

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO  
DESENVOLVIMENTO DE TOXOPLASMOSE OCULAR

**LIVIA MATTOS MARTINS**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
MARÇO DE 2015**

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO  
DESENVOLVIMENTO DE TOXOPLASMOSE OCULAR

**Lívia Mattos Martins**

Tese apresentada ao Centro de Biociências  
e Biotecnologia da Universidade Estadual  
do Norte Fluminense, como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Doutora em Biociências.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Lílian Maria Garcia Bahia de Oliveira

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**  
**Campos dos Goytacazes, RJ**  
**Março 2015**

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO  
DESENVOLVIMENTO DE TOXOPLASMOSE OCULAR

**LIVIA MATTOS MARTINS**

Tese apresentada ao Centro de Biociências  
e Biotecnologia da Universidade Estadual  
do Norte Fluminense, como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Doutora em Biociências.

Aprovada em 24 de março de 2015.

Comissão examinadora:

---

Raquel de Souza Gestinari (Doutora em Fisiopatologia Clínica e Experimental)  
– NUPEM/UFRJ (Macaé)

---

Renato Augusto da Matta (Doutor em Ciências) – LBCT/UENF

---

Elena Lassounskaia (Doutora em Imunologia) – LBR/UENF

---

Lilian Maria Garcia Bahia de Oliveira – (Doutora em Bioquímica e  
Imunologia ) - Orientadora - UFRJ (Macaé)

---

Alba Lucínia Peixoto Rangel – (Doutora em Biociências e Biotecnologia) - Co-  
Orientadora – LBR/UENF

**Dedico este trabalho, assim como todo meu amor, à minha  
mãe, minhas irmãs Lara e Laiza, minhas sobrinhas  
Nanda e Marina e ao meu cunhado Fernando.**

## AGRADECIMENTOS

Não existem palavras que possam explicar o quanto me sinto grata nesse momento. Gostaria de poder agradecer por cada oportunidade, por cada porta aberta, por cada conselho, por cada mão estendida, por cada incentivo e por cada sorriso que recebi ao longo do caminho. Sei que fatalmente vou esquecer alguém e peço minhas sinceras desculpas antecipadamente.

A minha orientadora Lilian por todas oportunidades de aprendizado e crescimento pessoal e profissional que recebi ao longo de todo esse tempo sob sua orientação.

A minha co-orientadora Alba, pela colaboração, pelas sugestões sempre preciosas, pela compreensão e especialmente pela amizade de todos os dias.

Aos professores Raquel Gestinari, Renato da Matta e Elena Lassounskaia pela gentileza de participarem da minha banca examinadora.

A Marcela, por ter aceitado revisar minha tese. Por ser uma pessoa tão generosa e competente. Por sempre estar disposta a me ajudar com toda boa vontade do mundo!

A Bianca e Flavia, companheiras de bancada, de campo e de vida.

Compartilhar com vocês a alegrias e sofrimentos de fazer um doutorado foi uma honra. Eu não poderia ter escolhido pessoas melhores para essa jornada. Aos demais colegas do laboratório: Rhonia, Rebeka, Maycon, Liliane e Ricardo por estarem disponíveis para ajudar sempre. Agradeço especialmente ao Ricardo, por ter realizado os exames fundoscópicos em todos os indivíduos participantes deste trabalho. Obrigada por toda ajuda e amizade que recebi de vocês ao longo desses anos.

A todos os colegas e funcionários do LBR e UENF. Um agradecimento especial à Juliana, por toda ajuda de sempre, por ter me ensinado a amar citometria, por toda amizade e carinho que recebi desde que cheguei. Aos técnicos do Biotério Maurício e Fábio, por sempre conseguirem mais camundongos quando era necessário.

A todos envolvidos na obtenção da bolsa do Doutorado-Sanduiche (PDSE). Ao Dr. Grigg, por ter me recebido em seu laboratório, por toda atenção, por tudo que aprendi em um espaço tão curto de tempo. A todos da *Molecular Parasitology Unit*, LPD, NIH: Alessandra, Juan David, Viviana, Dionne, Amy,

Asis, Andrea e Beth. Por toda ajuda, por todo conhecimento compartilhado, por eu ter me sentido *welcome* desde o primeiro dia. Aos demais colegas do NIH, sempre atenciosos e dispostos a ajudar. Agradeço em especial ao Pedro, Carol, Eduardo, Silvia e Karina: obrigada por estarem no lugar certo, na hora certa. Não teria sido a mesma coisa se não tivesse conhecido vocês.

A minha família e amigos. A minha mãe, minhas irmãs e minhas sobrinhas. Ao Fernando. Ao Bruno, Gabriel, Ivis, Shana, Mariana, Rosangela, Leandro, Tiago, Ana, Letícia, Raphael, Saulo, Wagner, Taciana e Luiz Sérgio. Aos meus tios, primos e agregados da família Mattos. Obrigada pelo amor que tenho recebido de vocês todos os dias.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
I – INTRODUÇÃO.....	1
II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1- Aspectos gerais .....	4
2.2- Uveítes e toxoplasmose ocular.....	7
2.3- Formas de classificação para cicatrizes retinianas/retinocoroidianas presumidamente causadas pela infecção por <i>T. gondii</i> .....	9
2.4-Fatores associados ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular .....	11
2.5 – Diferentes linhagens de <i>T. gondii</i> e desenvolvimento de toxoplasmose ocular .....	13
2.6 – Resposta imune a <i>Toxoplasma gondii</i> .....	15
2.6.1- Resposta Imune celular .....	15
2.6.2- Resposta imune mediada por anticorpos anti- <i>T. gondii</i> .....	17
2.7 – Diagnóstico .....	19
III- OBJETIVOS .....	22
3.1- Objetivo Geral.....	22
3.2- Objetivos específicos.....	22
VI- POPULAÇÃO ESTUDADA, MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1- População estudada.....	23
4.2 - Coleta de Amostras de Sangue Periférico.....	26
4.3- Estudo Genético .....	26
4.3.1- Extração de DNA Genômico de Amostras de Sangue Total.....	26

4.3.2- Quantificação de DNA por Espectrofotometria.....	26
4.3.3- Ensaio de <i>Taqman</i> .....	27
4.3.4- Análise do Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> .....	28
4.3.5 - Análise de Associação Genética .....	29
4.4 – Avaliação dos níveis séricos de Imunoglobulinas por meio de citometria de fluxo .....	29
4.4.1- Adsorção de soros com Proteína A .....	29
4.4.2 - Preparação de Antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i> para citometria de fluxo.....	29
4.4.3 - Citometria de fluxo para detecção de antígenos na superfície de taquizoítos.....	30
4.5- Detecção de Anticorpos IgG anti-TgERP no soro dos indivíduos por ELISA.....	32
4.6 – Genotipagem de <i>T. gondii</i> a partir de DNA extraído de sangue periférico de pacientes humanos.....	33
4.6.1 –Extração de DNA de sangue periférico para identificação de <i>T. gondii</i> .....	33
4.6.2 - Reação em Cadeia da Polimerase.....	33
4.6.3- Purificação e sequenciamento de DNA.....	34
V- RESULTADOS .....	36
5.1 - Comparações entre frequências alélicas das populações de Campos dos Goytacazes, CEU e YRI.....	36
5.2- Estudo de associação genética com SNP do gene <i>TLR9</i> .....	37
5.3- Relação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos no gene de <i>TLR9</i> e produção de IgG e IgM .....	39
5.4- Detecção de anticorpos esporozoíto-específicos (TgERP) no sangue periférico de indivíduos residentes em região altamente endêmica .....	44
5. 5- Extração e amplificação de DNA de <i>T. gondii</i> a partir de DNA extraído de sangue periférico de pacientes humanos .....	46



5.6- Sequenciamento de <i>T. gondii</i> a partir de DNA extraído de sangue periférico de pacientes humanos .....	50
5.7 - Genotipagem multiloci a partir de DNA extraído de sangue periférico de pacientes humanos.....	52
5.8- Construção de árvores filogenéticas para os <i>loci</i> NTS2 e B1.....	58
5.9 – Perfil parasitológico e imunológico de indivíduos com sorologia convencional negativa para toxoplasmose .....	61
VI- DISCUSSÃO.....	63
VII- CONCLUSÕES .....	78
VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79
ANEXO I.....	92
ANEXO II.....	95

## RESUMO

A toxoplasmose atinge ao menos um terço da população mundial sendo que em determinados locais como em Campos dos Goytacazes pode atingir até 84% da população de baixo poder aquisitivo. A toxoplasmose ocular pode atingir até 30% dos indivíduos soropositivos residentes em Campos dos Goytacazes. Estudos anteriores mostraram que parâmetros imunogenéticos, imunológicos e parasitológicos estão entre os fatores relacionados ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular. A relação entre a presença do polimorfismo no gene de TLR9 (SNP rs352140), níveis séricos de IgM e IgG e o desenvolvimento de lesões oculares presumidamente causadas pela infecção por *T. gondii* foi investigada neste trabalho. Observou-se que indivíduos apresentando cicatrizes de lesões oculares e portadores de genótipo CC apresentaram níveis significativamente mais elevados de IgG e IgM, quando comparados a indivíduos sem cicatrizes com o mesmo genótipo. Estes resultados indicam que a presença de polimorfismo no gene *TLR9* está relacionada com a produção de IgG e IgM específicos anti-*T. gondii*, e ainda corroboram resultados prévios que apontam que níveis séricos de IgG e IgM como marcadores moleculares para a identificação de lesões oculares. A presença de DNA de *T. gondii* no sangue periférico de indivíduos residentes em áreas endêmicas foi investigada por meio dos seguintes marcadores moleculares: ITS1, NTS2, B1, SAG1, SAG3 e SAG4. Observou-se que a amplificação de DNA de *T. gondii* foi mais frequente entre indivíduos portadores de cicatrizes oculares. O sequenciamento das regiões amplificadas mostrou que a infecção por linhagens polimórficas em relação à linhagem arquétipo tipo I (cepa RH) é mais frequente entre indivíduos com cicatrizes oculares. Estes resultados sugerem que o desenvolvimento de lesões oculares pode estar relacionado com a linhagem do parasito e a carga parasitária no sangue periférico do hospedeiro. De forma surpreendente DNA de *T. gondii* foi detectado em 22 de 24 indivíduos soronegativos para toxoplasmose de acordo com teste sorológico comercial. Em 64,7% destes casos, os indivíduos apresentaram resultados positivos para ao menos um dos seguintes testes sorológicos não comerciais: ELISA esporozoíto-específico (anti-TgERP), e em testes por citometria de fluxo em parasitos fixados: FC-AFTA-IgG e FC-AFTA-IgM. Seis indivíduos soronegativos para *T. gondii*, apresentaram lesões retinianas presumivelmente causadas pela infecção toxoplásmica. Estes resultados sugerem que as lesões oculares identificadas em indivíduos soronegativos para testes comerciais para a toxoplasmose podem ser causadas pela infecção por *T. gondii*, e ainda que, testes sorológicos convencionais podem não apresentar sensibilidade a determinadas cepas polimórficas circulantes em Campos dos Goytacazes e provavelmente em outros locais diferentes do hemisfério norte (Estados Unidos e Europa) onde tais testes são fabricados.

**Palavras-chave:** *T. gondii*, toxoplasmose ocular, SNP, TLR9, IgM, IgG, linhagem

## ABSTRACT

Toxoplasmosis affects at least one third of the world population and in some places as Campos dos Goytacazes can affects up to 84% of the low income population. Ocular toxoplasmosis can affects up to 30% of *T. gondii* positive individuals living in Campos dos Goytacazes. Previous studies have shown that immunogenic, immunological and parasitological are among the factors related to the development of ocular toxoplasmosis. The relationship between the presence of the TLR9 gene polymorphism (SNP rs352140), serum IgM and IgG levels and the development of ocular lesions presumably caused by *T. gondii* infection was investigated in this work. It was observed that individuals with retinal/retinochoroidal scars and CC genotype had significantly higher levels of IgG and IgM when compared to individuals without retinal/retinochoroidal scars. These results indicate that the presence of the TLR9 gene polymorphism is associated with IgG and IgM specific anti-*T. gondii* production and further confirmed previous results which indicate that serum levels of IgG and IgM can be used as molecular markers for the identification of ocular lesions. The presence of *T. gondii* DNA in the peripheral blood of individuals living in endemic areas was investigated by means of the following molecular markers of the parasite: ITS1, NTS2, B1, SAG1, SAG3 and SAG4. It was observed that the *T. gondii* DNA amplification was more common among subjects with ocular scarring lesions compared to seropositive subjects without ocular disease. The sequencing of the amplified region showed that the identification of polymorphic strains compared to the archetype strain type I (RH strain) is more common among individuals with ocular scars. These results suggest that the development of ocular disease can be related to the strain of the parasite and parasite burden in the peripheral blood of the host. Surprisingly *T. gondii* DNA was detected in 22 of the 24 seronegative individuals for toxoplasmosis according to commercial serological test. In 64.7% of these cases, individuals were positive for at least one of the following non-commercial serological tests: sporozoite-specific ELISA (anti-TgERP), and tests by flow cytometry in fixed parasites: FC-AFTA-IgG and FC-AFTA-IgM. A total of 6 seronegative individuals to *T. gondii* presented retinal scars presumably caused by *T. gondii* infection. These results suggest that ocular disease identified in individuals seronegative for commercial tests for toxoplasmosis may be caused by *T. gondii* infection, and that conventional serological tests may not be sensitive to certain polymorphic strains circulating in Campos dos Goytacazes and probably in other different places from the northern hemisphere (US and Europe) where such tests are manufactured.

**Keywords:** *T. gondii*, ocular toxoplasmosis, SNP, TLR9, IgM, IgG, strain

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Classificação das cicatrizes retinianas/retinocoroidianas presumidamente causadas pela infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	11
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo do ensaio de TaqMan utilizado para genotipar SNPs potencialmente associados com a toxoplasmose ocular.....	28
<b>Figura 3:</b> Gráficos representativos utilizados para determinar a Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos (PPFP).....	32
<b>Figura 4:</b> Detecção de por FC-AFTA- IgG e FC-AFTA-IgM por Citometria de Fluxo. Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos (PPFP) marcados para IgG e IgM entre os grupos TOXO (L), TOXO (NL) e NEG (A).....	40
<b>Figura 5:</b> Relação entre genótipos de SNP rs342140 no gene TLR9 e produção de IgG e IgM.....	41
<b>Figura 6:</b> Associação entre a produção de IgG em grupos de indivíduos com cicatrizes oculares e controles e genótipos de SNP no gene TLR9 relacionados à toxoplasmose ocular. ....	42
<b>Figura 7:</b> Associação entre a produção de IgM em grupos de indivíduos com cicatrizes oculares e controles e genótipos de SNP no gene TLR9 relacionados à toxoplasmose ocular. ....	43
<b>Figura 8:</b> Associação entre genótipo CC e produção de IgG e IgM em grupos de indivíduos com cicatrizes oculares e controles. As barras indicam valores de mediana.....	44
<b>Figura 9:</b> Porcentagem de indivíduos reativos anti-TgERP. ....	45
<b>Figura 10:</b> Visualização em gel de agarose de fragmentos de DNA amplificados por meio de <i>nested-PCR</i> .....	47
<b>Figura 11:</b> Amplificação das regiões ITS1, NTS2 e B1.....	49
<b>Figura 12:</b> Árvore filogenética construída com base nas sequências obtidas para o locus NTS2.....	59
<b>Figura 13:</b> Árvore filogenética construída com base nas sequências obtidas para o locus B1.....	60

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Grupos de indivíduos envolvidos no estudo imunogenético, imunológico, epidemiológico e parasitológico, segundo a sorologia para toxoplasmose e fundoscopia.....	25
<b>Tabela 2:</b> Lista de primers externos e internos utilizados para as reações de Nested PCR, para identificação dos loci ITS1, NTS2, B1, SAG1, SAG3 e SAG4.....	34
<b>Tabela 3:</b> Perfil das populações de estudo quanto à sorologia para toxoplasmose e exame fundoscópico. ....	36
<b>Tabela 4:</b> Frequências alélicas para SNP de TLR9 (rs352140) em populações de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI. ....	37
<b>Tabela 5:</b> Análises de associação genética entre SNP no gene de TLR9 e manifestação ocular da toxoplasmose. ....	37
<b>Tabela 6:</b> Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP no gene de TLR9 (rs352140).....	38
<b>Tabela 7:</b> Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes oculares e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP no gene de TLR9 (rs352140).....	39
<b>Tabela 8:</b> Genotipagem de <i>T. gondii</i> a partir de DNA extraído de sangue periférico de pacientes humanos para as regiões SAG1, SAG3 e SAG4. ....	50
<b>Tabela 9:</b> Confirmação da presença de DNA de <i>T. gondii</i> no sangue de pacientes humanos.....	51
<b>Tabela 10:</b> Análise da sequência de DNA para o locus NTS2.....	54
<b>Tabela 11:</b> Porcentagem de indivíduos polimórficos para o locus NTS2 de acordo com a sorologia para Toxoplasmose, presença e tipo de cicatriz ocular. ....	55
<b>Tabela 12:</b> Análise da sequência de DNA para o locus B1. ....	56
<b>Tabela 13:</b> Análise da sequência de DNA para o locus SAG3 .....	57
<b>Tabela 14:</b> Frequência de sítios polimórficos nos loci ITS1, NTS2, B1, SAG1 e SAG3.....	57
<b>Tabela 15:</b> Perfil parasitológico e imunológico de indivíduos com sorologia convencional negativa para toxoplasmose.....	62

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

APC	<i>Antigen presenting cell</i> - Célula apresentadora de antígeno
D.O.	Densidade ótica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> - Ensaio Enzimático de Imunoadsorção
FC-AFTA	<i>Flow Cytometry-Based Anti-Fixed Tachyzoite Antibodies</i> – Detecção de anticorpos anti-taquizoitos fixados por Citometria de fluxo
FITC	Fluoresceína isotiocianato
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da imunodeficiência Humana
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> – Antígeno Leucocitário Humano
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
ILR	<i>Interleukin Receptor</i> – Receptor de interleucina
ITS1	<i>Internal transcribed Spacer</i> - Espaçador interno transcrito
MAPk	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> - Proteína-quinases ativadas por mitógenos
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i> - Factor nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	<i>Nod Like Receptor</i> – Receptor tipo NOD

NO	<i>Nitric oxide</i> - Óxido nítrico
NTS2	<i>Non Transcribed Spacer 2</i> – Espaçador não transcrito 2
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> – Padrão molecular associado à Patógeno
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> - Salina Fosfatada Tamponada
PCR	<i>Polymerase Chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
PPFP	Percentual de Parasitas Fluorescentes Positivos
RFC	Reação de Fixação do Complemento
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismos em tamanho de Fragmentos de Restrição
RIF	Reação de Imunofluorescência Indireta
SAG	<i>Surface Antigen</i> – Antígeno de Superfície
TgERP	<i>Toxoplasma gondii embryogenesis-related protein</i> – Proteína relaciona à embriogênese de <i>T. gondii</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor</i> - Fator Transformante de Crescimento
Th	<i>T helper lymphocytes</i> - Linfócitos T auxiliares
TLR	<i>Toll-Like receptors</i> - Receptores Toll-like
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> - Fator de Necrose Tumoral
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> - Complexo Principal de Histocompatibilidade
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
RHI	Reação de Hemoaglutinação Indireta

## I – INTRODUÇÃO

A toxoplasmose ocular é considerada o principal sintoma grave da toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes, sendo responsável por até 85% dos casos de uveítes posteriores no mundo (Talabani *et al.*, 2010). A toxoplasmose ocular apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas e seu diagnóstico é baseado na observação de cicatrizes retinianas/retinocoroidianas por meio de exame fundoscópico (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). Assim, apesar de sua importância epidemiológica, o diagnóstico da toxoplasmose ocular continua baseado em critérios subjetivos e na experiência do observador. Como consequência, acredita-se que erros de diagnóstico sejam frequentes (Maenz *et al.*, 2014). Oréfice e Bahia-Oliveira (2005) estabeleceram um conjunto de critérios para a classificação de cicatrizes retinianas/retinocoroidianas presumidamente causadas pela infecção por *Toxoplasma gondii*. Segundo esta classificação, tais cicatrizes podem ser classificadas como A, B e C, de acordo com critérios morfológicos, de pigmentação e grau de destruição tecidual. As lesões tipo A apresentam maior grau de destruição tecidual quando comparadas às lesões tipo B, e estas últimas são mais severas que lesões tipo C (Oréfice and Bahia-Oliveira, 2005; Bahia-Oliveira *et al.*, 2012).

Acredita-se que o desenvolvimento da toxoplasmose ocular seja um fenômeno multifatorial, envolvendo fatores como *status* imunológico e fatores imunogenéticos do hospedeiro, via de infecção e fatores genéticos do parasito (Holland, 2004). Estudos prévios demonstraram que níveis elevados de IgM e IgG estão relacionadas à presença de lesões oculares (Martins, 2009). Peixoto-Rangel e colaboradores, 2008, observaram que a presença de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene de *TLR9* pode ser considerado um fator relacionado ao desenvolvimento de lesão ocular. Este mesmo SNP foi implicado na alta produção de IgM em pacientes com cirrose biliar (Kikuchi *et al.*, 2005).

Estudos populacionais identificaram indivíduos soronegativos para toxoplasmose portadores de cicatrizes oculares compatíveis com aquelas causadas pela infecção por *T. gondii* (Martins, 2009). Este achado sugere que testes comerciais podem não identificar a totalidade de indivíduos infectados por *T. gondii*. Desta forma buscou-se, por meio de métodos parasitológicos e



imunológicos alternativos, biomarcadores capazes de identificar a infecção por *T. gondii*, e que estejam relacionados ao desenvolvimento da toxoplasmose ocular.

A detecção de anticorpos esporozoíto-específicos (anticorpos anti-TgERP) pode ser capaz de identificar a infecção por oocistos de *T. gondii* (Hill *et al.*, 2011). A infecção por oocisto tem sido implicada como fator de risco para o desenvolvimento de toxoplasmose ocular, visto que após surtos de infecção devido à ingestão de água contaminada a prevalência de desenvolvimento de doença ocular costuma ser mais alta que a encontrada na população soropositiva (Bowie, King, Werker, IsaacRenton, *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1998; de Moura *et al.*, 2006b; Balasundaram, Manohar B. *et al.*, 2010). Acredita-se que a toxoplasmose adquirida por meio da ingestão de oocistos ocasionem formas mais severas da toxoplasmose, visto que esporozoítos seriam mais resistentes às enzimas digestivas que bradizoítos (Dubey *et al.*, 1981; Dubey *et al.*, 2002). Em Campos dos Goytacazes a infecção por oocistos via água não tratada foi descrita como importante via de transmissão de *T. gondii* (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Simultaneamente Campos dos Goytacazes apresenta uma das mais altas prevalências de toxoplasmose ocular podendo chegar até 30% dos indivíduos soropositivos para *T. gondii* (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). I

A infecção por *T. gondii* também pode ser identificada por meio da detecção direta do DNA do parasito no sangue periférico de indivíduos com infecção aguda ou crônica (Silveira *et al.*, 2011). A extração, amplificação e sequenciamento de DNA de *T. gondii* presente em sangue periférico pode ser utilizada não apenas para confirmar a infecção pelo parasito, como para identificação de sua linhagem filogenética (Shobab *et al.*, 2013). Acredita-se que exista relação entre a linhagem do parasita e o desenvolvimento de sintomas na toxoplasmose. No entanto, poucos estudos identificaram genótipos envolvidos no desenvolvimento de toxoplasmose ocular, especialmente fora da Europa e América do Norte, onde os estudos, se limitaram a identificar as linhagens envolvidas como tipo I, II e III (Grigg, *et al.*, 2001; Switaj *et al.*, 2006; Bottos *et al.*, 2009; de-la-Torre *et al.*, 2013). A genotipagem *multi-loci* tem potencial para esclarecer possível relação entre o desenvolvimento e severidade de toxoplasmoses ocular e as diferentes linhagens de *T. gondii* circulantes na América do Sul, bem como contribuir para o esclarecimento sobre as principais linhagens de *T. gondii* circulantes entre humanos na região estudada.

O entendimento de como os fatores citados acima atuam individualmente e em conjunto é fundamental para: (i) elucidar os mecanismos que levam ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular, (ii) o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais eficientes, (iii) diminuir a incidência da doença (iv) promover desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

## II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1- Aspectos gerais

A toxoplasmose, doença infecciosa causada por *Toxoplasma gondii*, afeta ao menos um terço da população mundial. A infecção na população adulta e imunocompetente é geralmente assintomática. Entretanto, cerca de 10% dos indivíduos soropositivos desenvolvem sintomas, no geral brandos, incluindo febre e linfadenopatia, ainda, em raros casos podem desenvolver-se sintomas graves e até mesmo fatais, com miocardites, pneumonias, hepatites, polimiositose e encefalites (Remington *et al.*, 2006). Recentemente a infecção por *T. gondii* tem sido apontada como uma doença capaz de modificar o humor, o comportamento (Flegr, 2013) e comportamento sexual (Flegr and Markoš, 2014). Além de estar relacionada com o desenvolvimento de esquizofrenia e outros distúrbios mentais (Flegr, 2013; Holub *et al.*, 2013).

