



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

LEONARDO DE FREITAS TEODORO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS
RECEPTORES TLR2, TLR4 E TLR9 E DA
PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-
INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES COM
TOXOPLASMOSE OCULAR CICATRICIAL E
REATIVADA.**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Cirurgia e Medicina
Translacional

Orientadora: Profa. Assoc. Eliane Chaves Jorge
Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Gatto

**Botucatu
2020**

LEONARDO DE FREITAS TEODORO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS
RECEPTORES TLR2, TLR4 E TLR9 E DA
PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-
INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES COM
TOXOPLASMOSE OCULAR CICATRICIAL E
REATIVADA.

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho",
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre(a)
em Cirurgia e Medicina
Translacional.

Orientadora: Profa. Assoc. Eliane Chaves Jorge
Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana Gatto

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5661

Teodoro, Leonardo de Freitas.

Análise da expressão gênica dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 e da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes com toxoplasmose ocular cicatricial e reativada / Leonardo de Freitas Teodoro. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Eliane Chaves Jorge

Coorientador: Mariana Gatto

Capes: 40101177

1. Toxoplasmose ocular. 2. Receptores Toll-like.
3. Toxoplasmose gondii. 4. Expressão gênica

Palavras-chave: Coriorretinite, Intergerons; Receptores toll-like; Toxoplasma gondii; Toxoplasmose ocular.

Leonardo de Freitas Teodoro

Análise da expressão gênica dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 e da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes com toxoplasmose ocular cicatricial e reativada.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Cirurgia.

Orientadora: Prof^a. Assoc. Eliane Chaves Jorge

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Gatto

Comissão examinadora

Prof^a. Assoc. Eliane Chaves Jorge
Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Prof. Dr.
Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. João Marcello Fortes Furtado
Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP

Botucatu, 20 de fevereiro de 2020.

Dedicatória

Ao meu pai, **Marco Túlio**, por me transformar no homem que sou hoje e me estimular a seguir meus sonhos.

Agradecimientos

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliane Chaves Jorge, por me acompanhar neste período e me ajudar a progredir.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Mariana Gatto, por me ajudar quando mais precisei e nunca deixar de prestar seu apoio.

À minha família, em especial minha esposa Mariana, minha parceira, que garantiu que eu pudesse ter tempo e condições de concluir esta obra.

À minha antiga co-orientadora Profa. Dra. Sueli Calvi pelo empenho e ajuda na elaboração do trabalho. Com certeza fará falta na pesquisa nacional.

À César Martins Cortez Vilar e Philipe R. R. de Oliveira, residentes de oftalmologia por terem me ajudado a avaliar e captar os pacientes para o trabalho.

À Jéssica Cristina Bilizário Nogueira de Andrade, aprimoranda do laboratório de moléstias infecciosas, pela ajuda prestada na coleta e processamento das amostras.

À Marcia Fonseca Piagentini Cruz, pela ajuda com as disciplinas da pós-graduação e na organização do meu tempo ao longo do mestrado.

Por fim, agradeço aos colegas de residência por me ajudarem durante o longo período de elaboração deste trabalho.

Resumo

TEODORO LF. Análise da expressão gênica dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 e da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes com toxoplasmose ocular cicatricial e reativada. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu. 2020.

Introdução: A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório que atinge o olho por via hematogênica, na forma de taquizoítos livres ou dentro de macrófagos circulantes. No olho, a reação imune celular e humoral induzida pelo toxoplasma leva à uveíte posterior e retinocoroidite focal necrosante. Cerca de dois terços dos indivíduos acometidos podem apresentar recidiva nas margens da lesão primária, em outro local da retina ou no olho contralateral. As causas das recidivas ainda são pouco conhecidas, porém a resposta imune desempenha um papel essencial. O mapeamento de mediadores inflamatórios na TO tem ganho importância por facilitar a compreensão sobre a modulação da inflamação, que varia com a expressão das citocinas. Estudo recente mostrou que há diferenças no perfil de expressão destes mediadores no humor aquoso, durante as recidivas de TO. Outras evidências sugerem que os TLRs (*toll-like receptors*) estariam envolvidos na reação imune contra o toxoplasma, e que várias proteínas PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno) foram associadas à ativação destes receptores. No entanto, não há estudos sobre o papel dos TLRs na patogênese da TO e o envolvimento deles nos mecanismos envolvidos nas recidivas. **Objetivo:** avaliar o padrão de resposta imunológica sistêmica de pacientes com toxoplasmose recidivada e cicatricial por meio da expressão gênica dos receptores TLRs e de citocinas pró e anti-inflamatórias. **Métodos:** Foram avaliados 44 indivíduos, divididos em três grupos: 14 com TO reativada (TOR); 16 com TO cicatricial (TOC); e 14 sem toxoplasmose ocular (grupo controle – C). Os pacientes dos grupos TOR e TOC foram submetidos a avaliação oftalmológica completa. A quantificação da expressão gênica dos TLR2, TLR4 e TLR9 por q-PCR foi realizada a partir de células mononucleares do sangue periférico dos participantes do estudo. A produção de citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α no soro foi quantificada por ELISA. **Resultados:** As idades variaram de 19 a 68 anos no grupo TOC, e 20 a 49 anos no grupo TOR. No grupo de TOC, 8 (57,1%) eram do sexo feminino e no grupo TOR 11 eram homens (68,7%). Quanto aos TLRs, a expressão do TLR2 foi diminuída nos grupos TOC e TOR em relação aos controles. O grupo TOR apresentou expressão diminuída do TLR4 em relação aos grupos TOC e controle enquanto a expressão de TLR9 foi aumentada no grupo TOR em relação ao grupo TOC. Já na avaliação das citocinas, a IL-10 apresentou diminuição no grupo TOR em relação ao controle. As demais citocinas não apresentaram alteração entre os grupos. **Conclusão:** Os achados sugerem que durante as recidivas da toxoplasmose ocular há envolvimento do TLR9 e manutenção do estado pró-inflamatório, evidenciado pela diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; toxoplasmose ocular; coriorretinite; receptores Toll-Like.

Abstract

TEODORO LF. Analysis of the gene expression from the TLR2, TLR4 and TLR9 receptor and the pro and anti-inflammatory cytokine's production in patients with reactivated and cicatricial ocular toxoplasmosis. Dissertation (Master degree) – Botucatu Medical School, UNESP, Botucatu. 2020.

Introduction: Toxoplasmosis is a zoonosis caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular parasite that reaches the eye via the hematogenous pathway, in the form of free tachyzoites or within circulating macrophages. In the eye, the cellular and humoral immune reaction caused by toxoplasma lead to posterior uveitis and necrotizing focal retinochoroiditis. About two-thirds of ocular toxoplasmosis (OT) patients may relapse on the margins of the primary lesion, elsewhere on the retina or even on the contralateral eye. The causes of relapses are still poorly understood, but the immune response plays an essential role. The mapping of inflammatory mediators in OT has gained importance for facilitating the understanding of the modulation of inflammation, which varies with the expression of cytokines. A recent study showed that there are differences in the expression profile of these mediators in aqueous humor during recurrences of OT. Other evidence suggests that TLRs (toll-like receptors) play a role in the immune reaction against toxoplasma, and several PAMP (pathogen-associated molecular patterns) proteins have been associated with the activation of these receptors. However, no studies are correlating TLRs in the pathogenesis of ocular toxoplasmosis and the mechanisms involved in recurrences. **Objective:** To evaluate the pattern of the systemic immune response in patients with recurrence and cicatricial toxoplasmosis through gene expression of TRL receptors and pro and anti-inflammatory cytokines. **Methods:** Forty-four individuals were evaluated, divided into three groups: 14 with recurrent ocular toxoplasmosis (ROT); 16 with cicatricial ocular toxoplasmosis (COT); and 14 without ocular toxoplasmosis (control group - C). The patients in the ROT and COT groups underwent a complete eye evaluation. The quantification of gene expression of TLR2, TLR4 and TLR9 by q-PCR was performed from mononuclear cells in the peripheral blood of the study participants. The production of cytokines IL-6, IL-10 and TNF- α in serum was quantified by ELISA. Results: Ages ranged from 19 to 68 years in the COT group, and 20 to 49 years in the ROT group. In the COT group, 8 (57.1%) were female and in the ROT group, 11 were men (68.7%). As for the TLR, the expression of TLR2 was decreased in the COT and ROT groups in relation to the controls. The ROT group showed decreased expression of TLR4 in relation to the COT and control groups while the expression of TLR9 was increased in the ROT group in relation to the COT group. In the evaluation of cytokines, IL-10 showed a decrease in the ROT group compared to the control. The other cytokines did not change between groups. **Conclusion:** The findings suggest that during the recurrence of ocular toxoplasmosis there is involvement of TLR9 and maintenance of the pro-inflammatory state, evidenced by the decrease in the anti-inflammatory cytokine IL-10.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; ocular toxoplasmosis; chorioretinitis; Toll-Like receivers.

Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Estrutura dos receptores <i>Toll-Like</i> .	26
Figura 2	Desenho esquemático da interação APC linfócitos CD4.	28
Figura 3	Níveis de expressão gênica de receptores TLR2 (A), TLR4 (B) e TLR9 (C) em PBMCs de pacientes com toxoplasmose ocular cicatricial (TOC), recidivada (TOR) e indivíduos controles (C).	46
Figura 4	Dosagem das citocinas TNF- α (A), IL-10 (B) e IL-6 (C) por ELISA de pacientes com toxoplasmose ocular cicatricial (TOC), recidivada (TOR) e indivíduos controles.	47

Lista de Tabelas

Tabela 1. Primers utilizados na quantificação da expressão gênica.	41
Tabela 2. Características da acuidade visual, pressão intraocular e número de lesões nos grupos TOR e TOC	44
Tabela 3. Número de lesões cicatríciais e ativas nos grupos TOR e TOC	44
Tabela 4. Localizações das lesões nos grupos TOR e TOC	45
Tabela 5. Características da RCA, <i>flare</i> , PKs e vitreíte no grupo TOR	45

Lista de Abreviaturas e *Símbolos*

Lista de Abreviaturas e Símbolos

TOA	Toxoplasmose ocular ativa
AV	Acuidade visual
C	Controle
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
Fas-L	Ligante de Fas
Flare	Reação de Tyndall em câmara anterior
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HCFMB	Hospital das clínicas da faculdade de medicina de Botucatu
HSP70	Proteína do choque térmico
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IKK	Inibidores Kinase K
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon <i>gama</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
LRR	<i>Repetições ricas em leucina</i>
NK	<i>Natural killer</i>
MHC	Complexo principal de Histocompatibilidade
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MyD88	Fator de diferenciação mielóide
OD	Olho direito
OE	Olho esquerdo
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PEF	<i>Penetration enhancing factor</i>
Perc.	Percentuais
PIO	Pressão intraocular
PKs	Precipitados ceráticos
POT	Toxoplasmose ocular presumida

RCA	Reação de câmara anterior
RNA	Ácido ribonucleico
ROR γ	<i>Related orphan receptor gama</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
TGF- β	Fator de transformação do crescimento <i>beta</i>
TIR	Receptor 1 de Interleucina (<i>Toll/IL-1R</i>)
TIRAP	Proteína adaptadora do domínio receptor de interleucina-1 do Toll
TLR	<i>Toll-like receptor</i> / Receptores <i>toll-like</i>
<i>T.gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Th	(Linfócitos) T <i>helper</i>
TO	Toxoplasmose ocular
TOC	Toxoplasmose ocular cicatricial
TOR	Toxoplasmose ocular reativada
Treg	(Linfócitos) T regulatórias
TNF- α	Fator de necrose tumoral <i>alpha</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VEGF	<i>Vascular endothelial growth fator</i>
VDRL	<i>Veneral disease reserch laboratorial</i>

Sumário

Sumário

Dedicatória	6
Agradecimentos	8
Resumo	10
Abstract	12
ListadeFiguras.....	14
ListadeTabelas	16
ListadeAbreviaturas e Símbolos	18
1. Introdução	23
2. Objetivos	33
3. Material e Métodos.....	35
4. Resultados	43
5. Discussão	49
6. Conclusões	55
7. Referências Bibliográficas.....	57
8. Apêndice.....	67

Introdução

1. Introdução

1.1. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição universal causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), um parasita intracelular obrigatório, que tem como principal hospedeiro definitivo o gato, e o homem como um dos hospedeiros intermediários (1). O *T. gondii* pertence ao filo *Apicomplexa*, e é capaz de infectar praticamente todo tipo de célula nucleada, o que lhe confere alta prevalência sorológica (2).

