode causar morbidade severa ^{78, 24}, apesar da existência de tratamento efetivo, baseado no uso associado de drogas antiparasitárias e imunossupressoras ³.

O *T. gondii* tem tropismo por tecido neural, como a retina. A lesão ocular clássica inicia-se na retina, e com o desenvolvimento da inflamação, haverá comprometimento das diferentes camadas da retina e posterior envolvimento da coróide ⁶⁶. Tendo em vista

que o tecido alvo é a retina neural, esta será circundada por intenso processo inflamatório granulomatoso, com a presença freqüente de cistos intracelulares ⁷⁸ do parasita. Taquizoítos livres e cistos também foram encontrados em células do epitélio pigmentar da retina ²⁶. Nota-se, ainda, envolvimento da retina e de seu epitélio pigmentar por necrose, com neovascularização do espaço sub-retiniano e da coróide, bem como inflamação focal ⁶⁵. O processo inflamatório associado à infecção da retina pelo *T. gondii* pode lesar a membrana de Bruch, resultando na interrupção da interface coriorretiniana ⁸⁶.

O compartimento intra-ocular não apresenta drenagem linfática e parece funcionar como outros órgãos sem esta função, resultando, assim, em uma resposta e apresentação imunológica alterada ou especial ⁷⁵.

Apesar de evento incitante diferente, duas formas de uveíte granulomatosa bilateral – a oftalmia simpática (OS) e a síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) – apresentam grande semelhança na maior parte de suas características clínicas, da histologia e da imunologia no tecido ⁷³. Nestes dois tipos de uveíte, há associação com os de resposta celular de linfócitos T contra antígenos de retina, indicando em seu desenvolvimento uma participação auto-imune significativa ¹⁶. A principal, e talvez única, característica que poderia realmente diferenciar entre a OS e o VKH seria a presença de uma ferida perfurante na OS ⁸.

Não obstante a patogênese da OS ter sido investigada extensivamente, ainda hoje sua exata etiologia é obscura ³⁰. Em modelos experimentais a injeção subconjuntival de Antígeno S em um dos olhos causou uma uveíte simpática bilateral, ao passo que a injeção intra-ocular em um dos olhos foi ineficaz na indução da doença, mostrando a necessidade de exposição sistêmica do antígeno na deflagração da OS ⁷⁴. No entanto, anticorpos auto-reativos foram encontrados contra os segmentos externos de

fotorreceptores e células de Muller em pacientes portadores da síndrome de VKH, em menores títulos em alguns pacientes com síndrome de Becht e em poucos pacientes com OS ⁸. Isto sugere que anticorpos anti-retina estão presentes e que a auto-imunidade da retina deve ter um importante papel na patogênese das uveítes posteriores.

A uveíte causada pela toxoplasmose poderia compartilhar da mesma resposta auto-imune da OS, com a ruptura dos cistos causando a exposição dos antígenos retinianos, como microperfurações traumáticas. Foi descrito um aumento de frequência de auto-anticorpos de retina em portadores de toxoplasmose ocular, baseados em uma reação de imunofluorescência de difícil quantificação ⁹⁵. O envolvimento ocular e resposta auto-imune celular inadequada a antígenos da retina também foram descritos em células de memória do sangue de pacientes com toxoplasmose ocular ³⁴. É interessante notar que foram descritos níveis mais altos de resposta celular contra antígenos de retina em portadores de uveíte por toxoplasmose, mas não relacionados à eficiência no controle da infecção ⁹⁰.

Uma alternativa para a produção de auto-anticorpos contra a retina seria a reação cruzada causada por uma exposição de epítomos produzidos especificamente pelo parasita, mimetismo antigênico, o que já foi exposto para a tripanossomíase americana ^{14, 70}. A origem da auto-imunidade, quer pela exposição mecânica de antígenos quer pela produção de anticorpos por reação cruzada, não pode ser distinguida em modelos experimentais usuais por meio de infecção ativa ou crônica, pois os dois processos resultam em respostas semelhantes. Recentemente, um modelo de imunização experimental adequada sem infecção cística residual e resposta imune similar à doença primária foi alcançado pelo uso de taquizóitos irradiados viáveis, permitindo imunização eficiente sem infecção crônica ³⁶.

1.1 OBJETIVOS

Diante dos dilemas acima apresentados e em função de desenvolver testes diagnósticos e/ou para permitir identificação de indivíduos em risco para certas patologias, pretendemos estudar a presença de anticorpos anti-retina na toxoplasmose humana e experimental, utilizando estudos sorológicos, avaliando sua importância patogénica em modelos experimentais.

Especificamente, pretendemos:

- Avaliar a presença de anticorpos anti-retina em população humana com sorologia conhecida para a toxoplasmose.
- Avaliar a presença de anticorpos anti-retina de alta afinidade em pacientes com uveíte de várias origens ou causada pelo *T. gondii*.
- Avaliar a frequência de anticorpos anti-retina de alta afinidade em pacientes com sorologia conhecida para a toxoplasmose.
- Padronizar um modelo experimental para a toxoplasmose ocular e avaliar a presença de anticorpos contra o agente.
- Avaliar a histologia ocular destes modelos em animais após imunização com taquizóitos irradiados, um modelo de indução de resposta imune-humoral anti-*T. gondii*.

1.2 ESTADO DA ARTE EM TOXOPLASMOSE

1.2.1 HISTÓRICO

O *Toxoplasma gondii* foi descrito pela primeira vez em julho de 1908, em São Paulo, por Splendore, quando o parasita atingiu os coelhos de seu laboratório com uma infecção mortal. Neste mesmo ano, a infecção foi detectada ao atingir um roedor africano, o gondi, usado como animal de laboratório do Instituto Pasteur da Tunísia. O nome *Toxoplasma* foi atribuído pela forma em arco dos parasitas, e *gondii*, pelo nome do roedor no qual foi identificado ⁷⁶. Os primeiros casos humanos foram descritos a partir de 1914. No ano de 1923, em Praga, o envolvimento ocular pelo *T. gondii* foi descrito em uma criança de 11 meses com a toxoplasmose congênita ⁷⁶, sendo que os primeiros casos de envolvimento humano no Brasil foram descritos a seguir ¹. Em 1937, os primeiros casos da doença em humanos são descritos nos Estados Unidos em crianças com infecção congênita grave, e somente a partir desta data é que a toxoplasmose humana, tida como doença, começou realmente a ter sua importância na medicina ⁷⁶. Quatro sinais clínicos são identificados na toxoplasmose congênita, resultando na Tétrade de Sabin, microcefalia ou anencefalia, calcificações cerebrais, convulsões e coriorretinite com envolvimento que, geralmente, abrange ambos os olhos, em especial as máculas ¹⁸. A partir do teste do corante, desenvolvido em 1948, a real incidência da doença passa a ser encontrada ⁷⁶.

Em 1948, são expostos os primeiros casos de uveíte por *T. gondii* ³⁸. Na década de 1950, aparecem os primeiros achados confirmatórios histopatológicos do *T. gondii* em tecido necrótico de lesão de retinocoroidite em adulto ⁹⁶. Nessa época a tuberculose, antes reconhecida como a principal causa de uveíte posterior granulomatosa, é rapidamente substituída pela toxoplasmose ocular ⁴¹. Em 1954, Jacobs & Habegger confirmam os achados da Dra. Wilder e em 1957, o Dr. Hogan abre a IV Conferência

Edward Jackson com a afirmação: “A toxoplasmose humana é uma das doenças mais interessantes da medicina moderna”. Esta afirmação, cinquenta anos depois, ainda é verdadeira ³⁸.

Somente em 1969 o ciclo completo de vida do *T. gondii* é elucidado pelo achado de oocistos em fezes de felinos, o que permitiu explicar a infecção de vegetarianos estritos, que tinham uma incidência de cerca de 50% da população normal, não explicável pela ingestão de carne ou transmissão congênita, vias aceitas de transmissão naquele momento ⁴⁷.

Desde então, a toxoplasmose ocular é considerada a mais importante causa de uveíte posterior em diferentes partes do mundo, podendo levar à cegueira e à perda visual ^{57, 4}.

O ciclo de vida completo do *T. gondii*, no qual o gato, hospedeiro definitivo, elimina oocistos, permite que indivíduos de diferentes etnias, com costumes dietéticos e socioculturais distintos sejam atingidos por esta doença ³².

1.2.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS, CICLO DE VIDA e TRANSMISSÃO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório, um patógeno humano e veterinário de grande significância ⁴⁷. Pertence ao filo

Apicomplexa, com habilidade de infectar uma grande gama de hospedeiros intermediários, incluindo todos os mamíferos e pássaros ⁵⁸. Os felinos, hospedeiros definitivos, são os únicos a apresentarem ciclo entérico sexuado, com excreção fecal de oocistos resistentes ao meio ambiente. A infecção humana por este parasita é responsável pela perda visual de pelo menos 1% dos indivíduos infectados, causa morte e grande morbidade em fetos e pacientes imunodeprimidos ⁶⁰.

Os humanos freqüentemente são contaminados por via oral pela ingestão dos cistos de *T. gondii* presentes na carne de animais contaminados, ou por oocistos liberados nas fezes dos gatos (hospedeiro definitivo) durante a infecção primária recente, em água ou alimentos contaminados ⁷⁸. Outra forma de contágio é pela transmissão placentária, quando a infecção primária da mulher ocorre durante o período de gestação ⁷⁸. A transmissão pode ocorrer, ainda, mediante produtos sanguíneos contaminados, transplantes de órgãos, ou ingestão de taquizoítos em leite caprino não pasteurizado ⁸⁷.

Em alguns grupos étnicos, nos quais não se consome carne, a toxoplasmose também é encontrada, muitas vezes, em porcentagens semelhantes as dos outros grupos consumidores deste alimento. Nestes casos, a infecção é causada pela ingestão de água ou verduras contaminadas por oocistos ³².

Quadro 1. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.

1.2.3 CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *T. GONDII*

O *T. gondii* consiste predominantemente de três linhagens, designadas I, II e III ⁴³. Sua propagação na natureza ocorre, essencialmente, pela replicação assexuada ou por cruzamento entre gametas originados de uma mesma linhagem infectante. A reprodução clonal parece ser o principal meio de propagação do parasito, sendo que somente nas populações naturais pode haver recombinação sexual entre suas diferentes cepas ^{61,85}. A recombinação gênica pode ser feita apenas nos hospedeiros definitivos, os felinos ⁴³, e é considerada extremamente rara ³¹.

Na maioria das vezes, os três tipos clonais distintos representam os genótipos mais bem-sucedidos para os nichos até então estudados, como humanos, animais domésticos

e animais de criação ³¹. A maior parte dos casos de toxoplasmose humana em países desenvolvidos, tanto a pós-natal adquirida quanto a congênita, é devida ao tipo II, apenas 10 a 25% deles são ocasionados pelo tipo I ⁷⁶. Deve-se levar em conta que a virulência da cepa, assim como o tamanho do inóculo e o perfil genético de cada indivíduo, influenciam na transmissão e na severidade da toxoplasmose congênita ⁷⁶.

A toxoplasmose é uma das causas mais comuns de retinite infecciosa, tanto em indivíduos imunocompetentes quanto em imunodeprimidos, e é responsável por cerca de 30 a 50% de todas as uveítes posteriores nos Estados Unidos⁴² e números ainda mais altos em nosso país, principalmente no Rio Grande do Sul ⁴⁶.

Como não se tem inequivocamente qual a cepa responsável pelo envolvimento ocular na toxoplasmose, ainda não está claro se o genótipo do *T. gondii* correlaciona-se à incidência, à severidade ou ao tipo de doença ocular ³¹. Entretanto, a cepa tipo I foi encontrada em diversos surtos nos quais o envolvimento ocular pela toxoplasmose era bastante freqüente ²⁸.

1.2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE TOXOPLASMOSE

É muito difícil estudar o grande espectro de fatores que entrevêm na patogênese de algumas doenças que acometem o ser humano. Isto se deve a problemas éticos e a longos períodos entre o aparecimento de sinais e sintomas que podem existir na doença em questão ⁸¹. Modelos animais em toxoplasmose têm sido extremamente usados para descrever a patologia da infecção e para identificar novas e efetivas drogas a ser usadas posteriormente em humanos ¹⁹. Diferentes modelos animais foram elaborados para o

estudo de diversos aspectos e com distintos comportamentos imunológicos, visando ao estudo das mais diversas patologias ⁸². A toxoplasmose ocular apresenta alguns poucos modelos experimentais para ser usados, embora existam diferenças inerentes entre homens e animais que possam reduzir a relevância de dados obtidos experimentalmente.