*Toxoplasma gondii* apresenta um complexo ciclo biológico, envolvendo fase sexuada e assexuada com estágios evolutivos característicos. A reprodução sexuada acontece exclusivamente no trato intestinal de gatos e outros felídeos e leva a liberação, por meio das fezes, de oocistos contendo esporozoítos. Oocistos se disseminam no ambiente com auxílio da água, vento e chuva e são altamente infectantes para mamíferos e aves. Após a ingestão, a parede dos oocistos se rompe e esporozoítos se transformam em taquizoítos. Taquizoítos são a forma evolutiva de reprodução e disseminação rápida. São capazes de invadir todas as células nucleadas, onde se replicam e rapidamente invadem células vizinhas. Taquizoítos são responsáveis pela indução de respostas inflamatórias e manifestações clínicas da toxoplasmose na fase aguda. Esta forma evolutiva também é responsável pela transmissão vertical, ou congênita. (Montoya and Liesenfeld, 2004). Devido à pressão do sistema imune taquizoítos transformam-se em bradizoítos. Bradizoítos são semelhantes à taquizoítos, porém, possuem replicação lenta e são capazes de formar cistos. Bradizoítos persistem dentro do cisto por toda vida do hospedeiro, no entanto podem transformar-se em taquizoítos e causar o aparecimento de sintomas e reagudização em pacientes imunocomprometidos ou imunossuprimidos. Devido à carnivoriedade os cistos teciduais podem ser ingeridos e no trato intestinal do novo hospedeiro eles se rompem e liberam bradizoítos que se transformarão em taquizoítos e

recomeçarão o ciclo (Montoya and Liesenfeld, 2004).

A prevalência de oocistos no ambiente é o fator fundamental para a transmissão da toxoplasmose para humanos. Um único gato infectado pode produzir 100 milhões de oocistos não esporulados, que entre 1 e 5 dias se tornarão infectivos (Elmore *et al.*, 2010). Os principais fatores de riscos associados à infecção por oocistos incluem brincar em caixas de areia e parques escolares (dos Santos *et al.*, 2010), contato com solo e jardinagem sem luvas (Cook *et al.*, 2000), lavagem inadequada de frutas e vegetais (Kapperud *et al.*, 1996) contato com água contaminada (de Moura *et al.*, 2006a). O uso de água não filtrada, especialmente para consumo, está relacionado com o aumento da prevalência da toxoplasmose especialmente em populações de baixo poder aquisitivo (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

O risco de infecção por cistos é dependente do modo de processamento e preparo da carne (Dubey *et al.*, 1990; Kotula *et al.*, 1991). Os cistos sobrevivem por semanas refrigerados entre 1 e 4°C e por até uma semana congelados a temperaturas entre -1 e -8°C, porém a maioria dos cistos morre a temperaturas iguais ou menores que -12°C. O aquecimento a 60°C por 4 min. é suficiente para matar todos os cistos teciduais (Dubey, 1998). O tipo de carne utilizada para consumo humano também influencia no risco de transmissão, visto que são observadas variações na soroprevalência de acordo com a espécie e o país de origem dos animais utilizados para consumo (Dubey and Jones, 2008; Halos *et al.*, 2010).

Outra via de infecção de importância epidemiológica é a infecção vertical ou congênita. A infecção congênita ocorre quando a mãe adquire a infecção pela primeira vez durante a gravidez. A gravidade dos sintomas apresentados pela criança está diretamente relacionada com o período da gravidez em que a infecção foi adquirida. A infecção congênita adquirida no primeiro trimestre de gravidez é mais grave que aquelas adquiridas em períodos posteriores da gestação, porém, as chances do parasito ser transmitido para o feto são de aproximadamente 30%. Por outro lado mais de 60% das mulheres que adquirem toxoplasmose no último trimestre de gravidez a transmitem para seus filhos, embora estes apresentem, de uma forma geral, sintomas mais brandos (Remington *et al.*, 2006).

A falta de acurácia na identificação da via de infecção por *T. gondii* é hoje um dos grandes desafios de estudos epidemiológicos. Buscando contornar tal problema Hill e colaboradores (2011) identificaram uma proteína esporozoíto-específica, a *Toxoplasma gondii* *embryogenesis-related protein*, TgERP, capaz de identificar anticorpos antígenos esporozoíto-específicos. A partir da identificação desta proteína foi desenvolvido um teste de ELISA anti-TgERP capaz de distinguir entre a via de infecção por oocistos e por cistos teciduais (Hill *et al.*, 2011).

Desde a década de 1960 acredita-se que características genéticas do parasito podem influenciar no curso da infecção por *T. gondii* (Hogan *et al.*, 1964). Devido a sua ampla distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros espera-se que *T. gondii* apresente um grande diversidade genética. As linhagens de *T. gondii* encontradas na América Latina apresentam ampla diversidade genética, sendo observados aos menos 10 haplogrupos (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 14), com graus variados de diversidade (Su *et al.*, 2012). Porém, observa-se que a Europa e América do Norte apresentam três linhagens dominantes: tipo I, II e III ou haplogrupos 1, 2 e 3 (Grigg, *et al.*, 2001). Em modelos experimentais a virulência das três linhagens mais comumente encontradas na Europa e América do norte é bem estabelecida. A linhagem tipo I é altamente virulenta, enquanto as linhagens tipo II e tipo III possuem virulência considerada moderada a baixa (Grigg, *et al.*, 2001). No entanto, ainda não está estabelecido se diferença na virulência observada em camundongos, relacionada às três linhagens arquétipo, pode ser extrapolada para a toxoplasmose em humanos (Boothroyd and Grigg, 2002; Ajzenberg, 2010; Dubremetz and Lebrun, 2012).

A toxoplasmose apresenta alta prevalência em todo mundo. Estima-se que entre 25 a 30% da população mundial esteja infectada por *T. gondii* (Robert-Gangneux and Dardé, 2012). No entanto, a soroprevalência da toxoplasmose varia entre as diversas regiões do globo. No sudeste da Ásia, Norte da Europa e América do Norte são encontrados os menores percentuais de soroprevalência, variando entre 4 e 30%. Nas regiões centrais e sul da Europa, a soroprevalência varia entre 30 e 50%, enquanto na América Latina mais de 50% da população é soropositiva para toxoplasmose. Os dados sobre a prevalência da toxoplasmose na África são escassos, porém, com exceção da África do Sul, nos países onde existem dados disponíveis a soroprevalência se apresenta acima de 40%

(Revisado por Maenz *et al.*, 2014). Bahia-Oliveira e colaboradores (2003) observaram que em Campos dos Goytacazes a soroprevalência para toxoplasmose pode chegar a 84%, entre indivíduos vivendo em baixas condições sócio-econômicas, sendo esta uma das mais altas prevalências registradas (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de toxoplasmose ocular é a sequela mais comum da toxoplasmose em indivíduos adultos imunocompetentes (Holland, 2004). Embora a toxoplasmose ocular seja comum em casos de infecção congênita, atualmente admite-se que a maior parte dos casos seja devido à infecção pós-natal (Talabani *et al.*, 2010). Cerca de 2% dos indivíduos soropositivos nos Estados Unidos desenvolvem toxoplasmose ocular (Holland, 2003b). No Brasil este percentual varia de 17,7% na região Sul (Glasner, *et al.*, 1992) e pode subir para até 30%, como demonstrado em estudo populacional realizado em Campos dos Goytacazes (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012).

## **2.2- Uveítes e toxoplasmose ocular**

A úvea, também conhecida como trato uveal, é uma estrutura vascularizada, localizada entre a esclera e a retina, composta pela coróide, corpos ciliares e íris. Uveíte é uma denominação geral para inflamações no trato uveal e abrange, tanto inflamações com origem em células retinianas e vasos relacionados, quanto originadas na esclera (Herbort, 1996). Uveítes podem estar relacionadas a diversas infecções, bem como a doenças auto-imunes (Banares *et al.*, 1997).

Uveítes são classificadas de acordo com sua localização anatômica, evolução clínica e lateralidade. Bloch-Michel e Nussenblatt, 1987 propuseram um critério de classificação baseado nas características anatômicas da lesão. Segundo este critério as uveítes são divididas em anterior, intermediária, posterior e panuveíte. Na uveíte anterior há o acometimento da íris e dos corpos ciliares. Uveítes intermediárias se apresentam no vítreo, na retina periférica, e na parte posterior dos corpos ciliares. Uveítes posteriores apresentam envolvimento da coróide e retina. São consideradas panuveítes quando dois ou mais destes segmentos são afetados (Bloch-Michel and Nussenblatt, 1987).

As uveítes podem ser classificadas em granulomatosas e não-granulomatosas. Uveíte granulomatosa apresenta precipitados de células

inflamatórias, formando nódulos inflamatórios no endotélio da superfície da córnea, denominados nódulos de Koeppe, levando ao espessamento ou atrofia da íris. Uveíte não-granulomatosa apresenta a formação de fibrina entre a íris e o cristalino, esta manifestação está relacionada à presença de HLA-B27 (Herbort, 1996).

De acordo com a lateralidade, as uveítes podem ser classificadas como unilaterais e bilaterais. Nas uveítes unilaterais há o acometimento de apenas um dos olhos, ou, em caso de recorrência, quando o outro olho é acometido, porém não simultaneamente. Em casos de uveítes bilaterais ambos os olhos são acometidos simultaneamente (Banares *et al.*, 1997).

A toxoplasmose ocular é uma retinocoroidite focal, portanto uveíte posterior, não granulomatosa, com ou sem cicatrizes coroidianas prévias (Banares *et al.*, 1997). Acredita-se que a infecção por *T. gondii* seja responsável por 28 a 50% dos casos de uveítes posteriores no mundo (Holland, 2004). No Brasil, estima-se que este percentual suba para até 80% (Melamed, 2009).

O parasito pode chegar ao tecido ocular de diversas formas: livremente no plasma, dentro de leucócitos circulantes ou a partir do cérebro por meio do nervo óptico (Mets *et al.*, 1996). Sabe-se que células dendríticas infectadas podem atuar como “cavalos de Tróia” e promover a entrada do parasito na retina (Furtado, *et al.*, 2012), e que mecanismos moleculares envolvendo a molécula de adesão intracelular-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1* – ICAM-1) estão envolvidos na transmigração de *T. gondii* no epitélio retiniano (Furtado, *et al.*, 2012).

Taquizoítas podem causar destruição tecidual devido à replicação e consequente lise de células infectadas. As lesões retinocoroidais ativas podem elevar rapidamente a resposta imune local, necessária para o controle da proliferação do parasito. No entanto, a resposta imune agressiva tem sido apontada como um dos fatores envolvidos na destruição tecidual e necrose (Lu *et al.*, 2004).

Outra possível causa de dano tecidual é a presença de autoanticorpos contra antígenos retinianos. É sabido que soros de pacientes que desenvolveram toxoplasmose ocular podem apresentar anticorpos com atividade contra o tecido retiniano humano, sendo os níveis de anticorpos antifotoreceptores significativamente mais altos que nestes indivíduos (Nussenblatt *et al.*, 1989; Whittle *et al.*, 1998).

A destruição tecidual inicial dará origem a lesões primárias ativas. Tais lesões são caracterizadas como retinocoroidites focais necrozantes, acompanhadas de inflamação no humor vítreo. Inflamações nos tecidos retiniano e coroidiano adjacentes também são comumente observadas. A cura para este tipo de lesão em geral ocorre, com ou sem tratamento, dentro de 6 a 8 semanas em indivíduos imunocompetentes, resultando na formação de cicatrizes retinianas/retinocoroidianas (Gilbert et al., 1999, Rothova, 1993).

Cerca de 60% dos pacientes apresentam lesões recorrentes, porém, os fatores que levam à recorrência ainda são pouco compreendidos. Tem-se demonstrado que a ruptura de cistos e a replicação dos parasitos são fatores importantes nesse processo. Observa-se que a maioria das lesões recorrentes ocorre em regiões adjacentes a cicatrizes retinocoroidais prévias. Em modelos animais, observou-se que a maioria dos cistos presentes no olho também está localizada nestas regiões (Pavesio and Lightman, 1996). Muitos fatores podem levar à ruptura dos cistos, entre eles podemos citar: ruptura mecânica devida à multiplicação de *T. gondii*, reações mediadas por células de defesa do organismo hospedeiro, efeitos hormonais e devido a produtos de reações inflamatórias (Pavesio and Lightman, 1996). Outros fatores também podem estar relacionados à recorrência, tais como hipersensibilidade a antígenos de *T. gondii* liberados de cisto (Abrahams and Gregerson, 1983) e re-infecção, especialmente por cepas diferentes (Araújo et al., 1997).

A infecção por *T. gondii* pode levar ao aparecimento de outros sintomas oculares tais como estrabismo, microftalmia, catarata, descolamento de retina, iridocilite, nistagmo e atrofia do globo ocular (Maenz et al., 2014).

### **2.3- Formas de classificação para cicatrizes retinianas/retinocoroidianas presumidamente causadas pela infecção por *T. gondii***

As cicatrizes retinianas/retinocoroidianas formadas a partir da cura de lesões ativas apresentam variações em suas manifestações. Glasner e colaboradores (1992) classificaram as cicatrizes retinianas/retinocoroidianas de acordo com a probabilidade destas terem sido causadas por *T. gondii*. Usando uma escala que varia de 1 a 5, na qual 1 significa toxoplasmose ocular e 5 não se enquadrando em toxoplasmose ocular. Este critério de classificação é pautado



na experiência prévia do observador em categorizar as lesões de acordo com sua aparência morfológica, sendo intrinsecamente subjetivo (Glasner, *et al.*, 1992).

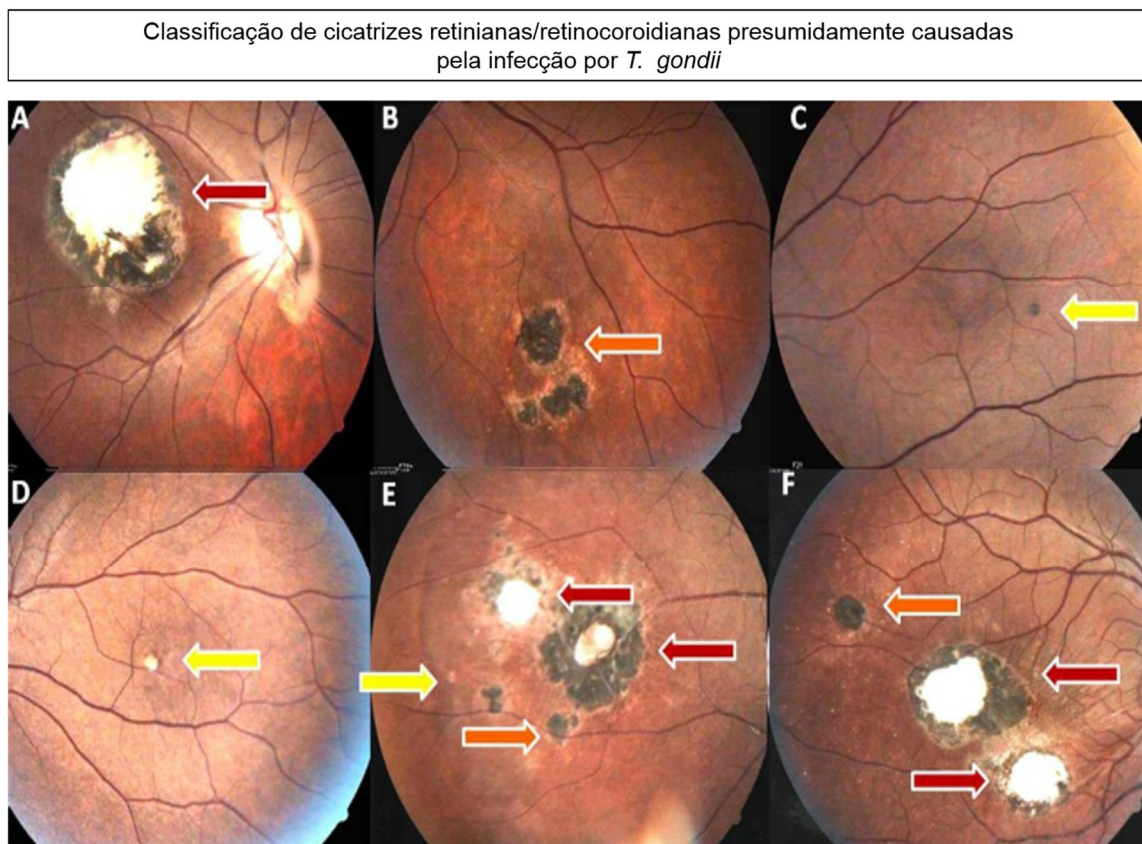
A incerteza quanto à natureza etiológica das cicatrizes retinianas/retinocoroidianas observadas em estudos epidemiológicos é uma realidade. A dificuldade na precisão do diagnóstico pode tanto subestimar como superestimar as lesões oculares causadas por *T. gondii*. A inexistência de classificação universal para as diversas manifestações clínicas observadas na população contribui para aumentar o grau de dificuldade em se determinar com maior precisão a real prevalência da retinocoroidite toxoplásmica em estudos epidemiológicos (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012).

Nesse sentido, foi proposta por Oréfice e Bahia-Oliveira (2005) uma classificação baseada em critérios morfológicos, que refletem o grau de destruição da retina. Por este método de classificação, as lesões retinianas/retinocoroidianas compatíveis com lesões causadas por *T. gondii* foram divididas em tipos A, B e C (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012).

As lesões tipo A geralmente apresentam limites bem demarcados, sendo circundadas por um halo pigmentado e com uma região central com pouca ou nenhuma pigmentação devido à destruição da retina e coróide. Esse tipo de lesão inclui a cicatriz macular característica da toxoplasmose congênita, conhecida como “roda de carroça”. As lesões tipo B são circundadas por um halo hipopigmentado com uma região central hiperpigmentada e apresentam menor grau de destruição tecidual quando comparadas às lesões do tipo A. Lesões do tipo C são definidas como áreas de hiperplasia ou atrofia do epitélio da retina, com um menor grau de destruição tecidual que as lesões tipo A ou B, podendo ser tanto hipo quanto hiperpigmentada. Este tipo de lesão é o que apresenta maior incerteza etiológica. Os pacientes podem apresentar lesões únicas ou múltiplas. Nesse último caso, as lesões podem ser todas do mesmo tipo ou até mesmo dos três tipos citados. (Figura 1) (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012).

É importante notar que localização e tamanho não foram critérios para classificação, porém lesões tipo C são geralmente menores e situam-se na periferia da retina. As lesões tipo A e B atendem aos critérios tradicionais para serem consideradas como causadas por infecção por *T. gondii*. Por outro lado, as lesões tipo C são frequentemente ignoradas em inquéritos epidemiológicos. No entanto, estudos imunoepidemiológicos recentes têm demonstrado que as

lesões tipo C devem ser incluídas como causadas pela infecção por *T. gondii*. (Bahia-Oliveira et al, 2012).



**Figura 1:** Classificação das cicatrizes retinianas/retinocoroidianas presumidamente causadas pela infecção por *Toxoplasma gondii* (Bahia-Oliveira et al, 2012). Setas vermelhas indicam cicatrizes do tipo A. Setas laranjas indicam cicatrizes do tipo B. Setas amarelas indicam cicatrizes do tipo C.

## 2.4- Fatores associados ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da toxoplasmose ocular ainda não foram totalmente esclarecidos. Fatores como a forma da infecção, idade, *background* genético do hospedeiro e do parasito podem estar associados ao surgimento e severidade de lesões oculares (Holland, 2004).

Acredita-se que a toxoplasmose pós-natal represente a maioria dos casos de toxoplasmose ocular, sendo este o principal sinal desenvolvido por indivíduos imunocompetentes soropositivos. No entanto, o desenvolvimento de doença ocular grave também é uma das principais sequelas observadas na toxoplasmose congênita. A ausência de testes de laboratório confiáveis e as semelhanças clínicas entre a manifestação da toxoplasmose ocular adquirida de forma

congenita ou pós-natal dificultam a correta identificação da via de infecção (Maenz *et al.*, 2014).

Acredita-se que lesões centrais envolvendo a mácula são mais prováveis de terem sido causadas por infecção congênita. Em estudo desenvolvido por Mets e colaboradores, 2006, entre 76 crianças de 0 a 3 meses, 51% desenvolveu lesões maculares. Em outro estudo, lesões maculares foram encontradas em 52% das crianças avaliadas (Phan *et al.*, 2008). Entre crianças brasileiras com toxoplasmose congênita, lesões maculares foram encontradas em 76% das 44 crianças avaliadas (Melamed *et al.*, 2010). As altas frequências de lesões próximas à mácula levam a crer que a localização das lesões não se dá de forma randômica. Diferenças existentes entre regiões periféricas e centrais da retina, no que diz respeito ao desenvolvimento tecidual e a distribuição micro-vascular durante o desenvolvimento embrionário são apontadas como responsáveis pela maior frequência de lesões na região macular em casos de toxoplasmose congênita (Yuodelis and Hendrickson, 1986). Porém, em estudo realizado na região sul do Brasil mais de um terço dos indivíduos com toxoplasmose adquirida de forma pós-natal também apresentaram lesões maculares (Silveira *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de lesões bilaterais e aparecimento tardio de lesões oculares ativas também têm sido considerados indícios de toxoplasmose congênita (Bosch-Driessen *et al.*, 2002). No entanto, estes sinais também foram observados em infecções pós-natais (Silveira *et al.*, 2001). Estes dados sugerem que tanto a infecção congênita quanto a infecção pós-natal apresentam manifestações clínicas semelhantes e ambas podem ser implicadas em casos mais graves de toxoplasmose ocular.

A idade dos indivíduos tem sido indicada como fator de risco para o desenvolvimento da toxoplasmose ocular. No surto de toxoplasmose ocorrido na Columbia Britânica no Canadá entre 1994 e 1995, foi observado que os indivíduos que não desenvolveram toxoplasmose ocular tinham média de idade de 28 anos, enquanto a média de idade dos grupos que desenvolveram toxoplasmose ocular foi de 54 anos (Burnett *et al.*, 1998). Em outro estudo, utilizando uma série de 154 indivíduos com toxoplasmose ocular ativa, Bosch-Driessen e colaboradores observaram que a média de idade entre os indivíduos portadores de toxoplasmose ocular com indício de infecção antiga era de 29,9 anos. Nos indivíduos com indício de soroconversão recente, a média de idade foi de 50,6

anos (Bosch-Driessen *et al.*, 2002). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados no Brasil, onde a prevalência da toxoplasmose ocular foi significativamente mais alta entre indivíduos com mais de 50 anos (Portela *et al.*, 2004).

Recentemente têm-se considerado que a forma de infecção também pode ser um fator envolvido no desenvolvimento de toxoplasmose ocular. Em modelos animais observa-se que, utilizando uma mesma linhagem do parasito, a infecção por oocistos é mais virulenta que a infecção por cistos teciduais. Esta maior virulência pode ser devida a hipótese de que esporozoítos são mais resistentes às enzimas digestivas que os bradizoítos (Dubey *et al.*, 1981; Dubey *et al.*, 2002). Embora a associação entre infecção por oocistos e virulência em humanos seja incompreendida, existem relatos de alta prevalência de casos de toxoplasmose ocular após surtos associados à ingestão de água contaminada na Índia (Palanisamy *et al.*, 2006), bem como no Canadá (Bowie, *et al.*, 1997).

Estudos populacionais têm demonstrado que diversos polimorfismos em genes associados à resposta imune estão envolvidos na suscetibilidade ou proteção ao desenvolvimento e severidade de lesões oculares. A presença do alelo HLA-B35 foi positivamente relacionada com o desenvolvimento de toxoplasmose ocular em indivíduos soropositivos para HIV (Demarco *et al.*, 2012). Foram observadas relações entre a presença de toxoplasmose ocular e polimorfismos em genes das citocinas, tais como IFN- $\gamma$  (Albuquerque *et al.*, 2009; Peixe *et al.*, 2014), TNF- $\alpha$  (Cordeiro, Moreira, Costa, *et al.*, 2008), IL-10 (Cordeiro, Moreira, Andrade, *et al.*, 2008), IL-6 (Cordeiro *et al.*, 2013); bem como em genes de receptores da imunidade inata, como o TLR-9 (Peixoto-Rangel *et al.*, 2009) e P2X7 (Jamieson *et al.*, 2010). No entanto, deve-se ressaltar que os estudos acima envolveram diferentes populações e genes envolvidos em diferentes etapas da resposta imunológica. E ainda, em alguns casos os polimorfismos estudados foram identificados como fatores de risco, e em outros casos como fatores de proteção.

## **2.5 – Diferentes linhagens de *T. gondii* e desenvolvimento de toxoplasmose ocular**

Até recentemente eram reconhecidas apenas três grandes linhagens filogenéticas de *T. gondii* chamadas tipo I, II e III, ou haplogrupos 1, 2 e 3. Estas linhagens são predominantes nos EUA e na Europa, e apresentam diversidade

genética limitada, variado de 1 a 5%, dependendo da região analisada do genoma (Boyle *et al.*, 2006; Walzer and Boyle, 2012). Em camundongos a virulência dos tipos I, II e III é bem estabelecida, sendo a linhagem tipo I altamente virulenta, e as tipo II e III moderadas ou avirulentas, porém o cruzamento experimental entre linhagens II e III resultou em uma progênie F1 altamente virulenta (Grigg, *et al.*, 2001). Acredita-se que estes 3 haplogrupos tenham surgido de cruzamentos recentes a partir de um ancestral comum e que sua expansão entre humanos esteja relacionada a agricultura e a presença de animais domésticos (Sibley and Ajioka, 2008). Um novo haplogrupo, chamado de tipo X ou haplogrupo 12, identificado em animais selvagens na América do Norte, também foi reportado como causador de infecções em humanos (Khan *et al.*, 2011; Wendte *et al.*, 2011).

No passado as linhagens encontradas na América do Sul eram classificadas em uma das três linhagens arquétipos ou eram consideradas, de maneira genérica, como atípicas. No entanto, atualmente reconhece-se a ampla diversidade genética presente na América do Sul, sendo identificados ao menos 10 haplogrupos (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14) apresentando graus variados de divergência genética e virulência em camundongos (Belfort-Neto *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2012).