Cerca de um terço da população mundial é infectada pelo toxoplasma de forma assintomática. No Brasil, a prevalência da infecção na população adulta varia de 50 a 83%, podendo a doença se apresentar sob a forma aguda ou crônica, de acordo com a cepa do parasita e com a imunidade do hospedeiro (3,4).

A infecção humana ocorre principalmente pela ingestão de oocistos do *T. gondii* presentes no solo, em alimentos ou água contaminados por fezes de gato e por cistos teciduais presentes em carne crua ou malcozida (1). A transmissão vertical é menos frequente, mas potencialmente grave, podendo causar óbito em 12% dos casos e sequelas no sistema nervoso central e na retina em até 90% das crianças acometidas no início da gestação (5).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção pelo toxoplasma é assintomática na maioria dos casos, com curso benigno e cura espontânea (6). Porém, cerca de 10-20% dos infectados apresentam algum tipo de sintomatologia, sendo a mais comum, a linfadenopatia isolada com febre de curta duração (7). Já nos indivíduos imunocomprometidos, como os submetidos à transplantes de órgãos, portadores de doenças linfoproliferativas ou síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a toxoplasmose costuma ser a mais prevalente das infecções oportunistas do sistema nervoso central, com alta taxa de mortalidade (8).

1.2. Toxoplasmose Ocular

A toxoplasmose ocular é uma das causas mais frequentes de uveíte posterior no mundo, e pode levar à deficiência visual grave e cegueira irreversível, especialmente em crianças e adultos jovens (9,10). No Brasil a prevalência varia conforme a região do país, sendo maior na região Sul, onde alguns hábitos alimentares, como a ingestão de embutidos crus e carne malpassada, contribuem para torná-la endêmica para a doença (2).

O *T. gondii* atinge o olho pelo sangue, sob a forma de taquizoítos livres ou dentro de macrófagos circulantes (11). Na retina, sua presença provoca resposta imune celular e humoral, com consequente formação de cistos (12). A ruptura destes cistos dormentes libera parasitas viáveis que desencadeiam processo inflamatório e necrose granulomatosa focal da retina e da coróide (retinocoroidite) (13).

A toxoplasmose ocular pode ser de origem congênita ou adquirida. A congênita pode ser neonatal (20%), quando a infecção ocorre durante os primeiros meses de gestação e a retinocoroidite cicatricial está presente ao nascimento, e tardia (80%), quando a infecção ocorre no segundo ou terceiro trimestres e a doença ocular não ocorre ao nascimento, mas se manifesta na primeira década de vida, como resultado de infecção aguda ou reativação. A forma ocular adquirida é a mais frequente e pode ser concomitante com o quadro sistêmico da toxoplasmose ou se manifestar algum tempo depois (14).

A toxoplasmose ocular é uma doença recidivante. Cerca de dois terços dos pacientes apresentam recorrência que pode localizar-se nas margens da lesão primária (lesão satélite), em outro local da retina ou no olho contralateral (15). As causas das recidivas ainda são pouco conhecidas, havendo várias teorias na literatura: a persistência e ruptura de cistos de retinianos, a reação de hipersensibilidade ao antígeno toxoplásmico, a autoimunidade contra antígenos retinianos, a liberação do PEF (*penetration enhancing fator*) pelo parasita, e a reinfecção pelo toxoplasma (16,17).

Outros fatores envolvidos nas recidivas estariam relacionados à baixa de resistência mediada por linfócitos, traumas, estresse e gestação. Além disso, sabe-se que a resposta inflamatória no humor vítreo e na câmara anterior não está relacionada à presença de parasitas viáveis, o que reforça o papel da autoimunidade na patogênese da doença (18).

1.3. Resposta Imune e Receptores Toll-like

A resposta imune a um microrganismo pode ser inata ou adquirida. A inata é responsável pela proteção inicial contra as infecções, bloqueando a entrada de microrganismos e eliminando rapidamente os que conseguem invadir os tecidos do hospedeiro. As células que representam a imunidade inata são os macrófagos, as células denominadas *natural killer* (NK) e os polimorfonucleares. A imunidade adquirida se desenvolve mais lentamente e proporciona uma defesa especializada e mais eficaz contra as infecções, pois requer a expansão e a diferenciação de linfócitos

em resposta aos microrganismos (19).

A imunidade inata é então, a primeira linha de defesa do organismo após a invasão de um patógeno ou injúria tecidual. A resposta do organismo começa pelo reconhecimento do agente agressor por uma ampla variedade de receptores presentes na superfície celular ou no citosol, e consequente ativação de resposta imune protetora (20).

Dentre esses receptores, se destacam os *Toll-like* ou TLRs (21,22), uma família de proteínas transmembranas evolutivamente conservadas em insetos e humanos que desempenham papel importante na detecção e reconhecimento de patógenos microbianos, bem como na geração de sinais para a produção de proteínas e citocinas pró inflamatórias (22-26). Esses sensores estão presentes em células imunes (macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos) e não imunes (células epiteliais, endoteliais, cardiomiócitos, adipócitos) (27-29), sendo aptos a reconhecer certos constituintes microbianos: os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP), e os padrões moleculares associados ao dano (DAMP) (30).

Uma vez sensibilizados por esses padrões, os TLRs enviam uma sinalização para o núcleo celular, induzindo a síntese de mediadores pró-inflamatórios e consequente eliminação do agente agressor e resolução do dano tecidual (31).

Atualmente, são identificados 12 membros da família *Toll-like* em mamíferos, contudo somente 10 são funcionais em humanos (32, 33). Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 estão localizados na membrana plasmática e os TLRs 3, 7, 8 e 9 são expressos no interior das células, especialmente no retículo endoplasmático e nas membranas endossômicas (21).

Estruturalmente os receptores *Toll-like* apresentam um domínio extracelular com repetições ricas em leucina, o LRR (responsável pelo reconhecimento), e um domínio intracelular, o TIR (Toll/IL-1R) (34), que se assemelha ao receptor da IL-1 (Figura 1).

O domínio TIR com as moléculas adaptadoras, MyD88 (fator de diferenciação mielóide) e TIRAP (proteína adaptadora do domínio receptor de interleucina-1 do *Toll*) (23), podem ser encontrados nas caudas citoplasmáticas de receptores de IL-1 e IL-18, o que confere a estes receptores vias similares de sinalização aos TLRs, resultando na ativação de fatores transcricionais NF- κ B e AP-1, e na síntese de mediadores inflamatórios (36-37).

Os PAMPs são moléculas produzidas e conservadas pelos microrganismos e não por células do hospedeiro, sendo essenciais para o seu metabolismo e sobrevivência (38). Os TLRs reconhecem um repertório distinto de PAMPs, entre eles:

glicolípídeos, lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas, lipopeptídeos e peptídeoglicanos e outros componentes da parede celular microbiana (34). Como exemplo de pares receptores-ligantes bem caracterizados, temos: TLR4 e LPS, TLR5 e flagelina, TLR 1, 2 e 6 e lipoproteínas e TLR 3, 7, 8 e 9 e diferentes ácidos nucleicos (39).

Após o reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs, a proteína MyD88 é recrutada ao domínio TIR, iniciando uma cascata enzimática que culminará com a dissociação dos inibidores 1 e 2 da Kinase (IKK) e translocação do NF- κ B para o núcleo, resultando na transcrição de citocinas, quimiocinas, reativos do oxigênio e nitrogênio, e aumento da fagocitose (40-41).

Além da imunidade inata, a estimulação dos TLRs pelos PAMPs também induz a imunidade adaptativa, com ativação de células dendríticas, aumento da expressão de MHC (complexo principal da histocompatibilidade) em APCs (células apresentadoras de antígenos). Este processo torna mais eficiente a apresentação de antígenos aos linfócitos T e B e aumenta a produção de citocinas como o TNF- α , IL-5, IL-6, IL-8 e IL-12, quimiocinas e óxido nítrico (NO) (32).

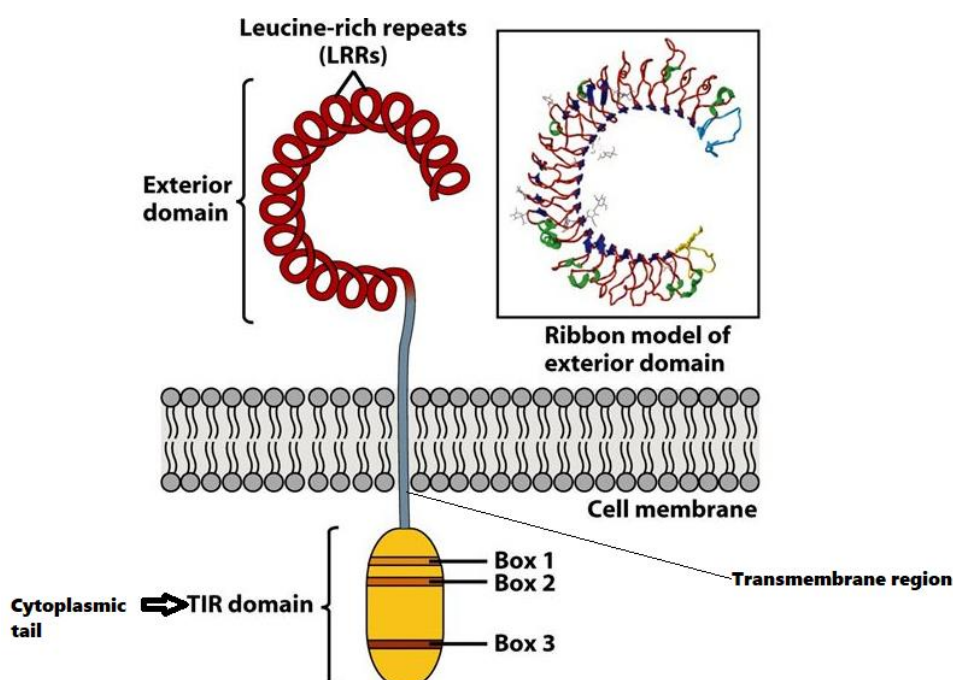


Figura 1. Estrutura dos receptores Toll-Like. Fonte: Kindt et al., 2007 (35).

1.4 Resposta Imune na Toxoplasmose

O *T. gondii* induz uma resposta imune consistente e duradoura, buscando o controle da proliferação dos taquizoítos. Os principais PAMPs expressos pelo *T. gondii* e reconhecidos pelos TLRs, são moléculas ligadas a âncoras proteicas de GPI (glicosilfosfatidilinositol), expressas também por outros protozoários como o *Trypanosoma cruzi*, a *Leishmania* spp e o *Plasmodium* spp (24,40,42). Takeda & Akira reportaram que o *T. gondii* expressa ligantes de TLR2 e TLR4, que estimulam a produção de citocinas por macrófagos (26). Com resultados semelhantes, Gazzinelli *et al.* (40) verificaram em ratos, que GPIs de *T. gondii* induziram a ativação de NF- κ B e produção de TNF- α por macrófagos, possivelmente por meio de TLR2 e TLR4.

Outros PAMPs de *T. gondii* são as profilinas e a HSP70 (proteína do choque térmico). Esta última parece estar relacionada com a ativação do TLR4 (44). As profilinas, que são uma classe de proteínas ligantes de actina altamente conservadas nos parasitas do filo Apicomplexa, são responsáveis por ativar o TLR11 (32,43,44). O TLR11 é o mais divergente de todos os membros da família TLR, e está presente nos vertebrados, entretanto em humanos, é representado por um pseudogene, que codifica uma forma não funcional de TLR11 (32,47).

Recentemente foi observada uma associação entre complexos proteicos liberados por organelas secretoras do *T. gondii*, os micronemas (MIC), e a ativação resposta imune via TLR2. Esta seria uma outra PAMP que induziria a liberação de IL-12 (48). Outras pesquisas sobre o papel dos TLRs na toxoplasmose têm demonstrado a associação deles com o processo de neurodesenvolvimento, neuroplasticidade, aprendizagem e memória. Estudo experimental em ratos verificou a associação de lesões cognitivas com a infecção por toxoplasmose e o principal receptor ligado à proteção neuronal foi o TLR2 (49).

A infecção pelo *T. gondii* também induz imunidade não específica, independente de célula T, com ativação de células do sistema imune inato, como macrófagos e células NK. Essa ativação em estágios precoces da infecção, aumenta a atividade fagocítica de macrófagos, que limitam a replicação dos taquizoítos e produzem citocinas inflamatórias, recrutando outras células efetoras da imunidade (46-50).

