

RODRIGO ECHEVERRIA FLORES

**NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA – 12 E FATOR
DE NECROSE TUMORAL-a EM DIFERENTES
APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DE TOXOPLASMOSE**

**Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de
Pós – Graduação da Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul.**

Orientadora: Dra Denise Cantarelli Machado

**PORTO ALEGRE, RS
2005**

F634n Flores, Rodrigo Echeverria

Níveis séricos de interleucina – 12 e fator de necrose tumoral-? em diferentes apresentações clínicas de toxoplasmose / Rodrigo Echeverria Flores; orient. Denise Cantarelli Machado. Porto Alegre: PUCRS, 2005.

37f.: gráf. tab.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

1. TOXOPLASMOSE. 2. INTERLEUCINA – 12/sangue. 3. FATOR DE NECROSE TUMORAL. 4. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

C.D.D. 616.96

C.D.U. 616.993:577.27(043.3)

N.L.M. WC 725

AGRADECIMENTOS

Ao professor e incentivador Dr. Cláudio Silveira, cujo apoio e ajuda foram essenciais em todas as etapas da realização desse trabalho.

À professora orientadora Dra. Denise C. Machado, pela disponibilidade e paciência na orientação.

Ao professor Dr. Mário Wagner pelas valiosas informações estatísticas e epidemiológicas.

À Regina Polito, Christian Viezzer e Gustavo Barbosa, do laboratório de Pneumologia do IPB – PUC – RS, pelo auxílio na execução da técnica de ELISA.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CD4 – Marcador de superfície da célula T auxiliar

CD8 – Marcador de superfície da célula T citotóxica

CMV – Citomegalovírus

ELISA – Ensaio imunoenzimático

IC – Intervalo de confiança

IFN- γ - Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacárides

MEIA? - Ensaio imunoenzimático de micropartículas

NK – Célula “Natural Killer”

NO – Monóxido de Nitrogênio

PCR – Proteína C Reativa

PCR-RT – Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa

STAT-1 – Fator de Transcrição Nuclear

Th – Célula T auxiliar

RESUMO

A Toxoplasmose é uma zoonose universal, transmitida tanto através de contaminação oral, quanto de maneira congênita. O protozoário causador, *Toxoplasma gondii*, provoca no organismo uma forte resposta imune celular, padrão Th1, que não resolve a infecção mas que leva a maioria das pessoas a um estágio crônico assintomático. Em algumas regiões do sul do país, há uma elevada prevalência de lesões oculares, causadas por toxoplasmose, a maioria delas adquiridas. Nesse estudo determinou-se a variabilidade dos níveis séricos de duas citocinas importantes na resposta imune ao Toxoplasma, a Interleucina 12 (IL-12) e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α). Foram analisados soros de 106 pacientes com diferentes apresentações clínicas da doença (lesão ocular cicatrizada, lesão ocular recidivante, doença recente e toxoplasmose crônica assintomática) e de 31 controles sadios, obtendo-se valores significativamente mais elevados de IL-12 nos indivíduos que apresentavam lesões oculares cicatrizadas, quando comparados com todos os outros grupos de pacientes e controles ($p < 0,005$). Os valores de TNF- α não apresentaram diferenças entre os grupos. Os resultados apontam para a viabilidade de novos estudos, visando a uma possível aplicação da determinação de IL-12 sérica na prática clínica, como teste prognóstico nos casos de toxoplasmose ocular.

Palavras chave: Toxoplasmose, Citocinas séricas, IL-12, TNF- α .

ABSTRACT

Toxoplasmosis is an universal zoonosis, transmitted so much through oral contamination, as well by congenital route. The protozoan, *Toxoplasma gondii*, provokes a strong cellular immune response, pattern Th1, that do not overcome the infection but that takes most of the patients to an asymptomatic chronic stage. In some areas of the south of the country, there is a high prevalence of ocular lesions, caused by toxoplasmosis, most of them acquired cases. In this study was determined the variability of the seric levels of two important citokynes in the immune response to the *Toxoplasma*, Interleukin 12 (IL-12) and Tumor Necrosis Factor- a (TNF-a). The analisis were performed in 106 patients' sera with different clinical forms of the disease (scarred ocular lesion, lesion ocular reactivated, recent disease and chronic toxoplasmosis) and in 31 healthy controls. Significantly higher levels of IL-12 were observed in individuals with scarred ocular lesions, when compared with all groups of patients and controls ($p < 0,005$). There was no significant diference in the TNF-a seric levels beetwen the groups. The results shows the viability of new studies, in order to obtain a possible application of the seric determination of IL-12 in medical routine, as a prognostic test, mainly in the cases of ocular toxoplasmosis.

Key Words: Toxoplasmosis, Serum cytokines, IL-12, TNF-a.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Epidemiologia	03
2.2 Resposta Imune	05
2.3 Quantificação de Citocinas	08
2.3.1 Ensaios biológicos para citocinas	10
2.3.2 Imunoensaios	11
2.3.3 Citometria de fluxo e técnicas moleculares	12
2.4 Quantificações Séricas de Citocinas	12
3 OBJETIVOS	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Amostras	17
4.2 Testes Sorológicos	18
4.3 Quantificação de IL-12 e TNF-?	18
4.4 Análise Estatística	18
5 RESULTADOS	19
5.1 Descrição da Amostra.....	19
5.2 Quantificação das Citocinas nos Grupos Estudados	20
6 DISCUSSÃO	23
7 CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo parasita intracelular *Toxoplasma gondii*. A forma adquirida da doença geralmente passa despercebida, embora possa causar linfadenopatia e febre baixa, num quadro similar à mononucleose. Nos pacientes imunocompetentes, a doença progride para um estágio crônico, assintomático. Formas graves e na maioria das vezes fatais, entretanto, são observadas nos imunocomprometidos, notadamente nos paciente com AIDS. Lesões oculares são as mais freqüentes apresentações clínicas da toxoplasmose congênita. Esta forma da doença apresenta uma prevalência muito alta no Brasil, de 1/3.000 nascidos vivos, quando comparada a outros países (1). Curiosamente, em algumas regiões, como no Noroeste do Rio Grande do Sul, observam-se altas taxas (21%) de lesões oculares (retinocoroidites) nos indivíduos infectados, a maioria delas devidas a infecções adquiridas após o nascimento, o que mostra a capacidade do parasita em causar doença mesmo em indivíduos imunocompetentes (2,3).

A resposta imune apresentada pelo organismo em resposta ao *Toxoplasma gondii* tem sido intensivamente estudada, produzindo maiores esclarecimentos a respeito desta infecção. Revisões de pesquisadores importantes, compilaram as principais descobertas nessa área, baseadas principalmente em modelos animais. Parece evidente que o principal mecanismo de resistência ao parasita é a imunidade mediada pelas células T, tanto da linhagem CD4⁺, quanto da CD8⁺ (4, 5).

Contribuições relevantes foram igualmente obtidas por pesquisadores brasileiros, da Universidade de São Paulo, trabalhando com amostras de pacientes de Erechim-RS, em ensaios de proliferação celular. Os autores chegaram a conclusões em relação à toxoplasmose ocular, mostrando a diferença na resposta imune nas lesões congênitas e adquiridas e o papel protetor do interferon- γ (IFN- γ) e da interleucina 12 (IL-12) no desenvolvimento destas lesões (6, 7).

O presente trabalho visou descrever os níveis séricos das citocinas IL-12 e TNF- α em diferentes apresentações clínicas de toxoplasmose e em indivíduos assintomáticos com e sem contato prévio com o parasita, buscando similaridades

em trabalhos anteriores e discutindo uma possível aplicação clínica para esses testes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia

A toxoplasmose é adquirida tanto pela ingestão de cistos, através do consumo de carne contaminada, quanto de oocistos, forma sexuada de reprodução, eliminados exclusivamente pelos felídeos, através das fezes, que contaminam jardins, caixas de areia e, mais raramente, reservatórios de água potável.