Os modelos animais têm melhorado muito nosso conhecimento nos vários aspectos da doença. A infecção pelo *Toxoplasma* pode ser facilmente adquirida na maioria dos animais de laboratório, com exceção dos ratos, que são particularmente resistentes à infecção aguda, mas práticos para estudos de cistogênese ¹⁹. A toxoplasmose ocular é, geralmente, estudada em modelos experimentais de infecções crônicas em coelhos ²⁵ e hamsters ⁶⁹, mas estes modelos são caracterizados por infecções protraídas de difícil acompanhamento. Mais recentemente, um modelo de desafio intravítreo com taquizoítos tem apresentado resultados interessantes, em especial para estudos de curto prazo ou de resposta imune local ⁴⁵.

1.2.5 PREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE

Estima-se que cerca de um terço da população mundial tenha sido exposta ao *T. gondii* ⁹¹. No Brasil, de 50 a 80% da população adulta é soropositiva para *T. gondii* ³. A prevalência pode variar em diferentes regiões de um mesmo país, entre países e até mesmo entre diferentes grupos étnicos de uma mesma região ²⁴. A frequência de anticorpos antitoxoplasma é alta em quase todos os países ¹. No Rio Grande do Sul, a prevalência é de 82%, em São Paulo é de 42%, e no Paraná é de 66% ⁵⁷. Um Estudo feito na região metropolitana de Recife, com crianças entre 9 e 15 anos mostra que 79,1% delas já apresentam anticorpos para o agente ¹³, A soroprevalência é mais alta e

bastante semelhante ⁸⁹ entre diferentes populações, como em países da África Ocidental e da América Latina, provavelmente devido ao clima quente e úmido e pelos hábitos alimentares semelhantes. Em Costa Rica e na Guatemala esta porcentagem é de 94% ²⁴. Em outras partes do mundo com clima frio, onde a viabilidade dos oocistos deve ser menor e os felinos menos freqüentes, encontram-se números bem diferentes. Entre os esquimós, a prevalência é de 0%, no sudeste da Ásia – China e Coréia – ela varia entre 4 e 39%, enquanto que na Escandinávia os números ficam entre 11 a 28% ^{89, 24}.

Há muito o *T. gondii* é reconhecido como causador de doença severa em dois grupos distintos. O primeiro é composto por indivíduos imunodeprimidos antes da infecção, ou que desenvolvem a imunossupressão após terem sido infectados. Lesões graves neurológicas e oculares podem ocorrer neste grupo. O segundo consiste de indivíduos infectados durante a gestação, por transmissão vertical. Estes podem sofrer conseqüências graves que vão desde abortamento, hidrocefalia até o envolvimento ocular e neurológico. Estes sintomas, na maioria das vezes, não estão presentes no nascimento. Foi identificado, recentemente, um terceiro grupo de indivíduos em risco de desenvolver sintomas severos. Este é constituído por pessoas saudáveis expostas a certo tipo de cepa particularmente prevalente na América do Sul; estas têm envolvimento pulmonar e esplênico. Observa-se, ainda, uma maior incidência de envolvimento ocular nesta região ⁴⁸.

A prevalência da doença ocular entre os portadores da doença sistêmica varia pelo mundo, nos Estados Unidos é estimada em 0,6%, e a mais alta prevalência descrita no mundo encontra-se em nosso país, no Rio Grande do Sul, com 21,3% ⁴⁶.

Nos EUA, cerca de 30 a 50% de todos os casos de uveíte posterior são causados pela toxoplasmose ⁷⁸, já no Brasil, este número sobe para marcas que estão em torno de 50 a 80% ^{57, 80, 47}.

1.2.6 TOXOPLASMOSE ADQUIRIDA EM IMUNOCOMPETENTES

A toxoplasmose adquirida após o nascimento em indivíduos imunocompetentes, tem diferentes graus de severidade ³¹. Embora seja tradicionalmente considerada uma doença benigna e autolimitada, pode ser assintomática ou até mesmo apresentar sintomas semelhantes à infecção pelo vírus da Influenza, causando linfadenopatia em 90% dos casos, com febre, mal-estar de curta duração e, ocasionalmente, dor de garganta ⁹¹. Esta variação na apresentação clínica e a severidade da doença em indivíduos suscetíveis têm sido atribuídas a vários fatores, desde à heterogeneidade genética do hospedeiro até ao genótipo do parasita responsável pela infecção ³¹. A doença é controlada pela resposta imune do hospedeiro causada pela infecção aguda ⁴⁶. Esta resposta contra a infecção parasitaria é individual, complexa e compartimentada. A diferença em respostas imunes pode ser explicada pelo alto nível de heterogeneidade no campo genético. Em geral, o desenvolvimento da resposta imune de um hospedeiro imunocompetente ao longo da infecção pelo *Toxoplasma* leva à aquisição de uma imunidade protetiva para o feto em uma eventual reinfecção ²².

A imunidade celular é a componente-chave na resposta imune do hospedeiro contra o ataque do *Toxoplasma* ⁵⁶. Os maiores envolvidos na resposta imune são os macrófagos, linfócitos T e células do tipo “natural Killer” (NK), além das citocinas. Os anticorpos têm um papel menor, embora essencial no diagnóstico da toxoplasmose humana ²². O primeiro anticorpo a aparecer durante a resposta imune é a imunoglobulina M (IgM), ele aparece no final da primeira semana de infecção. A imunoglobulina G (IgG) é a segunda substância a aparecer na toxoplasmose; existem quatro subclasses em diferentes proporções, são elas IgG1, IgG2 e IgG3 – esta parece

ser a predominante. Elas são extremamente importantes na proteção dos fetos, pois são capazes de atravessar a placenta. O principal alvo destas imunoglobulinas são os antígenos de superfície do parasito. A IgA é encontrada em dois locais diferentes, nas mucosas e no plasma, tanto em humanos quanto nos modelos experimentais ²².

1.2.7 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A transmissão congênita do *Toxoplasma* de uma mãe infectada para seu feto foi a primeira forma de transmissão a ser reconhecida. Com exceção de mulheres portadoras de imunodeficiência, o feto só se torna infectado quando a mãe adquire a infecção aguda durante a gestação. Aproximadamente 40% dessas mulheres, se não forem tratadas, transmitirão a infecção. A taxa de transmissão fetal durante a primoinfecção nos 1^o, 2^o e 3^o trimestres é de, respectivamente, 25%, 54% e 65%. Acredita-se que o tratamento da gestante previne sérias seqüelas na criança recém-nascida, não previne a transmissão fetal, mas diminui a carga infectante e, sendo assim, as conseqüências serão menores quanto antes se instituir o tratamento.

Estima-se que a infecção congênita da toxoplasmose atinja nos EUA cerca de 3.000 recém-nascidos a cada ano. A maioria destas crianças não apresenta sinais ao nascimento, e, quando apresentam sintomas, estes são generalizados ou neurológicos. Estas crianças sintomáticas com freqüência apresentam doença retiniana extensa ao nascimento ⁷⁸.

Um estudo desenvolvido em Massachusetts-EUA mostra que 20% dos recém-nascidos com infecção congênita assintomática, apresentam envolvimento ocular ao nascimento. Durante a adolescência, a porcentagem de envolvimento ocular nestas crianças não tratadas sobe para 82% ^{98, 51, 78}. Em estudo semelhante desenvolvido na

Europa por Koppe e Kloosterman, 70% destas crianças desenvolverão doença ocular, com 1 a 2% delas apresentando severo comprometimento visual causado pela infecção

66.

1.2.8 TOXOPLASMOSE EM IMUNODEPRIMIDOS

A Aids afeta cerca de 40 milhões de pessoas no mundo. 90% desta população vive em países em desenvolvimento ⁹⁴. Estima-se que cerca de 10% dos pacientes com Aids nos EUA e 30% na Europa faleçam devido à toxoplasmose ³⁵.

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) pela toxoplasmose pode ser uma manifestação inicial da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) podendo estar associada a lesões difusas ou não ²³. A Aids causa depressão severa do sistema imune a infecções seletivas do linfócito T CD4+. Sendo assim, certas infecções e neoplasias ocorrem com frequência nestes pacientes com envolvimento ocular ⁶⁸.

O envolvimento ocular pela toxoplasmose na Aids é menos comum do que o envolvimento do SNC, com diferentes manifestações características. A toxoplasmose ocular em pacientes com Aids é mais frequente no Brasil e na França do que nos EUA. Jabs mostrou que em portadores desta doença existe uma associação importante entre a toxoplasmose ocular e a encefalite; 56% destes pacientes apresentam doença ocular e acometimento cerebral, e 12% dos pacientes com encefalite por toxoplasmose também apresentam doença ocular ²¹.

A lesão retiniana típica assemelha-se à figura clássica da retinocoroidite necrotizante, geralmente maior em sua extensão, refletindo a imunodeficiência do hospedeiro. O foco de infecção pode ser único ou múltiplo e são bilaterais em 30 a 50% dos casos. Áreas extensas de necrose da retina podem envolver pólo posterior, zona

peripapilar, ou, ainda, estar confinadas na periferia, mimetizando a síndrome da necrose aguda da retina. Invariavelmente, estas lesões estão associadas a uma cicatriz prévia, sugerindo que elas sejam manifestações de doença adquirida e não congênita. A câmara anterior exibe uma reação celular fraca ²³. A reação vítrea, freqüentemente, é insignificante.

O tratamento convencional – pirimetamina, clindamicina e sulfadiazina – é eficiente em 75% dos casos. Uma vez ocorrendo à resolução da infecção ocular, o tratamento é mantido, visto que há recorrência na ausência de tratamento. O uso de corticosteróide é desnecessário e só ocorre quando há associação com retinite por Citomegalovírus (CMV) ²³.

Na grande maioria das vezes, este envolvimento é decorrente de reativação, na qual um indivíduo cronicamente com *T. gondii* se infecta, por exemplo, com o vírus da Aids ou manifesta um envolvimento sistêmico por câncer, comprometendo a imunidade do hospedeiro, que fica incapaz de controlar localmente a ruptura de cistos e liberação de taquizoítos, permitindo reinvasões e reagudizando a infecção. Sendo assim, o paciente não tem condições de combater o parasita, o que implica em grandes perdas do órgão envolvido ou até mesmo em morte devido ao diagnóstico tardio ⁸⁷.

1.2.9 PREVENÇÃO DA TOXOPLASMOSE

A prevenção é a forma mais eficiente de controle da toxoplasmose. Duas populações nas quais a prevenção à toxoplasmose é mais importante são gestantes e

pacientes imunodeficientes soronegativos para este agente e passíveis de infecção aguda grave fetal ou do hospedeiro. O principal fator é evitar a ingestão e o contato com cistos e oocistos. A atenção às medidas de higiene preventivas é a única maneira atualmente disponível para evitar-se a toxoplasmose congênita. Além das medidas de prevenção primária, é necessário identificar mulheres que contraíram a doença durante a gestação, para que o tratamento seja instituído o mais rápido possível ¹⁵.

A obrigatoriedade de realização de testes sorológicos para toxoplasmose durante a gravidez é variável nos diferentes países. No Brasil não há obrigatoriedade, mas são realizados testes de rotina. Nos EUA e na Holanda também não são obrigatórios; já na França e Áustria, devido a uma maior incidência por problemas culturais, estes exames são obrigatórios. Nestes países, em décadas passadas, a alimentação infantil, tradicionalmente era composta por alimentos muito cozidos, diferente da dos adultos, fazendo com que uma grande população feminina suscetível chegasse à idade adulta. Quando a alimentação passou a envolver culinária de risco, com pratos que continham carnes animais cruas, houve alta incidência de infecção aguda em mulheres com idade fértil ²⁰. A correção dos hábitos e o reforço à prevenção levaram a uma diminuição relativa dos casos de toxoplasmose congênita nas últimas décadas ⁷¹.

Novos algoritmos baseados em métodos diagnósticos para a toxoplasmose congênita e fetal estão sendo propostos, como isolamento do parasita no líquido amniótico ou sangue fetal, detecção de hidrocefalia mediante a ultrassonografia ⁷¹.