O início da resposta inata e o reconhecimento do antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APC), iniciam a cascata da resposta adaptativa. Estas APCs, por meio de sinalização de membrana induzem a diferenciação dos linfócitos

T CD4 virgens em padrões específicos. A diferenciação ocorre tanto pelas citocinas envolvidas como pelos receptores de membrana expressos (19). A defesa imunológica aos patógenos pode variar conforme a diferenciação das células T CD4 em suas subpopulações: Th1, Th2, Th17 e Treg (Figura 2). Cada subpopulação desencadeia a produção de citocinas específicas e está relacionado a maior capacidade de defesa ou dano dos patógenos ao indivíduo (19).

As características que definem os tipos diferenciais de células efetoras são as citocinas que eles produzem, os fatores de transcrição que eles expressam, e as alterações epigenéticas no loci do gene da citocina. Em relação as citocinas características de cada população temos: TNF- α e IFN- γ nas células Th1; IL-4, IL-5 e IL-13 nas células Th2; IL-17 e IL-22 para Th17; TGF- β 1, IL-10 para Treg (41).

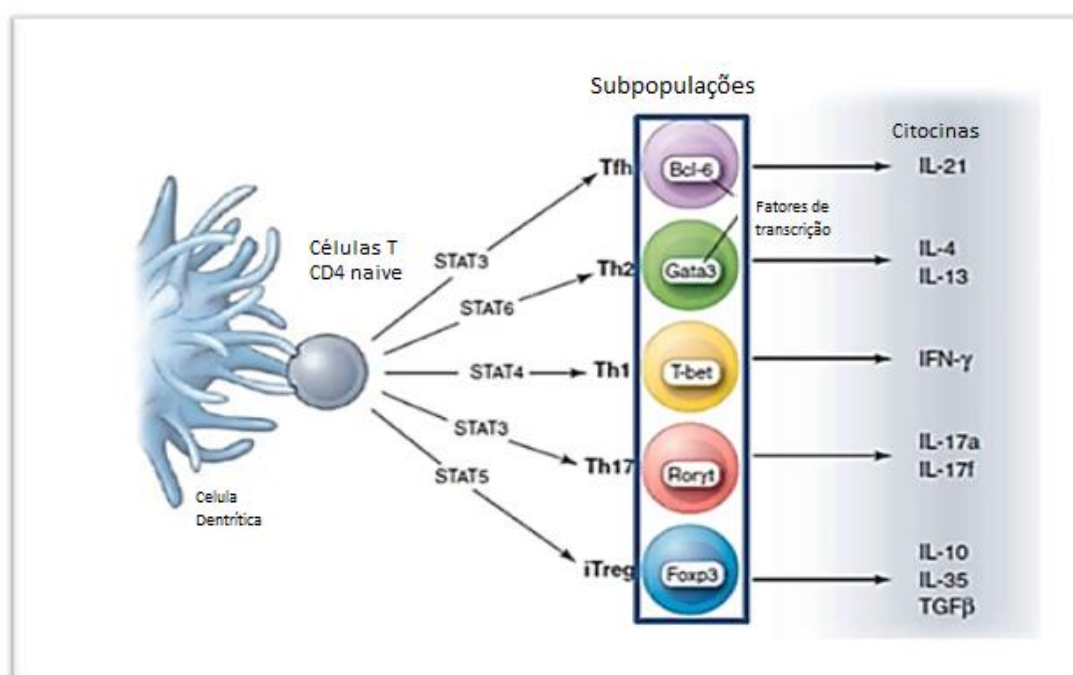


Figura 2. Desenho esquemático da interação APC linfócitos CD4. Fonte: O'Shea & Paul., 2010 (51).

Após a infecção pelo *T. gondii*, macrófagos e células dendríticas produzem IL-12, que ativa células NK a produzirem IFN- γ . Embora a produção de IFN- γ seja dependente da IL-12, outras citocinas, tais como TNF- α , IL-1 e IL-15, potencializam o efeito da IL-12 sobre as células NK. O IFN- γ aumenta as propriedades fagocíticas dos macrófagos, aumenta a síntese das iNOS (sínteses de óxido nítrico) e de outros componentes antimicrobianos, e juntamente com a IL-12, ativa linfócitos TCD4+ e TCD8+, induzindo a diferenciação das células T em perfil Th1. Células desse perfil produzem IFN- γ e outras citocinas como TNF- α , IL-6, importantes para o controle da

infecção (46, 47, 52-58).

A ativação da resposta imune e o controle da infecção pelo *T. gondii* durante a fase aguda da doença resulta no aumento da resposta inflamatória. No entanto, é necessário um balanço entre a produção de citocinas pró-inflamatórias, que controlam o crescimento do parasita, e a produção concomitante de citocinas anti-inflamatórias, para que o excesso de inflamação não seja prejudicial aos tecidos do hospedeiro (59-60).

Assim, macrófagos, ao mesmo tempo em que induzem citocinas do perfil Th1, também podem regular a inflamação por meio da IL-10 e TGF- β (61). Essas citocinas exercem ações supressoras e inibem a síntese de IL-12 e IFN- γ , limitando as funções efectoras contra o *T. gondii* e as proporções da infecção, a fim de evitar alterações imunopatológicas graves (62-64).

A IL-12 é importante para o início de uma forte e efetiva imunidade mediada por células contra os taquizoítas de *T. gondii*, enquanto que a IL-10 parece modular a síntese de IL-12 e IFN- γ “in vivo”, evitando resposta imune excessiva que poderia desencadear um intenso processo inflamatório. Portanto, IL-10 e IL-12 são antagonistas envolvidas na regulação da síntese de IFN- γ durante a fase inicial da infecção. A principal via pela qual a IL-10 inibe a síntese do IFN- γ pelas células NK e Th1 é a da inibição de IL-12 por macrófagos (61,64).

A explicação sobre a resistência e a suscetibilidade a infecções parasitárias é baseada na dicotomia Th1 e Th2. A falta de padrão Th1 pode induzir déficit no controle do patógeno, por meio da ação IFN- γ , IL-6 e MIP-1. Por outro lado, o excesso de padrão anti-inflamatório Th2 está associado à maior número de lesões e recorrências, em especial por causa de IL-5 e do VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (65).

No entanto, outros subtipos de linfócitos T como as células regulatórias Treg e as Th17 também desempenham papel crucial durante a infecção pelo *T. gondii*. As células Tregs auxiliam na regulação das respostas inata e adaptativa e possuem a capacidade de controlar a resposta imune excessiva contra antígenos próprios, tumorais, exógenos e agentes infecciosos. Desta forma elas limitam o dano tecidual, porém também podem impedir que a infecção seja eliminada, por suprimir respostas imunes cruciais (36).

Os linfócitos Th 17, surgem da transformação das células CD4 +, cultivadas na presença de TGF- β , IL-6, IL-1 B, IL-23 e IL-21, que passam a expressar o fator de transcrição ROR γ t (*related orphan receptor gamma*), e desempenham um papel atribuído inicialmente a uma hiper-ativação de células Th1 (66). Eles atuam na

resistência contra várias infecções bacterianas e parasitárias, produzindo preferencialmente IL-17 e promovendo um processo inflamatório intenso mediado por neutrófilos (67).

Evidências científicas têm apontado as células Th17 como componentes críticos da resposta imune contra o *T. gondii*. Camundongos deficientes da citocina IL-6, fundamental para a produção de células Th17, apresentam maior susceptibilidade a toxoplasmose, pela produção reduzida de IL-17 (68). Dutra *et al.*, encontraram níveis mais elevados de IL-17A, produzidas por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com toxoplasmose ocular presumida e toxoplasmose ocular ativa. Além disso, foi observada maior frequência de linfócitos Th17 com antígenos específicos do parasita em pacientes com retinocoroidite, o que sugere que as células Th-17 e a IL-17A contribuem para o processo inflamatório no desenvolvimento da toxoplasmose ocular (12).

1.5 Resposta Imune na toxoplasmose ocular

Em 1908, Nicolle & Manceaux, corresponsáveis junto com Splendore, pela descrição de um novo organismo em forma de arco, denominado *Toxoplasma gondii*, definiram a toxoplasmose como sendo “infecção, algumas vezes doença!” Até os dias atuais, esta continua a ser uma das principais questões sobre a doença (69).

Assim, o motivo pelo qual alguns indivíduos são expostos ao parasita de forma crônica e não são infectados, e outros, com o mesmo estímulo, acabam desenvolvendo a doença, permanece uma incógnita. Da mesma forma, a carência de informações sobre os mecanismos pelos quais somente alguns pacientes com retinocoroidite desenvolvem as recidivas permanece como uma das principais questões no estudo da toxoplasmose ocular (70).

Embora a retina seja considerada o sítio primário de infecção pelo *T. gondii*, o olho é um ambiente imunologicamente privilegiado, onde inúmeros fatores contribuem para tal, incluindo barreiras anatômicas (71). A resposta imune intraocular é suprimida, o que diminui chance de destruição tecidual (72). Em circunstâncias normais, células presentes em várias partes do olho como córnea, íris, corpo ciliar e retina, bem como células T e macrófagos, expressam ligante de Fas (Fas-L), uma proteína transmembrana do tipo II que pertence à família de fatores de necrose tumoral, que induz a deleção de células T e células NK no olho, por apoptose. Além disso, o humor aquoso e o vítreo contêm citocinas e outros mediadores que têm propriedades imunossupressoras (72).

O *T. gondii* no hospedeiro humano comporta-se como agente dotado de alta infectividade e baixa patogenicidade. A resposta para a intensidade da uveíte e surgimento das recidivas então pode estar relacionada ao tipo de imunidade gerada pela interação parasita/hospedeiro, às diferentes cepas existentes, fatores genéticos e ambientais.

Meenken *et al.*, correlacionaram o HLA-Bw62 com a gravidade da toxoplasmose ocular congênita. Rodrigues *et al.*, relacionaram o HLA-B35 à suscetibilidade à retinocoroidite por *T. gondii* em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida. Jorge *et al.*, demonstraram que pacientes com determinados fenótipos do sistema sanguíneo Duffy apresentam risco aumentado de desenvolvimento de toxoplasmose ocular (67,68,73).

Estudo experimental em ratos mostrou que durante a infecção ocular aguda pelo *T.gondii*, uma resposta pró-inflamatória leve mediada pelo perfil Th1, com aumento de IFN- γ e TNF- α e diminuição de TGF- β 1, no sangue e humor aquoso, está associada ao controle da uveíte e menor grau de lesão retiniana. De forma oposta, um padrão baseado em TGF- β 1 pode levar a maior dano tecidual (74).

Para o controle da infecção por *T. gondii* vários componentes da resposta imune inata e adquirida são induzidos simultaneamente por mecanismos ainda não completamente entendidos. Embora existam muitos trabalhos avaliando imunidade inata e infecção por *T. gondii*, pouco é relatado sobre o envolvimento dos TLR2, TLR4 e TLR9 na toxoplasmose ocular e a relação deles com a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (75-78).

O envolvimento dos TLR 2 e 4 tem sido bem descrito, porém somente em estudos experimentais. Em relação ao TLR9, há poucas informações na literatura. Somente um estudo brasileiro realizou análise gênica de famílias com toxoplasmose ocular sem atividade inflamatória (cicatricial) sugerindo que o TLR9 pode se relacionar à defesa contra o *T.gondii*, no entanto, os autores concluem que novos estudos são necessários para confirmar os achados (78).

Justificativa

Em função da carência de informações sobre o envolvimento dos TLRs na toxoplasmose ocular em humanos e na hipótese de que estes receptores estejam envolvidos diretamente na resposta imune e recidivas da doença, esperamos que a avaliação da expressão gênica dos receptores TLR2, 4 e 9 e da produção das citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes com retinocoroidite auxiliará na compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença.

Objetivos

2. Objetivos

Objetivo geral

Avaliar o padrão de resposta imunológica sistêmica em pacientes com Toxoplasmose ocular recidivada e cicatricial.

Objetivos Específicos

Avaliar as características socio-epidemiológicas e clínicas dos pacientes com toxoplasmose ocular recidivada e cicatricial.

Avaliar a expressão gênica dos *receptores TLR2, TLR4 e TLR9* em pacientes com toxoplasmose ocular recidivada, cicatricial.

Avaliar a produção das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α em pacientes com toxoplasmose ocular recidivada, cicatricial.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Tipo de Estudo

Estudo Transversal.

3.2. Local do Estudo

O estudo foi conduzido no Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

3.3. Análise Ética

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob o número 531.949.