A soroprevalência da doença varia muito nas diferentes regiões do globo, conforme fatores sociais e econômicos das populações. É maior nas áreas tropicais do que nas regiões quentes e áridas ou frias. No Brasil, diversos inquéritos sorológicos, realizados em épocas e regiões distintas, encontraram prevalências de anticorpos anti-Toxoplasma entre 42 e 87,6% (8).

Um estudo multicêntrico europeu, que estudou 252 gestantes infectadas e 708 grávidas soronegativas, apontou o consumo de carne inadequadamente cozida ou curada como o principal fator de risco para a infecção. As carnes que apresentaram maior risco foram as de porco e carneiro e nesse estudo não foi demonstrado o papel do contato com gatos na aquisição da doença (9).

Num estudo de prevalência realizado em gestantes no Hospital Nossa Senhora da Conceição, em Porto Alegre – RS, a escolaridade foi fator de proteção para a toxoplasmose, com taxas de soropositividade significativamente menores em mulheres que tinham mais de nove anos de escola, quando comparadas com as demais (10).

Na região de Erechim – RS, um estudo realizado em 1990, mostrou associação positiva entre toxoplasmose e a etnia italiana, relacionada com seus hábitos alimentares, que incluem a ingestão de carne suína em forma de embutidos, consumidos por vezes logo após a preparação (8).

Outro estudo, publicado recentemente, realizado com gestantes do Alto-Uruguaí gaúcho, região de Erechim, avaliou o contato com o solo como o fator de

maior associação positiva com a toxoplasmose, além da moradia em zona rural e a idade (11).

A forma congênita de transmissão da doença é a mais grave. Além da manifestação ocular, seqüelas neurológicas podem advir de uma infecção adquirida no útero. Tanto a eficácia do tratamento na redução da transmissão congênita quanto a validade da implantação de programas de triagem sorológica em gestantes permanecem sem conclusões definitivas (12). Os dados de prevalência obtidos em gestantes variam desde 10 a 55% na Europa (9) até 59,8 a 74,5% no sul do Brasil (10,11). As taxas de infecção congênita no Brasil variam de 3,3 a 8/10.000 nascidos vivos (1, 13, 14), estando entre as maiores do mundo. A maioria dos bebês é assintomática ao nascer e a doença ocular é a forma mais comum de manifestação da doença congênita. Embora a idade gestacional seja reconhecidamente um fator que influencia na gravidade da doença congênita, o aparecimento de sinais não oculares no momento do nascimento, como calcificações intracranianas, também são fatores de risco para o aparecimento posterior das manifestações oftalmológicas, por vezes tardias (15).

Embora seja freqüente na forma congênita, as lesões oculares são também importantes manifestações clínicas da toxoplasmose adquirida. Em Erechim (RS), dados pouco usuais foram levantados, desde 1990. Na ocasião, ao examinar uma amostra aleatória de mais de 1000 pessoas da zona rural, um grupo de pesquisadores encontrou uma prevalência de retinocoroidite toxoplásmica de 21,3% nos adultos daquela população. Como os relatos de infecção congênita na região não fogem dos apresentados no resto do país, fica clara a evidência de que trata-se de doença adquirida após o nascimento, na maioria das vezes (16). Uma parte dessa população estudada em 1990 que era soronegativa na época (130 pessoas) foi investigada em 1997 novamente, e uma taxa de soroconversão de 19,3% foi encontrada, com o aparecimento de lesões em 2 indivíduos (9,5%), outro achado que suporta essa teoria (3). Em 2001, em novos exames da mesma coorte, obteve-se uma taxa de soroconversão de 17%, com lesões oculares em 18% desses pacientes. A freqüência de soroconversão e aparecimento de lesões foi maior nas pessoas abaixo de 17 e acima de 50 anos. Ainda não há maneira eficiente de diferenciar, dentre os que são soropositivos, quem irá desenvolver lesões ou não (8).

2.2 Resposta Imune

Seguindo-se à infecção oral por *Toxoplasma* inicia-se uma resposta imune, inicialmente inespecífica, seguida de uma forte resposta celular Th1, além da produção de imunoglobulinas anti-*Toxoplasma*. Na maioria das vezes, esta resposta obriga o parasita a encistar-se nos tecidos, passando para um estágio de latência ou cronicidade, no qual é vigiado pelo sistema imunológico. Diversas situações imunossupressoras, como a AIDS, podem levar à reativação desses cistos e à recidiva da doença. O papel das células CD4⁺ e CD8⁺ no controle da infecção é inequívoco. Cepas não virulentas de *Toxoplasma* produzem doença quando inoculadas em animais com deficiências de linfócitos T. Bem demonstrado, igualmente, está o papel das citocinas no controle da toxoplasmose aguda e na vigilância do estágio de latência. Gazzinelli e colaboradores, em 1994, demonstraram o papel protetor do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e do interferon- γ (IFN- γ), através do tratamento de ratos infectados com anticorpos neutralizadores anti-TNF- α e anti-IFN- γ (17). Além deste, outros estudos (18, 19, 20, 21) comprovaram o papel central, principalmente do interferon gama, no controle das infecções por *Toxoplasma gondii*.

A secreção de citocinas inicia-se muito cedo na resposta ao parasita, e as células da imunidade inata como as células dendríticas e principalmente as *Natural Killers* (NKs) atuam como a fonte inicial de Interleucina-12 (IL-12) e IFN- γ (4). A IL-12 é uma citocina estimuladora, capaz de induzir a produção de IFN- γ pelas NKs e linfócitos T, sendo, portanto, requisito importante para a resistência ao parasita (22). Esta citocina igualmente influencia fortemente o caráter Th1 da resposta imune subsequente. Um estudo recente, mostrou também a capacidade da Interleucina-18 (IL-18) de aumentar a resistência ao *Toxoplasma*, mediante sua habilidade de estimular a produção de IL-12 (23). Esta cascata de citocinas (IL-18/IL-12/IFN- γ) é, sem dúvida, vital para o estabelecimento de uma resposta imune adequada, com o consequente controle da infecção.

O protozoário é capaz de ativar inespecificamente macrófagos e células NK, imediatamente após o primeiro encontro entre ele e o hospedeiro. Em ratos, a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ , na presença de sinais acessórios, como o TNF

- ? ou LPS, é necessária para o início da atividade citotóxica dos macrófagos (24). A destruição do *Toxoplasma* se dá através de vários mecanismos efetores, oxidativos ou não, incluindo a produção de monóxido de nitrogênio (NO), a limitação da disponibilidade do ferro intracelular e a produção da enzima 2,3-dioxigenase indolamina, sintetizada por macrófagos ativados, responsável pela quebra do triptofano intracelular, privando, dessa forma, o parasita de um aminoácido essencial (25). Um mecanismo dependente de oxigênio é também a maneira pela qual as células dendríticas também exercem papel efetor durante a resposta imune inespecífica ao *Toxoplasma* (20). A citocina IL-12 parece ser o mediador central da síntese inicial de IFN- γ pelas células NKs, o que acaba levando a ativação microbicida dos macrófagos (4). Na fase inicial da infecção, a resistência do organismo é, portanto, devida ao papel sinérgico dos macrófagos e das células NKs, sendo a citocina IFN - γ seu mediador mais importante.