A alta frequência de toxoplasmose que leva à cegueira no Brasil justifica a necessidade de educar a população para prevenção da doença ocular e congênita; deve-se evitar o consumo de carne crua, mal cozida, que possam conter cistos e água contaminados pelo oocisto das fezes do gato ^{15, 36}. É necessário observar, ainda, a possibilidade da contaminação pela ingestão de leite pasteurizado e queijo fresco ³⁷.

Atualmente, é necessário ter cuidado também com os pacientes doadores de órgãos; pois a transmissão do *T. gondii* pelo transplante de órgãos de um doador soropositivo para receptor soronegativo é uma importante causa em potencial da doença em pacientes que sofreram transplante de órgãos sólidos ⁶².

O uso de vacinas em humanos, embora com variadas possibilidades e promessas, ainda não foi alcançado. Apenas uma vacina comercial de uso veterinário fornece uma proteção em torno de 70% ^{5, 15} para ovelhas. Uma alternativa seria a obtenção de agentes atenuados ou estéreis que fornecessem uma imunidade adequada.

A radiação ionizante foi utilizada para esterilização de cistos em carnes e oocistos em frutas e vegetais. Doses altas de radiação podem ter efeito direto sobre a membrana celular por meio da produção de radicais livres. Já que taquizoítos purificados e isolados não estão envolvidos na divisão celular, o alvo principal da radiação, principalmente a estrutura do cromossomo, pode ser afetado sem interferir em outros processos biológicos e metabólicos, permitindo que parasitas irradiados ofereçam o mesmo desafio imunológico que organismos intactos, sem os prejuízos que estes poderiam produzir ³⁶.

1.2.10 TOXOPLASMOSE OCULAR

As lesões oculares causadas pelo *T. gondii* são originadas tanto da infecção congênita quanto da infecção adquirida após o nascimento ^{81, 28, 67}. Na região sul do Brasil, são muitos os casos de infecção adquirida ^{81, 80, 40}. Nos Estados Unidos, estudos mostraram que dois terços das lesões oculares por toxoplasmose ocular são devidos à infecção adquirida ²⁷. Também foi estimado que de 5 a 20% de todas as causas de

cegueira neste país são causadas por doença inflamatória que acomete o olho, entre elas a retinocoroidite por *Toxoplasma gondii* ⁵⁵.

Na região sul do Brasil, a toxoplasmose ocular pode ser encontrada em muitos indivíduos da mesma família ⁸⁰. Nesta região foram realizados estudos mostrando mães com sorologia negativa que apresentavam filhos com doença ocular, com aumento da prevalência conforme a idade, indicando que a doença teria sido adquirida posteriormente ao nascimento, por provável ingestão de alimento contaminado com cisto do *T. gondii* ^{79, 28, 89}.

No hospedeiro imunocompetente, podem-se encontrar evidências antigas de atividade da toxoplasmose e a doença freqüentemente se desenvolve em um dos olhos por vez ⁶⁶.

A doença ocular aparece, na maioria das vezes, em pessoas que tem entre sete e 57 anos, com idade média de 25 anos, os surtos tem duração de cerca de quatro meses, e um mesmo indivíduo pode ter vários surtos seguidos ¹⁵.

O diagnóstico diferencial é feito com qualquer outra causa de retinocoroidite, como a sarcoidose, tuberculose, sífilis e infecções fúngicas e virais. Na infecção congênita incluem-se ao diagnóstico diferencial o coloboma macular e as infecções congênitas virais como herpes simplex e citomegalovírus, ou ainda um foco de retinoblastoma ⁴⁶.

A longo e médio prazo, são observadas complicações da toxoplasmose ocular, tais como:

- Glaucoma - a pressão intra-ocular altera-se na fase inicial da retinocoroidite toxoplásmica, principalmente se houver iridociclite. Usualmente ocorre hipertensão transitória, que desaparece com midríase medicamentosa. Pode ocorrer também hipotensão transitória pela diminuição da produção de humor aquoso ¹.

- Organização vítrea - o envolvimento vítreo é regra em toxoplasmose ocular; ocorre transudação protéica e infiltração celular. A extensão deste comprometimento é variável e normalmente depende do tamanho da lesão das recidivas. Na maior parte dos casos, o vítreo vai se normalizando conforme a cicatrização da lesão ocorre. Após algumas semanas ou meses pode voltar a sua transparência adequada à visão ^{1, 46}.
- Descolamento de retina - aparece em casos mais severos. A opacificação vítrea persiste e há, freqüentemente, formação de traves vítreas entre as lesões e os locais onde o vítreo é mais aderido, como papila, mácula, base do vítreo e vasos retinianos. A trave vítrea traciona pontos de aderências vitreoretinianos, nos quais pode existir ruptura e ocorrer o descolamento tracional da retina ^{1, 46}.
- Hemorragia vítrea - pode ocorrer a partir de oclusão vascular retiniana, ou pelo próprio descolamento de retina, pela avulsão dos vasos retinianos. Com o tempo a hemorragia vítrea tende a clarear ⁴⁶.
- Catarata - freqüente nos casos mais graves, em pacientes que receberam intensa terapia com corticóide e casos associados à heterocrômia de Fuchs ¹.

1.2.11 IMUNIDADE NA TOXOPLASMOSE OCULAR

O olho é o protótipo do órgão imune privilegiado. Acreditava-se que seus antígenos eram expressos exclusivamente no olho, residindo atrás de uma barreira órgão-sangue eficiente, considerando-se que estes eram desconhecidos pelo sistema imune ^{6, 2}.

Em 1873, Van Albrecht foi o primeiro a descrever o privilégio imune no olho. Nas últimas décadas, Streilein tem feito algumas das mais importantes descobertas neste campo. Este autor demonstrou que o privilégio imune no olho é o resultado de vários mecanismos imunorregulatórios, juntamente com características histológicas e fisiológicas⁸³. Medawar introduziu o termo privilégio imune em meados de 1900, para descrever a aceitação de tecido “estranho” transplantado na câmara anterior do olho. Ele acreditou que o privilégio imune no olho era devido ao fato da separação primária deste – logo de início – do sistema imune^{6,2}.

A autotolerância ocular até algum tempo atrás era baseada na imunotolerância. Atualmente, acredita-se que se trate de imunoignorância^{2,6}. O privilégio imune consiste em uma série de mecanismos que são aplicados a funções do sistema imune em certos órgãos do corpo fazendo que seu mecanismo efetor seja mantido sob controle e prevenindo larga destruição de tecidos durante o evento da resposta imune⁸⁸. O privilégio imune ocular é um fenômeno complexo que envolve muitos mecanismos imunorregulatórios, tais como:

- Barreira física - previne a entrada e a saída de moléculas grandes como as proteínas provenientes do olho.
- Balanço celular e fatores imuno supressivos solúveis que, no olho, inibem a atividade das células imunocompetentes que possam entrar.
- Antígenos protéicos liberados por um dano causado ao olho levando a uma imunidade sistêmica alterada que limita a geração de células efectoras pró-inflamatórias^{2,6,83}.

Atualmente, sabe-se que o privilégio imune envolve não somente mecanismos ativos, mas também de seqüestro, inibição inata, processo imune adaptativo no olho e modulação da resposta que se desenvolvem sistemicamente em antígenos liberados pelo

olho. O modelo que emerge de vários estudos baseia-se em um sistema que se sustenta num tripé e se compõe dos seguintes elementos: separação, inibição e regulação ⁶.

Uma separação efetiva entre o olho e a circulação, acompanhada por uma barreira hemato-ocular eficiente, torna o olho altamente imperceptível ou invisível ao sistema imune, sendo esta separação normalmente suficiente ^{6,2}.

Apesar de evento incitante diferente, duas formas de uveíte granulomatosa bilateral, a oftalmia simpática (OS) e a síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), apresentam grande semelhança em grande parte de suas características clínicas e da histologia e imunologia no tecido ⁷³. Nestes dois tipos de uveíte, existe associação com os tipos de resposta celular de linfócitos T contra antígenos de retina, indicando em seu desenvolvimento uma participação auto-imune significativa ¹⁶. A principal e, talvez, única característica que poderia realmente diferenciar a OS da VKH seria a presença de uma ferida perfurante na OS ⁸.

Apesar da patogênese da OS ter sido investigada extensivamente, ainda hoje sua exata etiologia é obscura ³⁰. Em modelos experimentais a injeção subconjuntival de Antígeno S em um dos olhos causou uma uveíte simpática bilateral, ao passo que a injeção intra-ocular em um dos olhos foi ineficaz na indução da doença e mostrou a necessidade de exposição sistêmica do antígeno na deflagração da OS ⁷⁴. Entretanto, anticorpos auto-reativos foram encontrados contra os segmentos externos de fotorreceptores e células de Muller em pacientes portadores da síndrome de VKH, em menores títulos em alguns pacientes com síndrome de Becht e em poucos pacientes com OS ⁸. Isto sugere que anticorpos anti-retina estão presentes e que a auto-imunidade da retina deve ter um importante papel na patogênese das uveítes posteriores.

Todo este estado mostra a importância da toxoplasmose, em especial na sua forma ocular, embasa e justifica a necessidade de pesquisa sobre o tema, sobretudo em relação à participação da resposta imune contra a retina na patogênese da lesão retiniana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado com material humano e animal, e todos eles foram feitos dentro das normas internacionais para estudo, compreendendo seres humanos e animais. Todos os experimentos têm aprovação do comitê de ética da CAPPesq- HCFMUSP sob o número 961/04 e da Comissão de Ética em Experimentação humana e animal do IMTSP.

2.1 AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS

Foram utilizados 634 soros humanos que estavam estocados na soroteca do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP). Este material foi previamente utilizado em um estudo epidemiológico realizado no Estado de São Paulo, que definiu a soroprevalência por ELISA e IFA de Imunoglobulina G (IgG) anti-*Toxoplasma gondii*. O sangue analisado foi coletado de pessoas saudáveis, sem sinais ou sintomas na época da coleta. Destes soros, 384 eram IgG positivos e 250 IgG negativos.

Prospectivamente, mais 80 soros foram coletados de pacientes portadores de uveíte, os quais eram tratados no ambulatório de uveíte da Clínica Oftalmológica do HCFMUSP. 50 pacientes eram portadores de uveítes não causadas por *T. gondii* e os outros 30 eram pacientes portadores de uveíte por *T. gondii*, comprovado inequivocamente por exames sorológicos e clínicos oftalmológicos (fundoscopia). Todos os pacientes concordaram em participar do presente estudo e assinaram o consentimento informado, de posse da Profa. Dra. J. H. Yamamoto.

Qualquer um dos grupos foi composto por indivíduos com idade entre 20 e 50 anos, de ambos os sexos. Todos foram informados dos estudos originais e concordaram em ceder suas amostras para estudos semelhantes.

Os soros foram estocados e congelados a -80°C até ser utilizados.

2.2 MODELO EXPERIMENTAL E PARASITA

2.2.1 PARASITA

A cepa RH do parasita *T. gondii* utilizada em todos os experimentos foi mantida estável congelada em nitrogênio líquido, e reativada por passagens sucessivas intraperitoneais (i.p.) em camundongos não-isogênicos. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Protozoologia do IMTSP.

2.2.2 MODELO EXPERIMENTAL

O animal escolhido para o modelo experimental utilizado foi o hamster. Os hamsters tinham entre 6 e 8 semanas de vida e foram obtidos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Sua manutenção foi realizada dentro das facilidades específicas existentes no Laboratório de Protozoologia do IMTSP, em condições livres de patógenos específicos. Todos os experimentos executados com os animais estavam de acordo com as normas propostas pela Comissão de Ética para Uso e Cuidado Animal da FMUSP e da Association for Research in Vision and Ophthalmology (Arvo), Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

2.2.3 PARASITAS, IMUNIZAÇÃO E MODELO EXPERIMENTAL

O processo de imunização dos animais experimentais seguiu o protocolo já descrito na literatura ³⁷. Brevemente, os taquizoítos purificados de *T. gondii* cepa RH, previamente retirados de animais infectados, foram purificados e irradiados com 255 Gy em uma fonte de ⁶⁰Co (GAMMACELL, Atomic Energy of Canada, Ltd.), de forma homogênea, em presença de oxigênio. Após a irradiação, a viabilidade foi determinada utilizando Azul de Tripiano, e a suspensão, com viabilidade maior de 95% foi ajustada a 1×10^8 taquizoítos/ml em RPMI 1640 contendo 50% de soro fetal bovino inativado e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific®) e estocada em alíquotas em nitrogênio líquido (-196°C) onde permaneceram até o momento do uso.