Atualmente, acredita-se que o desenvolvimento e a severidade da toxoplasmose ocular possam estar relacionados com o genótipo de *T. gondii*. O desenvolvimento de toxoplasmose ocular foi associado a *T. gondii* tipo II na Alemanha (Shobab *et al.*, 2013; Herrmann *et al.*, 2014). Resultado semelhante foi observado na França (Fekkar *et al.*, 2011). A genotipagem, por meio do marcador NTS2, de *T. gondii* a partir de sangue periférico demonstrou que o desenvolvimento de toxoplasmose ocular pode estar relacionado com tipo I em pacientes poloneses com toxoplasmose ativa (Switaj *et al.*, 2006). Em pacientes norte-americanos que sofreram vitrectomia, a presença de lesões oculares foi associada a linhagens polimórficas (Grigg, Ganatra, *et al.*, 2001). No Brasil, o desenvolvimento de toxoplasmose ocular devido a infecção pós-natal foi associado à infecção por *T. gondii* tipo I (Vallochi *et al.*, 2005) e, posteriormente, por novos genótipos (Khan *et al.*, 2006). Na Colômbia, o desenvolvimento de toxoplasmose ocular foi associado ao tipo I e a linhagens polimórficas, embora em apenas 3 indivíduos a genotipagem tenha sido completa (de-la-Torre *et al.*, 2013).

A genotipagem do parasito em pacientes com toxoplasmose ocular muitas vezes é inviável pela dificuldade de detecção do DNA do parasito no sangue periférico de indivíduos na fase crônica da toxoplasmose. Com o intuito de contornar esse problema, peptídeos linhagem específicos foram desenvolvidos. Por meio de técnica de ELISA modificada, utilizando seis diferentes peptídeos, é possível distinguir entre infecções causadas por tipo II e não por tipo II (Kong *et al.*, 2003). Por meio de sorotipagem observou-se que uma nova linhagem não reativa com nenhum dos peptídeos utilizados era a mais frequente entre pacientes alemães portadores de toxoplasmose ocular (Shobab *et al.*, 2013). Entre pacientes colombianos a sorotipagem apresentou pacientes com tipo I/III, não reativos e um atípico, enquanto na França todos foram sorotipados como tipo II, exceto um paciente com sorotipo atípico (de-la-Torre *et al.*, 2013).

## **2.6 – Resposta imune a *Toxoplasma gondii***

### **2.6.1- Resposta Imune celular**

Em geral, o início da resposta imune é dependente de uma classe de receptores de superfície altamente conservados, os *Toll-like receptors* (TLR's). Os TLR's são expressos na superfície de monócitos e macrófagos e são capazes de reconhecer padrões moleculares altamente conservados (PAMP's) presentes na superfície de organismos infecciosos. Na resposta contra *T. gondii* há a ativação principalmente do TLR11, por meio da ligação da profilina, proteína que se liga à actina, presente no parasito (Akira *et al.*, 2001).

O papel do TLR9 na resposta imune a *T. gondii* ainda é pouco esclarecido. Sabe-se que o principal ligante para estes receptores é DNA CpG, tipicamente encontrado em bactérias (Agrawal and Kandimalla, 2003). No entanto, já foi demonstrado que TLR9 também pode ser ativado por moléculas presentes em *Plasmodium falciparum*, indicando um importante papel no reconhecimento de parasitos Apicomplexa (Pichyangkul *et al.*, 2004; Coban *et al.*, 2005). Foi demonstrado ainda que camundongos deficientes em TLR9, infectados por *T. gondii*, apresentam uma diminuição na resposta tipo Th1 (Minns *et al.*, 2006). Demonstrou-se ainda que a presença de polimorfismo único (rs352140) no gene de TLR9 está relacionada com o desenvolvimento de lesão ocular (Peixoto-Rangel *et al.*, 2009). Ainda, a presença deste mesmo polimorfismo pode levar

ao aumento na expressão de IgM, contribuindo para o surgimento de doenças auto-imunes (Kikuchi *et al.*, 2005).

O gene de TLR9 está localizado em um complexo gênico presente no cromossomo 3. Apresenta 16 exons e 10 diferentes RNA's mensageiros. O SNP rs352140 está localizado em uma região exônica, na posição 2269 no gene de TLR9. Esta região polimórfica apresenta três variações alélicas A, T e C, sendo o alelo C considerado o alelo ancestral. A presença do polimorfismo gera uma alteração sinonima, ou seja não há substituição de aminoácidos na proteína. Produzida (Base de dados NCBI).

A ligação de PAMP's presentes em *T. gondii* leva à ativação de uma cascata de sinais intracelulares, iniciada nos TLR's e mediada pela molécula adaptadora MyD88. MyD88 por sua vez ativa NF- $\kappa$ B e MAPK, e a subsequente produção de citocinas inflamatórias, entre elas a IL-12 (Akira *et al.*, 2001).

Em modelo murino a ausência de MyD88 leva a suscetibilidade à infecção por *T. gondii*, e 100% de mortalidade ainda na fase aguda (Sukhumavasi *et al.*, 2008). No entanto estudos desenvolvidos com diversas linhagens de camundongos *Knockouts* têm demonstrado que a ausência de 1 ou mais TLR's específicos não é suficiente para induzir 100 % mortalidade (Melo *et al.*, 2010) indicando que outras vias de sinalização independentes de MyD88 também estão envolvidas na resistência a infecção por *T. gondii*.

Uma classe de receptores conhecidos como *NOD-like receptors* (NLR's) estão envolvidos na ativação de caspase 1 por meio de um complexo conjunto de proteínas denominado inflamossoma (Latz *et al.*, 2013). A infecção por *T. gondii* ativa o inflamassoma por meio do receptor NLR1 (Ewald *et al.*, 2014), possivelmente por meio da proteína de superfície GRA15 (Gov *et al.*, 2013). Após sua ativação do inflamossoma, a caspase 1 é capaz de converter as pro-formas de IL-1b, IL-18 e IL-33 em citocinas ativas (Latz *et al.*, 2013). Tanto IL-1b quanto IL-18 usam MyD88 como molécula adaptadora levando a ativação de NF- $\kappa$ B e MAPK, e à produção de IL-12 (Adachi and Alam, 1998). Na presença de IL-12, IL-1b e IL-18 são capazes de potencializar a produção de IFN- $\gamma$  por células *Natural Killers* (NK) (Hunter *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 2000).

Células NK e macrófagos são fundamentais no combate à infecção aguda. Os macrófagos podem atuar tanto como células efetoras quanto como células apresentadoras de antígeno (APC's). Eles são capazes de ativar células B e T,

além de produzir NO, citocinas protetoras, tais como, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ . A produção destas citocinas contribui para estimulação das células NK, que por sua vez também se tornam produtoras de IFN-  $\gamma$  capazes de ativar macrófagos não infectados para a produção de IFN-  $\gamma$  (Filisetti and Candolfi, 2004).

Células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são os tipos celulares fundamentais para o controle da infecção por *T. gondii*. Estas exercem suas funções através de atividades citotóxicas e/ou secreção de citocinas envolvidas na regulação da resposta imune (Hunter *et al.*, 1994). A resistência à infecção por *T. gondii* está intimamente relacionada a uma resposta tipo Th1, caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$  e consequente ativação de macrófagos, células NK e T CD8<sup>+</sup> citotóxicas. Desse modo o controle eficaz da infecção se dá pela ação sinérgica entre células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> (Nagasawa *et al.*, 1991).

Células TCD 8<sup>+</sup> são essenciais na fase aguda da infecção, exercendo atividade citotóxica contra taquizoítas ou células infectadas por *T. gondii* (Yano *et al.*, 1989). Células T CD8<sup>+</sup> lisam células infectadas e expõem os parasitos previamente protegidos a mecanismos e elementos imunológicos tais como: anticorpos, moléculas do sistema complemento, macrófagos e células NK (Hegab and Al-Mutawa, 2003)

Células T CD4<sup>+</sup> tipo Th2 também são necessárias para o controle eficaz da infecção pois são fontes de IL-4, citocina necessária para a ativação de células B. Porém, se a resposta à infecção por *T. gondii* se desenvolver em vigência da predominância da resposta imune Th2, a replicação do parasito será detida com mais dificuldade e poderão surgir problemas clínicos devido à destruição tecidual (Filisetti and Candolfi, 2004).

Após a fase aguda, é necessário que a intensa resposta inflamatória montada seja controlada. Células T reguladoras, produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$ , são responsáveis por modular a resposta imune, diminuindo a resposta pró-inflamatória, que muitas vezes é a principal responsável pelas patologias identificadas em indivíduos portadores de *T. gondii* (Nguyen *et al.*, 1998; Dawson *et al.*, 2005).

### **2.6.2- Resposta imune mediada por anticorpos anti-*T. gondii***

A resposta imune humoral é basicamente dirigida às formas taquizoítas que são liberadas após a lise das células hospedeiras. Anticorpos específicos



também são capazes de inibir a fixação do parasito às células hospedeiras, controlando a infecção. Sabe-se ainda que hospedeiros cronicamente infectados geralmente são resistentes à infecção por novos organismos. Isso provavelmente é devido à presença de anticorpos circulantes, numa situação chamada de imunidade concomitante. Porém, uma infecção por diferentes cepas pode ocorrer ocasionalmente causando reagudização (Hegab and Al-Mutawa, 2003).

A primeira classe de anticorpo a ser detectada após infecção por *T. gondii* é IgM (Davidson *et al.*, 1993). A presença de IgM é tida como sinal de infecção recente e pode ser detectada de 3 a 10 dias após a infecção. Seu título máximo é atingido cerca de 1 a 2 meses após a infecção decaindo após 8 meses (Karim and Ludlam, 1975). No entanto, para alguns pacientes, os anticorpos IgM podem ser detectáveis entre 7 a 12 anos após a infecção aguda (Bobić *et al.*, 1991; Bertozzi *et al.*, 1999).

A produção de IgM é seguida por IgA. A produção de IgA é estimulada por citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (Defrance *et al.*, 1992). Anticorpos IgA são detectados sob duas formas: IgA sérico, também conhecido como IgA 1 e IgA de mucosa (IgA 2). Ambas as formas são encontradas durante a infecção por *T. gondii*. Na infecção adquirida, IgA é produzida durante a fase digestiva do parasito por linfócitos presentes na lâmina própria do trato gastrointestinal (Husband and Gowans, 1978). É possível detectar IgA no soro até 9 meses após a infecção (Foudrinier *et al.*, 1995). Também podemos identificar IgA em sítios ativos de infecção. Alguns autores têm proposto que tal fato pode ser devido à presença de TGF- $\beta$  um potente fator de conversão para IgA (Stavnezer, 1995; Labalette *et al.*, 2002).

IgG é considerada a principal classe de imunoglobulina envolvida na resistência a *T. gondii* (Ronday *et al.*, 1999). As imunoglobulinas G podem ser detectadas no soro de indivíduos contaminados depois de 8 a 12 dias de infecção, com um pico de titulação após 1 ou 2 meses, a partir de então começam a declinar para um ponto estável, mas continuarão positivos indefinidamente, durante toda a fase crônica da toxoplasmose (Karim and Ludlam, 1975). As quatro subclasses de IgG apresentam proporções desiguais durante a infecção. Sendo IgG1, IgG2 e IgG3 predominantes. As IgGs são capazes de produzir citotoxicidade mediada por anticorpos ou opsonização graças à receptores Fc presentes na superfície de

macrófagos e outras células. Eles também são capazes de proteger o feto graças a sua capacidade de atravessar a placenta (Filisetti and Candolfi, 2004).

Trabalho prévio mostrou que pacientes portadores de lesões oculares apresentam níveis elevados de IgG total e IgM. Porém, a presença de IgM em níveis elevados foi detectada apenas em pacientes portadores de lesão ocular, inclusive em pacientes soronegativos para toxoplasmose. Assim, apesar de sua importância, muito pouco se sabe sobre o papel de IgM no contexto da toxoplasmose ocular (Martins, 2009).

## **2.7 – Diagnóstico**

O diagnóstico laboratorial para toxoplasmose pode ser realizado por meio de métodos diretos ou indiretos. Os métodos de identificação direta são muito úteis principalmente em indivíduos imunocomprometidos ou imunodeprimidos (Montoya and Liesenfeld, 2004). O isolamento do parasito diretamente de tecidos e fluídos (sangue, líquido cérebro-espinhal, leite, humor vítreo e aquoso, entre outros) pode ser realizada principalmente durante a fase aguda da infecção ou na reativação da fase crônica (Hitt and Filice, 1992; Montoya, 2002). Os testes de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) têm se demonstrado importantes para o diagnóstico pré-natal de toxoplasmose congênita, por identificar a infecção precocemente, evitando procedimentos invasivos para o feto (Hohlfeld *et al.*, 1994; Montoya, 2002), e em casos de toxoplasmose ocular atípica (Montoya and Remington, 1996; Fardeau *et al.*, 2002). Entretanto, estes métodos não são empregados como rotina para o diagnóstico da toxoplasmose.

Os testes sorológicos por sua vez, são amplamente utilizados. A identificação de anticorpos, bem como a determinação da classe de imunoglobulina predominante no soro de indivíduos contaminados pode trazer informações sobre a fase evolutiva da doença. O teste de Sabin & Feldman, também conhecido como “*Dye test*”, é considerado o teste padrão ouro para toxoplasmose. Este teste detecta a infecção precocemente, com alta sensibilidade e especificidade (Sabin and Feldman, 1948). Porém, devido à dificuldades em sua execução, este método não é utilizado rotineiramente, sendo executado apenas em centros de pesquisa, principalmente como referência para padronização de outros métodos.

A metodologia mais comum para o diagnóstico sorológico de toxoplasmose é a detecção de IgG total por meio de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). A utilização de IgG total, ou suas subclasses, é útil, visto que esta classe de imunoglobulina aparece de uma a duas semanas após a infecção e permanece durante toda vida do indivíduo (Montoya and Liesenfeld, 2004).

Os testes que identificam IgM são valiosos no diagnóstico da fase aguda da infecção. Testes para detecção de IgA, são indicados para diagnóstico de fetos e recém-nascidos, por serem mais sensíveis que os testes para detecção de IgM (Stepick-Biek *et al.*, 1990; Decoster *et al.*, 1991). Entretanto, IgA pode ser detectado durante anos em adultos, não tendo portanto, valor diagnóstico para a fase aguda da infecção, isoladamente. O uso de IgE como ferramenta diagnóstica só é recomendado em combinação com outros testes sorológicos (Pinon *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 1993). Outros testes indiretos também podem ser utilizados, tais como: reação de fixação do complemento (RFC), reação de imunofluorescência indireta (RIF), reação de hemoaglutinação indireta (RHI), *Western Blot*, entre outros.

O diagnóstico da toxoplasmose ocular é normalmente feito de acordo com as características da lesão, aliado a sorologia (Garweg, 2005). No entanto, principalmente em casos de lesão tipo C, esse diagnóstico é seriamente prejudicado, o que pode levar a erros no estabelecimento do tratamento. Muitos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de métodos diagnósticos precisos para a toxoplasmose ocular, tais como a identificação de parasitos no humor aquoso por meio de PCR (Montoya *et al.*, 1999; Fardeau *et al.*, 2002; Garweg, 2005) e a identificação de imunoglobulinas no meio intraocular (Garweg, 2005). No entanto, tais técnicas são caras e invasivas o que as torna inviáveis para a prática clínica.

O uso de citometria de fluxo tem sido proposto como novo método de diagnóstico sorológico diferencial para infecção causadas por *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*. Esta técnica também vem sendo empregada para a comprovação de cura para doença de Chagas e leishmaniose (Brézin *et al.*, 1991; Martins-Filho *et al.*, 1995; Cordeiro *et al.*, 2001; Martins-Filho *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2006; de Andrade *et al.*, 2007; Pissinate *et al.*, 2008; Silva-dos-Santos *et al.*, 2012)

O uso de citometria de fluxo para diagnóstico da toxoplasmose também foi demonstrado, inclusive como forma alternativa para aplicação do “*Dye Test*” (Cozon *et al.*, 1993; Cozon *et al.*, 1999). Em estudo recente foi observado que a aferição dos níveis de IgM e IgG anti-*T. gondii* por meio de citometria de fluxo foi capaz de promover a diferenciação entre fases aguda e crônica da toxoplasmose (Silva-dos-Santos *et al.*, 2012).

### III- OBJETIVOS

#### 3.1- Objetivo Geral

Identificar marcadores imunogenéticos, imunológicos e parasitológicos associados ao desenvolvimento de Toxoplasmose ocular em região altamente endêmica para toxoplasmose.

#### 3.2- Objetivos específicos

Quanto aos parâmetros imunogenéticos investigar se o SNP *rs342140* no gene de *TLR9* está associado com a manifestação de toxoplasmose ocular.

Quanto aos parâmetros imunológicos: relacionar a presença de SNP *r352140* no gene de *TLR9* com níveis séricos de IgG e IgM específicos anti-*T. gondii*, avaliados por citometria de fluxo, em indivíduos acometidos ou não por toxoplasmose ocular.

Quanto aos parâmetros epidemiológicos, investigar por meio de ELISA antígeno esporozoíto-específico (TgERP) a via de infecção por *T. gondii*.

Quanto aos parâmetros parasitológicos, investigar DNA de *T. gondii* em sangue periférico de pacientes cronicamente infectados e soronegativos de acordo com testes comerciais, e por meio de genotipagem multi-loci das seguintes regiões do genoma do parasito: ITS1, NTS2, B1, SAG1, SAG3, SAG4.

## VI- POPULAÇÃO ESTUDADA, MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- População estudada

Este estudo foi realizado com indivíduos residentes no município de Campos dos Goytacazes/RJ, os quais foram agrupados com base na infecção por *T. gondii* e manifestação de doença ocular. Amostras de sangue periférico foram coletadas após consentimento informado e identificadas por códigos alfanuméricos com intuito de resguardar os direitos de privacidade dos indivíduos.

Os critérios utilizados para seleção dos indivíduos foram: 1) teste sorológico para toxoplasmose; 2) exame oftalmológico para verificação de lesões oculares e classificação das lesões em A, B e C de acordo com suas características morfológicas considerando a severidade do envolvimento da retina e da coróide e pigmentação; 3) sexo; 4) idade; 5) estado imunológico, sendo que foram excluídos indivíduos com imunodepressão e/ou debilitados no seu estado geral de saúde.

Por meio de parceria com o Hemocentro do Hospital Ferreira Machado foi coletado sangue de 467 indivíduos doadores de sangue. Em 235 indivíduos foi realizada sorologia para toxoplasmose por meio do kit comercial específico para IgG e para IgM (AxSYN Abbot). Nos demais indivíduos a sorologia foi feita por ELISA *in house*. Cento e oitenta e três indivíduos foram submetidos a exame oftalmológico para identificação de retinocoroidites toxoplásmicas e classificação das lesões de acordo Bahia-Oliveira *et. al*, 2012 (Tabela 1). Apenas as 183 amostras provenientes de indivíduos que realizaram o exame oftalmológico foram selecionadas para os estudos parasitológico, epidemiológico, imunológico e imunogenético.

Também participam deste estudo indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes recrutados em áreas previamente estudadas (N=360). O diagnóstico sorológico para toxoplasmose foi obtido por meio do Kit VIDAS (*BioMerieux*). Todos indivíduos deste grupo de estudo foram submetidos a exames oftalmológicos, e agrupados segundo os mesmos critérios utilizados para os indivíduos doadores de sangue. Os resultados dos exames sorológicos e fundoscópicos podem ser observados na Tabela 1.

Todos os indivíduos que participaram do estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e, somente após o esclarecimento sobre sua forma de participação e leitura do termo de consentimento pelo indivíduo, é que se procedeu à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Faculdade de Medicina de Campos e ao Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o número 17560013.1.0000.5244.

**Tabela 1:** Grupos de indivíduos envolvidos no estudo imunogenético, imunológico, epidemiológico e parasitológico, segundo a sorologia para toxoplasmose e fundoscopia.

Sorologia	Apresentação Clínica	Tipo de Cicatriz	Estudo Imunogenético	Estudo Imunológico	Estudo Epidemiológico	Estudo Parasitológico	Total*
Positiva	TOXO (NL) <sup>d</sup>	NL	179	80	91	124	304
		TOXO (A) <sup>a</sup>	37	14	20	10	47
	TOXO (L) <sup>e</sup>	TOXO (B) <sup>b</sup>	26	9	21	9	35
		TOXO (C) <sup>c</sup>	28	13	28	14	42
Negativa	TOXO (NL)	NL	44	21	25	24	109
		TOXO (B)		3	2		3
	TOXO (L)	TOXO (C)	0	3	3	1	3
			<b>314</b>	<b>143</b>	<b>190</b>	<b>182</b>	<b>543*</b>

<sup>a</sup> O grupo TOXO (A) A inclui indivíduos com cicatrizes tipo A, ou com cicatrizes múltiplas tipo AB ou ABC. <sup>b</sup>: O grupo TOXO (B) inclui apenas indivíduos com lesão tipo B; <sup>c</sup> inclui apenas indivíduos com lesão tipo C. <sup>d</sup> O grupo TOXO (L) inclui indivíduos com cicatrizes oculares, independentemente do tipo de lesão apresentada.

<sup>e</sup> O grupo TOXO (NL) apresenta indivíduos sem cicatrizes oculares

\* O total de indivíduos não corresponde à soma de cada grupo de estudo visto que de modo geral, os indivíduos participaram de mais de um estudo.



## 4.2 - Coleta de Amostras de Sangue Periférico

O sangue dos indivíduos voluntários foi coletado por venopunção através do sistema de tubos a vácuo contendo o anticoagulante citrato de sódio, e na ausência de anticoagulante. As amostras de sangue coletadas em tubos contendo citrato de sódio foram utilizadas para o estudo genético. Para que possam ser realizados os testes para detecção de anticorpos anti- *T. gondii* as amostras sanguíneas coletadas em tubos sem anticoagulante foram processadas para obtenção do soro. Tanto o sangue quanto o soro foram armazenados a -20°C.

## 4.3- Estudo Genético

### 4.3.1- Extração de DNA Genômico de Amostras de Sangue Total

DNA genômico foi extraído e purificado de amostras de sangue total com o kit comercial *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Brevemente, a 100µL de sangue com anticoagulante foram adicionados 20µL de proteinase K. Após ajuste de volume, com PBS, para 220 µL foram adicionados 200 µL de tampão AL, misturados com auxílio de vórtex e incubados a 56°C por 10 minutos. Após incubação foram adicionados 200µL de etanol 100% e novamente misturado com auxílio do vórtex.

A solução resultante foi pipetada em colunas, encaixadas sobre um tubo de 2mL, e centrifugadas a 6000xg por 1 minuto. A solução que passou através das colunas foi descartada, as colunas foram reposicionadas em novo tubo. Para lavagem da mesma foram adicionados 500µL de tampão AW1 com etanol e então centrifugadas a 6000xg por 1 minuto. Foram adicionados 500 µL de tampão AW2. Foi feita uma nova etapa de centrifugação da coluna por 5 minutos a 20.000xg para secar. A coluna com o DNA aderido, foi então posicionada em um novo tubo de 2ml e pipetados 100µL de tampão AE diretamente sobre a membrana. Após a incubação de 1 minuto a temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado a 6000xg por 1,5 minutos. Este último procedimento foi repetido para melhor eluição do DNA. O sobrenadante, contendo DNA foi armazenado a -20°C até o uso.

### 4.3.2- Quantificação de DNA por Espectrofotometria

Alíquotas de 2µL de DNA foram quantificadas por meio do equipamento *NanoDrop Spectrophotometer* ND-1000, utilizando o *software NanoDrop* ND-1000. A concentração, medida em ng/µL, foi determinada pela medida da

absorbância das amostras a 260nm. Foram feitas também leituras a 280nm e 230nm para se avaliar a pureza das amostras de DNA, que foram estimadas pelas seguintes razões:  $A[260]/A[280]$  e  $A[260]/A[230]$ , no qual o mais puro DNA encontrava-se próximo a 1.8 e 1.2, respectivamente

As amostras de DNA de todos os indivíduos foram avaliadas por PCR touchdown para checar o sucesso da extração, antes do início dos ensaios genéticos. Para cada tubo de reação foi adicionado 3µl de amostra de DNA genômico diluído 1:10. Após, foram adicionados 8,5µl de uma mistura de reação de PCR contendo 7,45µl de uma mistura mestre (tampão de PCR 10X, 25mM MgCl<sub>2</sub>; 5mM dNTPs; 5M Betaine), 10µl de cada par de primer previamente diluído 1:10 e 0,25U de AmpliTaq Gold DNA polimerase. A amplificação do PCR foi feita sob as seguintes condições:

94 °C por 10 min (aquecimento inicial)		
94 °C por 20 seg (desnaturação)		
63-56 °C por 60 seg usando decréscimo de 0,5 °C/ ciclo (anelamento)		} 14 ciclos
72°C por 60 seg (extensão)		
94°C por 20 seg	} 20 ciclos	
56°C por 60 seg		
72°C por 60 seg		
72°C por 5 min		

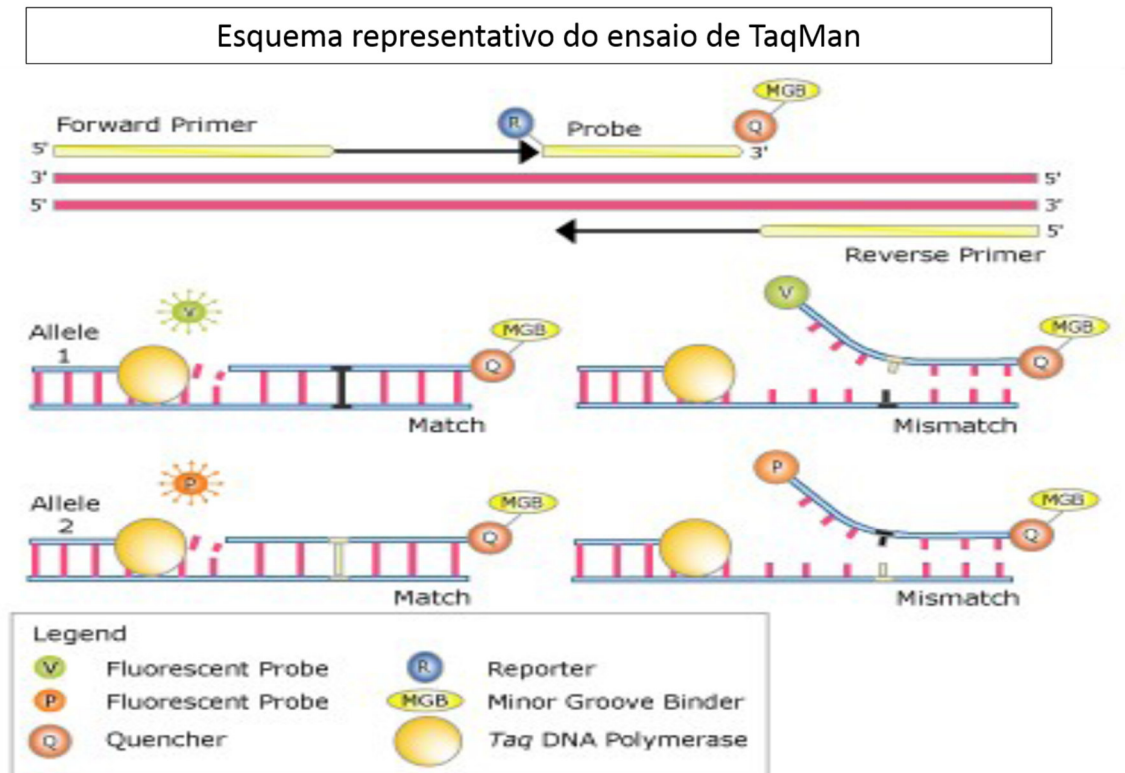
A visualização dos produtos da PCR *Touchdown* foi feita por meio de gel de agarose a 2% e estocadas a -20°C.