A intensidade da resposta inata pode ser influenciada pelo gênero. Estudos mostraram uma maior rapidez na produção de IFN- γ e TNF- α em ratos machos infectados, em comparação com fêmeas da mesma espécie (26). Em relação ao impacto deste achado na epidemiologia da toxoplasmose ocular, foco deste trabalho, não há relato dessa associação nos trabalhos de um importante pesquisador brasileiro do tema, Dr. Cláudio Silveira (8).

A resposta inata também é a responsável pelo início da resposta específica, com a conversão de macrófagos em células apresentadoras de antígenos. Há uma forte migração dos linfócitos CD4+ para um padrão de resposta imune dito Th1, que acaba levando a mais produção de IFN- γ , além disso, as células CD8+, ativadas pela IL-2, exercem efeito citolítico contra os taquizoítos, formas de reprodução rápida do protozoário, encontradas nos tecidos durante a infecção aguda, ou contra células infectadas (4, 5, 24).

O estudo das citocinas produzidas durante a resposta imune ao *Toxoplasma* também desperta muito interesse e revela dados interessantes. Pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP), realizaram estudos com amostras de pacientes de Erechim, descobrindo diferenças no perfil de citocinas secretadas por células mononucleares de 177 pacientes, após estímulo com antígenos de *Toxoplasma*. Esses indivíduos estavam divididos em grupos diferentes, conforme seu perfil

sorológico ou a existência de lesões oculares, adquiridas ou congênitas. Os resultados mostraram que nos soropositivos sem lesão, há maior produção de IL-12 e IFN- γ do que nos pacientes com lesão, além de demonstrar que nos pacientes que adquiriram a toxoplasmose após o nascimento e desenvolveram lesões oculares, há maior produção de IL-10 do que nos indivíduos com lesões adquiridas de forma congênita. Em ambas as formas de lesão havia mais secreção de IL-1 e TNF- α do que nos assintomáticos, revelando que essas citocinas podem estar envolvidas na patogênese da lesão (6, 7). Esses resultados estimulam novos estudos no sentido de tentar utilizar essas diferentes citocinas no acompanhamento ou no prognóstico dos pacientes com lesão ocular toxoplásmica.

Embora o papel protetor da IL-12 e do IFN- γ esteja bem determinado, a participação do TNF- α na infecção permanece controverso. Estudos em modelos animais revelaram resultados conflitantes. Esta citocina pró-inflamatória é um potente ativador de macrófagos, mas a sua atividade principal na toxoplasmose parece ser a de potencializar os efeitos da IL-12 nas células NK (4). Quando células infectadas por *Toxoplasma* são cultivadas na presença de IFN- γ e TNF- α , ocorrem efeitos opostos, com a primeira citocina inibindo a proliferação do protozoário e a segunda aumentando essa multiplicação. Como a secreção de TNF- α parece permanecer constante em situações de imunossupressão, como a AIDS, enquanto os níveis de IFN- γ caem, esse pode ser um mecanismo envolvido na reativação dos cistos na infecção latente (27).

Os mecanismos imunológicos que estão por trás da manutenção da vigilância sobre os cistos teciduais e a eventual reativação dos mesmos, interessam particularmente a nosso estudo, já que as manifestações oculares são freqüentemente decorrentes de uma reativação de infecções crônicas. Estudos em ratos mostraram que a depleção das células CD4+, e a neutralização tanto do IFN- γ quanto do TNF- α são capazes de aumentar a severidade das infecções oculares (17). Estudos posteriores demonstraram que as duas citocinas em questão podem induzir a produção de NO, sendo esse último o responsável pelo controle da infecção ocular (28).

O papel da IL-12 parece ser importante na manutenção das infecções crônicas de toxoplasmose sob vigilância. Em ratos infectados, deficientes dessa citocina, que estavam recebendo doses exógenas da mesma, a retirada da IL-12 levou à morte dos mesmos por encefalite, devido a reativação de cistos cerebrais. A produção constante dessa citocina parece ser fundamental na manutenção da resposta Th1 montada contra o patógeno (29, 30).

Uma estratégia utilizada pelo *Toxoplasma* para confundir o sistema imune e manter-se encistado envolve a mudança na expressão de seus antígenos de superfície. Assim, taquizoítos, formas de reprodução rápida e bradizoítos, formas de reprodução lenta do protozoário, contidas nos cistos, exibem proteínas de superfície parecidas mas antigenicamente distintas, o que favorece sua persistência no organismo do hospedeiro (31).

É interessante considerar, igualmente, que quando os macrófagos tornam-se infectados pelo protozoário, perdem a capacidade de produzir TNF- α e ocorre um atraso na síntese de IL-12, graças ao bloqueio de fatores nucleares de transcrição, como o STAT-1. Esta subversão na função do macrófago parece vital para uma expansão inicial dos taquizoítos do parasita, assegurando a posterior formação de cistos, e a conseqüente cronificação. Sem dúvida, o protozoário desenvolveu uma habilidade de convivência em equilíbrio com os hospedeiros. O equilíbrio entre a supressão da resposta imune e a sua ativação correlaciona-se com a presença de milhões de pessoas assintomáticas e cronicamente infectadas pela toxoplasmose no mundo (32).

Embora se conheça a resposta imunológica contra o *Toxoplasma gondii* com razoável profundidade, não se sabe ainda até que ponto poderá ser usado este conhecimento na abordagem diagnóstica e/ou prognóstica aos pacientes acometidos pelas várias formas da doença.

2.3 Quantificação de Citocinas

Importantes mediadores da resposta imune, as citocinas e seus receptores, têm sido muito estudadas nos últimos anos. Métodos laboratoriais desenvolveram-se

para a quantificação de muitas delas, e muito conhecimento científico tem se acumulado sobre o assunto. Embora já se use rotineiramente em algumas instituições, a validade da dosagem de citocinas está longe de ser unanimidade.

As citocinas podem ser definidas como uma grande família de proteínas solúveis de baixo peso molecular, envolvidas na regulação da atividade celular, particularmente, mas não exclusivamente, dentro do sistema imune (33). Elas funcionam como mensageiros químicos, de maneira bastante similar aos hormônios. Embora responsáveis por efeitos biológicos muito distintos, as citocinas compartilham uma série de características comuns: todas elas são pleotrópicas, isto é, tem a habilidade de agir contra variados alvos celulares, usualmente através de seus receptores; são redundantes, de modo que muitos efeitos biológicos característicos de uma podem ser executados por várias outras; são capazes de regular sua própria produção, de maneira autócrina ou parácrina, em resposta a estímulos do meio e exercem seus efeitos rapidamente depois de liberadas pelas células, possuindo meia-vidas curtas. Embora muitas atuem mais localmente no seu sítio de liberação, algumas alcançam a corrente circulatória, podendo atuar num modelo tipicamente endócrino (34). As citocinas classificam-se em três grandes grupos funcionais:

?? Citocinas que regulam a resposta imune inata;

?? Citocinas que regulam a resposta imune adaptativa;

?? Citocinas que estimulam a hematopoiese.

Embora a classificação acima tenha aplicação didática, clinicamente o que mais interessa é relacionar as citocinas com os dois principais tipos de linfócitos T CD4: Th1 e Th2. Como este tem sido o foco da maioria dos trabalhos conduzidos nesta área, optaremos por classificar a citocina baseado no perfil a que pertence e não na função que exerce.

De fato, a migração da célula T auxiliar (Th) CD4 de um estágio inicial (Th0) para um perfil Th1 ou Th2 tem um impacto muito grande na resposta imune subsequente e existe uma secreção de citocinas características de cada um desses fenótipos. Assim, inclui-se entre as citocinas de perfil Th1: Interferon- γ (IFN- γ), Fator

de Necrose Tumoral- β (TNF- β) e Interleucina-2 (IL-2), e as características do tipo Th2 são: Interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) (35). Ambos fenótipos podem produzir Interleucina-3 (IL-3) (34). Funcionalmente, os linfócitos Th1 estão associados à imunidade celular e os Th2 à imunidade humoral. Convém ressaltar que o desvio da célula T auxiliar para um dos dois tipos depende de muitos fatores, entre os quais, a sua interação com a célula apresentadora de antígenos, também ela uma secretora de citocinas. Ocorre, portanto, uma cascata anterior, pro-inflamatória ou inespecífica, que igualmente está mais associada a um dos dois fenótipos de linfócitos Th.