Cada grupo era composto por ao menos 5 hamsters, divididos de acordo com os protocolos experimentais. Os animais foram imunizados com 3 doses quinzenais i.p. de 1×10^7 taquizoítos irradiados dose/animal. Após 15 dias da última dose, os animais foram desafiados com injeção intravítrea no olho esquerdo de 100 taquizoítos viáveis, em 2µl de solução salina, com microseringa com agulha finíssima (Hamilton). Outro grupo de animais foi inoculado somente com salina. Para a realização do desafio, os animais foram submetidos à anestesia geral, sob assistência veterinária e a injeção intravítrea dos taquizoítos foi executada por oftalmologista experiente, sob visão de um microscópio.

Uma semana após o desafio os animais foram sacrificados por narcose com CO₂ com coleta de sangue por punção cardíaca e os olhos foram enucleados e fixados em formol tamponado.

2.3 HISTOLOGIA

Após fixação, por pelo menos 24h em geladeira e processamento convencional para inclusão em parafina, cortes seriados de 4µm de espessura foram realizados em cada olho e aderidos à lâmina silanizada. Para os demais procedimentos, o material era re-hidratado em álcoois e submetido à despigmentação. Uma coloração histológica pela Hematoxilina e Eosina (H&E) foi preparada para análise histológica convencional.

Para a imunomarcação do agente infeccioso (*Toxoplasma gondii*) foi empregado o método imunohistoquímico Estreptavidina-biotina peroxidase (SABC, do inglês: *Streptavidin-biotin peroxidase*)⁴⁴, com metodologia padronizada no Laboratório da disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo. Brevemente, cortes histológicos de 4µm de espessura foram submetidos à desparafinização em xilol por 30 minutos em estufa a 56°C e hidratados em concentrações decrescentes de álcoois. O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado em água oxigenada (H₂O₂) 10 volumes a 3% e bloqueio das proteínas inespecíficas por incubação em solução de leite desnatado (Molico-Nestlé) 10%. Anticorpo policlonal de coelho anti-*Toxoplasma gondii*, (Dako, cód. B1013) foi colocado sobre os cortes diluído em solução de soro-albumina-bovina (BSA) a 1%. O anticorpo foi revelado por incubação com anticorpo secundário universal (anticamundongo, anticoelho e anticabra) do (LSAB peroxidase, Dako. cód. K0690) e, finalmente, revelados com Estreptavidina-biotina peroxidase. A revelação da reação imunohistoquímica foi realizada com cromógeno 3'3 Diamino-benzidina (DAB), com coloração do fundo com hematoxilina de Mayer's e montados adequadamente. Foram ainda realizados controles adequados, positivos e negativos, em cada reação.

2.4 ANTÍGENOS DE RETINA

O antígeno de retina total (WHRE) foi obtido a partir de retinas humanas descartadas de olhos que foram utilizados para transplante de córnea, obtidos no programa de Transplante de Córnea de universidades estaduais paulistas. A retina foi cuidadosamente removida, lavada em salina e mantida em tubo cônico de 1,5ml contendo 0,5ml de solução tampão, Tris/HCl 0,125M, pH 6,8, dodecil sulfato de sódio 1%, uréia 4M, fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM, EDTA 5mM e bromo fenol azul 1mg/ml e estocado a -17°C até ser usado.

O extrato de retina foi preparado com a retina estocada por pulverização sob congelamento com nitrogênio líquido com a ajuda do grau e pistilo. O pulverizado era recolhido e aquecido a 65°C durante quinze minutos para maior dissolução das proteínas de membranas, sendo clareado a seguir por centrifugação a 10000g por 2 minutos. O sobrenadante era recolhido e considerado o extrato total de retina humana (WHRE); seu conteúdo protéico foi determinado pelo método de Bradford ⁵² e ajustado para uma quantidade final de estoque de 250µg/ml.

Os demais antígenos retinianos, Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) e antígeno S (AgS), foram produzidos e doados pela Profa. Dra. J. H. Yamamoto (HCFMUSP, São Paulo), e foram mantidos congelados a -70,0°C até ser utilizados.

A qualidade do WHRE foi testada em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, seguindo os protocolos convencionais ⁹³, utilizando-se um gel de 10% de concentração de acrilamida. Após a corrida, o gel foi corado Azul Brilhante G 250 para visualização das bandas protéicas. Gel similar foi corrido com banda única e transferido para membrana de nitro celulose para execução de imunomarcação, por técnicas convencionais ⁹³. Anticorpos humanos aderidos a membranas foram revelados

com conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase e revelado com sistemas semelhantes ao utilizado para imunohistoquímica.

2.5 ELISA DE TRIAGEM COM EXTRATO TOTAL

Foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços manufaturadas com plásticos de alta ligação a proteínas (Corning). A sensibilização foi feita com 100µl de solução de WHRE 10µg/ml, diluído em tampão carbonato 0.1M pH 9,0. Após incubação por 18h em geladeira, eventuais sítios de ligação foram bloqueados pela adição de PBS contendo Tween 20 0,02% e Leite Mólico 2% por 2 horas. Os soros foram diluídos 1/50 na mesma solução e incubados nos poços durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens, as placas foram incubadas com conjugado peroxidase anti-gama globulina humana (Sigma) diluído em PBST e incubados por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens, o conjugado ligado foi revelado por incubação com o-fenilenodiamina 1 mg/ml, H₂O₂ 0,03% em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 e a reação interrompida pela adição de HCL 4M após 30 minutos. A absorbância a 492 era, então, determinada em leitor de microplacas.

2.6 ELISA DE ALTA ESPECIFICIDADE PARA ANTÍGENOS RETINIANOS

Foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços manufaturadas com plásticos de alta ligação a proteínas (Corning) e a sensibilização foi feita com 100µl de solução contendo 2µg/ml de antígenos de retina humana, WHRE, Ag S ou IRBP, diluídos em PBS contendo 8M de Uréia. Eventuais sítios de ligação foram bloqueados pela adição de PBS contendo Tween 20 0,02% e Albumina bovina 0,2% durante 2 horas. Os soros foram diluídos 1/200 em PBST contendo 0,125 M de Uréia e incubados nos poços por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens, as placas foram incubadas com

conjugado peroxidase anti Fc de IgG humana (Sigma) diluído em PBST pelo período de 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens, o conjugado ligado foi revelado por incubação com o-fenilenodiamina 1mg/ml, H₂O₂ 0,03% em tampão citrato 0,1M pH 5,0 e a reação interrompida pela adição de HCL 4M após 30 minutos. A absorbância a 492 era, então, determinada em leitor de microplacas.

2.7 ELISA DE IgG ANTI-*T. GONDII* EM HAMSTERS

Foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços manufaturadas com plásticos de alta ligação a proteínas (Corning) e a sensibilização foi feita com 100µl de solução de antígeno salino de taquizoítos 10µg/ml, diluído em tampão carbonato 0.1M pH 9,0. Após incubação por 18h em geladeira, eventuais sítios de ligação foram bloqueados pela adição de PBS contendo Tween 20 0,02% e Leite Mólico 2% por 2 horas. Os soros foram diluídos 1/100 na mesma solução e incubados nos poços durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens, as placas foram incubadas com conjugado peroxidase antigama globulina de hamster (Sigma) diluído em PBST e incubado por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens, o conjugado ligado foi revelado por incubação com o-fenilenodiamina 1mg/ml, H₂O₂ 0,03% em tampão citrato de sódio 0,1M pH 5,0 e a reação interrompida pela adição de HCL 4M após 30 minutos. A absorbância a 492 era, então, determinada em leitor de microplacas.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações estatísticas sempre foram feitas entre médias de intensidade de reações sorológicas ou de frequência de reações consideradas positivas, utilizando a

abordagem paramétrica do ANOVA, quando da presença de uniformidade de variâncias ou a não-paramétrica de Kruskal-Wallis na ausência desta. Comparações entre subgrupos foram feitas pelo teste de Bonferroni (ANOVA) ou de Dunn (Kruskal-Wallis). Diferenças foram consideradas significantes quando a probabilidade de igualdade era menor que 0.05($p < 0.05$). Todas as análises foram feitas utilizando um pacote estatístico Statistica 7.0.

Para estabelecimento de limiares de reatividades ou “*cut-off*” foram definidos arbitrariamente como reagentes os pacientes portadores de uveítes, utilizando-se para limiar de reatividade a média de seus soros menos dois desvios padrões, limiar de 95%.

3.RESULTADOS

3.1 PREPARAÇÃO DE EXTRATO TOTAL DE RETINA HUMANA WHRE

Foram feitas várias preparações de retina humana, como descrito em Métodos, a partir de retinas humanas frescas retiradas de olhos descartados. Como um exemplo típico, mostramos a preparação de duas retinas humanas, que foram processadas conforme descrito em métodos e submetidas à eletroforese e Western Blot. A distribuição das proteínas do antígeno extraído, após eletroforese em gel de SDS-PAGE e sua reatividade contra soros de diferentes pacientes podem ser vistas na Figura 1.

Figura 1 – Distribuição de proteínas obtidas do extrato total de retina (WHRE), submetidas à eletroforese em SDS-PAGE em gel a 10 %, coradas (A e B) ou transferidas para membranas de nitrocelulose, em reação com soros humanos. As duas primeiras faixas mostram coloração para proteínas para antígeno em diferente quantidade, coradas para proteína, enquanto que as outras seis faixas mostram a reatividade das proteínas com diferentes soros humanos (Tg+ = soros de paciente com uveíte por *T. gondii*; Tg- = soros sem uveíte ou evidência de infecção por *T. gondii* e U+ = soro de paciente com uveíte por outra etiologia)

O rendimento total do processo foi cerca de ~1,6mg de proteínas totais de retina (WHRE) por retina e a eletroforese em SDS_PAGE a 10% mostrou uma boa preservação dos antígenos com bandas visíveis e claramente identificadas, evidenciando

que não ocorreu uma degradação significativa dos antígenos durante este processamento. Nas reações de Western-Blot, esperava-se obter uma reatividade específica mais evidente, mas houve apenas uma maior marcação de bandas em soros de pacientes portadores de uveítes, quer sejam causadas por *T. gondii* quer por outra etiologia. Houve, ainda, uma marcação não específica de alto peso molecular na maioria das amostras.

3.2 ESTUDO SOROLÓGICO DE TRIAGEM DE PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-RETINA

Estudou-se a presença de anticorpos anti-retina em soros da população brasileira assintomática, que estavam estocados em condições adequadas na soroteca do Laboratório de Protozoologia do IMTSP e liberados para estudos sorológicos da toxoplasmose. Não foi feita nenhuma restrição aos soros que vinham de pacientes adultos de cidades próximas ou da Grande São Paulo, com condições sociais semelhantes.

Os resultados do ELISA de triagem, conforme descrito em Métodos, do soro de 1:50 e conjugado de gama globulina de 606 soros humanos, dos quais 222 eram negativos para IgG anti-*T. gondii* e 384 eram positivos para IgG anti-*T. gondii*, por ELISA convencional, utilizando poços sensibilizados com antígeno WHRE 10ug/ml, podem ser vistos na Figura 2. Nesta opção de teste, observamos um ELISA de alta reatividade, com grande sensibilidade, mas com especificidade questionável. Isso se deu pelo fato da diluição do soro apresentar alta concentração protéica e boa absorção antigênica em uma baixa diluição do soro, além de um conjugado pouco específico, de alta sensibilidade e quantidade grande de antígeno no suporte de fase sólida.

Apesar destas restrições, os valores médios dos anticorpos anti-retina são maiores na população que é positiva para IgG anti-*T. gondii*, do que na população soronegativa para o agente, sugerindo algum grau de exposição de antígenos de retina na população infectada assintomática.