#### 4.3.3- Ensaio de *Taqman*

Ensaio *Taqman* foi aplicado para genotipar o SNP rs352140 de TLR9. Para tanto, amostras de DNA foram diluídas no tampão AE (do kit comercial *DNeasy Blood Tissue* - Qiagen) com uma concentração final de 400ng e colocadas em placas de 96 poços. Essas placas foram enviadas para a empresa *LGC Genomics*.

Resumidamente, o ensaio *TaqMan* é um ensaio que utiliza a atividade de exonuclease 5'-3' da DNA polimerase *Termus aquaticus* (Taq) para clivar uma sonda marcada duplamente e anelada a uma sequência alvo localizada entre os dois sítios ligantes do iniciador (*primer*). A discriminação alélica é feita usando PCR e, cada ensaio requer dois iniciadores não marcados e duas sondas alelo-

específicas duplamente marcadas com molécula repórter (duas moléculas repórter com fluorescência em comprimentos de onda distintos para alelo 1 e alelo 2) e molécula *quencher* (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema representativo do ensaio de *TaqMan* utilizado para genotipar SNPs potencialmente associados com a toxoplasmose ocular. Durante a PCR, cada sonda anela especificamente a uma sequência complementar entre os sítios de ambos *primers*. À medida que a enzima Taq polimerase cliva a sonda que hibridiza com o alvo, a fluorescência emitida pelo corante repórter é aumentada. O aumento substancial somente da fluorescência do corante VIC expressa homozigossidade para o alelo 1; o aumento somente da fluorescência do corante FAM significa homozigossidade para o alelo 2; o aumento substancial da fluorescência de ambos corantes (V e F) expressa heterozigossidade para os alelos 1 e 2. (Imagem: LgC Bioscience)

#### 4.3.4- Análise do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Análises de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foram realizadas utilizando planilha customizada do *Microsoft Excel*, de modo a certificar que não houve nenhum desvio, visto que desvios significantes neste teste podem ser interpretados como de erro de amostragem. Portanto, antes das análises associativas todos os dados de genotipagem foram verificados em relação ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. As frequências alélicas foram consideradas como dentro da proporção de *Hardy-Weinberg* quando valores de  $p$  forem maior ou equivalente a 0.05 ( $p \geq 0.05$ ).

#### **4.3.5 - Análise de Associação Genética**

As distribuições genótípicas e alélicas dos indivíduos casos (com sorologia positiva e presença de lesão ocular) e controles (sorologia positiva sem lesão ocular) foram comparadas usando o teste estatístico  $\chi^2$ , por meio de planilha customizada do *Microsoft Excel*, e pelo teste exato de *Fischer*, por meio do *software GraphPad Prism*.

#### **4.4 – Avaliação dos níveis séricos de Imunoglobulinas por meio de citometria de fluxo**

##### **4.4.1- Adsorção de soros com Proteína A**

Os títulos de IgG anti *T. gondii* são muito elevados quando comparados às outras classes de imunoglobulinas. Como consequência, os sítios de ligação para as imunoglobulinas são preenchidos de forma majoritária por IgG, dificultando a ligação de outras classes de imunoglobulinas. Assim, para maior acurácia na identificação de imunoglobulinas M uma alíquota do soro de cada indivíduo foi adsorvida com Proteína A agarose (*Sigma-Aldrich*).

Em 100µL de Proteína A agarose, em solução A (descrita pelo fabricante) foram adicionados 100µL de soro dos indivíduos participantes, em tubos cônicos com capacidade para 500 µL. Os tubos foram agitados gentilmente por 1 hora. Após um repouso de 30 minutos, 100 µL do sobrenadante foram cuidadosamente retirados, para que não haja mistura entre a proteína A decantada e o soro adsorvido. Os soros adsorvidos foram congelados a -20°C até seu uso.

##### **4.4.2 - Preparação de Antígenos de *Toxoplasma gondii* para citometria de fluxo**

Taquizoítas de *T. gondii*, cepa RH, foram mantidos por meio de passagens sucessivas em camundongos BALB/c fêmeas de quatro semanas de idade. Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e presos à placa de cortiça em decúbito dorsal com auxílio de agulhas. Foram injetados 5 ml de PBS estéril e gelado sob o peritônio previamente exposto. O peritônio foi massageado e o líquido peritoneal contendo os taquizoítas foi recolhido através de punção com seringa. Para manutenção da cepa, foram inoculados intraperitonealmente de 0,3 - 0,5 mL de material recolhido do lavado peritonal, por camundongo.

Para a preparação de taquizoitos fixados para Citometria de Fluxo, a lavagem peritoneal dos camundongos foi feita com 5ml de meio RPMI,

geralmente após 3 dias de infecção. O material coletado foi centrifugado a 700xg, a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em aproximadamente 30 ml de PBS e centrifugado a 900g por 10 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuspensionado em aproximadamente 40 ml de solução fixadora (1:1 PBS - Max Facs Fix) e mantido em repouso *overnight* a 4°C.

Após esse período os parasitos foram centrifugados a 900xg e ressuspensionados em 10 ml de PBS. Foi retirada uma pequena alíquota para contagem em câmara de Neubauer. O volume foi ajustado com PBS para uma concentração final de  $5,0 \times 10^6$  parasitos/mL.

#### **4.4.3 - Citometria de fluxo para detecção de antígenos na superfície de taquizoítos**

Os soros dos indivíduos foram submetidos a 4 diluições seriadas (em base 4) em PBS suplementado com 3% de Soro Fetal Bovino (SFB). Para a avaliação dos níveis séricos de IgM os soros foram inicialmente diluídos em 1/400, enquanto para IgG a diluição inicial foi 1/1000. Volume equivalente a 50 µL, para as quatro diferentes diluições de soro, foi dispensado em placas de 96 poços e fundo em U. Sobre os soros foram adicionados 50µL de solução contendo taquizoítos de parasitos fixados, contendo aproximadamente  $5 \times 10^6$  parasitos por ml ( $2,5 \times 10^5$  taquizoítos). As placas foram mantidas a 37°C por 30 min. Após a incubação as placas foram lavadas 2 vezes, com 200µl PBS suplementado com 3% de SFB, por centrifugação a 1000xg por 10 min.

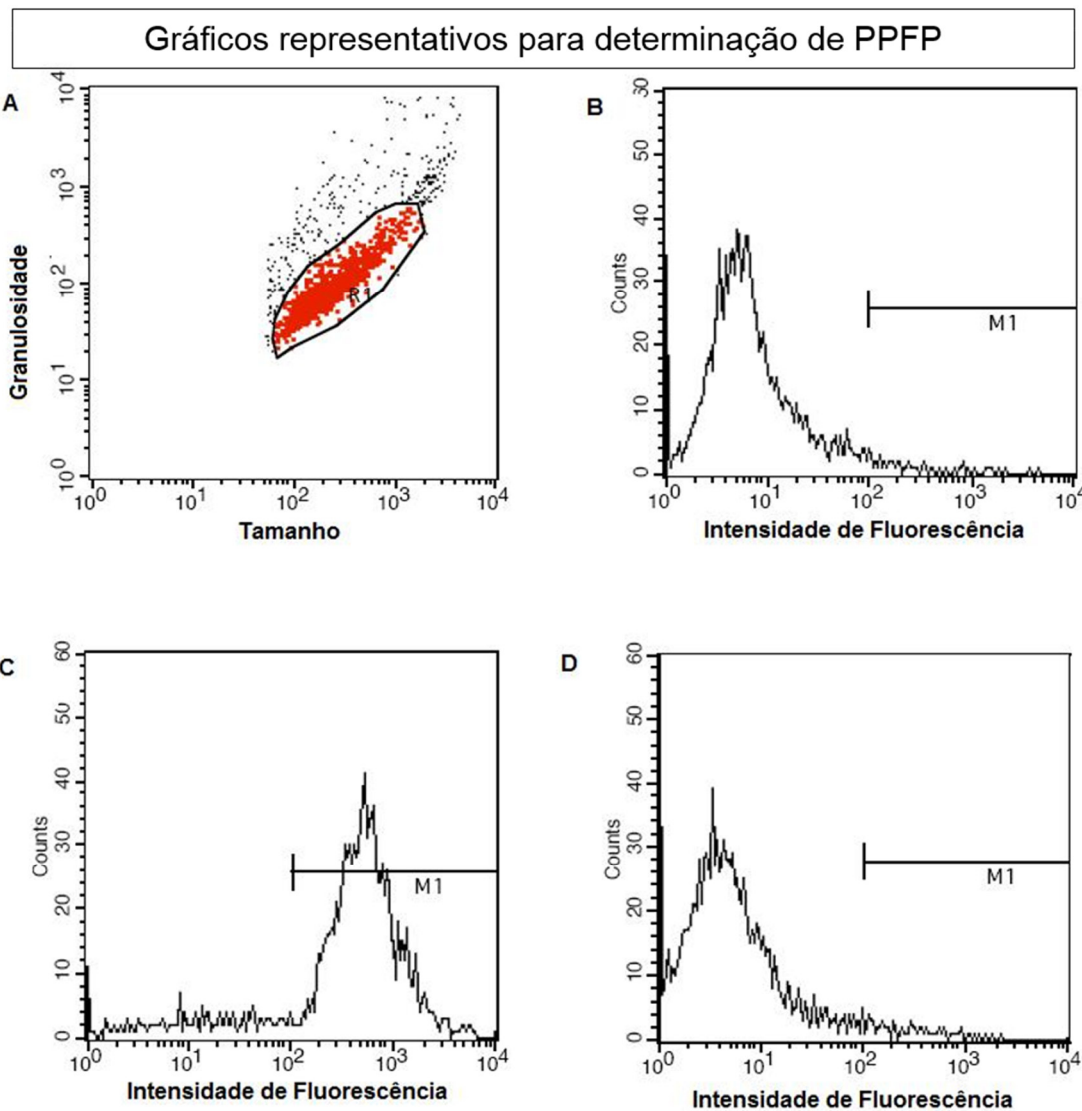
Os anticorpos anti-imunoglobulinas humanas IgM (1/200) e IgG total (1/2000) conjugados a FITC foram adicionados em cada poço e incubados a 37°C por 60 min. Como controle para as ligações não específicas, anticorpos foram adicionados a formas taquizoítas de *T. gondii* na ausência de soro humano. Após a incubação foi feita nova etapa de lavagem conforme descrito.

Ao final, os parasitos foram ressuspensionados em 200µl de solução fixadora Max Facs Fix e armazenados por até 24h a 4°C, ao abrigo da luz, para posterior análise em citômetro de fluxo.

A aquisição dos dados foi feita no *Becton Dickinson Facs Calibur*, com uso do *software CellQuest*, ou no *Becton Dickinson Facs Canto*, com uso do *Software Diva* (para as leituras realizadas no *National Institutes of Health*, Bethesda, MD, USA). Os dados foram analisados por meio do *software FlowJo*. Para cada

amostra individual foram adquiridas informações relativas aos parâmetros tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e intensidade relativa de fluorescência de 5.000 parasitos. A figura 3A mostra a distribuição característica que as formas taquizoítas de *T. gondii* apresentam em gráficos de tamanho versus granulosidade, o que permite o posicionamento de um marcador sobre a região correspondente à população de interesse (R1).

Utilizando histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, foi feita análise da intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada. Para cada experimento foi estabelecido um limiar de positividade de no máximo 2%, em função da curva de fluorescência do tubo controle de ligação inespecífica do anticorpo secundário (Figura 3B). Em seguida, o mesmo marcador (M1) foi empregado para obtenção do percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) para cada amostra individual (Figura 3C e D).



**Figura 3:** Gráficos representativos utilizados para determinar a Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos (PPFP). Seleção da população de parasitos florescentes positivos, gráfico de tamanho versus granulossidade (A); Controle interno da reação (parasitos incubados apenas com conjugado) (B); paciente soropositivo para toxoplasmose (C); paciente soronegativo para toxoplasmose (D). O posicionamento do marcador 1 (M1) segue o critério de se obter no máximo 2% de parasitos fluorescentes positivos, para o controle interno da reação.

#### 4.5- Detecção de Anticorpos IgG anti-TgERP no soro dos indivíduos por ELISA

O teste de ELISA com antígeno TgERP foi realizado essencialmente como descrito por Hill e colaboradores (2011). As placas de poliestireno de fundo chato (Corning) foram sensibilizadas com 100  $\mu$ L do antígeno TgERP (*Toxoplasma gondii* embryogenesis-related protein) diluído a 2  $\mu$ g/mL em tampão carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,6 e incubada a 4°C *overnight*. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem contendo 50 mM Tris, pH 7.4,

150 mM NaCl, 5% de leite desnatado e 1.0% de triton X-100. A seguir, as placas foram incubadas com soros diluídos a 1/500 em tampão de lavagem (100 ul/poço), durante 30 min em temperatura ambiente. Após mais um ciclo de três lavagens, adicionou-se IgG humana conjugada à peroxidase (KPL), diluída a 1/1000 em tampão de lavagem (100 ul/poço). As placas foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente e, em seguida, lavadas novamente três vezes e incubadas com 100 ul poço da solução reveladora. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (*Vmax ELISA reader*), usando-se filtro de 405 nm de comprimento de luz. O ponto de corte (*cut-off*) do teste foi calculado pela média das amostras negativas acrescida de três vezes o desvio padrão dessas amostras.

#### **4.6 – Genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de sangue periférico de pacientes humanos**

##### **4.6.1 –Extração de DNA de sangue periférico para identificação de *T. gondii***

Com a finalidade de detectar DNA proveniente de *T. gondii* no sangue periférico de indivíduos doadores de sangue, foi utilizado o *kit DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen)*. O volume de 500µl de sangue com anticoagulante foi adicionado a 20µl de proteinase K e 500µl de tampão AL, misturados com auxílio de vórtex e incubados a 56°C por 10 minutos. Após incubação foram adicionados 500µl de etanol 100%, novamente misturado com auxílio do vórtex.

As demais etapas do processo de extração foram realizadas conforme descrito no item 4.3.1.

##### **4.6.2 - Reação em Cadeia da Polimerase**

As amostras de DNA foram submetidas a *nested PCR* para identificação e posterior genotipagem de DNA de *T. gondii*. Foram utilizados dois pares de primers, internos e externos, específicos para ITS1, NTS2, B1, SAG1, SAG3 (Tabela 2).

Para cada tubo de reação foi adicionado 5µL de amostra de DNA total. A mistura da reação de PCR continha 5µL de tampão 10 X (*AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Buffer I- Life Technologies*), 5µL de dNTPs (10pMol/mL), 5µl de cada par de primer a 50pmol/mL e 0,5µL (2,5 U) de Taq Gold DNA polimerase (*Life Technologies*). A amplificação do PCR se deu sob as seguintes condições:



- 1- 95 °C por 5 min (aquecimento inicial)
- 2- 95 °C por 40 seg (desnaturação)
- 3- 58 °C por 60 seg Anelamento
- 4- 72°C por 60 seg (extensão)
- 5- 72°C por 10 min
- 6- Mater a 4 °C

} 35 ciclos

Repetiu-se os passos 2 a 4 por 35 vezes.

Com a finalidade de realizar a reação secundária do *nested PCR* 1 µl do produto da reação acima descrita foi submetido a novo PCR com o par de primer interno, sob condições idênticas as descritas.

Volume equivalente a 5µL do produto da PCR, acrescidos de 1µl de tampão de corrida, foi submetido a corrida em gel de agarose a 0.8% à 100V por 25 min. Utilizou-se o corante Gel Red (*Biotium*) a 3% para visualização das amostras.

**Tabela 2:** Lista de *primers* externos e internos utilizados para as reações de *Nested PCR*, para identificação dos loci ITS1, NTS2, B1, SAG1, SAG3 e SAG4.

<i>Locus</i>	Direção	Primer externo	Primer interno
ITS1	F	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA	GTGAACCTTAACACTTAGAGG
	R	TGCGTTCTTCATCGTTGCGC	GAGCCAAGACATCCATTGCT
NTS2	F	ACCAGAAAGCCAGTGGAAATG	TGTGCTCGTGACTTGATGTG
	R	TTTGTTTTCTCGCGTAGAGG	GGAAAACAAGCGGTGAGATT
B1	F	TGTTCTGTCCTATCGCAACG	TCTTCCCAGACGTGGATTTC
	R	ACGGATGCAGTTCCTTTCTG	CTCGACAATACGCTGCTTGA
SAG1	F	GTTCTAACCACGCACCCTGAG	CAATGTGCACCTGTAGGAAGC
	R	GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	TTATCTGGGCAGGTGACAAC
SAG3	F	CAACTCTCACCATTCCACCC	TCTTGTCGGGTGTTCACTCA
	R	GCGCGTTGTTAGACAAGACA	CACAAGGAGACCGAGAAGGA
SAG4	F	TACGATTTCAAGAAGGCGCT	GGACGACGATGAAACAAAGA
	R	GTTCTTTCCCGTGTCTTGA	CAGAAGGGTATGGTTTCCTTCT

#### 4.6.3- Purificação e sequenciamento de DNA

Antes de serem sequenciados os produtos da PCR foram purificados. O kit *ExoSap-IT* (USB corp) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, a cada 5µL de produto da PCR foram adicionados 2µL de *ExoSap-IT*, seguida de incubação por 15 minutos para degradação dos primers e nucleotídeos livres seguida por nova incubação de 15 minutos a 80°C para que a *ExoSap* seja inativada.

Em placas de 96 poços para sequenciamento de DNA, foram adicionados

3 $\mu$ L do DNA previamente tratado com *ExoSap* e 2 $\mu$ L do *forward primer* interno a 3.2pmol/ml, de acordo com o fragmento a ser sequenciado. Em outra placa em paralelo, o mesmo procedimento foi realizado, porém, foram adicionados 2 $\mu$ L do *reverse primer*.

As placas foram enviadas para sequenciamento, pelo método Sanger, no *National Institute of Allergy and Infectious Disease* (NIAID), Rocky Mountain Laboratories Genomics, Hamilton, MT, USA.

As sequências obtidas foram agrupadas por meio do *software Seqman*, e alinhadas por meio do aplicativo *ClustalW*, do *software MEGA*. O *software MEGA* também foi utilizado para a construção de árvores filogenéticas para os loci NTS2 e B1. As árvores filogenéticas foram construídas sob os seguintes parâmetros: máxima verossimilhança foi utilizado como método estatístico, a filogenia foi testada por meio de 5000 repetições do teste de *Bootstrap*, utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros.

## V- RESULTADOS

### 5.1 - Comparações entre frequências alélicas das populações de Campos dos Goytacazes, CEU e YRI

O estudo imunogenético foi realizado com a participação de indivíduos doadores de sangue do Hemocentro Municipal do Hospital Ferreira Machado (N=172) e moradores do município de Campos dos Goytacazes (N=142), totalizando 314 indivíduos agrupados de acordo com a sorologia presença e severidade da lesão ocular (Tabela 3).

**Tabela 3:** Perfil das populações de estudo quanto à sorologia para toxoplasmose e exame fundoscópico.

População	Sorologia	Grupo	N	%
População 2	Positiva	TOXO (A) <sup>1</sup>	37	11,78
		TOXO (B) <sup>2</sup>	26	8,28
		TOXO (C) <sup>3</sup>	28	8,91
		TOXO (L) <sup>4</sup>	91	
	Negativa	TOXO (NL)	179	57,0
		NEG	44	14,02
		Total	314	100

<sup>1</sup>O grupo A inclui indivíduos com lesão tipo A, ou com lesões múltiplas tipo AB, ABC e AC. <sup>2</sup>O grupo B apresenta indivíduos com lesão tipo B ou lesão múltipla tipo BC. <sup>3</sup>O grupo C apresenta indivíduos que possuem apenas lesão C. <sup>4</sup>O grupo TOXO (L) inclui todos indivíduos que apresentam algum tipo de lesão ocular de qualquer origem.

As frequências alélicas para o SNP de TLR9 (*rs352140*) foram calculadas e comparadas com as encontradas nas populações YRI (Moradores de Ibadan, Nigéria, etnia lorubá) e CEU (Moradores de Utah, ascendência europeia ocidental ou nórdica) obtidas na base de dados *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). A frequência do alelo C foi maior na população de Campos (50,9%), assim como na população CEU (52,2%) e YRI (69,5%). No entanto, as frequências observadas em Campos foram mais próximas às observadas na população CEU, que aquelas observadas na população YRI (Tabela 4).

**Tabela 4:** Frequências alélicas para SNP de TLR9 (*rs352140*) em populações de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.

Alelo	Frequência alélica em Campos dos Goytacazes-RJ – População 2	Frequência alélica na população CEU <sup>a</sup>	Frequência alélica na população YRI <sup>b</sup>
<b>C</b>	0,509	0,522	0,695
<b>T</b>	0,491	0,478	0,305

<sup>1</sup>CEU: Moradores de Utah, com ascendência europeia ocidental ou nórdica;

<sup>2</sup>YRI: Moradores de Ibadan, Nigéria. Pertencentes à etnia Iorubá.

## 5.2- Estudo de associação genética com SNP do gene *TLR9*

Com o objetivo de validar a influência do polimorfismo *rs352140* na propensão ao desenvolvimento e severidade da toxoplasmose ocular foram feitas análises de associação genética em estudo tipo caso controle. Os indivíduos soropositivos para toxoplasmose que apresentaram cicatrizes oculares foram considerados casos, e indivíduos soropositivos que não apresentaram cicatrizes oculares foram considerados controles. Dessa forma, as frequências alélicas e genótípicas dos grupos TOXO (A), TOXO (B), TOXO (C) e TOXO (L), foram comparadas às frequências do grupo TOXO (NL) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Análises de associação genética entre SNP no gene de *TLR9* e manifestação ocular da toxoplasmose.

Grupos	Valor de P Teste X <sup>2</sup>		EHW (Casos)	EHW (Controles)
	Alelos	Genótipos		
<b>TOXO (A)</b>	0,3831	0,6960	0.7401	0.233
<b>TOXO (B)</b>	0,9578	0,7106	0.671	
<b>TOXO (C)</b>	<b>0,0146</b>	<b>0,0075</b>	<b>0.006</b>	
<b>TOXO (L)</b>	0,2421	0,0885	0.138	

P com significância estatística em negrito.

Observou-se diferença significativa na frequência alélica e genotípica para o SNP *rs352140* entre indivíduos do grupo TOXO (C) e indivíduos sem lesão ocular (Tabela 5). A presença do genótipo TC se mostrou relacionada com o desenvolvimento de cicatrizes retinianas/retinocoroidianas do tipo C. A probabilidade de indivíduos com genótipo TC desenvolver lesão ocular do tipo C é 4,9 vezes maior quando comparados a indivíduos com genótipo CC (OR=4,9; IC: 1.071 - 22.42;  $p=0,0255$ ). Indivíduos que apresentam genótipo TC ou TT apresentam uma probabilidade aproximadamente 6 vezes maior de desenvolver

cicatrices oculares do tipo C (OR=6,017; IC: 1.379 - 26.25;  $p=0,0075$ ) (Tabela 7). No entanto, o grupo de indivíduos TOXO (C) não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5), dessa forma, apesar de apresentarem significância estatística, os resultados apresentados podem não refletir a realidade observada na população em geral.

**Tabela 6:** Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP no gene de TLR9 (*rs352140*)

	Lesão C (n=28)		Controles (n=177)		<i>p</i>	Odds Ratio	IC (95%)
	N	%	N	%			
<b>CC</b>	2	7,14	56	31,64	<b>0,0255</b>	1	<b>1.071 - 22.42</b>
<b>TC</b>	21	75	80	45,2		<b>4,900</b>	
<b>TT</b>	5	17,86	41	23,16		3,415	
<b>TT</b>	5	17,86	41	23,16	0,1437	1	0.7565 - 6.125
<b>TC</b>	21	75	80	45,2		2,153	
<b>CC</b>	2	7,14	56	31,64		0,2929	
<b>C</b>	25	44,6	192	54,2	0,1814	1,470	0.8336 - 2.591
<b>T</b>	31	55,4	162	45,8			
<b>CC</b>	2	7,14	56	31,64	<b>0,0075</b>	<b>6,017</b>	<b>1.379 - 26.25</b>
<b>TC+TT</b>	26	92,86	121	68,36			
<b>TT</b>	5	17,86	41	23,16			
<b>TC+CC</b>	23	82,14	136	76,84	0,5317	1,387	0.4958 - 3.879

*P* com significância estatística em negrito.