A detecção da presença de citocinas em fluidos biológicos ou em tecidos, monitorando as mudanças dos perfis durante a doença aumentou a capacidade de entendimento do papel destas moléculas. Em situações normais, as citocinas não são normalmente detectáveis nos fluidos biológicos ou nos tecidos, embora seus receptores estejam geralmente presentes. O encontro e a quantificação destas proteínas em situações patológicas podem ajudar a definir estágios das doenças ou representar um alvo para modulação terapêutica (36). Vários métodos têm sido propostos para a quantificação das diversas citocinas. Dentre eles destacam-se a detecção direta das proteínas por imunoenaios, os bioensaios e, mais recentemente, as técnicas moleculares e de citometria de fluxo.

2.3.1 Ensaios biológicos para citocinas

Os chamados bioensaios são considerados o padrão-ouro para detecção e quantificação das citocinas (36). Como tratam-se de técnicas complexas e demoradas, há dificuldade em sua implantação na rotina dos laboratórios. Baseados na detecção da atividade biológica gerada pela citocina são ensaios extremamente sensíveis, embora com baixa especificidade, devido à redundância, propriedade que caracteriza a capacidade que várias citocinas tem de gerar o mesmo efeito biológico. Os bioensaios freqüentemente são realizados com linhagens de células imortalizadas. Outros pesquisadores ou fornecedores especializados são as fontes destas linhagens celulares e é necessário o preparo do laboratório para trabalhar com cultura de tecidos, o que requer investimento razoável com equipamentos (36).

Os ensaios que detectam proliferação são os mais versáteis para a maioria das citocinas. Nestes ensaios estimam-se os níveis de citocina pela capacidade de estimular ou inibir a proliferação celular, medida usualmente pela incorporação de timidina radioativa no DNA (37).

2.3.2 Imunoensaios

A rapidez e a facilidade dos imunoensaios os tornam mais aplicáveis na rotina do que os bioensaios. Eles podem também distinguir citocinas de efeitos biológicos semelhantes, como os Fatores de Necrose Tumoral (TNFs) α e β (37). Os mais largamente utilizados são os ensaios imunoenzimáticos (ELISAs). Anticorpos anti-citocinas estão sensibilizando placas de poliestireno capturam as citocinas presentes nas amostras e, após lavagem, um segundo anticorpo marcado com enzima (conjugado) liga-se, formando um “sanduíche”, revelado e quantificado pela adição de um substrato apropriado, que se torna corado pela ação da enzima. A inclusão de biotina e avidina podem contribuir para aumentar a sensibilidade dos ensaios (37). Desta forma, citocinas específicas podem ser quantificadas, tanto diretamente no soro, quanto em sobrenadante de células, método freqüentemente usado no estudo dos perfis de citocinas em doenças infecciosas.

O maior problema dos imunoensaios é que eles podem detectar citocinas biologicamente inativas ou apenas fragmentos delas. Este fato pode ser relevante em amostras biologicamente complexas como o soro, dificultando a correlação da atividade biológica detectada nos bioensaios com a quantificação estimada por imunoensaios (37). Além disso, o fato das citocinas muitas vezes circularem ligadas a receptores solúveis ou proteínas carreadoras, pode inibir a ação dos anticorpos utilizados como reagentes nos imunoensaios, capazes apenas de detectar a fração livre das moléculas (38). Comparações entre os métodos de quantificação direta no soro com métodos baseados na demonstração celular das mesmas citocinas demonstraram a fraca correlação entre os níveis séricos e celulares, fato que deve ser considerado quando está se interpretando o resultado de uma quantificação sérica de uma determinada citocina (39). Em uma situação ideal, a utilização de métodos distintos pode ser necessária para confirmar o envolvimento da citocina em

um determinado processo (37). As principais vantagens da determinação sérica são a facilidade da obtenção da amostra e a rapidez dos ensaios.

2.3.3 Citometria de fluxo e técnicas moleculares

São as técnicas mais recentemente desenvolvidas para a quantificação de citocinas. A citometria de fluxo baseia-se na detecção direta de citocinas intracelulares graças à incorporação de um anticorpo marcado com fluorocromo, após períodos curtos de ativação ou estímulos variados (36). A técnica leva em conta o fato de que leucócitos não estimulados freqüentemente não expressam citocinas. A quantificação do RNA mensageiro (mRNA) específico, a chamada expressão gênica, é outra alternativa recente disponível. A adaptação de técnicas de PCR com transcrição reversa (PCR-RT) para este fim torna possível a detecção de uma única molécula do RNAm, graças à amplificação exponencial proporcionada pelo método. A detecção pode se dar em culturas de células mononucleares purificados, estimulados com antígenos específicos ou em amostras de sangue total.

Ambas técnicas são altamente sensíveis, o que pode levar a dificuldades em suas interpretações, já que pode haver dificuldade em valorizar clinicamente resultados extremamente baixos na expressão celular de determinadas citocinas.

2.4 Quantificações Séricas de Citocinas

Não há dúvida de que a determinação dos níveis de citocinas diretamente no soro e/ou plasma dos pacientes é a forma mais rápida e prática de avaliação laboratorial dessas moléculas. Embora com as ressalvas já relatadas em relação à possível falta de correlação sérica/celular, revisamos a seguir diversos trabalhos que propuseram algum tipo de aplicação clínica para a quantificação sérica de citocinas, relatando suas conclusões e apontando tendências observadas em cada um dos sub-grupos a seguir:

Talvez uma das associações clínicas mais fortemente estabelecida em relação às citocinas seja a correlação entre a IL-6 e a sepse, principalmente a

neonatal. Uma recente revisão sobre o tema, a aponta como um dos mais promissores entre os novos marcadores estudados (40). Embora alguns problemas, como a flutuação dos valores no período pós-natal, que ocasionou discordância entre valores de “cut-off” em vários trabalhos citados nesta revisão, os autores acreditam tratar-se de um teste prognóstico útil, principalmente no seguimento de complicações no período perinatal. Em um trabalho experimental sobre tema semelhante, a IL-6 sérica foi quantificada em 115 pacientes com infecções agudas diversas na admissão de um hospital sueco (41). O teste demonstrou, neste estudo, um Valor Preditivo Positivo (VPP) de 100%, na diferenciação entre infecções bacterianas e virais. Em outro estudo prospectivo, soros de 71 gestantes com ruptura prematura de membranas foram avaliados na busca de um preditor precoce de infecção neonatal. A IL-6, num “cutt-off” de 11,0 pg/ml demonstrou uma sensibilidade de 81% e especificidade de 76%, valores melhores do que a Proteína C Reativa (PCR), tradicional marcador inflamatório, que obteve 56% e 76%, respectivamente (42).

Em casos de doenças infecciosas crônicas, como a doença de Chagas, a correlação parece ser menor. Pesquisadores brasileiros (43) estudaram níveis séricos de IL-2, IFN- γ e TNF- α em 91 pacientes com diversas formas da doença. Os resultados obtidos não diferiram estatisticamente dos obtidos no grupo controle, embora níveis significativamente mais elevados de IL-2 tenham sido encontrados em pacientes não controlados, em relação aos compensados.