Figura 2 – Níveis de anticorpos anti-retina de soros de assintomáticos, em ELISA de triagem, separados de acordo com a reatividade da IgG anti-*T. gondii*. As barras representam a média dos valores encontrados e a tabela mostra a comparação entre as duas populações

Nesta triagem, o detalhamento evidencia que a reatividade do soro era sempre muito alta, sem permitir a identificação clara de grupos reagentes, um problema constante em auto-anticorpos. Isto poderia ser causado por reações cruzadas de baixa avides, e, pelo que avaliamos, esta reatividade foi utilizada em condições em que estas reações poderiam ser evitadas. Assim, apresentamos na Figura 3, ELISA otimizado para diminuição de reações cruzadas, utilizando uma quantidade cinco vezes menor de antígeno no suporte sólido, WHRE 2ug/ml, absorvido em 8M de Uréia, como descrito em Métodos. Um soro padrão, fortemente positivo no ELISA de triagem, foi utilizado

em diferentes diluições, em soluções que continham quantidades variáveis de caotrópico. A inclusão desta substância na solução de reação leva a uma queda intensa na reatividade, que chega a mais de 50% em alguns pontos, já na primeira diluição do caotrópico. Este agente caotrópico, uréia 0,125M, mostrou-se uma quantidade adequada para diminuir reações cruzadas, as quais foram confirmadas em outros ensaios. Outros fatores a ser analisados foram a diluição de uso dos soros, que permitia um uso de diluição 1/200 com alta discriminação e o uso de conjugado de maior especificidade, dirigidos contra a fração Fc da IgG humana e não contra a proteína total. Estas condições aqui determinadas foram utilizadas nos ensaios subseqüentes.

Figura 3 – Padronização do ELISA de melhor eficiência para evitar reações cruzadas, com uso de caotrópico como diluente de soros na determinação de auto-anticorpos contra retina, utilizando suporte sólido revestido com WHRE 2ug/ml em Uréia 8M

3.3 ELISA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA ANTICORPOS ANTI-RETINA

ELISA de alta eficiência foi feito nas condições descritas anteriormente para evitar reação cruzada e utilizando três antígenos de retina, o extrato total WHRE, e dois outros

antígenos purificados de retina: AgS: antígeno solúvel de retina ou arrestina e IRBP, proteína ligante de retinol do fotorreceptor, preparados por técnicas convencionais e fornecidos pela Profa. Dra. J. H. Yamamoto.

Para estes ensaios, utilizou-se quatro grupos de soros de pacientes, incluindo aqueles com uveíte, causada ou não pela toxoplasmose. Estes grupos eram compostos por 250 amostras de soros de pacientes assintomáticos com sorologia negativa para toxoplasmose (TgIgG-), 250 amostras de soros de pacientes assintomáticos com sorologia positiva para toxoplasmose (TgIgG+), 80 soros de pacientes com uveíte clinicamente diagnosticada, em qualquer fase de seu tratamento, compostos por 30 soros de pacientes com uveíte por *Toxoplasma gondii* (UTG+) e 50 soros de pacientes com uveítes causadas por outros fatores, que não o *Toxoplasma gondii* (UTG-), tanto de origem infecciosa quanto de inflamatória.

O resultado do ELISA otimizado com antígeno WHRE pode ser visto na Figura 4. A distribuição de reatividade mostrou que os grupos com uveíte tinham uma reatividade muito maior que os grupos sem uveíte, ao menos sintomática. Por este critério, foi utilizado um limiar arbitrário para reatividade a antígenos de retina, considerando-se não-reativo o soro cuja reatividade foi menor que a média subtraída de dois desvios padrão da população com uveíte, valor que foi utilizado para separar o eixo de reatividade. Não há diferença de reatividade comparando-se as duas populações portadoras de uveítes, mas há uma clara diferença quando esta população é comparada à população assintomática. A reatividade das populações de assintomáticos mostrou o mesmo resultado que ELISA de triagem, ilustrando que a média de reatividade a antígenos da retina (WHRE) dos pacientes positivos para IgG anti-*T. gondii* é maior do que a da população soronegativa para toxoplasmose.

Figura 4 – Distribuição de reatividade para ELISA otimizada para WHRE, de acordo com a origem dos soros das várias populações testadas: UTG-: Uveítes por outras causas; UTG+: Uveítes por *T. gondii*; Tg IgG-: assintomática com sorologia negativa para *T. gondii*; Tg IgG+: assintomática com sorologia negativa para *T. gondii*. Barras representam médias de intensidade do ELISA

O resultado do ELISA otimizado com antígeno solúvel de retina bovina ou AgS pode ser visto na Figura 5. Como para o extrato total, a distribuição de reatividade mostrou que os grupos com uveíte tinham uma reatividade muito maior que os sem uveíte, ao menos sintomática. Utilizou-se o mesmo critério para limiar arbitrário para reatividade a antígenos de retina, considerando-se a não-reativo o soro cuja reatividade foi menor que a média subtraída de dois desvios padrão da população com uveíte, valor que foi usado para separar o eixo de reatividade. Não há diferença de reatividade comparando-se as duas populações portadoras de uveítes, mas há uma clara diferença quando esta população é comparada à população assintomática. A reatividade das populações de assintomáticos não mostrou diferença significativa de reatividade média

das populações. É interessante notar que, nesta reação, o número de pacientes assintomáticos com reatividade acima do limiar foi muito alto, para ambas as populações.

Figura 5 – Distribuição de reatividade para ELISA otimizado para antígeno solúvel de retina AgS, de acordo com a origem dos soros das várias populações testadas.: UTG-: Uveítes por outras causas; UTG+: Uveítes por *T. gondii*; Tg IgG-: assintomática com sorologia negativa para *T. gondii*; Tg IgG +: assintomática com sorologia positiva para *T. gondii*. Barras representam médias de intensidade do ELISA

O antígeno bovino IRBP também foi testado com ELISA otimizado e a distribuição de reatividade entre as populações estudadas pode ser vista na Figura 6. Esta reação apresentou o menor nível de discriminação entre reagentes e não-reagentes, sempre utilizando o critério de limiar arbitrário para reatividade a antígenos de retina, considerando-se não-reativo o soro cuja reatividade foi

menor que a média subtraída de dois desvios padrão da população com uveíte. Este valor foi utilizado para separar o eixo de reatividade. Um grande número de soros reagentes foi encontrado em todas as populações, mas, novamente, as médias de reatividade apresentaram diferenças significativas. A média dos soros de pacientes com uveíte foi maior do que a média dos pacientes assintomáticos e a média dos assintomáticos com sorologia positiva foi maior que a média dos assintomáticos sem contato com o agente. Vale notar que os soros com maior reatividade para este antígeno encontravam-se na população com uveíte por *T. gondii*, embora não houvesse diferença significativa entre as médias das populações.

Figura 6 – Distribuição de reatividade para ELISA otimizado para antígeno IRBP bovino, de acordo com a origem dos soros das várias populações testadas: UTG-: Uveítes por outras causas; UTG+: Uveítes por *T. gondii*; Tg IgG-: assintomática com sorologia negativa para *T. gondii*; Tg IgG +: assintomática com sorologia positiva para *T. gondii*. Barras representam médias de intensidade do ELISA

3.4 ORIGEM DA RESPOSTA ANTI-RETINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS

Para estudo da origem da resposta imune anti-retina em modelos experimentais, foi avaliado a histologia retiniana em hamsters imunizados com taquizoítos irradiados estéreis de *T. gondii* e desafiados com taquizoítos vivos por injeção intravítrea como exposto em Métodos, um modelo de agressão ocular da toxoplasmose.

Para confirmação da resposta imune contra o agente, tanto o grupo dos animais imunizados como os não imunizados tiveram seu sangue coletado antes do início do experimento, uma semana após o término das imunizações e uma semana depois do desafio, logo após o sacrifício. A presença de anticorpos anti-*T. gondii* foi determinada

pelo ELISA clássico, utilizando-se extrato salino de *T. gondii*, adsorvido ao suporte sólido e a ligação quantitativa do anticorpo determinada por conjugado específico anti-IgG de hamster marcado com peroxidase. Os níveis médios de anticorpos de grupos de 5 animais podem ser vistos na Figura 7.

Figura 7 – Resposta imune contra *T. gondii* em hamsters imunizados, conforme descrito em Métodos, e desafiados com injeção intravítrea de taquizoítos. Barras representam média de reatividade e as barras representam o erro-padrão da média de cada grupo

Como se pode observar, a imunização dos animais produziu títulos elevados de imunoglobulinas específicas, confirmando o estabelecimento de uma resposta imune contra o agente nos animais imunizados. O tempo de desafio ocular não resultou na produção detectável de anticorpos IgG, como era de se esperar, sem resultar, até mesmo, em resposta anamnésica nos grupos imunizados, pelo menos ao nível de detecção dos testes.

3.5 HISTOLOGIA OCULAR DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Grupos de hamsters foram montados e ensaiados como descrito acima para produção de modelos experimentais de retinocoroidite por *T. gondii*. Após o sacrifício dos grupos de animais, os olhos foram enucleados e submetidos a um estudo histológico de rotina e imunohistoquímica.

3.5.1 HISTOLOGIA OCULAR DE ANIMAIS IMUNIZADOS

Inicialmente, na Figura 8, mostramos a análise de retina de hamsters imunizados com taquizoítos irradiados previamente ao desafio. Pode-se observar que a retina e as demais camadas do olho estavam preservadas, à mostra e sem nenhum tipo de processo inflamatório induzido pela imunização com taquizoítos irradiados. Não há nenhuma evidência de infecção ativa ou taquizoítos infectando células, com imunohistoquímica negativa. Este era o mesmo quadro encontrado em animais-controle e ambos os olhos mostravam este tipo de histologia normal.

Figura 8 – Micrografia da espessura total da retina de olho de hamster imunizado com 03 doses de taquizoítos irradiados. As três camadas do olho-retina, coróide e esclera estão preservadas. Coloração de H&E, aumento de 10 X

3.5.2 HISTOLOGIA OCULAR DE ANIMAIS DESAFIADOS

O desafio de animais não-imunizados e sem contacto prévio com o agente pode ser visto na Figura 9 e nas subseqüentes. Pode-se verificar que, com uma semana de evolução, há um grande envolvimento ocular, com intenso processo vítreo, hemorragias e inflamação, atingindo a coróide e a esclera, com lesão até dos tecidos extra-oculares intra-orbitários. Macroscopicamente, esta inflamação era visível por opacificação ocular e intensa morbidade dos hamsters inoculados, que chegavam a falecer antes do final do experimento, em sete dias, com toxoplasmose aguda e fenômenos sistêmicos, apesar da infecção ter sido iniciada pelo vítreo.

Num maior detalhamento, como pode ser observado na Figura 10, mesmo na histologia convencional era fácil o achado de células portando o agente, sempre dentro destas e mostrando grande proliferação, com mais de um agente e rosetas de agentes freqüentemente encontradas.

O achado de tais agentes ainda era mais intenso quando técnicas imunohistoquímicas foram utilizadas, o que pode ser visto na Figura 11. A intensidade da infecção retiniana é muito grande, atingindo todas as camadas e com achados freqüentes de taquizoítos intracelulares em rosetas, com infiltrado inflamatório e destruição das camadas retinianas

Figura 9 – Cortes histológicos da espessura total de um olho de hamster não-imunizado uma semana após desafio mostrando intenso processo inflamatório que envolve todas as camadas da retina e estende-se à coróide e esclera, comprometendo até mesmo, a gordura orbitária. Coloração de H&E, aumento de 10 X

Figura 10 – Maior aumento de cortes de retina de animais desafiados com *T. gondii* sem prévia imunização, mostrando grande comprometimento ocular, com agentes infecciosos nas várias camadas da retina, em franca proliferação (setas) H&E, aumento de 100 X

Figura 11 – Retina de hamsters infectados por via intravítrea e sacrificados após 7 dias, mostrando uma intensa invasão das camadas oculares no olho injetado com formação de rosetas intracelulares na maioria das células oculares, com restos antigênicos por todas as camadas. O olho contralateral também apresenta infecção. 100 X

3.5.3 HISTOLOGIA DE HAMSTERS IMUNIZADOS E DESAFIADOS

Os hamsters imunizados com três doses de taquizoítos irradiados foram submetidos a um desafio intravítreo como descrito em Métodos, sendo que após uma semana, os olhos foram enucleados e submetidos à histologia. O olho contralateral não apresentava lesão histológica e a retina do olho inoculado com taquizoítos viáveis pode ser vista na Figura 12, em colorações usuais. Verifica-se um comprometimento da camada mais interna da retina e vítreo por discreto infiltrado inflamatório. Foram encontradas regiões de maior comprometimento pelo processo inflamatório próximo à área do trajeto da inoculação vítrea, à gordura peri-orbitária e, por vezes, na superfície do cristalino. Não foi localizada uma reação inflamatória linfomononuclear ou granulomatosa, sendo que as células presentes na retina e na região vítrea pertenciam mais ao processo inflamatório agudo, como polimorfos nucleares e grandes linfócitos.