A presença do alelo T também foi apontado como relacionada ao desenvolvimento de lesões oculares de uma forma geral. Indivíduos com genótipo TC possuem probabilidade aproximadamente 2 vezes maior de desenvolver cicatrizes oculares quanto comparados a indivíduos com genótipo CC (OR=2,022. IC: 1.071 - 3.819;  $p=0,0285$ ). Ainda, indivíduos com genótipo TC ou TT apresentam uma probabilidade 1,8 vezes maior de desenvolver lesões oculares (OR=1,1851; IC: 1.010 - 3.394;  $p=0,0446$ ) quando comparada aos indivíduos que possuem genótipos CC (Tabela 7). Assim, os resultados indicam que a presença do alelo C, em caráter recessivo, pode ser um fator protetor em relação ao desenvolvimento de lesões retinianas/retinocoroidianas presumidamente causadas pela infecção por *T. gondii*.

**Tabela 7:** Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes oculares e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP no gene de TLR9 (*rs352140*)

	Toxo (L) (n=90)		Controles (n=177)		<i>p</i>	Odds Ratio	IC (95%)
	N	%	N	%			
<b>CC</b>	18	20	56	31,64		1	
<b>TC</b>	52	57,77	80	45,2	<b>0,0285</b>	<b>2,022</b>	<b>1.071 to 3.819</b>
<b>TT</b>	20	22,23	41	23,16	0,2765	1,518	0.7142 to 3.225
<b>TT</b>	20	22,23	41	23,16		1	
<b>TC</b>	52	57,77	80	45,2	0,3775	1,333	0.7036 to 2.524
<b>CC</b>	18	20	56	31,64	0,2765	0,6589	0.3101 to 1.400
<b>C</b>	88	48,88	192	54,2			
<b>T</b>	92	51,12	162	45,8	0,2421	1,239	0.8650 to 1.775
<b>CC</b>	18	20	56	31,64			
<b>TC+TT</b>	72	80	121	68,36	<b>0,0446</b>	<b>1,851</b>	<b>1.010 to 3.394</b>
<b>TT</b>	20	22,23	41	23,16			
<b>TC+CC</b>	70	77,77	136	76,84	0,8625	1,055	0.5747 to 1.937

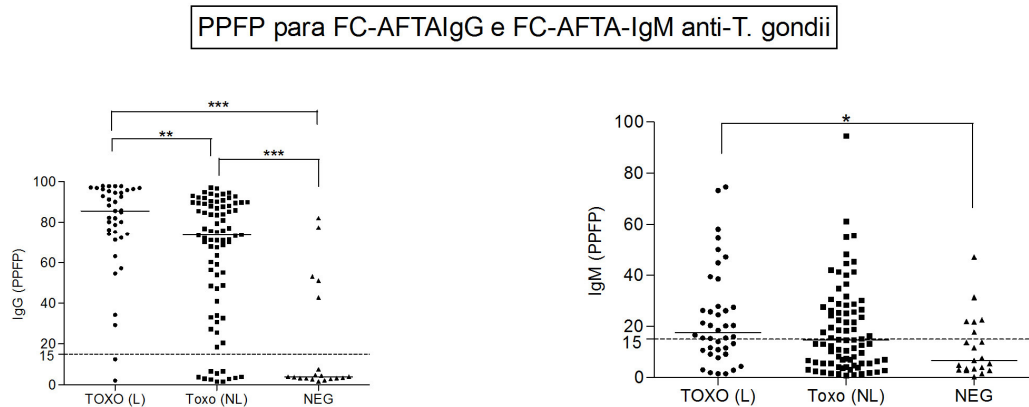
*P* com significância estatística em negrito.

### 5.3- Relação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos no gene de *TLR9* e produção de IgG e IgM

Níveis séricos de IgG e IgM específicos anti *T. gondii* foram avaliados por meio de FC-AFTA (*Flow cytometry- anti fixed Tachizoites*) em 143 indivíduos doadores de sangue no Banco de Sangue Regional do Hospital Ferreira Machado doadores de sangue. As concentrações séricas de IgG e IgM foram também avaliadas de acordo com a presença do SNP *rs352140* no gene de *TLR9*.

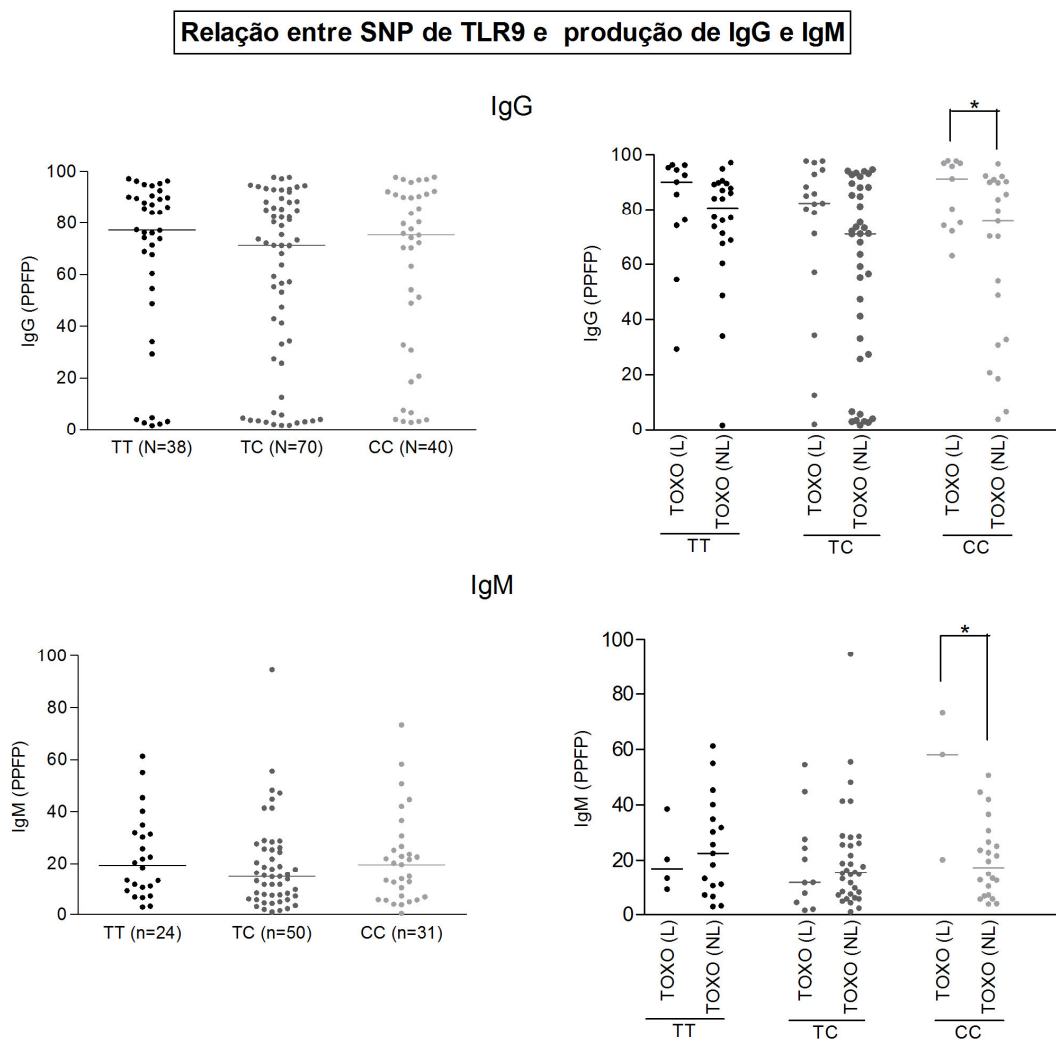
Como esperado, a porcentagem de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) de IgG foram significativamente maiores nos grupos TOXO (L) e TOXO (NL), quando comparados aos valores observados no grupo NEG. Observou-se também que indivíduos com lesões oculares apresentam concentrações de IgG significativamente elevadas quando comparados a indivíduos soropositivos sem lesões oculares. No que se refere aos níveis de IgM, foi observado que apenas o grupo TOXO (L) apresentou valores de PPFP significativamente maiores que o grupo NEG. Tanto para FC-AFTA-IgG quanto para FC-AFTA-IgM foi atribuído um *cut off* de 15% de PPFP. Com base neste *cut off*, foi constatado que 26,31% (5/19) dos indivíduos soronegativos por testes comerciais apresentaram resultado positivo para FC-AFTA-IgG. Quando os níveis de IgM foram avaliados foi observado que 28,57% (6/21) dos indivíduos soronegativos para testes comerciais foram soropositivos para FC-AFTA-IgM (Figura 4). Estes resultados

podem indicar que os testes FC-AFTA apresentam maior sensibilidade que os testes disponíveis comercialmente.



**Figura 4:** Detecção de por FC-AFTA- IgG e FC-AFTA-IgM por Citometria de Fluxo. Porcentagem de Parasitos Fluorescentes Positivos (PPFP) marcados para IgG e IgM entre os grupos TOXO (L), TOXO (NL) e NEG (A). Barras representam a mediana da dosagem obtida para cada grupo. \* Significa  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$ . \*\*\*  $P < 0,001$  pelos testes estatísticos de *Kruskal-Wallis* seguido de *Dunns*.

Quando os níveis séricos de IgG foram relacionados ao genótipo de *TLR9* (SNP *rs352140*), sem levar em consideração a fundoscopia dos indivíduos, não foram observadas diferenças significativas. No entanto, quando agrupados de acordo com exames fundoscópicos, indivíduos com lesão ocular e genótipo CC produzem estatisticamente mais IgG quando comparados a indivíduos soropositivos sem cicatriz ocular (Figura 5). Embora a concentração sérica de IgM seja em geral mais baixa que a observada para IgG, quando estas foram analisados em relação ao genótipo de *TLR9*, resultados semelhantes foram obtidos: indivíduos com cicatrizes oculares e genótipo CC também apresentaram estatisticamente mais IgM quando comparados a indivíduos sem cicatrizes oculares (Figura 5).

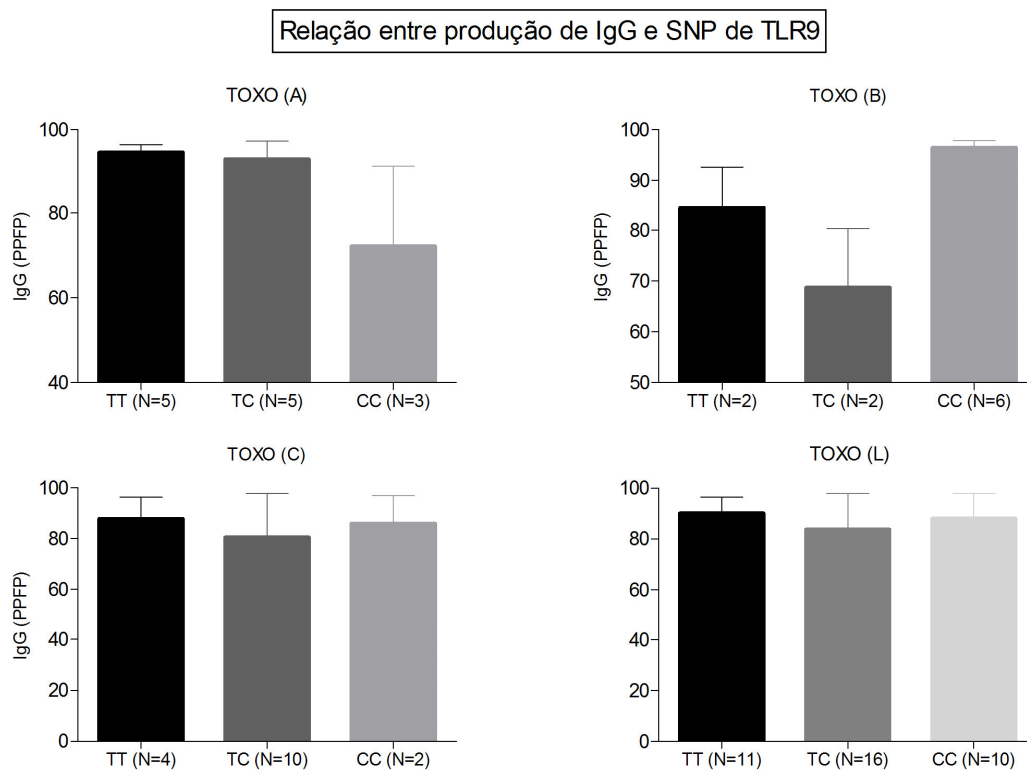


**Figura 5:** Relação entre genótipos de SNP *rs342140* no gene *TLR9* e produção de IgG e IgM. As barras indicam valores de mediana. \* Significa  $P < 0,05$  pelos testes estatísticos de Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

Os níveis de IgG também foram analisados considerando os genótipos e os três diferentes tipos de lesão ocular (A, B e C). Indivíduos com lesão tipo A e genótipo CC apresentaram uma tendência à menor produção de IgG, enquanto no grupo TOXO (B), os menores níveis de IgG foram identificados entre indivíduos com genótipo TC. No entanto, devido ao N reduzido, não podemos afirmar que para estes grupos a presença do alelo C está relacionada com a menor produção de IgG. Entre os indivíduos com lesão tipo C níveis elevados de IgG foram observados para os três genótipos estudados. No entanto, nenhum dos casos acima apresentou diferença estatisticamente significativa, dessa forma não foi possível estabelecer uma relação entre o genótipo e a produção de IgG,



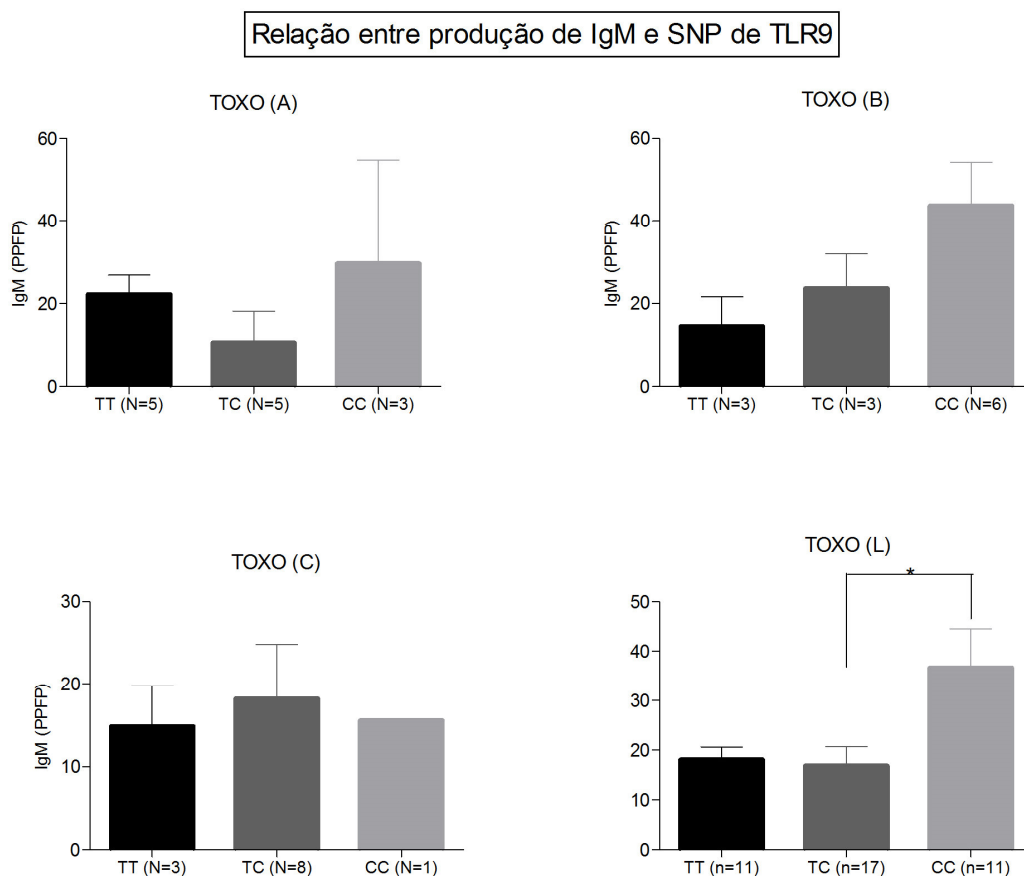
no contexto da presença de lesões oculares presumidamente causadas por *T. gondii* (Figura 6).



**Figura 6:** Associação entre a produção de IgG em grupos de indivíduos com cicatrizes oculares e controles e genótipos de SNP no gene TLR9 relacionados à toxoplasmose ocular. As barras indicam valores de mediana com desvio padrão.

O mesmo tipo de análise feita para IgG, associando indivíduos com diferentes tipos de lesão (A, B e C) e o genótipo do SNP de TLR9, foi realizada para comparação dos níveis de IgM. Foi observado que indivíduos com lesões tipo A, que possuem genótipo CC, tendem a apresentar concentrações séricas elevadas de IgM quando comparadas aos indivíduos com lesões semelhantes e genótipos TT e TC. De forma semelhante, indivíduos que possuem cicatrizes oculares provenientes de lesões do tipo B e genótipo CC tendem a produzir níveis mais elevados de IgM quando comparados a indivíduos com genótipo TC e TT. Em indivíduos com cicatrizes oculares do tipo C os níveis de IgM tendem a ser elevados entre os indivíduos que possuem genótipo TC, no entanto os níveis de IgM tenham sido medidos em apenas um indivíduo com genótipo CC e lesão ocular do tipo C (Figura 7).

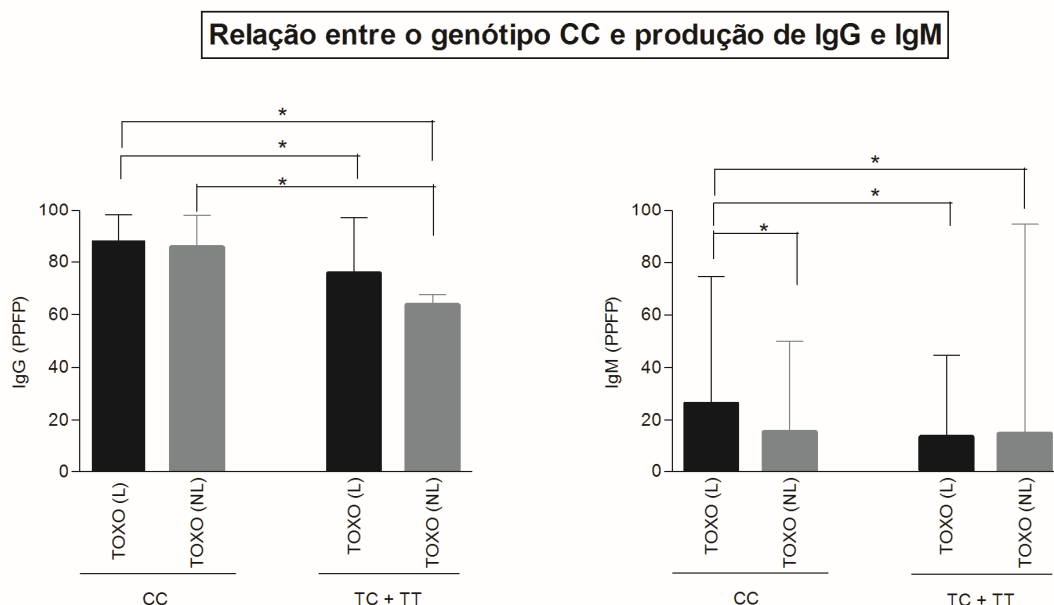
Ao serem analisados todos os indivíduos com lesões oculares observou-se que indivíduos com genótipo CC produzem estatisticamente mais IgM quando comparados aos indivíduos portadores dos demais genótipos, demonstrando a possível relação entre o SNP *rs352140* e a produção de IgM em indivíduos com cicatrizes retinianas/retinocoroidianas presumidamente causadas por *T. gondii* (Figura 7).



**Figura 7:** Associação entre a produção de IgM em grupos de indivíduos com cicatrizes oculares e controles e genótipos de SNP no gene *TLR9* relacionados à toxoplasmose ocular. As barras indicam valores de mediana. \* Significa  $P < 0,05$  pelos testes estatísticos de *Kruskal-Wallis* seguido de *Dunns*.

Com base nos resultados obtidos pela distribuição genotípica (Tabelas 6 e 7), os níveis de IgG e IgM foram comparados entre os indivíduos portadores de genótipo CC e portadores de genótipo TC+CC. Foi observado que indivíduos com genótipo CC apresentam significativamente mais IgG e IgM quando comparados aos indivíduos portadores dos genótipos TC+TT, independente da presença ou ausência de cicatrizes oculares (Figura 8). No entanto, indivíduos sem cicatrizes oculares e portadores de genótipo CC apresentaram significativamente mais IgG

quando comparados a indivíduos sem lesões oculares portadores de genótipo TC+TT. Enquanto indivíduos com genótipo CC e cicatrizes oculares apresentaram significativamente mais IgM quando comparados a indivíduos com mesmo genótipo, sem lesões oculares (Figura 8). Estes resultados indicam que a presença do genótipo CC pode estar relacionada com a maior produção de IgM, em indivíduos portadores de lesões oculares, observada em estudos prévios.



**Figura 8:** Associação entre genótipo CC ou TC + TT e produção de IgG e IgM em grupos de indivíduos com cicatrizes oculares e controles. As barras indicam valores de mediana. \* Significa  $P < 0,05$  pelos testes estatísticos de *Kruskal-Wallis* seguido de *Dunns*.

#### 5.4- Detecção de anticorpos esporozoíto-específicos (TgERP) no sangue periférico de indivíduos residentes em região altamente endêmica

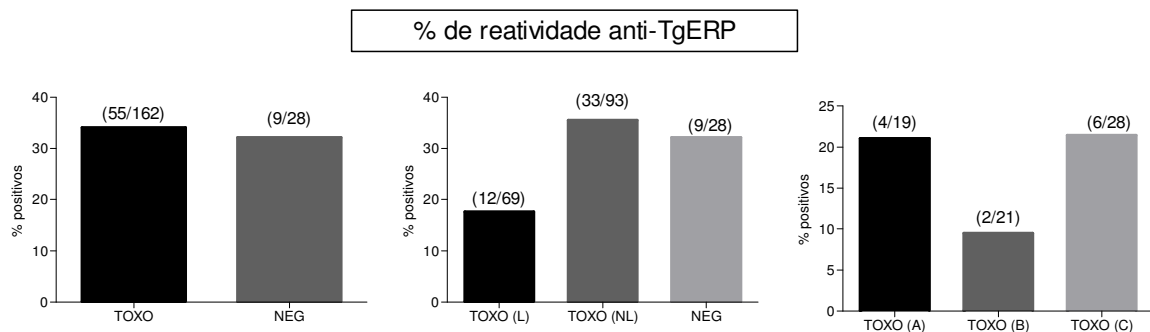
Com a finalidade de investigar a via de infecção por *T. gondii* e sua possível relação com o desenvolvimento de toxoplasmose ocular, soros de 190 indivíduos, entre eles doadores de sangue do Hospital Ferreira Machado (N=106) e indivíduos voluntários residentes em áreas previamente estudadas (N=84), foram submetidos a teste de ELISA esporozoíto-específico (anti-TgERP).

Dos 190 soros testados, 55 (28,9%) apresentaram reatividade anti-TgERP. Entre os 91 indivíduos soropositivos para os testes convencionais, 22,8% apresentaram reatividade, enquanto 9 entre os 28 (32,1%) indivíduos soronegativos por método sorológico comercial apresentaram reatividade anti-

TgERP. Este resultado indica que o teste de ELISA esporozoíto-específico pode ser capaz de detectar a presença de anticorpos específicos anti-*T. gondii*, que não foram detectados por meio de testes convencionais (Figura 9).

Quando avaliamos a relação entre presença de cicatrizes oculares e a reatividade anti-TgERP, a menor frequência de indivíduos reativos (17,4%) foi encontrada entre os indivíduos que apresentavam algum tipo de cicatriz ocular. Entre indivíduos soropositivos sem cicatrizes oculares e soronegativos o percentual de reatividade foi de 36,6% e 32,1% respectivamente. Nota-se que 2 soronegativos que apresentaram reatividade anti-TgERP possuem cicatrizes oculares.

Quando os indivíduos foram avaliados de acordo com o tipo de lesão ocular, A, B ou C, foi observado que os grupos de indivíduos que possuem lesões tipo A e C apresentam frequência semelhante de reatividade anti-TgERP, 21,05% e 21,42% respectivamente. Enquanto entre os indivíduos com lesão tipo B apenas 9,52% apresentou reatividade anti-TgERP. Embora a menor porcentagem de reconhecimento de TgERP tenha sido obtida entre indivíduos portadores de lesão tipo B, os resultados apresentados indicam que a reatividade anti-Tg ERP não está relacionada com a presença de lesões oculares.



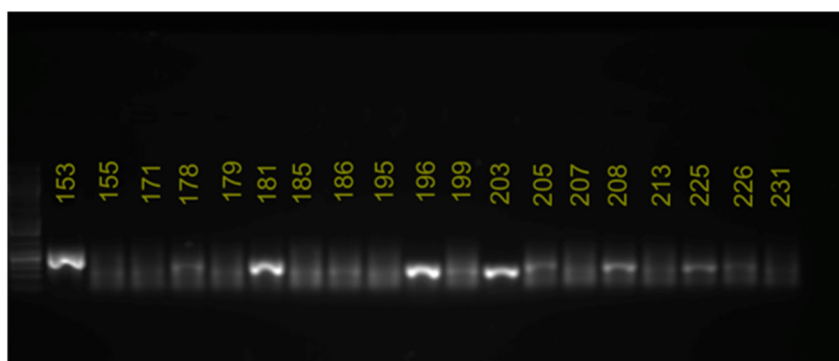
**Figura 9:** Porcentagem de indivíduos reativos anti-TgERP. As porcentagens foram demonstradas em relação à sorologia por método diagnóstico comercial; de acordo com presença/ausência de lesão ocular e de acordo com o tipo de lesão ocular apresentada.