Em pacientes transplantados, a determinação sérica de citocinas pode auxiliar como preditor de infecção por Citomegalovirus (CMV). Em um trabalho prospectivo com 75 transplantados de medula óssea, Humar e colaboradores, obtiveram um “odds ratio” de 1,7 para cada 100 pg/ml de aumento na IL-6 sérica dos pacientes, levando-os a sugerir o ensaio como uma ferramenta de diagnóstico precoce das infecções por CMV neste tipo de paciente (44).

Estudando 28 crianças com Doença Celíaca, com ou sem tratamento, em comparação com um grupo de 26 controles sadios, pesquisadores da USP, relataram níveis significativamente mais elevados tanto de IL-6 quanto do receptor solúvel de IL-2 no soro das crianças não tratadas, quando comparados com o grupo tratado e com o controle (45). A quantificação dessas moléculas poderia servir,

então, como marcadores não invasivos da atividade da doença e da resposta ao tratamento.

Na doença de Graves, o perfil sérico das citocinas têm sido objeto de estudo de diversos centros. Em um estudo recente com 84 pacientes, Salvi e colaboradores descreveram aumento significativo de IL-6 e seu receptor solúvel nos pacientes com oftalmopatia, fato também descrito em outro trabalho, que estudou 62 pacientes com doença ocular e 62 controles sadios (46, 47).

Em um estudo realizado em Hong Kong, níveis séricos da citocina pro-inflamatória IL-18 estavam significativamente elevados em pacientes lúpicas com doença renal em relação a pacientes sem comprometimento renal e controles sadios pareados por gênero e idade. Os valores da citocina correlacionavam, igualmente, com os de Monóxido de Nitrogênio (NO) plasmático nos mesmos pacientes, levando os autores a sugerir que este possa ser um alvo potencial para futuros tratamentos da doença (48).

Estudando a etiologia da caquexia nos pacientes com câncer, pesquisadores italianos, encontraram correlação negativa entre níveis séricos de IL-6 e TNF- α e leptina, hormônio que age no controle da ingesta alimentar, podendo constituir-se em marcadores do estado nutricional dos pacientes (49). Em pacientes com adenocarcinoma de pulmão, a determinação sérica de citocinas que definissem grupos Th1 e Th2, mostrou-se útil no seguimento dos pacientes, já que aqueles com níveis elevados de IL-4 (Th2), tiveram menor número de recorrências, num período de dois anos de acompanhamento, podendo demonstrar a existência de uma resposta imune humoral anti-tumor (50).

Na toxoplasmose em particular, a maioria dos estudos que demonstraram o papel protetor das citocinas foram realizados utilizando-se estudos de proliferação celular (6,7). Um trabalho interessante detectou altos níveis de IFN- γ no soro de pacientes imunocompetentes com a forma linfadenopática da doença, mas não em pacientes HIV positivos com encefalite toxoplásmica, revelando o potencial da investigação sérica das citocinas durante os episódios agudos da doença (51).

Embora muito tenha se estudado nos últimos anos, não há consensos fortemente estabelecidos quanto às reais possibilidades de aplicação clínica dos

testes séricos de citocinas. Embora certamente a quantificação sérica não seja a melhor maneira de determinar o papel das citocinas nas diversas patologias estudadas, o fato de utilizar-se de uma amostra de fácil obtenção e uma metodologia rápida e acessível como o ELISA, é muito tentador buscar aplicações clínicas para os ensaios séricos, já que as demais maneiras de quantificação de citocinas, como os bioensaios ou os testes moleculares, são acessíveis a um número limitado de laboratórios. Sem dúvida, trata-se de um campo promissor da imunologia, que pode evoluir, tanto com novos estudos, quanto com a melhoria nos próprios testes, para que a padronização possa trazer reprodutibilidade e maior correlação entre os níveis séricos e celulares das citocinas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Descrever a variabilidade dos níveis séricos das citocinas interleucina 12 (IL-12) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-?) em diferentes formas de apresentação da toxoplasmose e em suas recidivas;

3.2 Objetivo Específico

Comparar esses níveis entre os grupos de pacientes (toxoplasmose recente, lesão ocular cicatrizada, lesão ocular recidivante, toxoplasmose crônica) e os controles soronegativos;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram analisadas amostras de soro, obtidas através de punção venosa de pacientes, oriundos da Clínica Oftalmológica Silveira de Erechim-RS e do Laboratório Analic Ltda em Concórdia – SC, que foram classificados nos seguintes grupos:

??Toxoplasmose Recente: Pacientes com resultados sorológicos que demonstrem infecção ativa (Anticorpos IgM com títulos iguais ou superiores a 4,0 no método imunoenzimático de micropartículas (MEIA?), com ou sem apresentação clínica clássica (linfadenopatia cervical, fadiga, com ou sem febre).

??Toxoplasmose Ocular Cicatrizada: Pacientes apresentando lesão cicatrizada sugestiva, mais sorologia positiva para anticorpos anti-Toxoplasma em qualquer título, excluindo-se diagnósticos diferenciais.

??Toxoplasmose Ocular recidivante: Pacientes que apresentem lesões oculares recidivantes, com a coleta realizada no momento da reativação das lesões.

??Toxoplasmose “crônica”: Indivíduos que apresentem-se assintomáticos, porém com resultados sorológicos (presença apenas de anticorpos IgG) característicos de contato anterior com o parasita.

??Grupo Controle: Indivíduos assintomáticos e com resultados negativos para a sorologia anti-Toxoplasma, indicando ausência de contato com o protozoário.

A seleção dos três primeiros grupos, baseada nos critérios descritos, foi realizada pelo Dr. Cláudio Silveira, médico oftalmologista, colaborador deste projeto.

As amostras dos dois últimos grupos, foram oriundas do Laboratório Analic Ltda, de Concórdia-SC.

As amostras foram congeladas e transportadas até o local de realização dos ensaios em caixas térmicas com gelo.

4.2 Testes Sorológicos

Os resultados da sorologia para toxoplasmose destes indivíduos foram obtidos pelo método imunoenzimático de micropartículas (MEIA®), utilizado na rotina do laboratório, que tem o pesquisador como seu responsável técnico. Foi considerado critério de exclusão para qualquer grupo a presença de anticorpos anti-HIV, exame que foi realizado através da metodologia MEIA®, igualmente no Laboratório Analic Ltda.

4.3 Quantificação de IL-12 e TNF-?

As citocinas foram quantificadas através da técnica de ELISA utilizando-se para tanto os kits: optEIA Human IL-12 p70 set cat. n°55183 e optEIA Human TNF-? set cat. n°555212 (Pharmingen, San Diego, Ca, USA), seguindo as recomendações do fabricante, no laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUC – RS.

4.4 Análise Estatística

Foram analisados os dados obtidos nos grupos casos e controles, a um nível de significância ? de 0,05, através dos testes estatísticos de análise de variância, com teste de *post hoc* de Tukey para variáveis quantitativas e teste do chi-quadrado para variáveis qualitativas. Em casos de assimetria foram usadas transformações logarítmicas dos valores antes de proceder as análises, realizadas através do programa SPSS® versão 12.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição da Amostra

Foram obtidas 137 amostras de soro de pacientes com diversas apresentações clínicas de toxoplasmose e de controles soronegativos. 69 desses eram do gênero feminino (50,4%) e 68 (49,6%) do gênero masculino. A idade média dos participantes desse estudo foi de 27,95 anos, com desvio padrão de 12,63. As idades variaram de 3 a 77 anos. Nenhum indivíduo foi reagente para HIV, não havendo exclusão por este critério, o único que foi estabelecido para o trabalho. Na Tabela 1, uma descrição da amostra, já com a divisão dos grupos estudados.