Figura 12: Corte histológico da espessura total de retina de hamster imunizado uma semana após o desafio com taquizoítos viáveis, com pequeno processo inflamatório envolvendo apenas as camadas mais superficiais da retina e vítreo. Coloração de H&E, 10 X

O detalhamento da lesão retiniana nos animais imunizados e desafiados pode ser visto na Figura 13. Podem ser observados, também, extravasamento de hemácias e processo inflamatório por mononucleares agredindo o vítreo e as camadas superficiais da retina.

Figura 13 – Corte histológico da espessura total de retina de hamster imunizado uma semana após o desafio com taquizoítos viáveis, mostrando pequeno processo inflamatório envolvendo apenas as camadas mais superficiais da retina e o vítreo. Coloração de H&E, aumento de 40 X

Os mesmos cortes retinianos foram submetidos à imunohistoquímica para detecção de taquizoítos de *T. gondii*, que podem ser vistos na Figura 14. Pode-se notar, novamente, a discreta inflamação vítrea, mas podem ser identificados alguns taquizoítos

infectando as células superficiais em contato com o vítreo, embora sem acometimento das demais camadas da retina. Algumas vezes, as camadas afetadas estavam mais próximas da camada de fotorreceptores, mas a resposta tecidual era mínima e sem o auxílio da imunohistoquímica não seriam identificáveis, pela histologia convencional, como pode ser visto na Figura 15.

Figura 14 – Corte histológico das camadas da retina de hamster imunizado uma semana após o desafio mostrando pequeno número de taquizoítos (coloração castanha) em meio ao discreto processo inflamatório que envolve apenas as camadas mais superficiais da retina e o vítreo. Imunohistoquímica para *T. gondii*, aumento de 20 X

Figura 15 – Detalhe dos taquizoítos intracelulares nas camadas mais superficiais da retina de hamsters imunizados e desafiados com taquizoítos viáveis. Imunohistoquímica para *T. gondii*. 100 X

4. DISCUSSÃO

Com este estudo, estudou-se a presença e a origem de anticorpos séricos anti-retina na patogênese da retinocoroidite por toxoplasmose humana e experimental, buscando uma inflamação auto-imune autoperpetuante no olho, incapaz de conter o agente. Também se investigou a eventual origem parasitária de uma resposta imune que pudesse agredir a retina em modelos experimentais.

Inicialmente, os dados mostraram que valores médios de auto-anticorpos contra a retina humana eram mais prevalentes em pacientes com sorologia positiva para toxoplasmose, após uma padronização pouco seletiva, utilizando um novo tipo de antígeno extraído em condição mais desnaturante e que continha antígenos variados da retina, incluindo antígenos de membrana.

Este antígeno apresentava boas características de preservação e reagia com anticorpos contidos nos soros de pacientes com uveíte e/ou toxoplasmose, mas com níveis mais baixos em soros de pacientes assintomáticos sem toxoplasmose, utilizando um alto limiar de reação. As reações mostraram uma distribuição bastante ampla dos valores, tanto em soros de pacientes soropositivos para toxoplasmose como em soros de pacientes soronegativos para o agente. Esta variada distribuição de reações já havia sido identificada por outros autores, utilizando uma técnica de imunofluorescência em tecido, com baixa resolução individual entre pacientes com diferentes tipos de uveítes, mas foram utilizados ensaios apenas nos portadores de uveítes ou lesões oculares⁹⁵.

O extrato de retina humana usado é composto por inúmeras proteínas e o método utilizado para sua produção nos permitiu obter mais antígenos que o usual, obtido por extrações salinas ou mediante soluções detergentes, como descritos em outros trabalhos¹¹. A amostra contendo solução tampão SDS-PAGE, que continha uréia, promoveu a extração de domínios hidrofóbicos das proteínas de membrana, altamente prevalentes na retina, composta por inúmeras proteínas associadas à membrana. Isso resultou em um extrato mais sensível à detecção de anticorpos, se comparado a um antígeno da retina isolado menos reativo, freqüentemente usado de origem bovina, como o antígeno S e o IRBP. Estes dados já foram descritos em outros trabalhos, nos quais estes antígenos purificados mostram-nos resultados menos significativos se comparados à retina total, detectado por estudo de imunofluorescência de retina intacta⁹⁵.

A abordagem transversal de pesquisa em populações apenas selecionadas por sua sorologia específica para a toxoplasmose não tinha sido utilizada em estudos anteriores de imunidade na retinocoroidite por toxoplasma, já que, geralmente, são utilizados estudos dirigidos baseados em grupos de pacientes, em estudos caso-controle. Este tipo de estudo apresenta várias distorções pela origem dos pacientes e, mesmo em nossa população, é fácil notar quais pacientes com doenças retinianas são mais propensos a respostas auto-imunes, o que poderia significar uma distorção pouco controlável na triagem dos pacientes. Nesta reação inicial de triagem observou-se que pacientes anti-*T. gondii* IgG soropositivos tem níveis mais elevados de anticorpos anti-retina em seus soros.

O aprimoramento da reação de ELISA pode ser feito utilizando-se a uréia como diluente, uma forma de eliminar os anticorpos de baixa avidéz, menos específicos e que poderiam resultar em conclusões falso-positivas⁷². Em nossos dados, fica evidente que a dispersão e a reatividade inespecífica podem ser aprimoradas com o uso de Uréia

0,25M como diluente dos soros, proporcionando uma queda de 50% nos níveis detectados de anticorpos em um soropositivo e abolindo as reações do soronegativo, permitindo uma melhor discriminação entre reatores e não-reatores.

A comparação de reatividade para anticorpos contra retina total nos dois ensaios mostrou uma menor dispersão e uma melhor definição dos soros reagentes. Isto permitiu um estudo mais adequado, utilizando os soros de pacientes portadores de uveíte como reagentes e definindo um limiar de doença retiniana que permite identificar um contingente menor dos assintomáticos, talvez portador de doença ocular assintomática. Isto é corroborado pelo fato de que o número de achados de lesões retinianas à necropsia, em estudos horizontais, é maior do que a doença sintomática ⁵⁴.

A discriminação dos pacientes entre os diferentes antígenos utilizados, tanto o extrato total como antígenos purificados, mostrou distribuição semelhante, principalmente quando são analisados extrato total e antígeno S, que são uma purificação parcial da arrestina. Este antígeno já havia sido utilizado em ensaios sorológicos de detecção de anticorpos em uveítes inflamatórias e infecciosas, com alguns casos de toxoplasmose ocular ⁶⁴, com resposta pouco conclusiva, mas alguns soros reagentes. Os resultados mostraram que alguns pacientes assintomáticos apresentam anticorpos anti-retina, para estes dois antígenos, mas, como citado anteriormente, várias etiologias assintomáticas podem estar relacionadas a estes anticorpos, o que explica estes resultados ^{64, 95, 100}.

Nos achados deste projeto, o ELISA de alta afinidade usando o IRBP como antígeno foi o sistema menos eficiente de detecção anti-retina, mesmo quando pacientes portadores de uveíte foram comparados com o restante da população.

Muitos antígenos isolados foram propostos como os causadores de doença ocular auto-imune, alguns dos quais ligados a quadros específicos ⁷⁹, entretanto as descobertas

desta pesquisa mostraram maior reatividade em relação ao estrato de retina total humano; este apontou para um efeito menos específico do *Toxoplasma gondii*, que expõe não especificamente todo o espectro de antígenos da retina, e não somente um componente específico ou uma lesão, como poderia ser esperado assemelhando-se a outras doenças, virais ⁹⁷ ou degenerativas ¹⁰.

A indução de anticorpos anti-retina é controversa, já que o olho é um compartimento especial para a resposta imune; pois ele é considerado um santuário imunológico, do qual seus antígenos evitam ser capturados para que não haja seleção clonal, são, assim, mantidos em silêncio até que algo – as barreiras hemato-oculares ⁶ – quebre esta harmonia. Não há drenagem linfática dentro do olho, desta maneira, ele funciona como outros sítios de privilégio imunológico; o que pode resultar em apresentação e função imunológica alteradas ².

A oftalmia simpática sustenta este fato, no qual a exposição traumática de estruturas intra-oculares pode causar uma inflamação intra-ocular não só no olho lesado, mas também no olho sadio contralateral, em qualquer época da vida após o trauma ⁷³. Existem alguns outros exemplos de doenças auto-imunes oculares, restritas ou não ao olho ou sistêmicas: VKH, Behcet e espondilite anquilosante ⁹⁹. Este mecanismo também foi proposto para infecções oculares graves, como a oncocercose, na qual tanto anticorpos anti-retina como resposta celular contra a retina foram encontrados ⁴⁹.

Uma vez que o primeiro episódio de inflamação pelo *Toxoplasma gondii* ocorra, antígenos oculares serão expostos à resposta imune, suscitando uma resposta imune específica, que deve manifestar-se tanto por anticorpos como também por resposta celular. Reativações ou re-infecções no olho podem levar a tal resposta, criando células de resposta específicas e reativas. Este fato foi descrito por estudos feitos com ensaios

de proliferação celular para imunidade celular a antígenos próprios do olho, mostrando uma resposta celular baixa em doenças incontroláveis ⁸⁷.

O uso de modelos experimentais permitiu abordar outro aspecto desses anticorpos, a sua origem. Uma possibilidade importante seria o mimetismo antigênico pelo parasita, gerando um epítopo que pudesse ser confundido com antígenos próprios oculares do hospedeiro, com perda de visão, a qual poderia resultar em uma desvantagem do hospedeiro intermediário, favorecendo sua predação pelo hospedeiro definitivo, o que resulta em um mecanismo de seleção de protozoários com esta ação. Os modelos experimentais de toxoplasmose ocular são demorados e complexos, e esta possibilidade somente poderia ser testada na ausência de infecção ocular, restringindo os modelos de toxoplasmose ocular àqueles com cepas cistogênicas, que mantêm cistos oculares viáveis ⁶⁹. O modelo de imunização com taquizoítos irradiados mostrou-se eficiente, com boa resposta humoral sem instalação de cistos oculares ³⁶, o que permitiu o estudo a partir do desafio intravítreo, conforme descrito por outros autores ⁴⁵. Este modelo de desafio mimetiza a ruptura de um cisto tecidual retiniano, que contém centenas de bradizoítos, equivalente ao desafio com 100 taquizoítos. Esta pesquisa mostra a importância de uma imunidade ocular efetiva, já que animais não-imunizados apresentaram doença ocular destrutiva e quase sempre êxito letal por doença sistêmica em 14 dias. O número de agentes encontrados por imunohistoquímica era enorme e atingia todas as camadas retinianas, mesmo com a aplicação da injeção intravítrea, mostrando a agressividade do agente na ausência de mecanismos imunes de controle.

Nos animais imunizados sem desafio, nenhuma doença retiniana foi encontrada, e a pesquisa de anticorpos contra os antígenos retinianos heterólogos disponíveis não mostrou reatividade. A presença de altos níveis de anticorpos contra o agente não participou de nenhuma agressão retiniana. Os dados em relação à ausência de reações da

retina após a exposição à resposta imune protetora em modelos experimentais suportam o uso de vacinas na toxoplasmose humana. Como na composição da vacina poderia haver antígenos dos parasitas e, conseqüentemente, desencadeamento de uma doença auto-imune este fato foi questionado, já que isto havia ocorrido no passado com várias vacinas ⁶³.

Na amostra investigada, os níveis de auto-anticorpos anti-retina em pacientes portadores de uveíte permitiu identificar a presença de assintomáticos reatores na amostra da população soronegativa para anticorpos de toxoplasma mas com altos títulos de anticorpos anti-retina.

Esta associação sugere o uso da triagem com anticorpos anti-retina, visando otimizar a consulta oftalmológica, selecionando pacientes para um “follow up” de retina, permitindo diagnóstico e tratamento precoce.