3.4. Casuística

Participaram do estudo 44 indivíduos, sendo 16 com diagnóstico de toxoplasmose ocular reativada, 14 com diagnóstico de toxoplasmose ocular cicatricial e 14 indivíduos sem a doença. Os 30 indivíduos com toxoplasmose ocular reativada e cicatricial foram atendidos no Ambulatório de Uveítes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) - UNESP.

Dos 30 pacientes com toxoplasmose ocular avaliados, um foi retirado da análise, por se encaixar em um dos critérios de exclusão do estudo, permanecendo, 39 pacientes. Os 14 indivíduos sem toxoplasmose ocular eram doadores do Banco de Sangue do HCFMB.

Todos os participantes do estudo foram esclarecidos previamente sobre os propósitos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.4.1. Critérios de inclusão

Quando com toxoplasmose ocular recidivada:

- Presença de uma ou mais lesões de retinocoroidite, compatíveis clinicamente com toxoplasmose ocular sendo uma ou mais com sinais de atividade inflamatória e pelo menos uma com aspecto cicatricial;
- Testes sorológicos positivos para imunoglobulina G (IgG) e ou imunoglobulina M (IgM) anti-toxoplasma;
- Teste cardiolipínico do VDRL (*veneral disease research laboratorial*) negativo para Sífilis e;

- Teste tuberculínico pela técnica de *Mantoux* não reator ou reator fraco (até 9 mm).

Quando com toxoplasmose ocular cicatricial:

- Presença de uma ou mais lesões de retinocoroidite sem atividade inflamatória e com aspecto cicatricial;
- Testes sorológicos positivos para imunoglobulina G (IgG) e ou imunoglobulina M (IgM) anti-toxoplasma;
- Teste cardiolipínico do VDRL (*veneral disease research laboratorial*) negativo para Sífilis e;
- Teste tuberculínico pela técnica de *Mantoux* não reator ou reator fraco (até 9 mm).

Quando sem toxoplasmose ocular:

- exame biomicroscópico e fundoscópico compatível com a normalidade;
- antecedentes negativos para doenças oculares e;
- testes sorológicos negativos para imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) anti-toxoplasma;

3.4.2. Critérios de exclusão

Foram utilizados como critérios de exclusão do estudo: gravidez, doenças infecciosas prévias (um ano) ou atuais.

3.5. Grupos de Estudo

3.5.1. Grupo com Toxoplasmose Ocular Recidivada (TOR): Composto por 15 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial presuntivo de toxoplasmose ocular recidivada.

3.5.2. Grupo com Toxoplasmose Ocular cicatricial (TOC): Composto por 14 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial presuntivo de toxoplasmose ocular cicatricial.

3.5.3. Grupo Controle (GC): Composto por 14 indivíduos, sem toxoplasmose ocular.

3.6. Caracterização Geral da Amostra

3.6.1. Avaliação clínica oftalmológica

A avaliação clínica oftalmológica, realizada em todos os pacientes dos grupos TOR e TOC compreendeu:

- Anamnese completa;
- Acuidade visual inicial (TOR e TOC) e ao final do tratamento (TOR);

- Biomicroscopia;
- Tonometria de aplanção;
- Oftalmoscopia binocular indireta

A avaliação clínica oftalmológica dos indivíduos do grupo C compreendeu:

- Anamnese completa;
- Biomicroscopia;
- Oftalmoscopia binocular indireta.

Os 15 pacientes do grupo TOR receberam tratamento conforme padronização do ambulatório de Uveítes do HCFMB – UNESP.

3.6.2. Avaliação laboratorial

A avaliação laboratorial realizada em todos os pacientes dos Grupos TOR e TOC seguiu padronização do Laboratório de Análises Clínicas do HCFMB – UNESP para as sorologias, e da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo para o teste tuberculínico, sendo feita por meio dos seguintes testes:

- a) teste ELISA captura de IgM para pesquisa de anticorpos anti-toxoplasma IgM e imunoenzimático de micropartículas MEIA (*microparticle enzyme immunoassay*) para IgG;
- b) Teste caridolipínico do VDRL para pesquisa de sífilis;
- c) Teste tuberculínico pela técnica de *Mantoux* com tuberculina purificada PPD (*purified protein derivative*) para pesquisa de tuberculose.

3.5. Técnicas utilizadas: Exame Oftalmológico

3.5.1. Acuidade Visual

A verificação da acuidade visual, realizada em todos os pacientes dos grupos TOR e TOC foi feita com melhor correção óptica, quando utilizada pelo paciente, utilizando tabela de optotipos de Snellen (American Optical, San Diego, EUA), padronizada para 5 metros de distância com valores expressos em frações convertidos à escala decimal. Quando a acuidade foi menor que 0,1 a sequência habitual da propedêutica (conta dedos, movimentos de mão e percepção luminosa) foi realizada. Para análise estatística foi convertido as acuidades para tabela de Logmar.

3.5.2. Biomicroscopia

O exame foi realizado utilizando lâmpada de fenda Topcon (Topcon Medical Systems, Oakland, EUA), avaliando conjuntiva, córnea, câmara anterior, cristalino, vítreo e retina. Foi quantificada a presença de reação de câmara anterior (RCA) de 0 a 4 cruces, conforme critérios de Nussemblatt *et al.* (74), assim como a presença de flare (0 a 4 cruces), pelos critérios de Hogan *et al.* (75), e vitreíte (0 a 4 cruces) pelo critério de Kimura *et al.* (76).

3.5.3. Tonometria

A medida da pressão intraocular foi realizada com o paciente sentado, após anestesia tópica com 1 gota de colírio preparado com 5 mg de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Anestalcon®, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e 15 gotas de colírio de fluoresceína sódica (Fluoresceína®, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil), utilizando tonômetro de aplanção tipo Goldmann, modelo R-900, (Haag-Streit AG., Berna, Suíça), acoplado à lâmpada de fenda.

3.5.4. Fundoscopia

O exame fundoscópico foi realizado com oftalmoscópio binocular indireto, modelo H-OI (Neitz Instruments Co.Ltd., Tóquio, Japão) e lente de 20 dioptrias (Nikon Corporation, Tóquio, Japão), com o paciente em decúbito dorsal e pupila dilatada. Foram avaliados o disco óptico, vasos retinianos, retina, mácula e coroide. As lesões de retinocoroidite foram classificadas quanto a (ao):

- Atividade da lesão: ativa ou cicatricial, segundo o aspecto apresentado no exame. Para ser considerada cicatricial a lesão não poderia apresentar nenhum fenômeno inflamatório.
- Tipo: única, satélite ou múltipla (duas ou mais lesões no mesmo olho). A lesões satélites deveriam apresentar continuidade com a lesão primária.
- Localização: Segundo critério de Holland *et al.* (77): Zona I (central), Zona II (equador) e Zona III (periférica).

3.5.5. Dilatação pupilar

Para a realização de biomicroscopia do cristalino, vítreo e retina, bem como para o exame fundoscópico os indivíduos foram submetidos à dilatação pupilar com três instilações, espaçadas de cinco minutos, de uma gota de colírio de tropicamida a 1% (Mydracyl® 1%, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil).

3.6. Técnicas utilizadas: Análise Imunológica

3.6.1. Coleta de sangue

Cerca de 10 ml de sangue foram obtidos por punção venosa no antebraço, em um único momento, de todos os indivíduos dos grupos TOR, TOC e C. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 1500 RPM e o plasma separado e congelado a 80°C, para posterior dosagem de citocinas.

3.6.2. Obtenção de células mononucleares totais do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll – Histopaque (Sigma Chemical Co. USA). O anel rico em linfócitos e monócitos foi lavado, inicialmente, com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) por 15 minutos a 1500 rpm. Após esse período, as células foram ressuspensas em PBS, sendo a identificação e viabilidade delas feita por meio de contagem com Turk e azul de Tripán, respectivamente. A seguir, a suspensão de células totais foi acertada para 10⁷ células/mL.

3.6.3. Análise da expressão gênica por q-PCR

- Extração de RNA

Células mononucleares do sangue periférico, obtidas segundo o item anterior, foram utilizadas para extração do RNA total. As células foram colocadas em microtubos contendo Trizol (Invitrogen, Carlsband, CA, EUA) e clorofórmio e homogeneizadas em agitador por 15 segundos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000g à 4°C e a fase translúcida contendo RNA foi transferida para um novo tubo contendo álcool isopropílico. Após agitação e incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000g à 4°C para a formação do pellet no fundo do tubo. Todo o líquido foi desprezado sendo, então,

adicionado etanol 75%. A solução foi homogeneizada em agitador, até a liberação do pellet da parede do tubo e, em seguida, centrifugada por 5 minutos, a 7500g à 4°C. As amostras foram suspensas em água ultrapura e mantidas em freezer -80°C até o momento de uso.

As concentrações e a integridade do RNA das amostras foram determinadas a partir dos valores de absorbância, dados pelo aparelho Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc.). A razão A260/280 de todas as amostras estavam entre 1,8 e 2,0, o que demonstra a pureza do ácido nucleico.

- Síntese do cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1µg de RNA total utilizando Improm II Reverse Transcriptase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada tubo contendo RNA foi adicionado primers randômicos e água ultrapura, obtendo volume total de 5 uL. Em seguida foi adicionado nos tubos um mix contendo RNase out (Invitrogen), reaction buffer, MgCl₂, dNTPmix, enzima transcriptase reversa e água ultrapura. Posteriormente, os microtubos foram incubados no termociclador nas seguintes condições da reação, 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70° por 15 minutos. O cDNA produzido após esse período de incubação foi armazenado em freezer a -20°C.

- Quantificação da expressão gênica

A partir da obtenção do cDNA, foi efetuada a amplificação dos genes *TLR2*, *TLR4* e *TLR9* pelo método da quantificação relativa de acordo com o protocolo da Applied Biosystems Power Sybr® Green, StepOne Plus™ Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O volume total da reação foi de 10 µl composto por amostras, Sybr Green, primers e água ultrapura. As condições da reação foram; 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de anelamento a 95°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto, sendo os sinais de fluorescência adquiridos nos passos de anelamento e extensão do ciclo de amplificação (60°C por 1 minuto).

Para análise de especificidade de cada gene, foi adicionado o passo da curva de dissociação. A tabela 1 mostra a sequência dos primers utilizados. Os níveis da expressão de mRNA foram normalizados com β-actina. Em todos os ensaios, as amostras foram processadas em duplicata e a concentração de cada amostra testada foi fornecida diretamente pelo programa “*Sequence Detection Systems*” *Step One*

Plus (Applied Biosystems). A quantidade relativa da expressão dos genes *TLR2*, *TLR4* e *TLR9* para todos os grupos foram comparadas depois da normalização com os valores da β -actina (Δ CT). Os *fold-change* da expressão gênica foram calculados usando as diferenças nos valores de Δ CT entre as duas amostras ($\Delta\Delta$ CT) e a equação $2^{-\Delta\Delta$ CT.

Tabela 1. Primers utilizados na quantificação da expressão gênica.

Gene	Sequência reverse	Sequência forward
<i>TLR2</i>	5' GGTCTTGGTGTTTCATTATCTTC 3'	5' TCTCCCATTTCCTGCTTTTTT 3'
<i>TLR4</i>	5' TCTGCTGCAACTCATTTTCAT 3'	5' CCGCTTCCTGGTCTTATCAT 3'
<i>TLR9</i>	5' ACAGTTGCCGTCCATGAATA 3'	5' CCAAATCCCTCATATCCCTG 3'
<i>β-actina</i>	5' AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA 3'	5' CTGGAACGGTGAAGGTGACA 3'

3.6.4. Dosagem de citocinas plasmáticas por ELISA

As citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α serão avaliadas no plasma utilizando kits comerciais de ELISA e seguindo as instruções do fabricante.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graphpad Prims 5.01. Na avaliação das características demográficas, as diferenças significativas entre os diversos grupos foram determinadas pelo teste de Análise de Variância para amostras dependentes, e as médias comparadas pelo teste de Correlações Múltiplas de Tukey-Kramer Para a análise dos TLR foi usado distribuição gama e para a análise das citocinas foi utilizado anova seguido de teste de Dunn. Em todas as análises foi assumindo como verdadeira cada hipótese em que a probabilidade de erro for menor que 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4. Resultados

Características Demográficas

A média de idade dos pacientes com toxoplasmose ocular do grupo TOC, TOR foi de 43 (± 18) e 32 (± 8) anos. Em relação ao sexo, o grupo TOC foi composto em sua maioria por mulheres (57,14%) enquanto o grupo TOR teve maior prevalência do sexo masculino (68,75%). Quanto à cor da pele, a porcentagem de indivíduos caucasianos foi de 85,71% e 66,67% nos grupos TOC e TOR, respectivamente.