Tabela 1 - Descrição dos grupos, com gênero e faixas etária

Grupo	Número de amostras	Gênero	Idade (anos) média (d.p)
Toxoplasmose recente	14	42,9% Masculino	27,3 (15,3)
Lesão ocular cicatrizada	30	56,7% Masculino	27,5 (14,5)
Lesão ocular recidivante	30	53,3% Masculino	29 (14,7)
Toxoplasmose crônica	32	40,6% Masculino	30,2 (10,3)
Controle	31	51,6% Masculino	25,3 (9,1)
Valor de p		0,72	0,62

Como consideramos as variáveis idade e gênero como fatores de confusão, procuramos obter grupos homogêneos para esses dois critérios, como ficou demonstrado acima.

5.2 Quantificação das Citocinas nos Grupos Estudados

Em relação aos níveis séricos de IL-12 e TNF-a, observamos que muitos dos indivíduos estudados apresentaram níveis inferiores a sensibilidade dos kits utilizados (7,8 pg/ml). Foram 109 pacientes, no caso do TNF-a e 85 no caso da IL-12. Para efeitos dos cálculos estatísticos, esses níveis inferiores foram considerados como 3,9, sendo esse o menor valor numérico atribuído às duas variáveis. O valor máximo obtido no estudo foi de 1913 pg/ml para a IL-12 e de 1448 pg/ml para o TNF-a. Nos dois casos, os pacientes pertenciam ao grupo da lesão ocular cicatrizada. Em virtude dessa grande variabilidade observada nos níveis das citocinas, as distribuições dessas variáveis dentro dos grupos ficou assimétrica, sendo necessário o uso da mediana e da amplitude interquartis para a descrição das variáveis e da transformação logarítmica dos dados antes da análise de variância. A Tabela 2 descreve o comportamento dos níveis séricos das duas citocinas estudadas dentro dos grupos e o resultado da análise estatística.

Tabela 2 - Descrição dos resultados das duas citocinas estudadas, IL-12 e TNF-a em todos os grupos estudados

Grupos	IL-12 (pg/ml) mediana e amplitude interquartis 25-75	TNF-a (pg/ml) mediana e amplitude interquartis 25-75
Toxoplasmose recente	3,9 (3,9 a 9,075) ^a	3,9 (3,9 a 3,9) ^a
Lesão ocular cicatrizada	15,6 (8,3 a 97,2) ^b	3,9 (3,9 a 7,8) ^a
Lesão ocular recidiva	3,9 (3,9 a 14,5) ^a	3,9 (3,9 a 3,9) ^a
Toxoplasmose crônica	3,9 (3,9 a 3,9) ^a	3,9 (3,9 a 47,85) ^a
Controle	3,9 (3,9 a 3,9) ^a	3,9 (3,9 a 3,9) ^a

^{ab} Letras índice não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,005$).

O grupo de pacientes com lesões oculares cicatrizadas apresentou níveis de IL-12 maiores do que todos os outros grupos, a um nível de significância estatística a abaixo de 0,05. A grande variabilidade obtida nos resultados aponta para uma dificuldade no emprego desses testes na rotina laboratorial, principalmente para fins diagnósticos. Para fins de visualização, optamos por apresentar, nas Figuras 1 e 2, a representação gráfica das médias dos grupos após transformação logarítmica. Embora não sejam os valores absolutos das variáveis, é a melhor maneira de demonstrar a diferença obtida no grupo de pacientes com lesão ocular cicatrizada.