Pacientes portadores de uveíte, independente da causa – *Toxoplasma* ou não – apresentaram níveis (valores) médios mais altos de anticorpos anti-retina, mesmo se comparados aos valores achados na população soropositiva para *T. gondii*, esta apresentando níveis mais alto que a população soronegativa para *T. gondii*. Estes dados foram confirmados, porém com menos eficiência, quando o ELISA foi realizado com antígeno S e com o IRBP.

Os dados sugerem fortemente que a imunização contra o *T. gondii* é eficaz na prevenção do envolvimento ocular, mostrando a não-existência de indução da auto-imunidade reativa cruzada e também mostrando a indução de proteção parcial ao desafio intra-ocular com taquizoítos viáveis. Anticorpos IgG contra antígenos do estrato total de retina humano foram encontrados em níveis mais altos no soro da população brasileira que teve prévio contato com o *T. gondii*, comprovado pela positividade da sorologia IgG.

A uveíte por toxoplasmose induz à exposição e à resposta imune-humoral do hospedeiro contra antígenos da retina, provavelmente exacerbando o efeito direto do agente.

Sendo assim, pode-se acreditar que o dano ao tecido ocular é o resultado da combinação de fatores imune e parasita. A invasão inicial do olho pelo parasita contribui para a quebra da barreira hemato-ocular. Com esta barreira quebrada existe uma facilitação de translocação de células imunes para dentro do olho. Nota-se que durante a infecção pelo *T. gondii*, aspectos do privilégio imune estão seletivamente diminuídos ao ser aumentados ⁴⁸.

Os dados experimentais foram baseados na imunização com taquizoítos irradiados, um modelo que promove a mesma resposta imune a da primo-infecção, como descrito anteriormente ³⁶. A produção elevada de anticorpos específicos encontrados nos animais imunizados, mais a integridade da retina comprovada pelos estudos histológicos suportam o conceito de ausência de anticorpos reativos cruzados induzindo resposta inflamatória local. Animais imunizados e desafiados com parasitas intravítreo mostraram resposta protetora parcial, já os animais não-imunizados apresentaram doença severa. Ambos apresentaram, entretanto, resposta imune com efeito protetor e não-agressivo. O modelo experimental para a toxoplasmose ocular pode ser obtido por meio de infecção via oral, como descrito em outros trabalhos, promovendo um modelo que pode ser comparado à doença em humanos, porém com a presença de cistos viáveis nos olhos ¹⁷. O uso injetável de parasitas vivos e viáveis intra-oculares ⁴⁵ promovendo doença aguda também pode proporcionar um bom e confiável modelo experimental, sem o efeito indesejável da perpetuação da infecção crônica com a presença de parasitas viáveis no olho, o que poderia induzir a exposição de antígenos da retina pela presença direta destes antígenos.

O modelo utilizado nesta pesquisa baseia-se na inoculação intra-ocular de taquizoítos livres, o que mimetiza a ruptura de um eventual cisto tecidual local. Outros modelos de infecção crônica ocular, utilizando cepas cistogênicas, têm resultado muito mais complexo pela esporádica ruptura dos cistos ⁶⁹, incontrolável pelo pesquisador e que leva a uma pobreza marcante de resultados claros e controle experimental impossível. Além disso, sempre existe a possibilidade de que a infecção primária não resulte no estabelecimento de infecção retiniana. Neste estudo, o uso da inoculação direta de hamsters mostrou-se um modelo experimental confiável, que induz à lesão severa, permitindo a evolução de resposta imune por prévia imunização.

Os dados desta investigação mostraram claramente que animais imunizados foram parcialmente protegidos, embora a doença fosse restrita. Notou-se a presença de infecção residual de células vítreas, reafirmando a ausência de antígenos reativos cruzados mimetizados pelo parasita, como ocorre em outras infecções parasitárias ⁵⁹.

Com o estudo do modelo experimental para complementar os achados sorológicos, pode-se afirmar, ao contrário de alguns autores como Jones et al., que as evidências encontradas neste estudo, sugerem fortemente que a auto-imunidade é a responsável pelos danos causados pela toxoplasmose no olho e não apenas um fator contributivo. Mediante o estudo histológico do modelo experimental utilizado nesta pesquisa, podemos observar que não houve a destruição seletiva das camadas mais externas da retina e a vasculite que seriam esperadas nas uveítes alérgicas experimentais, pois os antígenos retinianos não haviam sido expostos ao sistema imune do hospedeiro e o parasita não consegue estabelecer lesões significativas na presença de resposta imune eficiente, induzida por imunização com agentes estéreis, o que deu tempo suficiente ao sistema imune para produzir anticorpos a fim de prevenir uma nova invasão.

Acredita-se que estas barreiras, em geral mecânicas, são as principais linhas de defesa que o olho saudável usa para manter-se separado e protegido do sistema imune, numa privilegiada ignorância imunológica que visa preservar o contato com a resposta imune. Entretanto, para isso existe um preço, que neste caso é o fato da persistência de células T antígeno específicas da retina no sangue periférico, as quais não são toleradas, mas apenas mantidas sob um frágil controle pelo timo. Circuitos regulatórios oculares específicos são induzidos ativamente pela liberação de antígenos nos tecidos lesados ⁶. Um agente que quebre esta barreira, como o Toxoplasma, além de seu dano específico, também expõe antígenos e leva a uma auto-imunidade perpetuante do processo, que é expressa pela presença de auto-anticorpos.

Os dados aqui utilizados, de certa forma, suportam o uso de imunossupressores na terapia da toxoplasmose ocular ^{1, 3, 5, 15, 23, 27, 35, 39, 46, 65, 68, 71, 76, 90, 92}, o que, geralmente, foi baseado em situações empíricas, fundamentados na intuição anti-inflamatória e visando diminuir o risco de perda desta importante função que é a visão.

Como comentários finais, acredita-se que a toxoplasmose deve ser prevenida de forma intensa, com controle de fontes de infecção e evitando-se a infecção dos pacientes, apesar de ser considerada uma doença geralmente assintomática. A perda parcial ou integral da visão de uma pequena proporção de infectados assume características econômicas e individuais enormes para os afetados e todo o esforço deve ser feito para a diminuição da prevalência deste patógeno, que discretamente afeta enormes contingentes da população humana e causa lesões irreversíveis na visão. Considera-se, também, que a inclusão de pesquisa de anticorpos anti-retina pode ser uma ferramenta importante em oftalmologia, principalmente em estudos de diagnóstico precoce e medicina preventiva, permitindo a identificação de doença leve, oligo ou assintomática, tanto de causa infecciosa como de outras etiologias, mas os ensaios

apresentados apenas aprimoram testes que precisam ser mais sensíveis e específicos, demandando novas inovações.

5. CONCLUSÃO

Como conclusão geral, acredita-se que a toxoplasmose ocular tem participação auto-imune, evidenciada pela presença de anticorpos anti-retina, sejam extratos totais ou frações purificadas, que são gerados pela exposição de antígenos da retina e não por mimetismo antigênico.

Especificamente, demonstrou-se que:

- Amostras de pacientes assintomáticos com sorologia positiva para toxoplasmose têm maior nível de anticorpos anti-retina em estudo de triagem.
- Foi possível padronizar um ELISA de alta reatividade que confirmou a presença de anticorpos anti-retina de alta afinidade em pacientes com uveíte de várias origens ou causada pelo *T. gondii*.
- O nível médio de anticorpos anti-retina de alta afinidade foi maior em amostras de pacientes com sorologia positiva para a toxoplasmose do que naqueles com sorologia negativa, usando extrato total de retina humana, ou frações purificadas, antígeno S e IRBP.
- Um modelo experimental para a toxoplasmose ocular foi padronizado em hamsters e permitiu mostrar que a imunidade usual induzida pelo agente não causa lesão retiniana significativa, na ausência de invasão ocular pelo agente.
- Neste mesmo modelo, foi mostrado que esta imunidade produz proteção contra o agente e não agressão auto-imune contra a retina.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abreu MT, Belfort JRR, Oréfice F.: Toxoplasmose Ocular, In Uveítes, Orefice F & Belfort R Jr ,eds São Paulo, Roca,1987, p 211-27 .
2. Avichezer D, Grajewski RS, Chan CC, Mattapallil MJ, Silver PB, Raber, JA, Liou GI, Wiggert B, Lewis GM, Donoso LA, Caspi RR. An immunologically privileged retinal antigen elicits tolerance: major role for central selection mechanisms. *J Exp Med.* 2003; 198(11):1665-76.
3. Bonfioli AA, Orefice F. Toxoplasmosis.Semin Ophthalmol. 2005; 20(3):129-41.
4. Bosch-Driessen LE, Berendschot, TT, Ongksuwito JV, Rothova A. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. *Ophthalmology.* 2002; 109(5):869-78.
5. Bout DT, Mevelec MN, Velge-Roussel F, Dimier-Poisson I, Lebrun M. Prospects for a human Toxoplasma vaccine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2002; 2(3):227-34.
6. Caspi RR. Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev.* 2006; 213:23-35.
7. Chan CC. Relationship between sympathetic ophthalmia, phacoanaphylatic endophthalmitis, and Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Ophthalmology.* 1988; 95(5):619-24.
8. Chan CC, Palestine AG, Nussenblatt RB, Roberge FG, Benezra D. Anti-retinal auto-antibodies in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, Behcet's disease, and sympathetic ophthalmia. *Ophthalmology.* 1985; 92(8):1025-8.
9. Chant SM, Heckenlively J, Meyers-Elliott RH. Autoimmunity in hereditary retinal degeneration. I. Basic studies.Br J Ophthalmol. 1985; 69(1):19-24.
10. Chant SM, Meyers-Elliott RH. Autoimmunity: a possible factor in the development of retinal degeneration in the RCS rat. *Clin Immunol Immunopathol.* 1982; 22(3):419-27.
11. Chevallet M, Santoni V, Poinas A, Rouquie D, Fuchs A, Kieffer S, Rossignol M,Lunardi J, Garin J, Rabilloud T. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins bytwo-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 1998; 19(11):1901-9.
12. Choi WY. Diagnosis and epidemiology of toxoplasmosis in Korea. *Kisaengchunghak Chapchi.* 1990; 28 Suppl: 41-4.

13. Coelho RA, Kobayashi M, Carvalho LB Jr. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003; 45(4):229-31.
14. Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*. 2006; 39(1):41-54
15. Cursino SRT, Andrade Filho HF.: Toxoplasmose, In *Tratado de Clínica Médica*, Lopes AC ed. São Paulo, Roca, 2006, p 4143-47
16. 14: Damico FM, Kiss S, Young LH. Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Semin Ophthalmol*. 2005; 20(3):183-90.
17. Damico FM, Cunha-Neto E, Goldberg AC, Iwai LK, Marin ML, Hammer J, Kalil J, Yamamoto JH. T-cell recognition and cytokine profile induced by melanocyte epitopes in patients with HLA-DRB1*0405-positive and -negative Vogt-Koyanagi-Harada uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46(7):2465-71.
18. De Jong PT. Ocular toxoplasmosis; common and rare symptoms and signs. *Int Ophthalmol*. 1989; 13(6):391-7.
19. Derouin F, Lacroix C, Sumyuen MH, Romand S, Garin YJ. Experimental models of toxoplasmosis. Pharmacological applications. *Parasite*. 1995; 2(3):243-56.
20. Desmonts G, Couvreur J, Alison F, Baudelot J, Gerbeaux J, Lelong M. [Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cookingslaughter-animal meat on the incidence of human infection] *Rev Fr Etud Clin Biol*. 1965;10(9):952-8.
21. Duarte MIS & Andrade Jr HF . Toxoplasmosis in Brasileiro Filho,G. ed Bogliolo Patologia, 7th ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006: 1373-1380
22. Filisetti D, Candolfi E . Immune response to *Toxoplasma gondii*.*Ann Ist Super Sanita*. 2004; 40(1):71-80.
23. Gagliuso DJ, Teich SA, Friedman AH, Orellana J. Ocular toxoplasmosis in Aids patients. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1990; 88:63-86; discussion 86-8.
24. Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, de Oliveira RC, Kobilka E. [Seroprevalence, epidemiology and ocular evaluation of human toxoplasmosis in the rural zone Jauguapita (Parana) Brazil] *Rev Panam Salud Publica*. 1999; 6(3):157-63.
25. Garweg JG, Kuenzli H, Boehnke M. Experimental ocular toxoplasmosis in naive and primed rabbits. *Ophthalmologica*. 1998; 212(2):136-41.