Avaliação Clínica Oftalmológica

Em relação a acuidade visual verificamos que os pacientes do grupo TOC apresentaram média de $0,53 \pm 46$ Logmar em olho direito (OD) e em olho esquerdo (OE) $0,54 \pm 43$ Logmar. Já no grupo TOR as médias foram de $0,61 \pm 0,38$ Logmar em OD e $0,63 \pm 0,44$ Logmar em OE. Quanto a pressão intraocular (PIO), o grupo TOC apresentou médias de $12,58 \text{ mmHg} \pm 1,51$ e $12,58 \text{ mmHg} \pm 2,71$, respectivamente em olhos direito e esquerdo. Já o grupo TOR apresentou médias de $14,27 \text{ mmHg} \pm 5,86$ em OD e de $12,33 \text{ mmHg} \pm 2,09$ em OE.

As lesões retinianas foram avaliadas em número e localização tanto para o grupo TOR, quanto para o grupo TOC. Em relação ao número de lesões cicatriciais, no grupo TOC foram encontradas 1 lesão em 8 (57,1%) pacientes, 2 lesões em 5 (35,7%) dos pacientes e 4 lesões em 1 paciente (7,1%). No grupo TOR, 1 lesão foi observada em 10 (62,5%) dos pacientes. A presença de 2, 3 ou 4 lesões foram encontradas em 2 pacientes em cada caso (12,5% em cada uma das hipóteses).

Quanto às lesões ativas (TOR), 1 lesão foi encontrada em 12 (75%) e 2 lesões em 4 (25%).

Em média, o grupo TOC apresentou $1,57 \pm 0,85$ de lesões cicatriciais, enquanto o grupo TOR, $1,25 \pm 0,44$ de lesões ativas e $1,75 \pm 1,12$ de lesões cicatriciais.

Os dados referentes aos valores de idade, média da AV, PIO e número de lesões ativas e cicatriciais estão representados nas **tabelas 2 e 3**.

Tabela 2. Características da acuidade visual, pressão intraocular e número de lesões nos grupos TOR e TOC.

<i>Variáveis</i>	<i>Grupo TOC (n=14)</i>	<i>Grupo TOR (n=16)</i>	<i>Valor de p</i>
Idade	43,07 ± 18,78	32,5 ± 8,33	<0,05
AV OD	0,53 ± 0,46	0,61 ± 0,38	<0,05
AV OE	0,54 ± 0,43	0,63 ± 0,44	<0,05
PIO OD	12,58 ± 1,51	14,27 ± 5,86	<0,05
PIO OE	12,58 ± 2,71	12,33 ± 2,09	<0,05
Nº de lesões ativas	0,0	1,25 ± 0,45	<0,05
Nº de lesões cicatriciais	1,57 ± 0,85	1,75 ± 1,12	<0,05

AV: acuidade visual em Log-mar; OD: olho direito; OE: olho esquerdo;
PIO: pressão intraocular em mmHg; Idade em anos; TOC: toxoplasmose ocular cicatricial;
TOR: Toxoplasmose ocular recidivada.

Tabela 3. Número de lesões cicatriciais e ativas nos grupos TOR e TOC.

<i>Número de lesões</i>	<i>Lesões cicatriciais grupo TOC</i>	<i>Lesões cicatriciais grupo TOR</i>	<i>Lesões ativas grupo TOR</i>
1 lesão	8 (57,1%)	10 (62,5%)	12 (75%)
2 lesões	5 (35,7%)	2 (12,5%)	4 (25%)
3 lesões	0 (0%)	2 (12,5%)	0 (0%)
4 lesões	1 (7,1%)	2 (12,5%)	0 (0%)

TOC: toxoplasmose ocular cicatricial; TOR: Toxoplasmose ocular recidivada

A localização das lesões foi avaliada dividindo a retina em 3 partes: Zona I (central), Zona II (equador) e Zona III (regiões periféricas).

No grupo TOC, 4 lesões (28,5%) estavam na Zona I, 3 (21,4%) na Zona II

e 7 (50%) na Zona III. No grupo TOR 1 lesão (6,2%) se situava na Zona I, 5 (31,2%) na Zona II e 10 (62,5%) na Zona III. Os dados a localização das lesões são representados na **tabela 4**.

Tabela 4. Localização das lesões nos grupos TOR e TOC.

Localização das lesões	Grupo TOC	Grupo TOR
Zona I	4 (28,5%)	1 (6,2%)
Zona II	3 (21,4%)	5 (31,2%)
Zona III	7 (50%)	10 (62,5%)

TOC: toxoplasmose ocular cicatricial; TOR: Toxoplasmose ocular recidivada

A intensidade da reação inflamatória foi avaliada somente em pacientes do grupo TOR. A reação em câmara anterior (RCA) estava ausente (0+) em 5 pacientes (31,2%), foi moderada (1 a 2+) em 8 pacientes (50%) e intensa (3 a 4+) em 3 (18,8%). O *flare* estava ausente em 5 pacientes (31,2%), foi moderado em 10 (62,5%) e intenso em somente um paciente (6,25%). A presença de precipitados ceráticos (PKs) não foi constatada em 8 pacientes (50%), foi moderada em 7 (43,7%) e intensa em 1 (6,25%) paciente. A vitreíte estava ausente em 3 pacientes (18,8%), foi moderada em 11 (68,8%) e intensa em 2 (12,4%) dos pacientes, conforme **tabela 5**.

Tabela 5. Características da reação inflamatória em câmara anterior (RCA e *flare*), córnea (PKs) e cavidade vítrea (vitreíte) no grupo TOR.

VARIÁVEIS	RCA	FLARE	PKs	VITREÍTE
AUSENTE	5 (31,2%)	5 (31,2%)	8 (50%)	3 (18,7%)
MODERADA	8 (50%)	10 (62,5%)	7 (43,7%)	11 (68,7%)
INTENSA	3 (18,7%)	1 (6,2%)	1 (6,2%)	2 (12,5%)

RCA: reação de câmara anterior; PKs: Precipitados ceráticos; Critério: ausente: 0+; moderado: 1 a 2+ e intenso 3 a 4+.

Em relação à expressão dos receptores TLR (**Figura 3**), nossos resultados mostraram que o grupo TOC e TOR apresentaram diminuição significativa da expressão de mRNA de TLR2 ($p=0,001$ e $p<0,0001$) em relação ao grupo controle. Não foi detectada diferença de expressão deste receptor entre os grupos de pacientes com toxoplasmose (**Fig. 3A**).

Quanto ao TLR4, foi observado que sua expressão foi significativamente diminuída no grupo TOR quando comparada aos grupos TOC e controle ($p=0,002$) (**Fig. 3B**). Em contrapartida, nossos resultados apontam que o grupo TOC apresentou expressão diminuída de TLR9 em relação ao grupo TOR ($p=0,0048$) e ao grupo controle ($p=0,0002$). (**Fig. 3C**).

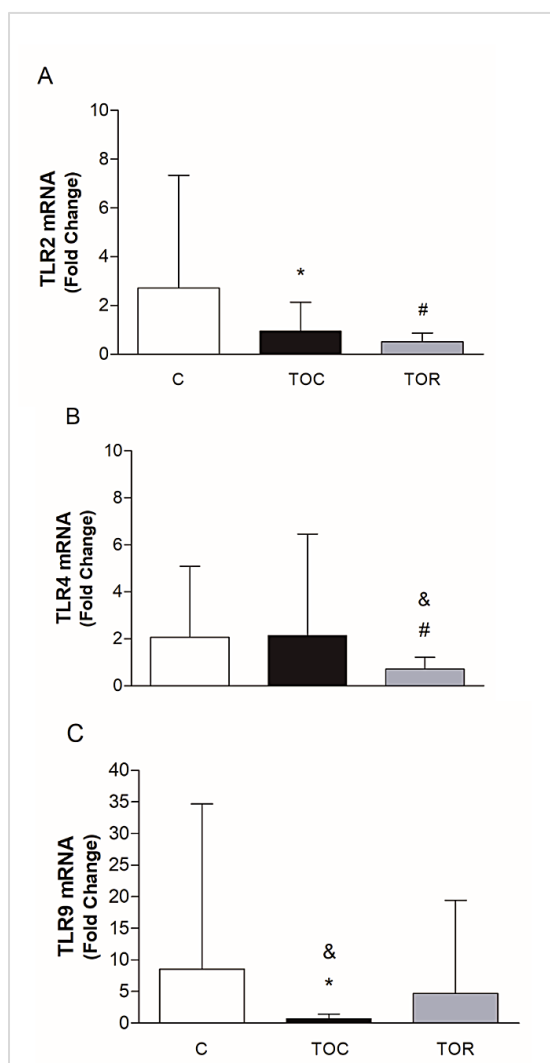


Figura 3. Níveis de expressão gênica de receptores TLR2 (A), TLR4 (B) e TLR9 (C) em PBMCs de pacientes com toxoplasmose ocular cicatricial (TOC), recidivada (TOR) e indivíduos controles (C). A quantificação foi realizada por expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Dados são expressos por média $\pm$ DP. $p<0.05$

* TOC vs. C; # TOR vs. C; & TOC vs. TOR.

Avaliação da dosagem de citocinas

Em relação à dosagem das citocinas (**Figura 4**), nossos resultados mostraram que o grupo TOR apresentou diminuição significativa na dosagem de IL-10 ($p=0,001$ e $p<0,0001$) em relação ao grupo controle. (**Fig. 4B**). Não foi detectada diferença na dosagem desta citocina nos grupos TOC e controle.

As citocinas IL-6 e TNF- α não apresentaram diferença na dosagem em relação aos grupos pesquisados. (**Fig. 4A e 4C**).

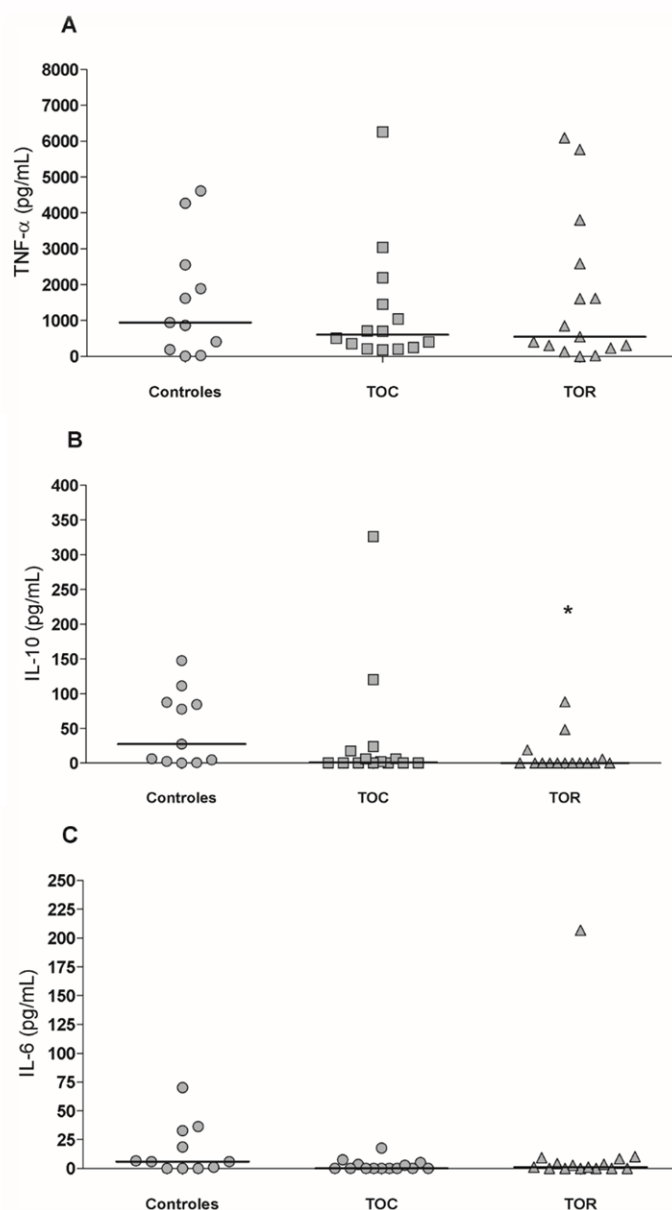


Figura 4. Dosagem das citocinas TNF- α (A), IL-10 (B) e IL-6 (C) por ELISA de pacientes com toxoplasmose ocular cicatricial (TOC), recidivada (TOR) e indivíduos controles. Os resultados são expressos em pg/ml. A linha horizontal representa a mediana. $p<0.05$. * TOR vs. controle.