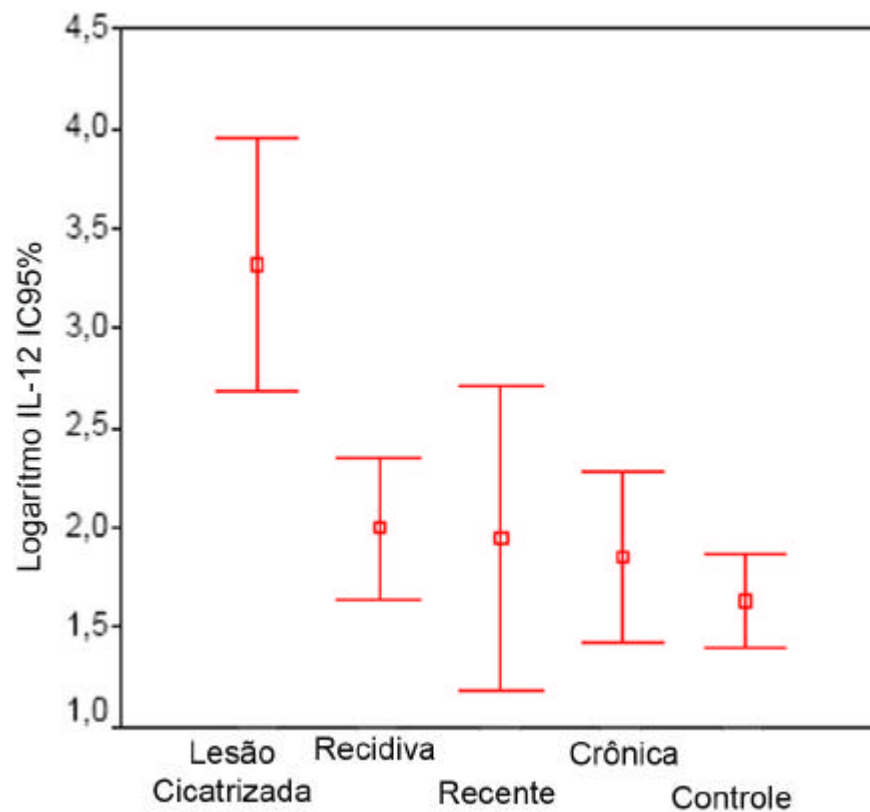


Figura 1 – Logaritmo das médias de IL-12 (IC95%) nos grupos estudados

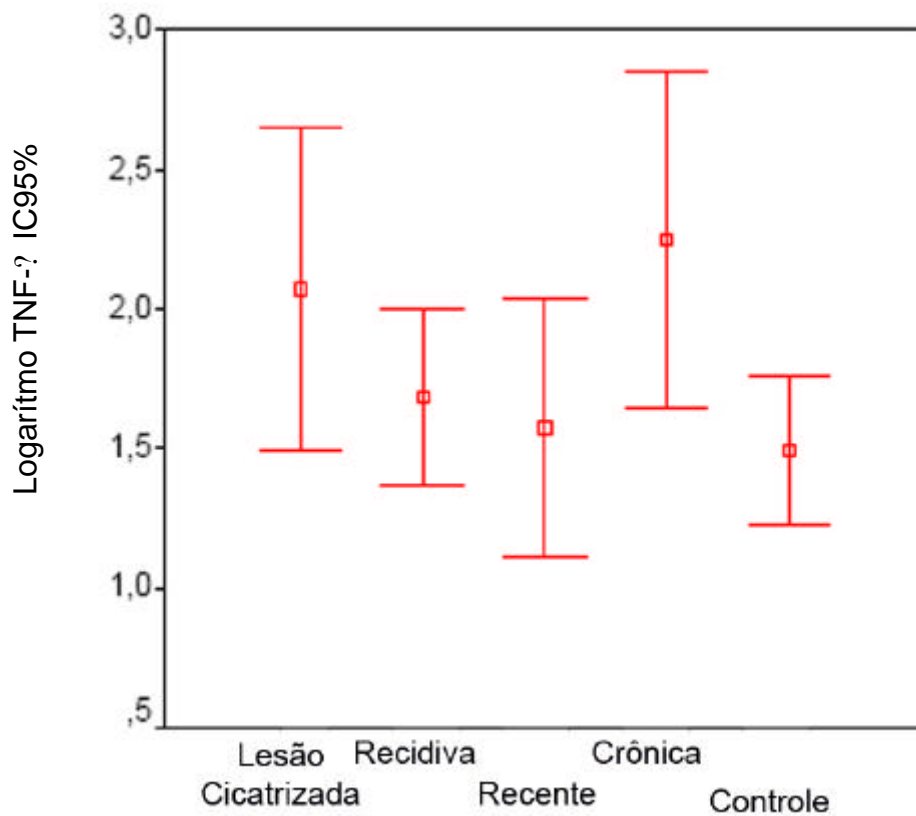


Figura 2 – Logaritmo das médias de TNF- α (IC95%) nos grupos estudados

Como apresentado na Figura 2, as concentrações séricas de TNF- α não tiveram comportamentos estatisticamente diferentes nos grupos de pacientes estudados, revelando uma falta de correlação dos níveis séricos desta citocina com as diferentes apresentações clínicas de toxoplasmose incluídas nesse estudo.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram níveis séricos de IL-12 significativamente mais altos nos pacientes que tinham lesão ocular cicatrizada, quando comparados com todas as outras formas de apresentação da toxoplasmose estudadas (recente, recidivas oculares e crônica) e com os controles soronegativos. Esse achado não confirma os resultados de trabalhos anteriores, que mediram o perfil de citocinas em sobrenadantes de culturas de mononucleares, em que pacientes soropositivos sem lesão (toxoplasmose crônica) apresentaram valores maiores de IL-12 que os pacientes com lesão ocular (6, 7). A diferença entre as metodologias empregadas pode ser uma das explicações para essa discordância. Sabidamente, uma das limitações dos ensaios séricos de citocinas é a dificuldade de reproduzir na circulação os eventos celulares que estão acontecendo no local da lesão (39). Por outro lado esse achado, se confirmado em outras ocasiões e com outra casuística, abre uma perspectiva interessante para futuras aplicações clínicas. Caso os níveis séricos de IL-12 sejam realmente maiores em pacientes que tem a lesão cicatrizada, quando comparadas com os que estão tendo recidivas, a determinação sérica dessa citocina poderia servir como um marcador prognóstico. Para isso, temos que responder à questão: no momento da primeira lesão, os pacientes que terão recidivas têm níveis de IL-12 menores do que os que resolverão a lesão sem novos episódios futuros?

A manutenção de níveis suficientes de IL-12 é necessária para a vigilância do sistema imune contra os cistos de toxoplasmose (29). A demonstração de que os níveis de IL-12 podem ser medidos diretamente no soro dos pacientes, sem a necessidade de ensaios mais elaborados e inacessíveis aos laboratórios de rotina, é um achado interessante desse estudo. Esses resultados incentivam trabalhos adicionais, preferencialmente estudos de coorte, para que, acompanhando a cinética da variação sérica da IL-12 possamos ter mais clareza sobre a possível aplicação clínica do ensaio, como teste prognóstico. Nossos achados confirmam conclusões de revisões realizadas sobre a aplicabilidade clínica das determinações séricas de citocinas, que sugerem que apenas em situações de cronicidade poderia haver

níveis demonstráveis desses mediadores no soro dos pacientes (37). Embora os pacientes crônicos sem lesão ocular não tenham apresentado níveis séricos elevados das citocinas estudadas, a necessidade de manter a lesão ocular sob vigilância, com uma secreção constante de IL-12 no microambiente celular, pode estar relacionada com o aparecimento de níveis séricos mais elevados dessa citocina nos pacientes com lesões oculares cicatrizadas.

Por outro lado, os resultados obtidos com o TNF-a nos permitem dizer que a determinação sérica dessa citocina parece apresentar pouca utilidade na toxoplasmose. A maioria dos pacientes estudados não teve níveis detectáveis dessa citocina, ficando com valores abaixo do limiar de sensibilidade do kit utilizado. Como não separamos os pacientes com lesão adquirida da congênita, talvez diminuíssemos a possibilidade de obter alguma diferença entre os grupos. Nos estudos de proliferação celular o TNF-a mostrou-se como uma espécie de marcador da lesão adquirida (6,7).

Tanto nas determinações de IL-12 quanto nas de TNF-a chamou-nos a atenção a grande amplitude dos dados. A assimetria das distribuições dessas variáveis, além de dificultar a análise estatística, aponta para uma possível limitação de um futuro uso na rotina clínica: todo o analito que possui uma grande variação inter-individual tem uma aplicação prática limitada, principalmente para uso diagnóstico. Como a possível aplicação da determinação sérica da IL-12 seja prognóstico, seria útil determinar, em estudos futuros, de coorte, a variabilidade intra-individual dessa citocina.

Uma outra limitação do estudo e da própria utilização prática das citocinas é a falta de especificidade. A resposta imune celular é dirigida contra um grande número de patógenos e em diversas situações biológicas. Para evitar que esse fosse um fator de confusão de nossos resultados, procuramos parear nossos grupos nas variáveis gênero e idade. Por serem indivíduos jovens, acreditamos que seja pequena a influência de infecções crônicas simultâneas, mas nenhum critério de exclusão específico foi aplicado e os resultados estão sujeitos a essas variações não específicas.

Assim, concluímos que há possibilidade de utilização do ensaio de determinação sérica da IL-12 nos pacientes com toxoplasmose, embora os resultados obtidos podem não correlacionar com os conseguidos por metodologias que medem citocinas em sobrenadantes celulares após estímulo antigênico. Em nosso estudo, os indivíduos com lesão ocular cicatrizada apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-12, quando comparados aos pacientes de outros grupos e aos controles saudáveis. Esse achado pode refletir a necessidade biológica de manutenção de produção dessa citocina para vigilância dos cistos teciduais do *Toxoplasma*. Por outro lado, os resultados ora apresentados podem apontar para uma futura aplicação da quantificação sérica da citocina como um teste prognóstico, possível marcador de recidivas de lesões oculares. Essas questões somente estudos posteriores poderão responder. Tais estudos devem ser delineados de maneira a possibilitar o acompanhamento da cinética da IL-12 sérica em diferentes momentos da evolução da doença ocular.

7 CONCLUSÕES

Os níveis séricos das citocinas IL-12 e TNF-a apresentam grande variabilidade nas diferentes apresentações clínicas de toxoplasmose estudadas: lesão ocular adquirida, toxoplasmose crônica, lesão ocular cicatrizada e toxoplasmose recente. Embora a maioria dos indivíduos estudados tenha apresentado níveis inferiores a 7,8 pg/ml (limiar de sensibilidade dos kits utilizados), nos dois casos foi observado uma grande dispersão dos dados, o que caracterizou distribuições assimétricas. Todos os grupos estudados apresentaram medianas de 3,9 pg/ml para as duas citocinas estudadas, com exceção do grupo de pacientes com lesão ocular adquirida, no qual foi obtido uma mediana de 15,6 pg/ml, para a IL-12 sérica.

Os níveis séricos de IL-12 foram significativamente maiores nos pacientes com lesão toxoplásmica ocular cicatrizada do que em pacientes pertencentes aos outros grupos estudados e do que nos controles soronegativos.