### **5. 5- Extração e amplificação de DNA de *T. gondii* a partir de DNA extraído de sangue periférico de pacientes humanos**

Com o objetivo de identificar e genotipar DNA de *T. gondii* extraído diretamente de sangue periférico de indivíduos residentes em região altamente endêmica para toxoplasmose, foi realizada extração de DNA de 182 indivíduos doadores de sangue no Banco de Sangue Regional do Hospital Ferreira Machado. Destes 33 indivíduos eram soropositivos para *T. gondii* com cicatrizes retinianas/retinocoidianas, 124 soropositivos sem cicatrizes oculares e 24 soronegativos sem cicatrizes oculares, e um indivíduo soronegativo com cicatriz ocular tipo C. O produto da extração foi submetido a *nested PCR* para os seguintes marcadores moleculares específicos: ITS1, NTS2, B1, SAG1, SAG3 SAG4, e visualizados em gel de agarose a 3% (Figura 10).

Visualização em gel de agarose dos produtos obtidos por meio de *nested-PCR*

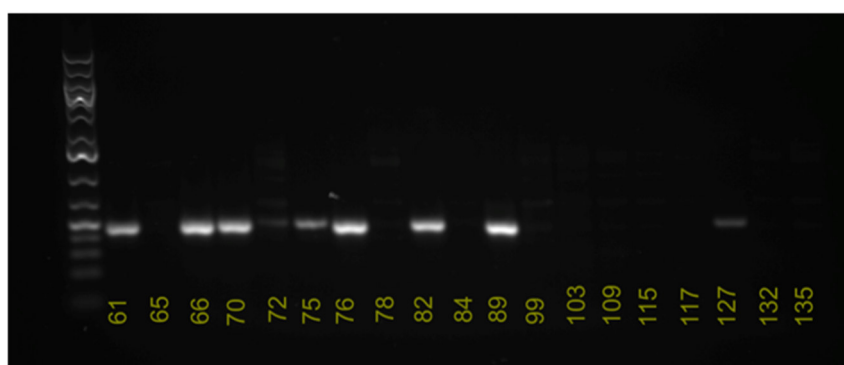
ITS1



NTS2



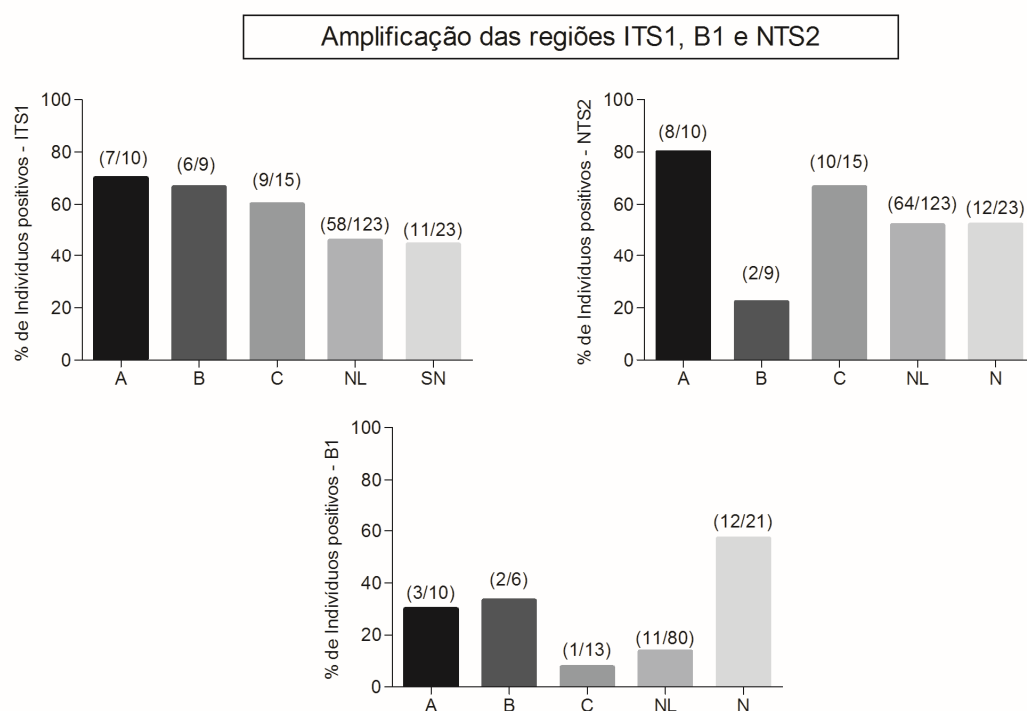
B1



**Figura 10:** Visualização em gel de agarose de fragmentos de DNA amplificados por meio de *nested-PCR*. Géis representativos mostrando a amplificação das regiões ITS1, NTS2 e B1.

Os marcadores ITS1 e NTS2 foram testados nas 182 amostras, no entanto, para ITS1 e NTS2, 2 e 3 amostras, respectivamente, foram excluídas, respectivamente, devido a falha de reação. B1 foi testado em 130 amostras de acordo com a disponibilidade de DNA extraído. E SAG1, SAG3 e SAG4 foram testados em 19 amostras, que foram positivas para ao menos 2 dos 3 marcadores descritos anteriormente.

Após a amplificação do DNA por *Nested PCR*, 91 das 180 amostras testadas (50,5%) apresentaram fragmentos amplificados para o marcador molecular ITS1. A identificação de *amplicons* tendeu a ser mais frequente entre os indivíduos portadores de cicatrizes oculares (64%). Entre os indivíduos com cicatriz do tipo A identificação de fragmentos amplificados ocorreu em 70% das amostras, seguida por B (66,6%) e C (60%). Nota-se ainda que a identificação de *amplicons* em indivíduos soropositivos sem cicatrizes oculares foi tão frequente (47,06%) quanto nos indivíduos soronegativos (47,82%). Para o marcador NTS2 foram obtidas fragmentos amplificados em 96 das 179 amostras amplificadas correspondendo a 53,33%. Não foram observadas relações entre severidade das cicatrizes retinianas/retinocoroidianas ou *status* sorológico com maior ou menor frequência na identificação de *amplicons*. De forma semelhante ao observado para ITS1 grande parte dos indivíduos soronegativos (52,17%) apresentaram *amplicons*. A menor frequência de detecção de fragmentos amplificados (22,2%) foi observada entre os indivíduos com cicatrizes oculares tipo B. O marcador B1 apresentou a menor frequência de *amplicons* observadas, onde apenas 29 das 130 amostras analisadas (22,3%) apresentaram fragmentos amplificados. A maior frequência de *amplicons* foi observada entre os indivíduos soronegativos (57,14%). Entre os indivíduos soropositivos, a identificação de fragmentos amplificados foi mais frequente entre aqueles que apresentaram cicatrizes oculares tipo B (33,3%) (Figura 11).



**Figura 11:** Amplificação das regiões ITS1, NTS2 e B1. Porcentagem de indivíduos que apresentaram *amplicons* para ITS1, NTS2 e B1 de acordo com a sorologia e resultado de exame fundoscópico.

Por se tratarem de sequências com cópias únicas no DNA de *T. gondii*, apenas amostras que foram positivas para 2 dos 3 marcadores moleculares previamente analisados, ITS1, NTS2 e B1, foram testadas para SAG1, SAG3 SAG4, totalizando 19 amostras (Tabela 8).

Entre os 19 indivíduos testados apenas 1 apresentou banda para SAG1, enquanto 4 apresentaram *amplicons* para SAG3 e 2 para SAG4. Apenas um indivíduo apresentou *amplicons* tanto para SAG1 quanto para SAG4. Todos os indivíduos em que houve amplificação de *amplicons* para as regiões SAG1 e SAG4 fazem parte do grupo TOXO (NL). Entre as amostras que apresentaram *amplicons* para o marcador SAG 3, 3 indivíduos eram soropositivos sem cicatrizes oculares TOXO (NL), enquanto 1 indivíduo pertencia ao grupo NEG (Tabela 8). Como esperado a detecção de SAG, SAG3 e SAG4 foi menos frequente, quando comparada aos marcadores ITS1, NTS2 e B1 que apresentam cópias múltiplas no genoma de *T. gondii*.



**Tabela 8:** Genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de sangue periférico de pacientes humanos para as regiões SAG1, SAG3 e SAG4.

Sorologia e perfil clínico	N	SAG1	%	SAG3	%	SAG4	%
TOXO (A)	2	0		0		0	
TOXO (C)	1	0		0		0	
TOXO (NL)	12	1	8,33	3	25	2	16,66
NEG	4	0		1	25	0	
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>1</b>	<b>5,26</b>	<b>4</b>	<b>21,05</b>	<b>2</b>	<b>10,52</b>

### 5.6- Sequenciamento de *T. gondii* a partir de DNA extraído de sangue periférico de pacientes humanos

Todos os produtos positivos no *nested PCR* para as regiões ITS1, NTS2, B1, SAG1, SAG3 SAG4 foram submetidos à purificação e sequenciamento de DNA por meio do método *Sanger*. As sequências obtidas foram comparadas com sequências referência depositadas no Genbank a fim de confirmar a presença de DNA de *T. gondii*.

Dentre as 91 amostras que apresentaram *amplicons* para a região ITS1, 58 (63,73%) foram confirmadas como de *T. gondii*. Entre os indivíduos com lesão tipo C, 88,9% das amostras que apresentam *amplicons* em géis de agarose foram confirmadas como DNA de *T. gondii*. No grupo TOXO (B) a confirmação foi obtida em 83,3% dos casos, enquanto para TOXO (A) e TOXO (NL) estes valores foram de 71,4% e 51,7%, respectivamente (Tabela 9).

Em relação ao *locus* NTS2, o sequenciamento das 96 amostras positivas foi capaz de confirmar a presença de DNA de *T. gondii* em 86 amostras. Entre os indivíduos com cicatrizes oculares tipo A e B, todas as amostras foram confirmadas como pertencendo a *T. gondii*. No grupo TOXO (NL) 89,1% das amostras foram confirmadas como de *T. gondii*, enquanto o grupo TOXO (C) essa porcentagem foi de 80%, a mais baixa entre os grupos analisados (Tabela 9).

A região B1 apresentou as maiores frequências de sucesso na confirmação por sequenciamento, chegando a 92,9% no total. No grupo TOXO (C), 8 das 10 amostras (80%) foram sequenciadas com sucesso. Nos demais grupos, 100% das sequências foram identificadas como do *locus* B1 de *T. gondii* (Tabela 9).

Em relação aos indivíduos soronegativos 90,9, 83,3 e 100% das amostras amplificadas para as regiões ITS1, NTS2 e B1, respectivamente, foram confirmadas como sequências de *T. gondii*. Em relação ao *locus* ITS1, 10 das 11

amostras amplificadas por *nested* PCR foram sequenciadas e identificadas como sequências de DNA de *T. gondii*. Para o *locus* NTS2, foi observado que 10 entre as 12 amostras extraídas de indivíduos soronegativos foram sequenciadas com sucesso, de forma que a confirmação da presença de DNA de *T. gondii* foi obtida. O marcador B1 apresentou a maior frequência de confirmação de DNA *T. gondii* por meio de sequenciamento: as 12 amostras amplificadas foram sequenciadas e apresentaram sequências compatíveis com o *locus* B1 de *T. gondii*. Nota-se que 2 amostras tiveram sequências confirmadas como DNA de *T. gondii* para os três *loci* analisados: ITS1, NTS2 e B1. Em outras 6 amostras, a confirmação foi obtida por meio da sequência dos marcadores NTS2 e B1, simultaneamente, enquanto para 1 amostra os marcadores ITS1 e NTS2 foram sequenciados com sucesso (Tabela 9).

**Tabela 9:** Confirmação da presença de DNA de *T. gondii* no sangue de pacientes humanos.

	ITS1 <sup>1</sup>			NTS2 <sup>2</sup>			B1 <sup>3</sup>		
	PCR	Seq.	%	PCR	Seq.	%	PCR	Seq.	%
TOXO (A)	7	5	71,4	8	8	100,0	3	3	100,0
TOXO (B)	6	5	83,3	2	2	100,0	2	2	100,0
TOXO (C)	9	8	88,9	10	8	80,0	1	1	100,0
TOXO (NL)	58	30	51,7	64	57	89,1	10	8	80,0
NEG	11	10	90,9	12	10	83,3	12	12	100,0
<b>Total</b>	91	58	63,7	96	86	89,6	28	26	92,9

<sup>1</sup> Produtos positivos no *nested* PCR para a região ITS1 foram sequenciados e comparados ao *Locus* ITS1, cepa RH, código de acesso no *GenBank* X75429.1. <sup>2</sup> Produtos positivos no *nested* PCR para a região NTS2 foram sequenciados e comparados ao *Locus* NTS2, cepa RH, código de acesso no *GenBank* AF158092. <sup>3</sup> Produtos positivos no *nested* PCR para a região B1 foram sequenciados e comparados ao *Locus* B1, cepa RH, código de acesso no *GenBank* AF179871.

Em relação aos marcadores SAG1 e SAG3 todas as amostras amplificadas por *nested* PCR foram sequenciadas com sucesso e a comprovação da presença de DNA de *T. gondii* foi obtida. No entanto para o *locus* SAG4 nenhum produto da *nested* PCR foi sequenciado com sucesso, levando a não confirmação da presença de DNA de *T. gondii* com base neste *locus*.

### 5.7 - Genotipagem *multi-loci* a partir de DNA extraído de sangue periférico de pacientes humanos

Amostras sequenciadas com sucesso foram agrupadas e alinhadas às suas respectivas sequências referência com a finalidade de observar a presença de polimorfismos em relação às sequências presentes na linhagem arquétipo tipo I, cepa RH.

Nenhuma das sequências obtidas a partir de ITS1 apresentou variações em relação à sequência observada para a cepa RH (código de acesso no *GenBank* X75429.1). Para o *locus* NTS2 foi observado que 61 das 86 amostras (70,93%) foram polimórficas em relação à sequência utilizada como consenso (*Locus* NTS2, cepa RH – *GenBank* AF158092). Polimorfismos foram observados em 13 sítios distintos e ao menos 7 variantes de *T. gondii* circulam entre humanos no município de Campos dos Goytacazes. Quarenta e oito das 61 amostras polimórficas (78,68%) apresentam 5 polimorfismos nas posições 723, 761, 765, 843 e 856, sendo esta a variante mais comum em relação ao *locus* NTS2. Apenas 6 amostras apresentam regiões polimórficas únicas, ou seja, possuíam polimorfismos não encontrados em nenhuma outra amostra analisada (Tabela 10).

Não foi observada relação direta entre a presença de cicatrizes oculares e polimorfismos específicos em relação ao *locus* NTS2. No entanto, observa-se que sequências que apresentavam polimorfismos foram mais frequentes entre amostras provenientes de indivíduos do grupo TOXO (L). Entre os indivíduos que apresentaram algum tipo de polimorfismo, 24,6% (15/61) apresentam cicatrizes oculares. Enquanto entre os indivíduos que não apresentam polimorfismo a porcentagem de indivíduos com cicatrizes oculares cai para 12% (3/25) (Tabela 11).

Entre os 8 indivíduos com lesão tipo A que tiveram o *locus* NTS2 sequenciado, apenas 1 não apresentou polimorfismo em relação à cepa RH. Proporção idêntica foi observada entre os indivíduos com lesão tipo C. Apenas 2 amostras provenientes de indivíduos com lesão tipo B tiveram o *locus* NTS2 sequenciado com sucesso. Destas, 1 amostra apresentou 3 polimorfismos em relação a sequência consenso. As informações obtidas por meio de

sequenciamento do *locus* NTS2 indicam que a infecção por linhagens de *T. gondii* que apresentam polimorfismos em relação à cepa RH pode estar relacionada com o aumento da incidência de toxoplasmose ocular (Tabela 11).

Em relação aos indivíduos soronegativos notou-se que as 10 amostras que tiveram o *locus* NTS2 sequenciado com sucesso apresentaram polimorfismos em relação à sequência consenso (Tabela 11).

**Tabela 10:** Análise da sequência de DNA para o *locus* NTS2.

Posição	699	723	737	739	761	765	783	840	843	856	885	893	913
RH-NTS2	A	C	C	C	T	A	G	C	G	A	C	A	T
BS37-A	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS47-A	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS75-A	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS399-A	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS456-A	.	T	.	.	G	.	.	.	.	G	.	.	.
BS466-A	.	T	.	T	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS467-A	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS06-B	.	T	.	.	G	.	.	.	.	G	.	.	.
BS24-SL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS14-SL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS40-C	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS51-C	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS56-C	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS273-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS70-C	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS169-C	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
BS402-C	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS426-C	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS27-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS28-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS29-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS30-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS36-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS38-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS45-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS55-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS61-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS63-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS66-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS76-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS82-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS127-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS143-NL	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
BS150-NL	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BS155-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS178-NL	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BS181-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS251-NL	.	T	.	.	G	.	.	A	.	.	.	.	.
BS262-NL	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
BS264-NL	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BS309-NL	.	T	.	.	G	.	.	.	.	G	.	.	.
BS338-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS340-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS342-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS353-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS372-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS381-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS408-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	C	.
BS420-NL	.	T	.	.	G	T	A	.	A	G	.	.	.

**Tabela 10:** Análise da sequência de DNA para o *locus* NTS2 (continuação)

Posição	699	723	737	739	761	765	783	840	843	856	885	893	913
RH-NTS2	A	C	C	C	T	A	G	C	G	A	C	A	T
BS431-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS432-NL	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.
BS465-NL	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS220-N	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS33-N	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS89-N	.	T	.	.	G	.	.	.	A	T	.	.	C
BS227-N	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS310-N	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS375-N	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS391-N	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS396-N	.	T	.	.	G	T	.	.	A	T	.	.	.
BS419-N	.	T	.	.	G	T	.	.	A	G	.	.	.
BS443-N	.	T	.	.	G	T	.	.	A	T	.	.	.

Sequências de DNA da linhagem arquétipo tipo I (cepa RH - AF158092) comparada amostras obtidas por meio da amplificação e sequenciamento de DNA de *T. gondii* presente no sangue periférico de 86 indivíduos. A tabela mostra apenas as amostras que apresentaram polimorfismo em relação a sequência arquétipo. 27 amostras apresentam sequências idênticas à AF158092. Os pontos (.) indicam identidade com a sequência AF158092. As posições numéricas anotadas se referem aos sítios numerados na sequência AF158092 publicada no GenBank.

**Tabela 11:** Porcentagem de indivíduos polimórficos para o *locus* NTS2 de acordo com a sorologia para Toxoplasmose, presença e tipo de cicatriz ocular.

Grupos	Polimorfismos relação ao <i>locus</i> NTS2 <sup>1</sup>	n	%
TOXO (A)	Amostras polimórficas	7	87,5
	Amostras não polimórficas	1	12,5
TOXO (B)	Amostras polimórficas	1	50,0
	Amostras não polimórficas	1	50,0
TOXO (C)	Amostras polimórficas	7	87,5
	Amostras não polimórficas	1	12,5
TOXO (L)	Amostras polimórficas	15	77,3
	Amostras não polimórficas	3	22,7
TOXO (SL)	Amostras polimórficas	36	59,6
	Amostras não polimórficas	22	40,4
NEG	Amostras polimórficas	10	100,0
	Amostras não polimórficas	0	0,0
Total	Amostras polimórficas	61	68,6
	Amostras não polimórficas	25	31,4

<sup>1</sup>: Polimorfismo em relação as sequências de DNA da linhagem arquétipo tipo I (cepa RH - AF158092)

Dentre as 26 amostras das quais o *locus* B1 foi sequenciado com sucesso, 4 apresentaram polimorfismo em 5 diferentes posições em relação a sequência consenso (*Locus* B1, cepa RH, *Genbank* AF179871). Três amostras provenientes de indivíduos do grupo TOXO (NL) apresentaram polimorfismos únicos, em posições distintas. Três amostras provenientes de indivíduos com lesão tipo A e

3 amostras provenientes de indivíduos com lesão tipo B foram sequenciadas com sucesso, porém não apresentaram polimorfismos em relação a sequência consenso de B1 (Tabela 12).

Como mencionado, para o *locus* B1 o maior sucesso na amplificação e sequenciamento de DNA foi entre indivíduos soronegativos. Para este *locus* 12 das 26 (46,15%) amostras sequenciadas pertenciam a indivíduos soronegativos. Dentre as 12 amostras uma apresentou 2 polimorfismos, nas posições 232 e 378, em relação a sequência consenso (Tabela 12).

**Tabela 12:** Análise da sequência de DNA para o locus B1.

Posição	203	232	366	378	631
RH-B1	A	T	T	G	C
BS28-NL	.	.	C	.	.
BS340-NL	G	.	.	.	.
BS434-NL	.	.	.	.	T
BS33-N	.	C	.	A	.

Sequências de DNA da linhagem arquétipo tipo I (cepa RH – AF179871) comparada amostras obtidas por meio da amplificação e sequenciamento de DNA de *T. gondii* presente no sangue periférico de 26 indivíduos. A tabela mostra apenas as amostras que apresentaram polimorfismo em relação à sequência arquétipo. 22 amostras apresentam sequências idênticas à AF179871. Os pontos (.) indicam identidade com a sequência AF179871. As posições numéricas anotadas se referem aos sítios numerados na sequência AF179871 publicada no *GenBank*.

Uma única sequência foi obtida para o *locus* SAG1. Esta se mostrou idêntica àquela apresentada pela cepa RH (código de acesso no GenBank X14080). Em relação ao *locus* SAG3, três sequências obtidas se mostraram polimórficas, enquanto uma sequência não apresentou polimorfismos em relação à sequência consenso (código de acesso no GenBank X14080). Duas sequências obtidas a partir de indivíduos soropositivos sem cicatrizes oculares apresentaram 7 sítios polimórficos em posições idênticas (Tabela 13). E estas mesmas amostras, BS181 e BS208, também apresentam polimorfismos em relação ao *locus* NTS2 em posições idênticas (Tabela 10).

Uma amostra, BS417, obtida a partir de um indivíduo soronegativo, apresentou 11 sítios polimórficos em relação a sequência consenso (Tabela 13), também apresentou polimorfismo em relação ao *locus* NTS2 (Tabela 10).

**Tabela 13:** Análise da sequência de DNA para o locus SAG3

Posição	206	226	230	242	243	248	251	269	278	286	301
RH - SAG3	C	G	A	C	C	A	A	G	A	G	A
BS336-NL	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BS181-NL	T	A	G	.	.	.	.	A	C	C	G
BS208-NL	T	A	G	.	.	.	.	A	C	C	G
BS419-N	T	A	G	T	A	G	T	A	C	T	G

Sequências de DNA da linhagem arquétipo tipo I (cepa RH - EF585693) comparada amostras obtidas por meio da amplificação e sequenciamento de DNA de *T. gondii* presente no sangue periférico de 4 indivíduos. Os pontos (.) indicam identidade com a sequência EF585693. As posições numéricas anotadas se referem aos sítios numerados na sequência EF585693 publicada no GenBank.

Com a finalidade de identificar quais dos *loci* avaliados apresentaram maior variação em relação às respectivas sequências consenso, o número de sítios polimórficos foi comparado com cada uma das sequências consenso. O *locus* SAG3 apresentou a maior frequência de sítios polimórficos, enquanto o *locus* ITS1 não apresentou polimorfismos em relação à sequência consenso. A sequência de SAG3 analisada consistia de 138 nucleotídeos, destes 11 sítios (8,0%) apresentaram polimorfismos em relação à sequência consenso. A segunda sequência mais polimórfica foi NTS2, com 3,1 % (11/360) de sítios polimórficos, seguida de B1 com 1,1% (5/450) de sítios polimórficos em relação às respectivas sequências consenso (Tabela 14).

**Tabela 14:** Frequência de sítios polimórficos nos loci ITS1, NTS2, B1, SAG1 e SAG3.

Locus	Tamanho da sequência <sup>1</sup>	Número de sítios polimórficos <sup>2</sup>	%
ITS1	365	0	0,0
NTS2	360	11	3,1
B1	450	5	1,1
SAG1	306	0	0,0
SAG3	138	11	8,0

<sup>1</sup>:Tamanho das sequências obtidas após amplificação, sequenciamento e alinhamento.

<sup>2</sup>: Número de polimorfismos apresentados nas sequências obtidas a partir do sangue periférico de doadores de sangue quando comparadas às sequências consenso para ITS1 (X75429.1), NTS2 (AF158092), B1 (AF179871), SAG1 (X14080) e SAG3 (EF585693).

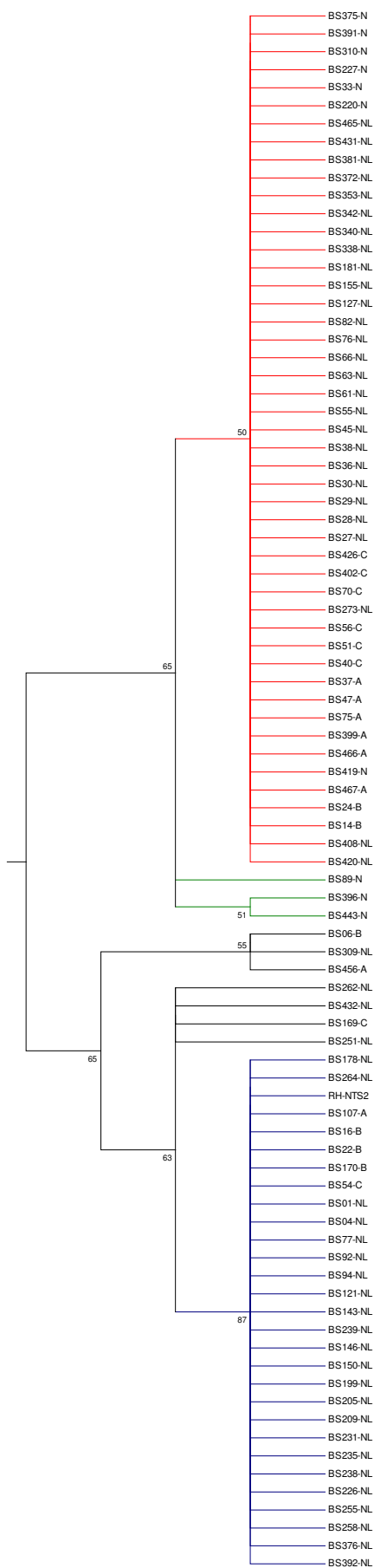


### 5.8- Construção de árvores filogenéticas para os *loci* NTS2 e B1

Árvores filogenéticas foram construídas para os *loci* NTS2 e B1, com a finalidade de estabelecer relações filogenéticas entre as sequências de DNA obtidas no sangue periférico de indivíduos doadores de sangue.