Discussão

5. Discussão

Com relação às características demográficas dos pacientes incluídos no estudo, verificamos que nos grupos TOR e TOC houve uma diferença entre as médias de idades, maior nos pacientes do grupo TOC. Este achado pode estar relacionado ao fato de que alguns dos pacientes do grupo TOC já eram acompanhados no HCFMB há vários anos por causa da toxoplasmose ocular e apresentavam mais de uma lesão cicatricial de retinocoroidite. Aleixo *et al.* (79), ao analisar os fatores de risco para a recorrência de retinocoroidite por toxoplasmose observou que a idade é um fator determinante no risco de recidiva da toxoplasmose.

Com relação ao sexo também houve diferença entre os dois grupos. No grupo TOC, 42,8% dos pacientes eram do sexo masculino, enquanto no grupo TOR, 68,7%. Rudzinski *et al.* (80) ao avaliar a resposta de imunomoduladores contra a toxoplasmose também encontrou um predomínio do sexo masculino no grupo de toxoplasmose recidivada (66,6%), similar ao presente estudo. Aleixo *et al.* no entanto, reportou prevalências similares de ambos os sexos.

A pesquisa da cor da pele revelou um predomínio de caucasianos em ambos os grupos. Assim, no grupo TOC, 12 indivíduos se declararam caucasianos em um universo de 14 (85,7%) e 10 em 15 (66,6%), no grupo TOR. Um indivíduo não respondeu ao questionário no grupo TOR sendo desconsiderado da avaliação. A escolha era sujeita a autodeterminação do sujeito.

Na região abrangida pelo presente estudo, o predomínio é de indivíduos de origem europeia na população, o que pode ter contribuído para os achados. No Brasil, porém, onde há grande miscigenação da população, existe o risco de viés na autodeclaração do paciente, o que torna difícil avaliar os resultados. Na literatura não há um consenso sobre a questão étnica na toxoplasmose. Um estudo em Londres (81) reportou que indivíduos de origem africana e do oriente médio teriam maior risco de desenvolver toxoplasmose.

Com relação à avaliação clínica dos pacientes com lesão ativa (grupo TOR), os resultados foram compatíveis com a literatura, com predomínio de sinais inflamatórios leves a moderados (74). O diagnóstico clínico da lesão recidivada foi feito utilizando como critério, a presença de lesão ativa satélite à cicatriz de retinocoroidite. Greigert, *et al.* (82) apoiado nos achados de Commodaro *et al.* (83), refere que o padrão-ouro para o diagnóstico da TO se dá por meio da presença de lesões retinianas típicas cicatriciais próximas a áreas de atividade claras e que a coleta

de humor aquoso para diagnóstico deverá ser reservada para lesões atípicas.

A presença de lesões retinianas é o marco mais importante para a TO. A presença delas é obrigatória no diagnóstico clínico, mas podem estar ausentes nas lesões atípicas. Para a classificação da localização utilizamos 3 posições: mácula, arcadas e periferia. Foram consideradas tanto as lesões cicatriciais, assim como o conjunto cicatriz e lesões ativas. As lesões maculares foram encontradas em 4 pacientes (28,5%) com toxoplasmose cicatriciais e em apenas em 1 (6,2%) recidivada. As lesões em arcada foram encontradas em 3 (21,4%) dos pacientes com TOC e em 5 (31%) dos pacientes TOR. As lesões periféricas foram as mais numerosas, sendo encontradas em 7 (50%) dos pacientes TOC e em 10 (62,5%) dos TOR. O aumento do achado de lesões maculares nos pacientes TOC pode se relacionar aos pacientes com lesões congênitas, que se apresentam muitas vezes em roda de carroça (lesão macular circular). A periferia, como sendo a maior porção retiniana é um dos locais mais prováveis da TOR no estudo.

O número de lesões retinianas é outro marco usado na TO. Durante a avaliação diferenciamos a presença de lesões cicatriciais e ativas. Nos pacientes com TOC encontramos 1 única cicatriz em 8 paciente (57,1%), 2 cicatrizes em 5 pacientes (35,7%) e 4 cicatrizes em 1 paciente (7,1%). A média de lesões no grupo TOC em lesões cicatriciais foi de 1,57. Nos pacientes com TOR encontramos 1 única lesão em 10 pacientes (62,5%), e 2, 3 e 4 lesões em 2 pacientes cada (12,5% em cada caso). A média de lesões foi de 1,75, similar aos achados no grupo TOC. Na análise de lesões ativas somente encontramos nos pacientes com TOR. Nestes a lesão única ativa ocorreu em 12 casos (75%), enquanto 2 lesões ativas ocorreram em 4 casos (25%). Neste critério os pacientes com TOR tiveram média de 1,25. No estudo de Aleixo et. al. (2019) (70) o risco de recorrência era maior se a lesão encontrada não fosse primária, ou seja, mais do que 1 lesão em fundo de olho.

A gravidade da toxoplasmose ocular depende de vários fatores como virulência da cepa do *T. gondii*, padrão genético e resposta imunológica do hospedeiro (84, 85, 86). Durante a fase aguda, os taquizoítos transformam-se em bradizoítos e sob essa forma ficam dormentes e estabelecem infecção crônica (87). Os mecanismos fisiopatológicos que engatilham a reativação da toxoplasmose ocular ainda são obscuros no entanto sabe-se que a resposta imune tem papel importante nesse processo (88).

Os receptores TLR são proteínas presentes nas membranas celulares que ao reconhecerem componentes do *T. gondii* engatilham resposta imunológica precoce através da ativação de células imunes e produção de mediadores inflamatórios com a

finalidade de eliminar os parasitas (89). A importância dos receptores TLR2 e TLR4 na resistência à infecção foi mostrada por estudo em que camundongos deficientes desses receptores mostraram níveis diminuídos de TNF- α e incapacidade de eliminar os parasitas (90). Nossos dados mostraram que a expressão do TLR4 foi maior em pacientes com a doença latente e controles em relação aos recidivados, sugerindo que a baixa expressão do TLR4 nesse grupo pode estar ligada com a reativação. Esse fato foi evidenciado por estudos experimentais que mostraram que camundongos deficientes de TLR4 foram suscetíveis a infecção (91, 92). O TLR4 também participa da defesa do hospedeiro aumentando a maturação de células dendríticas após sensibilização com *T. gondii* (93, 94).

Outro receptor que está envolvido com a proteção é o TLR2, o qual está relacionado com ativação de macrófagos e produção de NO (92, 95). No entanto, nossos resultados mostraram que o TLR2 foi menos expresso nos grupos cicatriciais e com recidiva. Khan *et. al.* (1996) (96) observou que apesar da liberação de NO induzida pelo TLR2, os ratos com deficiência de MyD88 somente morreram quando infectados por altas concentrações do parasita. Assim, o TLR2 é mais efetivo em superinfecções e grandes contagens de cistos, podendo ter seu efeito in vivo, pela presença de cepas menos virulentas e menor contaminação, muito menos importantes (97).

Outros receptores toll-like também são associados a infecção pelo *T. gondii*. Yarovsky *et.al.* (2014) (98) relata que além do TLR2, os TLR4, TLR7, TLR9, TLR11 e TLR12 parecem participar no reconhecimento e combate ao patógeno. No entanto, os dois últimos somente possuem função ativa em roedores, sendo provavelmente suplantados pelos demais em humanos.

Embora existam vários relatos de que os receptores TLR participem da resposta imune contra *T. gondii*, pouco é conhecido sobre a ação do TLR9 na toxoplasmose ocular. Um estudo mostrou que a ausência desse receptor reduz a resposta Th1 e causa inflamação reduzida na mucosa intestinal após infecção oral por *T. gondii* (99). Por outro lado, infecção in vitro com o parasita não engatilhou a ativação de TLR9 (100). Peixoto-Rangel *et. al.* (2009) (78) realizou um trabalho em famílias afetadas com toxoplasmose ocular e ao avaliar o polimorfismo nos genes dos TLR somente encontrou associação ao TLR9. A partir disso o autor postulou que talvez este receptor poderia promover uma ação pro-inflamatória associado à TO. Todavia, neste mesmo artigo, os autores afirmaram que poderia haver associação com os demais TLR pesquisados caso fosse realizado novos estudos com maior capacidade de análise

Além do exposto, o fator genético pode inferir na suscetibilidade à infecção

ocular (101). Alguns genes são associados com uma maior probabilidade de lesões, especialmente no sistema nervoso central. Jamielson et. al. (2009) (102) demonstrou uma associação no polimorfismo do gene ABCA4 com maior lesão pela toxoplasmose em olhos e sistema nervoso de crianças portadoras desta alteração.

A defesa contra a inflamação por toxoplasmose recruta diversas citocinas. Na infecção primária, IL-6 e IL-17A parecem estar associados a lesão e ao dano tecidual contra os patógenos. IL-6 é importante para a produção de IL-17A. (16) Da mesma forma, o INF- γ e o TNF- α são relacionados ao combate ao patógeno e ao padrão Th1.

A ativação do padrão Th1 induz um estado pró-inflamatório no qual os mediadores TNF- α e IL-6 são essenciais na amplificação do combate ao agente, tanto em quadro agudos, como em formas crônicas. (103) No nosso estudo, no entanto, tais citocinas não apresentaram diferença estatística nos grupos avaliados. Apesar de estimular a inflamação, alguns estudos sugerem que IL-6 pode reduzir a multiplicação do parasita e estimular a formação de cistos, controlando o dano local. (104, 105)

O IL-10 é uma citocina importante no controle da infecção. Ela é expressa durante a regulação para Th2. A elevação desta citocina se associa a menor controle contra o parasita, visto se tratar de uma citocina anti-inflamatória. Em nosso estudo observamos uma diminuição desta citocina no grupo TOR. Meira et. al. (2014) (106) observou uma diminuição desta citocina nos grupos com HIV, TO e Toxoplasmose crônica. Os níveis de IL-10 demonstraram uma tendência a diminuição no grupo com TO em relação ao grupo crônico, similar ao encontrado em nosso estudo. Isto pode ser explicado pela necessidade de melhora no controle do parasita e sua diminuição como forma de aumentar o combate, principalmente em fases iniciais do controle. Abdollah et al. (2013) (107) avaliou a mudança na concentração de IL-10 ao longo do tempo durante a vacinação de ratos para toxoplasmose e observou um aumento ao longo dos dias. Este achado não pode ser reproduzido em nosso estudo pois os pacientes coletados estavam no início do quadro inflamatório. No entanto, o estudo sugere que mesmo em tais pacientes poderíamos observar um aumento desta citocina ao longo do tempo.

Considerações finais

Os receptores TLR demonstram queda em relação aos controles. O TLR2 apresentou diminuição nos dois grupos com TO em relação ao controle. O TLR4 se apresentou diminuído na TOR em relação ao controle e, por fim o TLR9 se mostrou diminuído no grupo TOC em relação ao controle. As alterações observadas nos TLR

podem ser relacionada a imunidade contra o parasita e mesmo ajudar a explicar porque alguns pacientes desenvolvem recidiva e porque outros a lesão se mantém cicatrizada sem novas recidivas. A dosagem das citocinas demonstrou que o perfil anti-inflamatório Th2 pode estar suprimido em pacientes com toxoplasmose reativada em relação aos controles e cicatriciais. Tal alteração pode ser associada a diminuição dos receptores TLR4, diminuído somente no grupo cicatricial. No entanto, para definir o papel correto destes receptores serão necessários mais estudos que aumentem o tamanho amostral e consigam demonstrar a produção de citocinas nestes pacientes. A avaliação da produção de citocinas no humor aquoso e a presença dos receptores TLR em situ ao invés de sistêmicos poderá demonstrar se tais achados se reproduzem localmente.

Conclusões

6. Conclusões

Baseado nos achados obtidos pela expressão dos TLR, na dosagem das citocinas, nas condições experimentais utilizadas e de acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Houve diminuição da expressão dos receptores toll-like 2 dos grupos com toxoplasmose cicatricial e recidivada em relação aos controles.
2. Houve diminuição da expressão dos receptores toll-like 4 do grupo com toxoplasmose recidivada em relação aos grupos controle e toxoplasmose cicatricial.
3. Houve diminuição da expressão dos receptores toll-like 9 do grupo com toxoplasmose cicatricial em relação aos controles e toxoplasmose recidivada.
4. Houve diminuição da dosagem da citocinas IL-10 no grupo com toxoplasmose recidivada em relação ao grupo controle.