Os dados obtidos com a quantificação sérica de IL-12 e TNF-a não podem ser comparados com aqueles obtidos por ensaios que medem as mesmas citocinas em sobrenadantes de células mononucleares, pois apresentam perfis diferentes em situações clínicas semelhantes;

A IL-12 pode ser medida diretamente no soro de pacientes com lesão ocular toxoplásmica cicatrizada, sem a necessidade de ensaios mais elaborados e inacessíveis aos laboratórios de rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neto EC, Anele E, Rubim R, et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *International Journal of Epidemiology* 2000; 29: 941-47.
2. Silveira C, Belfort R Jr, Burnier M Jr, Nussenblatt R. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. *American Journal of Ophthalmology* 1998; 106: 362-64.
3. Silveira C, Belfort R Jr, Mucioli C, et al. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *American Journal of Ophthalmology* 2001; 131: 351-54.
4. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11: 569-88.
5. Subauste CS, Remington JS. Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Current Opinion in Immunology* 1993; 5: 532-37.
6. Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, et al. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 181: 2018-22.
7. Vallochi AL, Nakamura MV, Schlesinger MC, et al. Ocular toxoplasmosis: more than just meets the eye. *Scandinavian Journal of Immunology* 2002; 53: 1-5.
8. Silveira CAM. *Toxoplasmose: dúvidas e controvérsias*. Erechim/RS: Edifapes, 2002.
9. Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *British Medical Journal* 2000; 321: 142-7.
10. Varella IS, Wagner MB, Darella AC, et al. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *Jornal de Pediatria* 2003; 79: 69-74.
11. Spalding SM, Amendoeira MRR, Klein CH, Ribeiro LC. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in south of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2005; 38: 173-77.
12. Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *British Medical Journal* 1999; 318: 1511-14.
13. Carvalheiro CG, Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, et al. Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic confirmation in asymptomatic newborn infants. *Epidemiology and Infection* 2005; 133: 485-91.

14. Mozzatto L, Procianoy RS. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2003; 45: 147-51.
15. Binquet C, Wallon M, Quantin C, et al. Prognostic factors for the long-term development of ocular lesions in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Epidemiology and Infection* 2003; 131: 1157-68.
16. Glassner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *American Journal of Ophthalmology* 1992; 14: 136-44.
17. Gazzinelli RT, Brézin A, Li Q, et al. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- α and IFN- γ . *Experimental Parasitology* 1994; 78: 217-29.
18. Subauste CS, Remington JS. Role of gamma interferon in *Toxoplasma gondii* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991; 10: 58-67.
19. Olle P, Bessieres MH, Malecaze F, Seguela JP. The evolution of ocular toxoplasmosis in anti-interferon gamma treated mice. *Current Eye Research* 1996; 15: 701-07.
20. Aline F, Bout D, Dimier-Poisson I. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. *Infection and Immunity* 2002; 70: 2368-74.
21. Huang SFL, Kasper LH. CD4⁺ T cells in the pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. *Infection and Immunity* 2004; 72: 4966- 72.
22. Sher A, Collazzo C, Scanga C, et al. Induction and regulation of IL-12- dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunologic Research* 2003; 27: 521-28.
23. Cai G, Kastelein R, Hunter CA. Interleukin-18 (IL-18) enhances IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* 2000; 68: 6932-38.
24. Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Annali del Istituto Superiore della Sanità* 2004; 40: 71-80.
25. Nagineni CN, Pardhasaradhi K, Martins MC, et al. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infection and Immunity* 1996; 64: 4188-96.
26. Walker W, Roberts CW, Ferguson DJP, et al. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. *Infection and Immunity* 1997; 65: 1119-21.
27. Scheldegger A, Vonlaufen N, Naguleswaran A, et al. Differential effects of interferon - γ and tumor necrosis factor - α on *Toxoplasma gondii* proliferation in organotypic rat brain slice cultures. *Journal of Parasitology* 2005; 91: 307-15.
28. Roberts F, Roberts CW, Ferguson DJP, McLeod R. Inhibition of nitric oxide

production exacerbates chronic ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunology* 2000; 22: 1-5.

29. Yap G, Pesin M, Sher A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN- γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 2000; 165: 628-31

30. Sher A, Collazzo C, Scanga C, et al. Induction and regulation of IL-12 dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunologic Research* 2003; 3: 521-27.

31. Kim SK, Boothroyd JC. Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. *The Journal of Immunology* 2005; 174: 8038-48.

32. Denkers EY, Kim L, Butcher BA. In the belly of the beast: subversion of macrophage proinflammatory signaling cascades during *Toxoplasma gondii* infection. *Cellular Microbiology* 2003; 5: 75-83.

33. Delves PJ, Roitt IM. The immune system first of two parts. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343-1: 37-48.

34. O'Shea JJ, Frucht DM, Druckett CS. Cytokines and cytokine receptors. In: Rich RR, editor. *Clinical immunology principles and practice*. 2^a ed. Londres: Mosby; 2001. p. 12.1-12.21

35. Delves PJ, Roitt IM. The immune system second of two parts. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343-2: 108-20.

36. Hooks J, editor. Cytokines, chemokines and adhesion molecules. In: Rose N, Hamilton RG, Detrick B, editors. *Manual of clinical laboratory immunology*. 6^a ed. Washington: ASM Press; 2002. p. 319-56.

37. Whiteside TL. Assays for cytokines. In: Thompson A, Lotze M, editors. *The cytokine handbook*. 4^a ed. London: Academic Press; 2003. p. 1375-96.

38. Barnes A. Measurement of serum cytokines. *The Lancet* 1998; 352: 324-5.

39. Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, et al. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. *Clinical and Diagnostic laboratory Immunology* 2001; 8:1097-103.

40. Chiesa C, Panero A, Osborn JF et al. Diagnosis of neonatal sepsis: a clinical and laboratory challenge. *Clinical Chemistry* 2004; 50: 279-87.

41. Kulander L, Pauksens K, Venge P. Soluble adhesion molecules, cytokines and cellular markers in serum in patients with acute infections. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2001; 33: 290-300.

42. Pfeiffer KA, Reinsberg J, Rahmun A, et al. Clinical application of maternal serum cytokine determination in premature rupture of membranes – interleukin-6, an early predictor of neonatal infection? *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 1999; 78: 774-778.

43. Ward LS, Guariento ME, Fernandes GA, Maciel RMB. Serum cytokines in chronic Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1999; 32: 285-89.
44. Humar A, St Louis P, Mazzulli T, et al. Elevated serum cytokines are associated with cytomegalovirus infection and disease in bone marrow transplant recipients. *The Journal of Infectious Diseases* 1999; 179: 484-8.
45. Romaldini CC, Barbieri D, Okay TS, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α levels in children with celiac disease: response to treatment. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2002; 35: 513-17.
46. Salvi M, Pedrazzoni M, Girasole G, et al. Serum concentrations of proinflammatory cytokines in Graves' disease: effect of treatment, thyroid function, ophthalmopathy and cigarette smoking. *European Journal of Endocrinology* 2000; 143: 197-202.
47. Wakelkamp IM, Gerding MM, Van Der Meer JWC, et al. Both Th1 and Th2-derived cytokines in serum are elevated in Graves' ophthalmopathy. *Clinical and Experimental Immunology* 2000; 121: 453-57.
48. Wong CK, Ho CY, Li EK, et al. Elevated production of interleukin-18 is associated with renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Immunology* 2002; 130: 345-51.
49. Mantovani G, Macció A, Madeddu C, et al. Serum values of proinflammatory cytokines are inversely correlated with serum leptin levels in patients with advanced stage cancer at different sites. *Journal of Molecular Medicine* 2001; 79: 406-14.
50. Yamazaki K, Yano T, Kameyama T, et al. Clinical significance of serum Th1/Th2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Surgery* 2002; 131: 236-41.
51. Canessa A, Bono VD, Miletich F, Pistoia V. Serum cytokines in toxoplasmosis: increased levels of interferon- γ in immunocompetent patients with lymphadenopathy but not in AIDS patients with encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases* 1992; 165: 1168-70.

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA – 12 E FATOR
DE NECROSE TUMORAL – α EM DIFERENTES
APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DE TOXOPLASMOSE**

RODRIGO ECHEVERRIA FLORES

**PORTO ALEGRE, RS
2005**