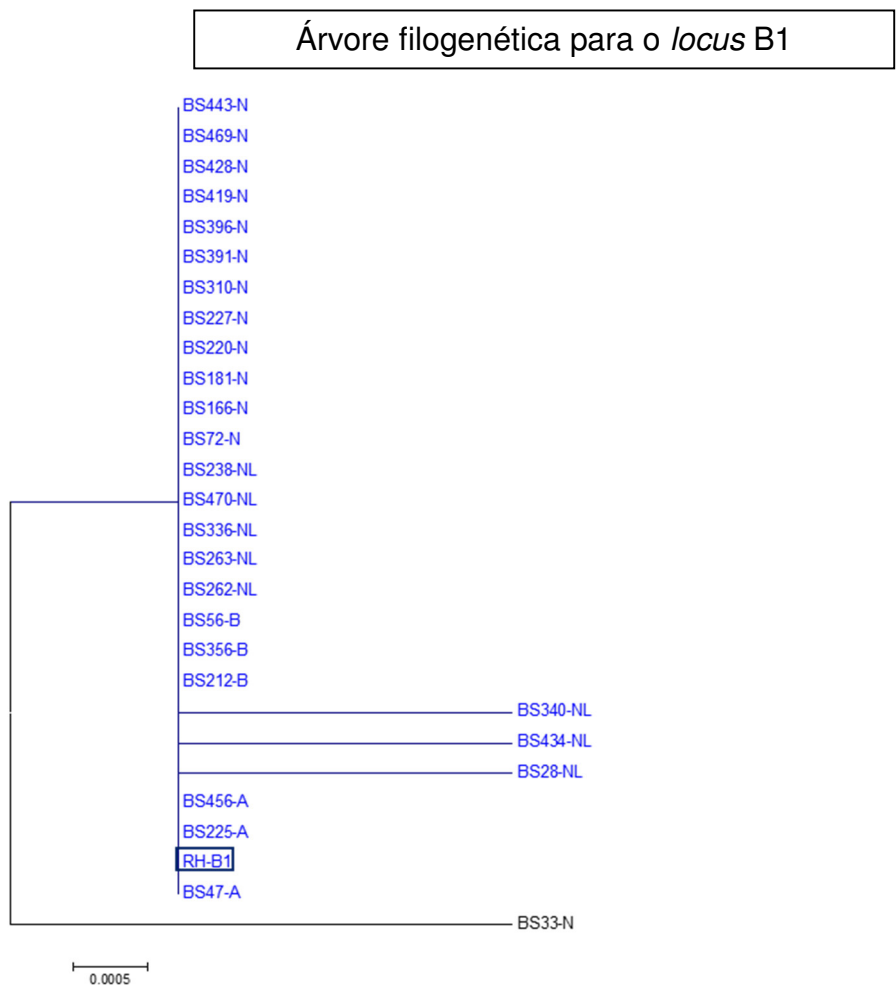
Para o *locus* NTS2 foram observados 2 grupos de sequências de *T. gondii*. Foi observado que indivíduos que apresentaram polimorfismos nas posições 723 (C/T), 761 (T/G), 765(A/T), 843(G/A) e 856(A/G) foram agrupados em um ramo único (em vermelho). Já indivíduos com sequências idênticas ou similares à observada na cepa RH foram agrupados num ramo distinto (em azul), enquanto amostras com polimorfismos em regiões distintas das mencionadas acima se dividiram em dois ramos, sendo um mais próximo filogeneticamente ao do ramo que contém a cepa RH (ramo verde), enquanto as demais amostras polimórficas se mostraram mais perto filogeneticamente das amostras agrupadas no ramo em vermelho. No entanto apenas o ramo da sequência consenso apresentou acima de 80 no teste de *bootstrap*, sendo, portanto, o único ramo estatisticamente significativo (Figura 12).

Para o *locus* B1 todas as amostras, exceto a extraída do indivíduo BS33-N foram agrupadas no mesmo ramo que cepa RH, porém, nenhum agrupamento foi estatisticamente significativo (Figura 13).



Árvore filogenética para o *locus* NTS2

**Figura 12:** Árvore filogenética construída com base nas sequências obtidas para o *locus* NTS2. Os parâmetros utilizados foram: máxima verossimilhança como método estatístico, utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros. A filogenia foi testada por meio de 5000 repetições do teste de *Bootstrap*.



**Figura 13:** Árvore filogenética construída com base nas sequências obtidas para o *locus* B1. Os parâmetros utilizados foram: máxima verossimilhança como método estatístico, utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros. A filogenia foi testada por meio de 5000 repetições do teste de *Bootstrap*.

### **5.9 – Perfil parasitológico e imunológico de indivíduos com sorologia convencional negativa para toxoplasmose**

Amostras de sangue periférico provenientes de indivíduos doadores de sangue com sorologia negativa segundo o teste comercial AxSYN (Abbot) foram submetidas à extração de DNA, amplificação e posterior identificação de DNA de *T. gondii*. Dentre as 24 amostras analisadas, foi possível identificar DNA de *T. gondii* em 22 amostras, por meio de ao menos um marcador molecular. Em onze indivíduos a presença de DNA de *T. gondii* foi confirmada pela amplificação e sequenciamento de apenas um dos *loci* avaliados: ITS1 foi identificado em 7 indivíduos, enquanto NTS2 e B1 em dois indivíduos, cada marcador. Em nove indivíduos a presença de DNA de *T. gondii* foi confirmada pela ampliação e sequenciamento de 2 regiões e dois indivíduos se mostraram positivos para os 3 *loci* analisados (Tabela 15).

Quando os resultados de DNA foram comparados com os resultados obtidos nos ensaios sorológicos não comerciais foi observado que para os 16 indivíduos testados por FC-AFTA IgM e IgG, foram obtidos resultados positivos para 6 (37,5%) e 5 (31,25%) indivíduos, respectivamente. Enquanto entre os 17 indivíduos testados por ELISA anti-TgERP, 6 (35,3%) apresentaram resultados positivos. Dois indivíduos apresentaram resultados considerados positivos para os 3 testes sorológicos realizados, e dois indivíduos apresentaram resultados positivos para 2 dos 3 testes realizados. É importante notar que para 7 indivíduos não foram realizados nenhum dos três testes sorológicos não comerciais. Assim, dentre os 17 indivíduos submetidos a testes sorológicos, 11 (64,7%) apresentaram resultado positivo para ao menos um dos testes realizados (Tabela 15).

**Tabela 15:** Perfil parasitológico e imunológico de indivíduos com sorologia convencional negativa para toxoplasmose.

	DNA no sangue periférico			Testes sorológicos		
	Marcadores			FC-AFTA <sup>a</sup>		ELISA <sup>b</sup>
	ITS1	NTS2	B1	IgM	IgG	anti-TgERP
BS07	-	-	.	<b>21,9</b>	3,25	0,352
BS21	+	-	-	<b>31,4</b>	4,68	0,405
BS33	-	+	+	7,66	4,58	<b>1,524</b>
BS41	+	-	-	<b>21,8</b>	3,24	0,404
BS48	+	-	-	.	.	.
BS49	+	-	-	.	.	.
BS65	+	-	-	5,79	3,03	<b>2,081</b>
BS72	+	-	+	0,399	2,87	0,557
BS89	+	+	-	<b>17,8</b>	<b>82,2</b>	<b>0,879</b>
BS166	+	-	+	.	.	.
BS167	+	-	-	.	.	.
BS206	+	-	-	.	.	.
BS220	-	+	+	.	.	.
BS227	-	+	+	5,53	.	0,243
BS 310	-	+	+	3,06	3,68	0,411
BS 313	-	.	-	4,89	3,29	0,266
BS 375	-	+	.	6,78	2,74	<b>0,88</b>
BS 391	-	+	+	.	.	.
BS 396	+	+	+	<b>47,1</b>	<b>42,9</b>	<b>0,879</b>
BS 419	-	+	+	.	<b>77,5</b>	<b>0,769</b>
BS 428	-	-	+	11,7	3,95	0,197
BS 443	+	+	+	<b>22,5</b>	<b>51,2</b>	0,485
BS 451	-	+	.	3,47	<b>53,1</b>	0,212
BS469	-	-	+	13,8	1,74	0,234

<sup>a</sup> Resultados expressos em PFP. *Cut off* estabelecido em 15%.

<sup>b</sup> Resultados expressos em DO. *Cut off* estabelecido em 0,587

Resultados considerados positivos, ou seja, acima dos respectivos *cut offs*, estão destacados em negrito.

## VI- DISCUSSÃO

O desenvolvimento de lesões retinianas/retinocoiroidinas é considerado a sequela mais frequente da toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes (Holland, 2004). No entanto, estudos sobre a prevalência de cicatrizes oculares presumidamente causadas por infecção por *T. gondii* são escassos e apresentam taxas de prevalência discrepantes. Estima-se que na América do Norte 2% da população soropositiva para toxoplasmose apresenta lesão ocular (Holland, 2003a), enquanto no Brasil estes valores podem atingir 17,7% na região sul (Glasner, *et al.*, 1992) e 30% em Campos dos Goytacazes (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). Acredita-se que um terço da população mundial esteja infectada por *T. gondii* (Robert-Gangneux and Dardé, 2012). Utilizando a estimativa considerada conservadora de que ao menos 2% destes indivíduos irão apresentar lesões oculares, calcula-se que ao menos 1 em cada 400 pessoas desenvolveram ou irão desenvolver lesões oculares devido a infecção por *T. gondii* (Kirby, 2012).

Os fatores que levam ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular e as diferenças observadas quanto à severidade das lesões não são completamente entendidos. Sabe-se que fatores genéticos do hospedeiro e do parasita, padrão de resposta imune e vias de infecção podem estar envolvidos (Kijlstra and Petersen, 2014). O presente estudo teve como objetivo avaliar fatores imunogenéticos, imunológicos, parasitológicos e epidemiológicos previamente relacionados com desenvolvimento de toxoplasmose ocular.

O receptor TLR9 possui a capacidade de reconhecer de parasitos Apicomplexa (Pichyangkul *et al.*, 2004; Coban *et al.*, 2005). Em relação a *T. gondii* foi demonstrado que camundongos deficientes em TLR9, apresentam uma diminuição na resposta tipo Th1, comprometendo desta forma a imunidade ao parasita (Minns *et al.*, 2006). Com o objetivo de estudar a relação entre a presença do SNP *rs352140* no gene de *TLR9* e o desenvolvimento de toxoplasmose ocular, o DNA de 314 indivíduos, entre eles doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital Ferreira Machado (N=172) e indivíduos residentes em áreas previamente estudadas por nosso grupo de pesquisa (N=142) foi analisado. As frequências alélicas para o SNP *rs352140* observadas (frequência de C= 0,509) foram comparadas às populações YRI (indivíduos nigerianos da etnia Iorubá) e CEU (indivíduos norte-americanos, moradores do

estado Utah de ascendência europeia ocidental ou nórdica). Foi observado que moradores de Campos dos Goytacazes apresentam frequências alélicas mais próximas às encontradas na população CEU (Tabela 4).

A presença de frequências alélicas mais próximas à população CEU pode ser explicada pela formação genética da população brasileira. Considerado um dos mais heterogêneos do mundo, o *background* genético da população brasileira foi formado durante 5 séculos a partir de indivíduos de 3 continentes: os europeus colonizadores, escravos africanos e os ameríndios. No entanto, no início do século XIX a miscigenação entrou em um processo antropológico de “europeização” da população brasileira, com a diminuição de intercruzamento entre as duas populações mais frequentes no país: os negros africanos e os ameríndios (Seyferth, 2002). Tem sido demonstrado que o DNA mitocondrial, de herança exclusivamente materna, apresenta contribuição similar das populações europeias, africanas e ameríndias (Alves, 2000), enquanto o cromossomo Y tem uma maior contribuição de populações europeias (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a contribuição europeia para o DNA mitocondrial pode ser maior do que imaginado previamente (Callegari-Jacques *et al.*, 2003), de forma que a população brasileira apresenta grande proporção de genoma de origem europeia, mesmo entre a população negra (Pena *et al.*, 2009).

O SNP *rs352140* representa uma substituição silenciosa, localizada no exon 2, cujas consequências na função e/ou expressão de TLR9 não são completamente entendidas (Xiao *et al.*, 2014). No entanto, este SNP tem sido associado à menor carga viral de HIV em crianças (Beima-Sofie *et al.*, 2013), suscetibilidade à infecção por papiloma vírus e desenvolvimento de câncer cervical (Lai *et al.*, 2013), de mama e do sistema digestivo (Wan *et al.*, 2014), bem como à rejeição de transplantes de rim (Kim *et al.*, 2013) e de medula (Xiao *et al.*, 2014). O SNP *rs352140* também tem sido apontado como protetor ao desenvolvimento de Lupus eritematoso (Xu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2013; Piotrowski *et al.*, 2013). Relações entre polimorfismo no gene de *TLR9* também tem sido estudada no contexto de doenças causadas por parasitos do filo Apicomplexa. O polimorfismo *rs352140* está associado ao desenvolvimento de malária sintomática (Omar *et al.*, 2012), bem como ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular (Peixoto-Rangel *et al.*, 2009).

Com a finalidade de validar a relação entre aquele SNP no gene de *TLR9* e o desenvolvimento e severidade da toxoplasmose ocular, os indivíduos soropositivos foram divididos em grupos de acordo com a presença e o tipo de lesão ocular apresentada. As frequências alélicas e genótípicas de indivíduos dos grupos TOXO (A), TOXO (B), TOXO (C) e TOXO (L) foram comparadas com as frequências exibidas pelo grupo TOXO (NL). Os resultados indicaram que indivíduos que apresentam genótipo CT possuem probabilidade 2 vezes maior de desenvolver lesões oculares, independente do tipo, quando comparados a indivíduos que apresentam genótipo CC, e indivíduos que apresentam os genótipos CT ou TT tem 1,8 vezes mais chance de desenvolver lesões oculares quando comparados à indivíduos portadores do genótipo CC. Foram obtidos resultados semelhantes entre os indivíduos pertencentes ao grupo TOXO (C), onde indivíduos que apresentam o genótipo CT ou TT possuem probabilidade seis vezes maior de desenvolver lesões oculares. Estes resultados indicam a presença do genótipo CC pode ser um fator protetor em relação ao desenvolvimento de retinocoroidites toxoplásmicas. Estes dados vão de encontro aos obtidos por Peixoto-Rangel e colaboradores (2009), onde a presença do alelo C foi considerada fator de risco para o desenvolvimento de toxoplasmose ocular. Apesar de ambos trabalhos estudarem indivíduos residentes no município de Campos dos Goytacazes, a análise dos dados foi realizada de forma distinta. O presente trabalho apresenta um estudo de associação genética do tipo caso-controle, enquanto aquele realizado por Peixoto-Rangel e colaboradores realizou teste de associação baseado em família (Peixoto-Rangel *et al.*, 2009).

Estudos tipo caso-controle podem apresentar problemas relacionados à extratificação étnica e miscigenação, visto que a sub ou super-representação de determinados grupos étnicos na população de estudo pode influenciar na frequência alélicas observadas. Em estudos baseados em família este problema diminui drasticamente, porém existe grande dificuldade na obtenção de amostras de famílias. Em estudos tipo caso-controle o tamanho amostral é um importante fator a ser considerado, e no presente trabalho o número de indivíduos em cada grupo de estudo pode ser considerado baixo para esse tipo de análise, especialmente nas análises envolvendo o grupo TOXO (C), que apresenta apenas 28 indivíduos “caso”. Ainda, o grupo de indivíduos TOXO (C) não está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, o que significa que os resultados obtidos, mesmo



que estatisticamente significantes, podem não refletir o que é observado na população. Em relação ao grupo TOXO (L) foi observado que os resultados obtidos estão no limiar do que pode ser considerado estatisticamente significativo e apresentam intervalo de confiança amplo, o que indica uma maior margem de erro. Dessa forma, embora resultados estatisticamente significantes tenham sido obtidos, estes resultados precisam ser replicado para garantir a confiabilidade e a ausência de associações espúrias.

Polimorfismos no gene de *TLR9* também podem influenciar a produção de imunoglobulinas. Piotrowski e colaboradores demonstraram que o genótipo TC do polimorfismo *rs352140* está relacionado com maior produção de anticorpos anti-DNA dupla fita em indivíduos com lúpus eritematoso sistêmico (Piotrowski *et al.*, 2013). O genótipo TT está relacionado com maiores níveis de IgA em indivíduos com nefropatia (Sato *et al.*, 2012) e níveis elevados de IgM em indivíduos com cirrose biliar (Kikuchi *et al.*, 2005). Com a finalidade de avaliar a influência do polimorfismo de *TLR9* na produção de imunoglobulinas no contexto da toxoplasmose ocular, níveis séricos de IgG e IgM foram avaliados por meio de citometria de fluxo e correlacionados com os alelos e genótipos de *TLR9*.

Indivíduos portadores de cicatrizes oculares presumidamente causadas pela infecção por *T. gondii* apresentam níveis de IgG significativamente elevados quando comparados a indivíduos sem cicatrizes oculares e soronegativos. Enquanto apenas indivíduos portadores de cicatrizes oculares apresentam níveis de IgM significativamente elevados quando comparados a indivíduos soronegativos (Figura 6). Níveis elevados de IgG e IgM em indivíduos portadores de cicatrizes oculares foram relacionados com o desenvolvimento de toxoplasmose ocular (Martins, 2009). O presente resultado corrobora a importância destas imunoglobulinas no contexto da toxoplasmose ocular e confirma tais imunoglobulinas como possíveis marcadores moleculares para a presença de toxoplasmose ocular.

Quando os níveis de IgG foram avaliados de acordo com o genótipo de *TLR9* foi observado que apenas indivíduos com cicatrizes oculares e genótipo CC apresentam significativamente mais IgG quando comparados a indivíduos sem lesão ocular. Quando os indivíduos foram agrupados como genótipo CC versus genótipo TC+TT observou-se que indivíduos com cicatrizes oculares e genótipo CC são os maiores produtores de IgG. Mesmo indivíduos sem cicatrizes oculares,

porém portadores de genótipo CC apresentam níveis significativamente elevados de IgG, quando comparados a indivíduos sem lesão ocular (Figuras 7 e 9). Resultados semelhantes foram encontrados quando os níveis de IgM foram analisados. Apenas indivíduos com cicatrizes oculares e genótipo CC apresentaram níveis de IgM significativamente elevados. E ainda indivíduos CC com cicatrizes oculares apresentam significativamente mais IgM quando comparados a indivíduos também com cicatrizes oculares, porém com genótipo TC ou TT (Figuras 8 e 9). Tais resultados indicam que o genótipo CC pode ser capaz de promover maior produção de IgG e IgM específica anti *T. gondii*.

Trabalhos anteriores demonstram a influência do SNP *rs352140* do gene de *TLR9* na produção de anticorpos autorreativos (Kikuchi *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2012; Piotrowski *et al.*, 2013). No presente trabalho temos o primeiro indício de que este polimorfismo no gene de *TLR9* pode estar associado à produção de anticorpos específicos anti-*T. gondii*. Desta forma, o papel do genótipo CC no contexto da toxoplasmose ocular pode ser devido a produção de níveis elevados de IgG e IgM (Figura 9). Porém, por se tratar de uma variação alélica silenciosa, é possível que o SNP *rs352140* esteja em desequilíbrio de ligação com outro marcador molecular, e este seja por sua vez o responsável por influenciar na função e/ou expressão de *TLR9*, conforme observado em população CEU (ANEXO II).

Durante o desenvolvimento do estudo populacional foi observado após exame fundoscópico que seis indivíduos soronegativos para testes comerciais apresentavam cicatrizes retinianas/retinocoroidianas compatíveis com as causadas pela infecção por *T. gondii*. Este achado estimulou a busca por biomarcadores parasitológicos e imunológicos capazes de identificar a infecção por *T. gondii* de forma alternativa aos testes sorológicos tradicionais e que possivelmente estivessem relacionados ao desenvolvimento de cicatrizes oculares.

Acredita-se que fatores ambientais podem estar envolvidos no desenvolvimento de toxoplasmose ocular. Após altos índices de toxoplasmose ocular observados após surtos de contaminação por água (Bowie, *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1998; de Moura *et al.*, 2006b; Balasundaram, M. B. *et al.*, 2010) aventou-se a hipótese de que a infecção por oocisto poderia ser um fator de risco para o desenvolvimento de Toxoplasmose ocular. Com o objetivo de estudar a

via de infecção de *T. gondii* e sua possível relação com o desenvolvimento de toxoplasmose ocular o soro de 190 indivíduos, entre doadores de sangue do hospital Ferreira Machado (N=106) e participantes de outros estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (N=84) foram testados para a detecção de anticorpos esporozoítas específicos (TgERP) (Hill *et al.*, 2011).

Apenas 28,9% dos soros testados apresentaram reatividade anti-TgERP. Quando analisados de acordo com a origem dos indivíduos, entre os doadores de sangue 41,5% foram soro-reativos, enquanto entre a população proveniente de estudos anteriores apenas 13,1% foram capazes de reconhecer o antígeno TgERP. Acreditamos que o grupo de indivíduos doadores de sangue apresenta, de forma geral, poder aquisitivo mais elevado quando comparados aos demais indivíduos testados. Este último grupo de indivíduos reside em áreas pobres do município de Campos dos Goytacazes, onde o acesso a rede de água tratada e ao saneamento básico é restrito. Acredita-se que condições sócio-econômicas e sanitárias estejam relacionadas com a prevalência da toxoplasmose. Bahia-Oliveira e colaboradores (2003) demonstraram que em Campos do Goytacazes a prevalência da toxoplasmose entre indivíduos de alto poder aquisitivo era de 23%, enquanto entre os indivíduos de baixo poder aquisitivo a prevalência foi de 84%. Este mesmo trabalho apontou a água contaminada por oocistos como principal fator de risco para transmissão da toxoplasmose. Dessa forma seria esperado um índice maior de reconhecimento de antígeno esporozoíto-específico, especialmente entre os indivíduos de baixo poder aquisitivo. No entanto, é sabido que o ELISA anti-TgERP só é capaz de detectar anticorpos até 8 meses após a infecção. Assim, acreditamos que o baixo índice de reconhecimento de TgERP entre os indivíduos com baixo poder aquisitivo esteja relacionado ao fato destes indivíduos serem soropositivos para a toxoplasmose por tempo superior ao que o teste seria capaz de detectar. De forma oposta entre os indivíduos doadores de sangue, que possuem maior poder aquisitivo, a exposição a *T. gondii* seria menor, portanto, o que levaria a maior proporção de infecções recentes, o que explicaria o maior índice de reconhecimento de TgERP neste grupo.

Quando os indivíduos foram avaliados de acordo com a sorologia e presença de cicatrizes oculares foi observado que entre indivíduos soropositivos sem cicatrizes oculares e soronegativos 36,6% e 32,1%, respectivamente, foram

capazes de reconhecer TgERP, enquanto apenas 17,4% dos indivíduos com cicatrizes oculares apresentaram sororreatividade contra TgERP. No entanto, os dados obtidos devem ser interpretados com cautela. Como mencionado acima, o reconhecimento de TgERP ocorre apenas em indivíduos com infecção recente (Hill *et al.*, 2011). Porém, o desenvolvimento de doença ocular na toxoplasmose adquirida geralmente ocorre na fase crônica da infecção, meses ou anos após a infecção inicial (Holland, 2003a). Desta forma o uso do antígeno TgERP pode não ser considerado o modelo ideal para a identificação da rota de infecção em indivíduos com toxoplasmose ocular.

Fatores genéticos do parasito também têm sido implicados como participantes no desenvolvimento e severidade de doenças oculares (Maenz *et al.*, 2014). A identificação de DNA de *T. gondii* no sangue periférico de indivíduos com cicatrizes oculares tem sido demonstrada em diversos trabalhos (Grigg, Ganatra, *et al.*, 2001; Switaj *et al.*, 2006; Bottos *et al.*, 2009; Ribeiro Ferreira *et al.*, 2011; Shobab *et al.*, 2013). No presente trabalho foram utilizados marcadores moleculares ITS1, NTS2 e B1 para identificação de DNA de *T. gondii*. Estas três regiões são frequentemente utilizadas para detecção de DNA de *T. gondii* por se tratarem de regiões conservadas, presentes em todas as linhagens de *T. gondii* e apresentam cópias múltiplas (Costa and Bretagne, 2012; Rahumatullah *et al.*, 2012).

Muitos trabalhos têm buscado a relação entre genótipo de *T. gondii* e desenvolvimento de toxoplasmose ocular utilizando DNA extraído de humor aquoso e vítreo (Figuerola *et al.*, 2000; Grigg, *et al.*, 2001; Fekkar *et al.*, 2011; de-la-Torre *et al.*, 2013; Shobab *et al.*, 2013; Novais *et al.*, 2014). No entanto, Bou e colaboradores demonstraram que a sensibilidade para detecção de DNA de *T. gondii* no sangue periférico pode ser semelhante à obtida em tecidos oculares (Bou *et al.*, 1999). Por se tratar de uma técnica menos invasiva que a retirada de líquidos intraoculares, o desenvolvimento de métodos capazes de identificar DNA de *T. gondii* diretamente no sangue periférico pode tornar uma importante ferramenta diagnóstica com grande utilidade para o estudo da relação entre as diferentes linhagens de *T. gondii* e o desenvolvimento de toxoplasmose ocular.