Referências

7. Referências Bibliográficas

1. Kawazoe U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP; Melo AL; Genaro O; Linardi PM; Vitor RWA. (Eds). *Parasitologia humana*. São Paulo: Atheneu, 2011. p.147-56.
2. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*. 1992; 114:136–44.
3. Amato, M.N., Barone, A.A. Toxoplasmose. In: Amato VN, Baldy, JLS. *Doenças Transmissíveis*, 1991: 832.
4. Wong S.Y., Remington J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* 1993; 7: 299-316.
5. Jobim E.M., Silva J.E.P. Toxoplasmose, uma doença congênita. *Saúde*, 2004: 30 (1-2): 50-56.
6. Mele A, Paterson PJ, Prentice HG, Leoni P, Kibbler CC. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29: 691-698.
7. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004; 363: 1965-1976.
8. Pereira-Chioccolla VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol*. 2009; 4:1363-1379.
9. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: Epidemiology and Course of Disease. *Am J Ophthalmol* 2003; 6(136): 973–988.
10. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. *Am J Ophthalmol*. 2004;137:1–17.
11. Furtado J.M., Bharadwaj AS et al. Migration of *Toxoplasma gondii*-Infected Dendritic Cells across Human Retinal Vascular Endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(11):6856-62.
12. Dutra M.S., Bela S.R., Association of a NOD2 gene polymorphism and T-helper 17 cells with presumed ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 2013;207(1):152-63.
13. Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol Today*. 1999;15(2):51-7
14. Oréfice F., Cunha Filho R., Toxoplasmose ocular adquirida, Toxoplasmose ocular pós-natal. *Rev bras oftalmol*. 2010;69(3):
15. Oréfice, F.; Bahia-Oliveira, L.M.G. Toxoplasmose. In: Oréfice, F. *Uveíte clínica e cirúrgica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, v.2, p.699-804, 2005.
16. Sauer A., Rochet E., The local immune response to intraocular *Toxoplasma* re-

- challenge: less pathology and better parasite control through Treg/Th1/Th2 induction. *Int J Parasitol.* 2013;43(9):721-8.
17. Lycke E, Norrby R, Penetration-enhancing factor extracted from *Toxoplasma gondii* which increases its virulence for mice. *J Bacteriol.* 1968;96(3):785-8.
 18. Pineles S, Rikkers SM, Levinson RD. Toxoplasmoses Ocular. In: Yanoff M; Duker J.S. *Oftalmologia.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p.828-832.
 19. Abbas AK LA, Pillai S. Propriedades gerais das respostas imunes. In: *Imunologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2011a. p. 1-14 p.
 20. Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An bras Dermatol.* 2004; 79(6):647-664.
 21. Abbas /ak, Lichtman AH. Innate Immunity. *Cellular and Molecular Immunology*, 5th ed, 2003; cap 12, 275-297.
 22. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol* 2002; v:20, 825-852.
 23. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 13-19.
 24. Horng T, Barton G, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nature Immunol.* 2001;2:835-841.
 25. Yamamoto M, Sato S, Hemmi O, Sanjo h, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role of TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR-2 and TLR-4. *Nature.* 2002; 420: 323-329.
 26. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 2004;16:3-9.
 27. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate immune response. *Nature Immunol.* 2001; 2: 675-680.
 28. Suttmüller RPM, Morgan ME, Netea MG, Grauer O, Adema GJ. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends in Immunology.* 2006; 27: 387-393.
 29. Majewska M, Szczepanik M. The role of Toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2006; 60: 52-63.
 30. Medzhitov R. Review. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews-Immunology.* 2001; 1: 135-145.
 31. Hammer GE, Ma A. Molecular Control of Steady-State Dendritic Cell Maturation and Immune Homeostasis. *Annual Review of Immunology*, 2013,31(1):743–791.

32. Kawai T, Akira, S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Research & Therapy*. 2005; 7(1): 12-9.
33. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. Human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-397.
34. Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Op. Immunol*. 1997; 9: 4-9.
35. Kindt TJ; Goldsby RA; Osborne BA; Kuby J. *Kuby immunology*. 6th ed. New York : W.H. Freeman; 2007.
36. Wu J, Chen ZJ. Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids. *Annual Review of Immunology*. 2014; 32(1):461–488.
37. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. Human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-397.
38. Turvey SE, Hawn TR. Short analytical Review. Towards subtlety: Understanding the role of toll-like receptors signaling in susceptibility to human infections. *Clinical Immunology*. 2006; 120: 1-9.
39. Cristofaro P, Opal SM. Role of Toll-like receptors in infection and immunity. *Drugs*. 2006; 66 (1):15-29.
40. Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signaling pathways: implications for host parasitism. *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6 (12):895-905.
41. Egwuagu CE. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine* 47 (2009) 149–156
42. Campos MAS, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *The Journal of Immunology*. 2001:416-23.
43. Seder RA, Gazzinelli RT, Sher A, Paul WE. IL-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for IFN- γ production and diminishes IL-4 inhibition to such priming. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 10188-10194.
44. Mendonça-Natividade FC, Lopes CD, Ricci-Azevedo R, Sardinha-Silva A, Pinzan CF, Alegre-Maller ACP. Receptor Heterodimerization and Co-Receptor Engagement in TLR2 Activation Induced by MIC1 and MIC4 from *Toxoplasma gondii*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(20), 5001.
45. Ihara F, Tanaka S, Fereig RM, Nishimura M, Nishikawa Y. Involvement of Toll-

like receptor 2 in the cerebral immune response and behavioral changes caused by latent *Toxoplasma* infection in mice. *PLOS ONE*, 2019. 14(8), e0220560.

46. Denkers EY & Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Reviews* 1998; 11: 569-88
47. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988; 240: 516-8.
48. Scharton-Kkersten T, Wynn TA, Denkers EY, Bala S, Showe L, Greenvald E, Hieny S, Gazzinelli RT, Sher A. In the absence of endogenous INF- γ mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J Immunol* 1996b; 4045-54.
49. Scharton-Kersten T, Caspar P, Sher A, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* evidence for interleukin-12-dependent and -independent pathways of interferon- γ production induced by an attenuated parasite strain. *Exp Parasitol* 1996a; 84: 102-114.
50. Sher A, Oswald IP, Hieny S, Gazzinelli RT. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor- α . *J Immunol* 1993; 150: 3982-3989.
51. O'Shea, J J, Paul, WE. (2010) Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327: 1098-1102.
52. Gazzinelli RT, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1992; 149: 175-80.
53. Gazzinelli RT, Denkers EY, Sher A. Resistance to *Toxoplasma gondii*: model of studying the selective induction of cell mediated immunity by intracellular parasites. *Infect Agents Dis* 1993; 2: 139-49
54. Gazzinelli RT, Wysocka M, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G & Sher A. Parasite induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994; 153: 2533-43.
55. Hunter CA, Subauste CA, Van Cleave VH, Remington JS. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii* – infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*, 1994; 62: 2818-24.
56. Kasper LH, Matsuura T, Fonseka S, Arruda J, Channon JY, Khan IA. Induction of $\gamma\delta$ T-cells during acute murine infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 1996; 157: 5521-27.
57. Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R, Trinchieri G. The

-
- interleukin-12 p40 is primed by interferon- γ in monocytic cells. *J Exp Med* 1996; 183: 147-57.
58. Seder RA, Gazzinelli RT, Sher A, Paul WE. IL-12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for IFN- γ production and diminishes IL-4 inhibition to such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10188-10194.
59. Iqbal J, Al-Awadhi M. Toxoplasmosis: Role of Cytokines in Disease Modulation & Tissue Pathology. *Ann Clin Pathol*. 2016;4(7): 1090
60. Alexander J, Scharton-Kersten TM, Yap G, Roberts CW, Liew FY, Sher A. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Phil Trans R Soc Lond* 1997; 352: 1355-9.
61. Frenkel JK. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today*. 1988; 4: 273-78.
62. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante N, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon- γ production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/ IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1041-8.
63. Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeek U. Regulation of NK cell functions by TGF- β 1. *J Immunol* 1995; 155: 1066-73.
64. Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. Transforming growth factor- β inhibits interleukin-12-induced production of interferon- γ by natural killer cells: a role for transforming growth factor- β in the regulation of T-cell independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol* 1995b; 25: 994-1000
65. Thieme C, Schlickeiser S, Metzner S, Dames C, Pleyer W. Immune Mediator Profile in Aqueous Humor Differs in Patients with Primary Acquired Ocular Toxoplasmosis and Recurrent Acute Ocular Toxoplasmosis. *Mediators of Inflammation*, 2019; 1–12.
66. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat. Rev. Immunol* 2006; 6: 329–333.
67. Meenken C, Rothova A, Waal LPD, Horst ARVD, Mesman BJ, Kijlstra A. HLA typing in congenital toxoplasmosis. *British Journal of Ophthalmology* 1995;79:494–7.
68. Rodrigues MLV, Figueiredo JFC, Demarco ALG et al. HLA class II alleles in patients with AIDS and *Toxoplasma gondii* chorioretinitis. In: International AIDS conference, 14., 2002. Barcelona. Abstract book..., v.2, Barcelona, 2002.p543.
69. Ferguson, DJ P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [online]. 2009, vol.104, n.2, pp.133-148.

70. Maenz MD, Schluter O, Liesenfeld G, Schares U, Gross U, Pleyer U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog Retin Eye Res.*2014; 39: 77-106.
71. Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology.*2003;11(9): 426 – 430.
72. Vicent NAK, PEEK R. Evidence for a compartmentalized B cell response as characterized by IgG epitope specificity in human ocular toxoplasmosis. *The J of Immunol.*2001;167:6263 – 6269.
73. Jorge, EC, Silva MRBM, Nakamoto, W, Jorge, EN. Avaliação do sistema sanguíneo Duffy como fator de risco para a toxoplasmose ocular.*Rev.bras.Oftalmol.* 2003;62(8):598-611.
74. Nussenblatt RB, Whitcep SM, Palestine AG. *Uveítis: fundamentals and clinical practice.* 2.ed. St. Louis: Mosby, 1998. 413p.
75. Hogan MJ, Kimura SJ, Thygeson P. Signs and symptoms of uveitis: I. Anterior uveitis. *Am J Ophthalmol.* 1959, 47:155-70.
76. Kimura SJ, Thygeson P, Hogan MH. Signs and symptoms of uveitis: II. Classification of the posterior manifestations of uveitis. *Am J Ophthalmol.* 1959; 47: 171-176.
77. Holland GN, Buhles WC, Mastre B et al. A controlled retrospective study of ganciclovir treatment for cytomegalovirus retinopathy: use of a standardized system for the assessment of disease outcome. *Arch Ophthalmol.* 1989;107 (12):1759-66.
78. Peixoto-Rangel AL, Miller EN, Castellucci L, Jamieson SE, Peixe RG, Elias LS, et al. Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 2009, vol.104, n.8, pp.1187-1190.
79. Aleixo ALQC, Oliveira RVC, Albuquerque MC, Biancardi AL, Curi ALL, Benchimol EI et al. Toxoplasmic retinochoroiditis: The influence of age, number of retinochoroidal lesions and genetic polymorphism for IFN- γ +874 T/A as risk factors for recurrence in a survival analysis. *PLoS ONE* 2019; 14 (2):e0211627
80. Rudzinski M, Argüelles C, Couto C, Oubiña JR, Reina S. Immune Mediators against *Toxoplasma Gondii* during Reactivation of Toxoplasmic Retinochoroiditis. *Ocular Immunology & Inflammation*, 2018; 00(00): 1–9.
81. Flatt A, Shetty N. Seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis among antenatal women in London: a re-examination of risk in an ethnically diverse population. *European Journal of Public Health*, 2012; 23(4),648–652.
82. Greigert V, Foggia ED, Filisetti D, Villard O, Pfaff AW, Sauer A, et al. When

- biology supports clinical diagnosis: review of techniques to diagnose ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol*. 2019; 0:1–5.
83. Commodaro AG, Belfort RB, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier Jr MN, et al. Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2009;104(2):
 84. Mack DG, Johnson JJ, Roberts F, et al. HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol* 1999; 29: 1351-8.
 85. Ferreira IM, Vidal JE, de Mattos CC et al. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol* 2011;129: 190-5
 86. Sullivan WJ Jr, Jeffers V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36: 717-33
 87. Kortbeek LM, Hofhuis A, Nijhuis CD, Havelaar AH. Congenital toxoplasmosis and DALYs in the Netherlands. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. 2, pp. 370–373, 2009.
 88. Talabani H, Mergey T, Yera H. Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review. *Parasite*, vol. 17, no. 3, pp. 177–182, 2010.
 89. Peng J, Lin X, Lin H, Chen S, Liu J, Guo Z, et al. Up-regulated TLR2 and TLR4 expressions in liver and spleen during acute murine *T. gondii* infection. *Parasitol Res* (2016) 115:4681–4686
 90. Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, Mansur DS. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 2007 Jul 15;179(2):1129-37
 91. Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, et al. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol* 2002;168(12): 5997-6001.
 92. Mun HS, Aosai F, Chen M, Piao LX, Norose K, Iwakura Y, et al. Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* through B-2 cell-mediated downregulation of host defense responses. *Microbiol Immunol*. 2003;47(7):533-42.
 93. Aosai F, Pena M, Mun H, Fang H, Mitsunaga T, Norose K, et al. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Cell Stress Chaperones*. 2006 Mar; 11(1): 13–22.
 94. Butcher BA, Fox BA, Rommereim LM, Kim SG, Maurer KJ, Yarovinsky F, et al. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in

cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002236.