26. Gazzinelli RT, Brezin A, Li Q, Nussenblatt RB, Chan CC. Toxoplasma gondii: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Exp Parasitol*. 1994; 78(2):217-29.
27. Gilbert RE, Stanford MR. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br J Ophthalmol*. 2000; 84(2):224-6.
28. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Junior M, Silveira S, Camargo ME, Nussenblatt RB, Kaslow RA, Belfort Junior R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*. 1992; 114(2):136-44.
29. Gormley PD, Pavesio CE, Luthert P, Lightman S. Retinochoroiditis is induced by oral administration of Toxoplasma gondii cysts in the hamster model. *Exp Eye Res*. 1999; 68(6):657-61.
30. Goto H, Rao NA. Sympathetic ophthalmia and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Int Ophthalmol Clin*. 1990; 30(4):279-85.
31. Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 2001; 184(5):633-9.
32. Hall SM, Pandit A, Golwilkar A, Williams TS. How do Jains get toxoplasma infection? *Lancet*. 1999; 354(9177):486-7.
33. Heckenlively JR, Solish AM, Chant SM, Meyers-Elliott RH. Autoimmunity in hereditary retinal degenerations. II. Clinical studies: anti retinal antibodies and fluorescein angiogram findings. *Br J Ophthalmol*. 1985; 69(10):758-64.
34. Hegab SM, Al-Mutawa SA. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clin Exp Med*. 2003; 3(2):84-105
35. Hill D, Dubey JP. Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8(10):634-40
36. Hiramoto RM, Galisteo AJ, do Nascimento N, de Andrade HF Jr. 200 Gy sterilised Toxoplasma gondii tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. *Vaccine*. 2002; 20(16):2072-81.
37. Hiramoto RM, Mayrbaurl-Borges M, Galisteo AJ Jr, Meireles LR, Macre MS, Andrade HF Jr. Infectivity of cysts of the ME-49 Toxoplasma gondii strain in bovine milk and homemade cheese. *Rev Saúde Pública*. 2001; 35(2):113-8.
38. Hogan MJ. Ocular toxoplasmosis. *Trans Pac Coast Otoophthalmol Soc Annu Meet*. 1969; 50:1-21.
39. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. *Am J Ophthalmol*. 2004; 137(1):1-17.

40. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol*. 2003; 136(6):973-88.
41. Holland GN, Lewis KG, O'Connor GR. Ocular toxoplasmosis: a 50th anniversary tribute to the contributions of Helenor Campbell Wilder Foerster. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120(8):1081-4.
42. Holland GN. Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol*. 1999; 128(4):502-5.
43. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995; 172(6):1561-6.
44. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) - procedures. *J Histochem Cytochem*, v 29, n4, p 577-80; 1981
45. Hu MS, Schwartzman JD, Lepage AC, Khan IA, Kasper LH. Experimental ocular toxoplasmosis induced in naive and preinfected mice by intracameral inoculation. *Ocul Immunol Inflamm*. 1999; 7(1):17-26.
46. Jabs DA & Nguyen QD: Ocular Toxoplasmosis, In *Int Ophthalmol Clin*, 1990
47. Jain SD, Uppal B, Mehta DK. Seroepidemiology of ocular toxoplasmosis-profile of an urban population. *Indian J Pathol Microbiol*. 1998; 41(4):387-90.
48. Jones LA, Alexander J, Roberts CW. Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. *Parasite Immunol*. 2006; 28(12):635-42
49. Kijlstra A, Hoekzema R, vd Lelij A, Doekes G, Rothova A. Humoral and cellular immune reactions against retinal antigens in clinical disease. *Curr Eye Res*. 1990;9 Suppl:85-9
50. Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol*. 2004; 34(3):423-32.
51. Koppe JG, Loewer-Sieger DH, de Roever-Bonnet H. Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet*. 1986; 1(8475):254-6.
52. Kruger NJ: The Bradford method for protein quantification. *Methods Mol Biol* 1994, 32 :9-15
53. Lappin MR. Feline toxoplasmosis: interpretation of diagnostic test results. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1996; 11(3):154-60
54. Latkany, P. Ocular disease due to *Toxoplasma gondii* in L. M. Weiss & K. Kim *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan: perspectives and methods, 2007, pp101-131 Elsevier, Boston

55. Levinson RD.: Immunogenetics of ocular inflammatory disease. *Tissue Antigens*. 2007; 69(2) : 105-12
56. Lindberg RE, Frenkel JK. Toxoplasmosis in nude mice. *J Parasitol*. 1977; 63(2):219-21.
57. Lynch MI, Cordeiro F, Ferreira S, Ximenes R, Orefice F, Malagueno E. Lacrimal secretory IgA in active posterior uveitis induced by *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(8):861-4.
58. Lyons RE, McLeod R, Roberts CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol*. 2002; 18(5):198-201.
59. McKechnie NM, Braun G, Connor V, Klager S, Taylor DW, Alexander RA, Gilbert CE. Immunologic cross-reactivity in the pathogenesis of ocular onchocerciasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993; 34(10):2888-902.
60. Meireles LR, Galisteo AJ Jr, Pompeu E, Andrade HF Jr. *Toxoplasma gondii* spreading in an urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. *Trop Med Int Health*. 2004; 9(8):876-81.
61. Mondragon R, Howe DK, Dubey JP, Sibley LD. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J Parasitol*. 1998; 84(3):639-41.
62. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363(9425):1965-76
63. Moylett EH, Hanson IC. Mechanistic actions of the risks and adverse events associated with vaccine administration. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114(5):1010-20.
64. Muiño JC, Juárez CP, Luna JD, Castro CC, Wolff EG, Ferrero M, Romero-Piffiguer MD. The importance of specific IgG and IgE auto antibodies to retinal S antigen, total serum Ig E, and sCD23 levels in autoimmune and infectious uveitis. *J Clin Immunol*. 1999; 19(4):215-22.
65. Nicholson DH, Wolchok EB. Ocular toxoplasmosis in an adult receiving long-term corticosteroid therapy. *Arch Ophthalmol*. 1976 94(2):248-54.
66. Nussenblatt RB, Belfort R Jr. Ocular toxoplasmosis. An old disease revisited. *JAMA*. 1994; 271(4):304-7. Erratum in: *JAMA* 1994 Aug 3; 272(5):356.
67. Ongkosuwito JV, Bosch-Driessen EH, Kijlstra A, Rothova A. Serologic evaluation of patients with primary and recurrent ocular toxoplasmosis for evidence of recent infection. *Am J Ophthalmol*. 1999; 128(4):407-12.
68. Park KL, Smith RE, Rao NA. Ocular manifestations of Aids. *Curr Opin Ophthalmol*. 1995; 6(6):82-7.

69. Pavesio CE, Chiappino ML, Gormley P, Setzer PY, Nichols BA. Acquired retinochoroiditis in hamsters inoculated with ME 49 strain *Toxoplasma*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995; 36(11):2166-75.
70. Pereira VR, Lorena Vm, da Silva AP, Coutinho EM, Silvas ED, Ferreira AG, Miranda P, Krieger MA, Goldenberg S, Soares MB, Correa-Oliveira R, Gomes YM: Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. Parasitology 2004; 129 (5): 563-70
71. Petersen E. Prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007; 5(2):285-93.
72. Polanec J, Seppälä I, Rousseau S, Hedman K. Evaluation of protein-denaturing immunoassays for avidity of immunoglobulin G to rubella virus. J Clin Lab Anal. 1994;8(1):16-21
73. Rao NA. Mechanisms of inflammatory response in sympathetic ophthalmia and VKH syndrome. Eye. 1997; 11 (2):213-6
74. Rao NA, Robin J, Hartmann D, Sweeney JA, Marak GE Jr. The role of the penetrating wound in the development of sympathetic ophthalmia experimental observations. Arch Ophthalmol. 1983; 101(1):102-4.
75. Rao NA, Marak GE. Sympathetic ophthalmia simulating vogt-Koyanagi-Harada's disease: a clinic-pathologic study of four cases. Jpn J Ophthalmol. 1983; 27(3):506-11.
76. Remington JS, Klein JO: Infectious Diseases of the Fetus and New Born Infant: Chapter 5 Toxoplasmosis Autores Regminton JS, McLeod R, Thulliez P, Desmont G pag 205-346
77. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. J Clin Microbiol. 2004; 42(3):941-5
78. Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. Parasitol Today. 1999; 15(2):51-7.
79. Shinzato M, Yamamoto JH, Hirata CE, Olivalves E, Bonfa E. Anti-SS-A/Ro reactivity in patients with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. Lupus. 2004; 13(4):279-80.
80. Silveira C, Belfort R Jr, Muccioli C, Abreu MT, Martins MC, Victora C, Nussenblatt RB, Holland GN. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. Am J Ophthalmol. 2001; 131(3):351-4.
81. Silveira C, Belfort R Jr, Burnier M Jr, Nussenblatt R. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. Am J Ophthalmol. 1988 Sep 15; 106(3):362-4.

82. Soyfoo MS, Steinfeld S, Delporte C. Usefulness of mouse models to study the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Oral Dis.* 2007;13(4):366-75
83. Streilein JW. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2003; 74(2):179-85.
84. Subauste CS, Remington JS. Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Immunol.* 1993; 5(4):532-7.
85. Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11(3):170-6.
86. Tabbara KF. Ocular toxoplasmosis: toxoplasmic retinochoroiditis. *Int Ophthalmol Clin.* 1995; 35(2):15-29.
87. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000; 30(12-13):1217-58. Erratum in: *Int J Parasitol* 2001;31(2):217-20.
88. Vallochi AL, Commodaro AG, Schwartzman JP, Belfort R Jr, Rizzo LV. The role of cytokines in the regulation of ocular autoimmune inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18(1-2):135-41.
89. Vallochi AL, Muccioli C, Martins MC, Silveira C, Belfort R Jr, Rizzo LV. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am J Ophthalmol.* 2005; 139(2):350-1.
90. Vallochi AL, da Silva Rios L, Nakamura MV, Silveira C, Muccioli C, Martins MC, Belfort R Jr, Rizzo LV. The involvement of autoimmunity against retinal antigens in determining disease severity in toxoplasmosis. *J Autoimmun.* 2005; 24(1):25-32.
91. Vallochi AL, Nakamura MV, Schlesinger D, Martins MC, Silveira C, Belfort R Jr, Rizzo LV. Ocular toxoplasmosis: more than just what meets the eye? *Scand J Immunol.* 2002; 55(4):324-8.
92. Vallochi AL, Yamamoto JH, Schlesinger D, Machado MA, Silveira C, Martins MC, Belfort R Jr, Kalil J, Rizzo LV. Lack of evidence for superantigen activity of *Toxoplasma gondii* towards human T cells. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34(8):1023-31.
93. Venkatesan P, Wakelin D: ELISAS for parasitologists: or lies, damned lies and Elisa. *Parasitology Today.* 1993; 9 (6): 228-232
94. Vrabec TR. Posterior segment manifestations of HIV/Aids. *Surv Ophthalmol.* 2004; 49(2):131-57.

95. Whittle RM, Wallace GR, Whiston RA, Dumonde DC, Stanford MR. Human antiretinal antibodies in toxoplasma retinochoroiditis. *Br J Ophthalmol*. 1998, 82(9):1017-21.
96. Wilder HC. Toxoplasma chorioretinitis in adults; a preliminary study of forty-one cases diagnosed by microscopic examination. *AMA Arch Ophthalmol*. 1952 Apr;47(4):425
97. Wildner G, Diedrichs-Mohring M. Autoimmune uveitis and antigenic mimicry of environmental antigens. *Autoimmun Rev*. 2004;3(5):383-7
98. Wilson CB, Remington JS, Stagno S, Reynolds DW. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital Toxoplasma infection. *Pediatrics*. 1980; 66(5):767-74.
99. Yamamoto JH, Boletti DI, Nakashima Y, Hirata CE, Olivalves E, Shinzato MM, Okay TS, Santo RM, Duarte MI, Kalil J. Severe bilateral necrotising retinitis caused by Toxoplasma gondii in a patient with systemic lupus erythematosus and diabetes mellitus. *Br J Ophthalmol*. 2003; 87(5):651-2.
100. Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, Filho JK, Nussenblatt RB, Cunha-Neto E, Gazzinelli RT, Belfort R Jr, Rizzo LV. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *J Infect Dis*. 2000; 181(6):2018-22.