95. Del Rio L, Butcher BA, Bennouna S, Hieny S, Sher A, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* triggers myeloid differentiation factor 88-dependent IL-12 and chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) responses using distinct parasite molecules and host receptors. *J Immunol*. 2004 Jun 1;172(11):6954-60.

96. Khan IA, Matsuura T, Fonseka S, Kasper LH. Production of nitric oxide (NO) is not essential for protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in IRF-1^{-/-} mice. *J Immunol*. 1996 Jan 15;156(2):636-43.

97. Mun HS, Aosai F, Norose K, Chen M, Piao LX, Takeuchi O, et. al. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int Immunol*. 2003 Sep;15(9):1081-7.

98. Yarovsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection *Nature Reviews Immunology* 2014; 14(2), 109-121

99. Minns LA, Menard LC, Foureau DM, Darche S, Ronet C, Mielcarz DW, et. al. TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 2006 Jun 15;176(12):7589-97.

100. Yarovsky F. Toll-like receptors and their role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunol Lett* 2008; 119, 17-21.

101. Deckert-Schlüter M, Schlüter D, Theisena F, Wiestler OD, Hof H. Activation of the innate immune system in murine congenital *Toxoplasma* encephalitis. *Journal of Neuroimmunology*. Volume 53, Issue 1, August 1994, Pages 47-51

102. Jamieson SE, Cordell H, Petersen E, McLeode R, Gilbert RE, Blackwell JM. Host genetic and epigenetic factors in toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Mar; 104(2): 162–169.

103. Mirjam Schenk,¹ Axel Bouchon,² Frank Seibold,³ and Christoph Mueller TREM-1-expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest*. 2007 Oct 1; 117(10): 3097–3106.

104. Weiss LM, Laplace D, Takvorian PM, Tanowitz HB, Cali A, Wittner M. A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Eukaryot Microbiol*. 1995 Mar-Apr;42(2):150-7.

105. Lyons RE, Anthony JP, Ferguson DJ, Byrne N, Alexander J, Roberts F, et. al. Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complex class I and transforming growth factor beta and a protective

role for interleukin-6. *Infect Immun.* 2001 Apr;69(4):2589-95.

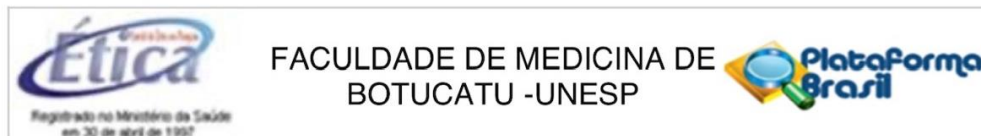
106. Meira CS, Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, Mattos CCB, Motoie G, Costa-Silva TA, et. al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- γ , TNF- α , and IL-10 levels. *Front Microbiol.* 2014; 5: 492.

107. Abdollahi SH, Ayoobi F, Khorramdelazad H, Hassanshahi G, Ahmadabadi BN, Rezayati M, et. al. Interleukin-10 Serum Levels after Vaccination with In Vivo Prepared *Toxoplasma gondii* Excreted/Secreted Antigens. *Oman Med J.* 2013 Mar; 28(2): 112–115.

Apêndice

8. Apêndice

Apêndice 1 - Parecer da Comissão de Ética da FMB – UNESP.



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão gênica dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 e das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-17 em pacientes com Toxoplasmose ocular cicatricial e recidivada.

Pesquisador: Leonardo de Freitas Teodoro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 23624013.6.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Oftalmologia/Otorrinolaringologia e de CCP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 531.949

Data da Relatoria: 17/02/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa PENDENTE em reunião do CEP de 03/02/2014. Sugerido alterações no TCLE.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar:

- padrão de resposta imunológica sistêmica em pacientes com TO em quadros de recidiva e na forma cicatricial.
- expressão genica do mRNA dos receptores TLR 2, TLR 4 e TLR9 e das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-17 em pacientes com TO recidivados e cicatricial e em indivíduos saudáveis, através da qPCR

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: desconforto da punção venosa e do exame oftalmológico.

Benefícios: prevenção de doenças oftalmológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo unicêntrico, onde serão avaliados 60 indivíduos, em três grupos (20 pacientes): Toxoplasmose ocular (TO) reativada (GTR); TO cicatricial (GTC); grupo controle (GC). Os 40 indivíduos com TO reativada e cicatricial serão atendidos no Ambulatório de Úveítes do HC FMB, e os 20 indivíduos controle serão recrutados de outros ambulatórios de oftalmologia.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

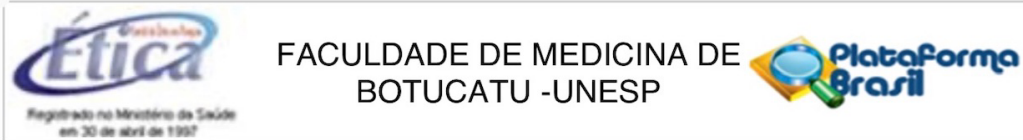
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

2 de 3



Continuação do Parecer: 531.949

Critérios de inclusão e exclusão bem especificados anteriormente.

A avaliação oftalmológica em GTR e GTC compreenderá: acuidade visual inicial e final só no GTR, biomicroscopia com lâmpada de fenda, tonometria com avaliação da pressão intra ocular, fundoscopia. Avaliações do GC: biomicroscopia e fundoscopia. As lesões de retinocoroidite serão classificadas quanto a atividade da lesão; tipo de lesão. Todos serão submetidos a coleta de 10ml de sangue para quantificação da expressão gênica dos TLR2, TLR4 e TLR9 e das citocinas IL-17 IL-10 e IFN-gama por qPCR, conforme protocolo. Orçamento previsto de 13.000,00.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto pendente quanto ao TCL:

Sugestões do parecerista

- redigir o TCLE para o grupo controle ou especificar no mesmo TCLE os grupos e procedimentos que serão realizados; usar linguagem mais acessível; falar que o exame oftalmológico causa algum desconforto.

Resposta do autor:

-O exame oftalmológico proposto é realizado de rotina em todos os pacientes dos ambulatórios de oftalmologia. Portanto foi proposto um único TCLE onde os autores explicam esse fato. Também informaram sobre o desconforto do exame, e usaram uma linguagem menos técnica.

Recomendações:

Sugiro aprovação sem necessidade de envio a CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO DE PESQUISA APROVADO EM REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA DO CEP REALIZADA EM 17/02/2014.

OBS: AO TÉRMINO DESTA ESTUDO É NECESSÁRIO POSTAR O RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Apêndice 2 – Esquema de tratamento para toxoplasmose ocular recidivada utilizada no estudo.

Uso ocular:

- 1- Acetato de prednisolona 1% colírio – 1 gota de 4/4h por 7 dias, com mudança para 6/6h por 7 dias se processo inflamatório em câmara anterior
- 2- Tropicamida 1% colírio – 1 gota de 12/12h por 15 dias se processo inflamatório em câmara anterior
- 3- Maleato de timolol 0,5% colírio – 1 gota 12/12h por 15 dias se hipertensão ocular

Uso oral:

- 1- Sulfadiazina 500mg – 1 comprimido, por via oral, de 6/6h por 30 dias
- 2- Pirimetamina 25mg - 3 comprimidos, por via oral, 1 vez ao dia por 3 dias, seguido por 1 comprimido, por via oral, 1 vez ao dia por 27 dias
- 3- Prednisona 20mg - 3 comprimidos, por via oral, 1 vez ao dia por 3 dias, seguido por 1 comprimido, por via oral, 1 vez ao dia por 20 dias, seguido por ½ comprimido, por via oral, 1 vez ao dia por 7 dias, dependendo da intensidade da uveíte posterior.
- 4- Ácido fólico 5 mg – 1 comprimido, por via oral, de 12/12h por 30 dias
- 5- Albendazol 400 mg – 1 comprimido, por via oral, dose único no início do tratamento
- 6- Omeprazol 20 mg – 1 comprimido, por via oral, cedo em jejum por 30 dias

Apêndice 3 – Modelo do termo de Consentimento livre e esclarecido entregue aos participantes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Quando ela atinge os olhos, pode levar à cegueira irreversível, especialmente em crianças e adultos jovens. Algumas substâncias do sistema de defesa do corpo parecem estar envolvidas no controle ou manutenção da infecção. Esta pesquisa visa estudar o perfil do sistema de defesa dos pacientes com toxoplasmose ocular e compará-lo com o perfil das pessoas sem a doença. Os resultados obtidos nesta pesquisa ajudarão a entender melhor a TO e porque ocorrem as recidivas da doença.

Eu, _____ recebi

pessoalmente o convite para participar da pesquisa: **“Análise da expressão gênica dos receptores TLR2, TLR4 e TLR9 e das citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes com Toxoplasmose ocular cicatricial e recidivada”**, a ser realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob responsabilidade do Médico Leonardo de Freitas Teodoro, sob orientação da Profa. Dra. Eliane Chaves Jorge, do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Co-orientação da Profa. Mariana Gatto, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, ambos da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, e todas as informações a respeito da mesma.

Fui devidamente informado sobre os objetivos e procedimentos envolvidos na pesquisa, que consistem em: 1. Coleta de 10 ml de sangue por punção venosa, em um único momento do estudo; e 2. Exame oftalmológico com medida da acuidade visual e da pressão intraocular, biomicroscopia e exame de fundo de olho.

Fui informado que depois de passar pelos exames, se for constatado que sou portador de toxoplasmose ocular, farei parte do grupo de portadores da doença e serei tratado (caso haja necessidade e eu concordar com o tratamento); e se meus exames forem normais, farei parte do grupo controle da pesquisa.

Fui informado de que os procedimentos realizados no estudo não acarretarão nenhum risco para minha saúde e, que o exame oftalmológico traz benefícios para a minha saúde, já que pode prevenir a cegueira pela toxoplasmose ocular e detectar outras doenças oftalmológicas. Também fui alertado de que a punção venosa e o exame oftalmológico poderão causar leve desconforto.

Ficou esclarecido que a minha participação é voluntária e que tenho a liberdade para me retirar da pesquisa em qualquer momento. Fui informado de que os dados colhidos na pesquisa serão mantidos em sigilo e que minha privacidade será resguardada.

Fui informado de que meu sangue será estocado e caso ele seja utilizado no futuro, serei procurado novamente para autorizar o seu uso.

Declaro que este documento tem duas vias, sendo que uma cópia ficará comigo e outra será mantida em arquivo pelo pesquisador. Com a assinatura abaixo, dou consentimento para a incorporação dos meus dados neste estudo.

Fui informado de que caso tenha qualquer dúvida adicional, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do telefone: (14) 3880-1608/ 1609/ 1610.

Botucatu, de de .

Assinatura do paciente

Leonardo de Freitas Teodoro CRM: 151257
End: Av. Prof. Montenegro, Distrito de Rubião Junior, s/n
Botucatu, SP
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP
Telefone: (14) 98112 2688
Email: leo_teodoro@hotmail.com

Assinatura do pesquisador

Profa Dra Eliane Chaves Jorge CRM: 55107
Depto OFT/ORL/CCP- Faculdade de Medicina de
Botucatu – UNESP
Telefone: 14 3880 1520
Email: elianej@fmb.unesp.br