A amplificação de DNA de *T. gondii* diretamente do sangue periférico de indivíduos doadores de sangue foi possível em 50,5%, 53,3% e 22,3% dos indivíduos para as regiões ITS1, NTS2 e B1, respectivamente. Estes valores são

próximos ao observado por Switaj e colaboradores que, utilizando apenas o marcador NTS2, foram capazes de identificar *amplicons* em 50% dos indivíduos com cicatrizes oculares presumidamente causadas pela infecção por *T. gondii*. e em 86,9% dos indivíduos com lesões oculares ativas (Switaj *et al.*, 2006), no entanto, os autores não avaliaram indivíduos soropositivos para toxoplasmose sem lesões oculares. Por outro lado, Bourdin e colaboradores utilizando o marcador B1 foram capazes de identificar DNA de *T. gondii* em apenas 16% dos indivíduos testados. Assim como no presente trabalho, a frequência de detecção de DNA foi maior entre indivíduos com cicatrizes oculares, quando comparados aos indivíduos soropositivos sem cicatrizes oculares (Bourdin *et al.*, 2014). Embora a hipótese de infecção recente não possa ser descartada, acredita-se que, por se tratarem de doadores de sangue, os indivíduos participantes deste estudo sejam imunocompetentes e estejam na fase crônica da toxoplasmose, e por isso apresentem número reduzido de cópias de DNA do parasita no sangue periférico. Porém, foi demonstrado que a identificação de DNA de *T. gondii* pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica mesmo em indivíduos cronicamente infectados, com ou sem cicatrizes oculares. Ainda, a maior detecção de DNA de *T. gondii* em indivíduos portadores de cicatrizes oculares pode indicar que o desenvolvimento de lesões oculares não é um evento local e pode estar relacionado com a carga parasitária no sangue periférico.

Embora B1 seja um marcador amplamente utilizado e apresente características similares a ITS1 e NTS2, estes últimos se mostraram mais sensíveis para a detecção de DNA de *T. gondii* em indivíduos cronicamente infectados, com ou sem cicatrizes oculares. ITS1 é uma região conservada de DNA ribossomal, que pode se repetir em tandem até 110 vezes no genoma de *T. gondii* (Guay *et al.*, 1993). NTS2 é uma região não transcrita do DNA ribossomal, considerada específica e polimórfica, capaz de distinguir as principais linhagens de *T. gondii* (Bottos *et al.*, 2009), apresentando entre 15 e 20 repetições (Grigg, M. E. comunicação pessoal). O *locus* B1 consiste de repetições em tandem e é considerado um marcador específico e sensível para detecção de DNA de *T. gondii*, bem como para distinção de diferentes linhagens de *T. gondii* (Grigg and Boothroyd, 2001). Para o *locus* B1 o número de repetições varia de acordo com a linhagem de *T. gondii* (Costa and Bretagne, 2012), podendo chegar a até 35 repetições (Bottos *et al.*, 2009).

Por se tratarem de genes de cópias únicas os marcadores SAG1, SAG3, SAG4 foram testados apenas em amostras que foram positivas para 2 dos 3 marcadores citados acima. Das 19 amostras testadas, apenas 1 apresentou banda para SAG1, 4 apresentaram *amplicons* para SAG3 e 2 para SAG4. Estes resultados eram esperados e foram semelhantes aos observados por Gibson e colaboradores, no qual a genotipagem de SAG1 foi restrita, quando comparada à obtida para os *loci* ITS1, NTS2 e B1 (Gibson *et al.*, 2011).

A presença de DNA de *T. gondii* foi confirmada em 63,7%, 89,6% e 92,9% das amostras de sangue periférico que apresentaram *amplicons* para os *loci* ITS1, NTS2 e B1, respectivamente, de modo que as porcentagens observadas no presente trabalho estão muito acima das descritas previamente na literatura. Zainodine e colaboradores, estudando doadores de sangue no Irã foram capazes de detectar DNA de *T. gondii* em 6,97% dos indivíduos testados por meio de real-time PCR do gene SAG1 (Zainodini *et al.*, 2014), enquanto Sarkari e colaboradores, também utilizando SAG1 como marcador molecular, demonstraram que 1,9% dos doadores de sangue apresentaram DNA de *T. gondii* (Sarkari *et al.*, 2014). As baixas taxas de detecção de DNA de *T. gondii* observadas entre doadores de sangue do Irã podem ser devido à utilização de um marcador molecular que apresenta cópia única no genoma do parasito. Ainda, diferença nos índices de detecção também pode ser relacionada com a metodologia adotada. *Nested-PCR* é considerada mais sensível para a detecção de DNA quando comparado às demais técnicas, inclusive real-time PCR utilizada nos trabalhos mencionados acima (Sarkari *et al.*, 2014).

A comprovação de parasitemia e alta prevalência da toxoplasmose entre indivíduos doadores de sangue, os quais supostamente estão na fase crônica da toxoplasmose, levanta questões de saúde pública e aponta a transfusão de sangue como possível rota de transmissão com relevância epidemiológica. Comparando estudos realizados em bancos de sangue nos últimos 15 anos, observou-se que a mais baixa prevalência de doadores positivos para *T. gondii* relatada foi de 5,1% na província de Shijiazhuang, China (Xin and Song, 2013). Por outro lado, a mais alta soroprevalência registrada (75%) foi entre doadores de sangue de Recife, região nordeste do Brasil (Coelho *et al.*, 2003), seguida por doadores de sangue da Etiópia (70,29%) (Walle *et al.*, 2013). Dessa forma, a

prevalência observada entre doadores de sangue de Campos dos Goytacazes, se assemelha às mais altas descritas na literatura.

Embora, na maioria dos casos, a toxoplasmose seja uma doença assintomática, sintomas como encefalites fatais podem ocorrer especialmente em indivíduos imunocomprometidos e imunossuprimidos (Tenter *et al.*, 2000). Outros grupos de indivíduos, como pacientes renais crônicos, submetidos a constantes transfusões de sangue, apresentam alto risco de desenvolver toxoplasmose sintomática grave (Mahgoub *et al.*, 2009; Ebrahim Zadeh *et al.*, 2014). Tem-se sugerido que teste sorológico para toxoplasmose seja incluído entre os testes pré-transfusionais, de modo a prevenir a transmissão da toxoplasmose ao menos para pacientes com alto risco de desenvolvimento de sintomas graves da toxoplasmose (Elhence *et al.*, 2010). McDonald e colaboradores sugeriram a aplicação de teste sorológico anti-*T. gondi* e a manutenção de um inventário de doadores de sangue IgM negativos a ser utilizado preferencialmente em pacientes vulneráveis (McDonald *et al.*, 1989). Dentre os 183 indivíduos doadores de sangue participantes deste estudo, 121 foram submetidos a teste comercial anti-IgM (Vidas – BioMerioux), no entanto nenhum deles apresentou resultado positivo (dados não mostrados). Os resultados indicam que mesmo indivíduos IgM negativos para testes comerciais, supostamente cronicamente infectados, apresentam parasitemia, sendo virtualmente capazes de transmitir toxoplasmose. Dessa forma sugere-se a criação de inventário de sangues de indivíduos negativos para toxoplasmose testados por múltiplos meios para utilização de forma prioritária em indivíduos com alto risco de desenvolvimento de sintomas clínicos graves. No entanto, mais estudos epidemiológicos envolvendo bancos de sangue são necessários para melhor entendimento do papel epidemiológico desta via de transmissão, bem como analisar a aplicabilidade e efetividade da inclusão de anti-*T. gondii* entre os testes sorológicos pré-transfusionais.

Com a finalidade de identificar as linhagens de *T. gondii* circulantes entre humanos, os produtos de PCR para os *loci* ITS1, NTS2 e B1, SAG1, SAG3 e SAG4 foram sequenciados. O sequenciamento do *locus* ITS1 foi realizado com sucesso em 58 das 91 amostras amplificadas. No entanto, nenhuma amostra apresentou polimorfismos em relação à sequência consenso (Cepa RH, código de acesso no GEnBank X75429.1). ITS1 é uma região extremamente conservada e utilizada para distinção entre espécies proximamente relacionadas, bem como

para identificação de novas espécies de coccídeos (Gibson *et al.*, 2011). Desta forma a ausência de polimorfismos corrobora a hipótese de que os indivíduos participantes deste estudo estavam infectados por *T. gondii* e não por outros parasitas coccídeos proximamente relacionados, como *Toxocara sp* ou *Neospora sp*.

Dentre as 86 amostras sequenciadas com sucesso para o *locus* NTS2, 61 apresentaram polimorfismos em relação à cepa RH. Com base neste *locus*, existem ao menos 7 linhagens de *T. gondii* circulando entre humanos em Campos dos Goytacazes. Dentre as 61 amostras polimórficas 48 apresentaram 5 polimorfismos nas posições 723 (C/T), 761 (T/G), 765(A/T), 843(G/A) e 856(A/G) (Figura 12, ramo vermelho). Switaj e colaboradores sequenciaram algumas linhagens de *T. gondii* e observaram que estes mesmo polimorfismos são observados nas linhagens arquétipo tipo II, III e de cepas que na época da referida publicação de Switaj foram consideradas “atípicas” (Switaj *et al.*, 2006). Três amostras apresentaram o polimorfismo AT na posição 856, este polimorfismo foi descrito na linhagem X, típica da América do Norte (Shobab *et al.*, 2013). A construção da árvore filogenética demonstrou que estes dois grupos estão proximamente relacionados (Figura 12, ramos vermelho e verde). Três amostras apresentaram apenas 1 polimorfismo em relação à sequência da cepa RH (BS179NL, BS264NL E BS143NL). Estas mesmas 3 amostras foram agrupadas no mesmo ramo da cepa RH (Figura 12, ramo azul). Outras 7 amostras apresentaram outros conjuntos de polimorfismos e foram agrupadas próximas a cepa RH (Figura 12, ramos azul e preto).

As amostras agrupadas no ramo em preto e no ramo em verde (Figura 12) não correspondem a nenhuma sequência já descrita na literatura. Apesar de as amostras BS466A, BS406NL e BS420NL e as amostras BS179NL, BS264NL E BS143NL estarem agrupadas nos ramos em vermelho e azul, respectivamente, estas apresentam um conjunto único de polimorfismos. Os conjuntos de amostras acima podem ser apontados como pertencentes a linhagens distintas das 3 cepas arquétipo, ou seja como linhagens consideradas atípicas. As demais amostras agrupadas no ramo azul podem pertencer tanto às linhagens arquétipo tipo II e tipo III, ou a linhagens atípicas, de acordo com os resultados de sequenciamento obtidos por Switaj e colaboradores (2006).



Dentre as 26 amostras para o *locus* B1 sequenciadas apenas 4 apresentaram polimorfismos em relação à sequência apresentada pela cepa RH, e nenhum dos polimorfismos encontrados corresponde aos previamente descritos por Shobab e colaboradores (2013) para as sequências arquétipo. Quando foi construída árvore filogenética todas as amostras foram agrupadas no mesmo ramo da sequência consenso, exceto a amostra extraída de um indivíduo soronegativo para testes comerciais (BS33N). Três dos indivíduos polimórficos para o *locus* B1 também apresentaram polimorfismo para o *locus* NTS2. Este resultado corrobora a hipótese que algumas amostras que obtiveram sequências de NTS2 idênticas às cepas II e III podem ser consideradas polimórficas, visto que elas apresentam polimorfismos na região B1 que não correspondem aos descritos para as cepas arquétipo (Figura 13).

Para o *locus* SAG1 a única sequência obtida se mostrou idêntica à cepa RH. No entanto, para o *locus* SAG3, 4 amostras foram sequenciadas com sucesso. Destas, uma se mostrou idêntica a RH, 2 apresentaram 7 sítios polimórficos idênticos entre si e uma amostra proveniente de indivíduo soronegativo apresentou 11 sítios polimórficos em relação à cepa RH. Por se tratar do *locus* mais polimórfico analisado no presente trabalho, acredita-se que as três linhagens (polimórficas para o *locus* SAG3 são distintas das 3 cepas arquétipo. A amostra positiva para BS336, foi obtida a partir de um indivíduo soropositivo sem lesão ocular e não apresentou polimorfismo em relação ao *locus* SAG3. Esta mesma amostra também foi sequenciada com sucesso para as regiões NTS2 e B1 e SAG1 e não apresentou polimorfismos em nenhum destes *loci*, indicando que esta amostra pode ser identificada como pertencente a linhagem tipo I, ou haplogrupo 1.

A diversidade de linhagens identificadas a partir de sequenciamento *multi-loci* era esperada, visto que trabalhos prévios utilizando *multi-loci* PCR-RFLP identificaram ao menos 21 linhagens de *T. gondii* em tecidos de galinhas coletados em Campos dos Goytacazes (Dubey *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2008). Como galinhas se alimentam de solo contendo oocistos elas podem ser consideradas bons indicadores das linhagens presentes no ambiente, consequentemente em humanos (Dubey *et al.*, 2008).

Apenas para os *loci* ITS1, NTS2 e B1 amostras pertencentes aos grupos TOXO(L), TOXO(NL) e NEG foram sequenciadas com sucesso. Com base nas

sequências obtidas, buscou-se avaliar a relação entre as linhagens de *T. gondii* e desenvolvimento de lesões oculares. Para tanto, foram utilizadas as sequências obtidas para o *locus* NTS2, visto que para o *locus* ITS1 não foram identificadas amostras polimórficas e para o *locus* B1 nenhuma amostra do grupo TOXO (L) apresentou polimorfismo.

Entre as amostras que apresentavam algum polimorfismo em relação à sequência consenso, 23,8% foram provenientes de indivíduos que apresentavam cicatrizes oculares. Enquanto entre as amostras não polimórficas apenas 12% foram obtidas a partir do sangue periférico de indivíduos com cicatrizes oculares. O desenvolvimento de toxoplasmose ocular vem sendo associado a diferentes linhagens de *T. gondii*, de acordo com o local e método de estudo. *T. gondii* tipo I foi associado ao desenvolvimento de Toxoplasmose ocular na Polônia (Switaj *et al.*, 2006), cepas tipo II e cepas polimórficas estavam associadas à doenças ocular na Alemanha (Shobab *et al.*, 2013), enquanto na França há o predomínio de cepas tipo II (Fekkar *et al.*, 2011) e cepas polimórficas no Brasil (Khan *et al.*, 2006). Shobab e colaboradores utilizando sequenciamento *multi-loci* de B1 e NTS2, bem como sorotipagem, observaram que o desenvolvimento de doença ocular estava relacionado a linhagens tipo II e linhagens não reativas na sorotipagem, ou seja, linhagens que não pertenciam a nenhuma das três linhagens arquetipo, em indivíduos alemães (Shobab *et al.*, 2013).

Dos 24 indivíduos soronegativos para testes comerciais (AxSYM – Abbott) 22 (91,66%) apresentaram DNA de *T. gondii* no sangue periférico para pelo menos um dos seguintes marcadores: ITS1, NTS2, B1, SAG3. Em todos os casos onde houve sequenciamento, os indivíduos soronegativos apresentaram sequências polimórficas em relação à cepa RH, desta forma acredita-se que estes indivíduos também seriam polimórficos para os loci SAG1 e SAG3.

Se observarmos estes resultados em conjunto com outros dados aqui obtidos para este grupo de pacientes é possível constatar que dentre estes 22 indivíduos, 11 foram positivos para pelo menos 1 dos testes sorológicos realizados: FC-AFTA-IgM, FC-AFTA-IgG e IgG anti- TgERT. Ressalta-se, no entanto, que dentre estes 22 indivíduos, 7 não foram submetidos a nenhum dos 3 testes sorológicos acima mencionados.

O ensaio de ELISA FC-AFTA-IgM apresentou maior frequência de reatividade, 37,5% (6/16), enquanto FC-AFTA-IgG apresentou 31,25% de

reatividade. Em relação ao ensaio de ELISA anti-TgERP, 6 dos 17 (35,3%) indivíduos soronegativos para testes comerciais apresentaram reatividade. Notou-se ainda que três indivíduos apresentaram reatividade nos três testes sorológicos realizados. Os demais indivíduos foram positivos para apenas um dos testes.

É sabido que existe variação antigênica entre as cepas de *T. gondii* (Ware and Kasper, 1987; Appleford and Smith, 2000) e que esta variação pode afetar o resultado dos testes sorológicos (Delibas *et al.*, 2006). SAG1 é uma proteína de superfície, previamente conhecida como P30, sendo o principal antígeno de *T. gondii* reconhecido pelo sistema imunológico humano (Velgeroussel *et al.*, 1994). SAG3, previamente reconhecida como P43, por sua vez está presente em taquizoítas e bradizoítas, e como SAG1, também está ancorada na membrana via glicofosfatidilinositol (Jacquet *et al.*, 2001). Embora apenas a amostra de um indivíduo tenha sido sequenciada para SAG1 e esta foi idêntica à observada na cepa RH, a diversidade observada para SAG3, onde 3 das 4 amostras foram polimórficas em relação à cepa RH, leva a crer que a diversidade de antígenos de superfície encontrada em Campos dos Goytacazes é superior à observada na América do Norte e Europa, locais onde a grande maioria dos testes comerciais foram desenvolvidos.

Estes resultados inéditos sugerem que testes comerciais podem não ser capazes de detectar infecções causadas ao menos por certas linhagens polimórficas, indicando que a prevalência de toxoplasmose em indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes, pode ser maior do que previamente estimado, podendo chegar a valores próximos a 100%.

Os resultados descritos no presente trabalho corroboram que o desenvolvimento de toxoplasmose ocular é um fenômeno multifatorial, envolvendo estado imunológico e imunogenético do hospedeiro, fatores genéticos do parasita e possivelmente fatores ambientais. Os resultados obtidos apontam que a participação da resposta imune inata, por meio do gene *TLR9*, sua relação com a resposta imune mediada por anticorpos, e a linhagem de *T. gondii* são alguns dos fatores relacionados ao desenvolvimento da Toxoplasmose ocular. No entanto, novos trabalhos devem ser realizados a fim de entender como cada um destes fatores, em conjunto e individualmente, podem atuar no desenvolvimento e/ou severidade das retinocoroidites toxoplásmicas. Os

resultados obtidos também sugerem que abordagem convencional de estudo epidemiológico deve ser revista. Faz-se necessário investigar o alto índice de identificação de DNA de *T. gondii* em indivíduos soronegativos para testes comerciais convencionais. Um estudo focado neste ponto é necessário, e caso o resultado se repita, os dados epidemiológicos baseados em sorologia, especialmente em regiões altamente endêmicas e com predominância de linhagens polimórficas, precisarão ser revistos, e novas abordagens diagnósticas precisarão ser desenvolvidas.

## VII- CONCLUSÕES

Indivíduos portadores do genótipo CC para o SNP rs352140 do gene de *TLR9* produzem níveis elevados de IgG e IgM, quando comparados a indivíduos portadores de genótipo CT ou TT. Este é o primeiro relato de SNP de *TLR9* influenciando na produção de anticorpos específicos anti-*T. gondii*.

A identificação de anticorpos específicos anti-TgERP pode não ser eficiente para o entendimento da via de infecção em indivíduos com cicatrizes retinianas retinocoroidianas presumidamente causadas pela infecção *T. gondii*. Isto se deve ao fato de a doença ocular se desenvolver meses ou anos após a infecção inicial e os anticorpos específicos anti-TgERP só são detectados até 8 meses após a infecção.

A maior frequência de detecção de DNA de *T. gondii* no sangue periférico de indivíduos portadores de lesões oculares sugere que o desenvolvimento da doença ocular pode estar ligado a fenômenos sistêmicos, como a presença de parasitos circulantes no sangue periférico. E ainda, o desenvolvimento de doença ocular pode estar relacionado à infecção por linhagens polimórficas, visto que estas foram mais frequentes entre indivíduos com cicatrizes retinianas/retinocoroidianas.

O alto índice de DNA de *T. gondii* detectado em sangue de indivíduos soronegativos sugere que os testes comerciais disponíveis podem não ser capazes de identificar todas as linhagens circulantes de *T. gondii* especialmente em regiões altamente endêmicas e com grande diversidade genética do parasita. Desse modo, novas ferramentas, tais como a detecção de anticorpos anti formas taquizoítas por meio de citometria de fluxo (FC-AFTA- IgM e IgG), detecção de anticorpos específicos anti- TgERP, e a detecção e sequenciamento de DNA de *T. gondii* em sangue periférico, podem ser utilizadas como métodos complementares para detecção de infecção por *T. gondii*.

## VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMAS, I. W., AND D. S. GREGERSON. 'Longitudinal-Study of Serum Antibody-Responses to Bovine Retinal S-Antigen in Endogenous Granulomatous Uveitis', *British Journal of Ophthalmology* **Vol. 67, No. 10**, 681-684, 1983.
- ADACHI, T., AND R. ALAM. 'The Mechanism of Il-5 Signal Transduction', *Am J Physiol* **Vol. 275, No. 3 Pt 1**, C623-33, 1998.
- AGRAWAL, S., AND E. R. KANDIMALLA. 'Modulation of Toll-Like Receptor 9 Responses through Synthetic Immunostimulatory Motifs of Dna', *Therapeutic Oligonucleotides* **Vol. 1002**, 30-42, 2003.
- AJZENBERG, D. 'Type I Strains in Human Toxoplasmosis: Myth or Reality?', *Future Microbiol* **Vol. 5, No. 6**, 841-3, 2010.
- AKIRA, S., K. TAKEDA, AND T. KAISHO. 'Toll-Like Receptors: Critical Proteins Linking Innate and Acquired Immunity', *Nature Immunology* **Vol. 2, No. 8**, 675-680, 2001.
- ALBUQUERQUE, M. C., A. L. ALEIXO, E. I. BENCHIMOL, A. C. LEANDRO, L. B. DAS NEVES, R. T. VICENTE, M.A G BONECINI-ALMEIDA, AND M. R. AMENDOEIRA. 'The Ifn-Gamma +874t/a Gene Polymorphism Is Associated with Retinochoroiditis Toxoplasmosis Susceptibility', *Mem Inst Oswaldo Cruz* **Vol. 104, No. 3**, 451-5, 2009.
- ALVES, SILVA. 'The Ancestry of Brazilian Mtdna Lineages (Vol 67, Pg 444, 2000)', *American Journal of Human Genetics* **Vol. 67, No. 3**, 775-775, 2000.
- APPLEFORD, P. J., AND J. E. SMITH. 'Strain and Stage Specific Variation in Toxoplasma Gondii Antigens', *International Journal for Parasitology* **Vol. 30, No. 11**, 1187-1191, 2000.
- ARAUJO, F., T. SLIFER, AND S. KIM. 'Chronic Infection with Toxoplasma Gondii Does Not Prevent Acute Disease or Colonization of the Brain with Tissue Cysts Following Reinfection with Different Strains of the Parasite', *Journal of Parasitology* **Vol. 83, No. 3**, 521-522, 1997.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., J. L. JONES, J. AZEVEDO-SILVA, C. C. F. ALVES, F. OREFICE, AND D. G. ADDISS. 'Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio De Janeiro State, Brazil', *Emerging Infectious Diseases* **Vol. 9, No. 1**, 55-62, 2003.
- BAHIA-OLIVEIRA, LÍLIAN M.G., ALBA L.P. RANGEL, MARCELA S. B. BOECHAT, BIANCA M. MANGIAVACCHI, LIVIA M. MARTINS, FRANCIELLE B. FERRAZ, MAYCON B. ALMEIDA, ELISA M. WAKED PEIXOTO, FLAVIA P. VIEIRA, AND RICARDO GERRA-PEIXE. 'Immunological and Immunogenetic Parameters on the Diversity of Ocular Toxoplasmosis: Evidence to Support Morphological Criteria to Classify Retinal/Retinochoroidal Scar Lesions in Epidemiologic Surveys, Toxoplasmosis', In Olgica Djurković Djaković (Ed.), *Toxoplasmosis - Recent Advances*, InTech, 2012.
- BALASUNDARAM, M. B., R. ANDAVAR, M. PALANISWAMY, AND N. VENKATAPATHY. 'Outbreak of Acquired Ocular Toxoplasmosis Involving 248 Patients (Vol 128, Pg 28, 2010)', *Archives of Ophthalmology* **Vol. 128, No. 4**, 508-508, 2010.
- BALASUNDARAM, MANOHAR B., RAGHURAM ANDAVAR, MANIKANDAN PALANISWAMY, AND NARENDRAN VENKATAPATHY. 'Outbreak of Acquired Ocular Toxoplasmosis Involving 248 Patients', *Archives of Ophthalmology* **Vol. 128, No. 1**, 28-32, 2010.
- BANARES, A., J. A. JOVER, B. FERNANDEZGUTIERREZ, J. M. B. DELCASTILLO, J. GARCIA, E. VARGAS, AND C. HERNANDEZGARCIA. 'Patterns of Uveitis as a Guide in Making Rheumatologic and Immunologic Diagnoses', *Arthritis and Rheumatism* **Vol. 40, No. 2**, 358-370, 1997.
- BEIMA-SOFIE, KRISTIN M., ABIGAIL W. BIGHAM, JAIRAM R. LINGAPPA, DALTON WAMALWA, ROMEL D. MACKELPRANG, MICHAEL J. BAMSHAD, ELIZABETH MALECHE-OBIMBO, BARBRA A. RICHARDSON, AND GRACE C. JOHN-STEWART. 'Toll-Like Receptor Variants Are Associated with Infant Hiv-1

- Acquisition and Peak Plasma Hiv-1 Rna Level', *Aids* **Vol. 27, No. 15**, 2431-2439, 2013.
- BELFORT-NETO, R., V. NUSSENBLATT, L. RIZZO, C. MUCCIOLI, C. SILVEIRA, R. NUSSENBLATT, A. KHAN, L. D. SIBLEY, AND R. BELFORT. 'High Prevalence of Unusual Genotypes of Toxoplasma Gondii Infection in Pork Meat Samples from Erechim, Southern Brazil', *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias* **Vol. 79, No. 1**, 111-114, 2007.
- BERTOZZI, L. C., L. A. SUZUKI, AND C. L. ROSSI. 'Serological Diagnosis of Toxoplasmosis: Usefulness of Iga Detection and Igg Avidity Determination in a Patient with a Persistent Igm Antibody Response to Toxoplasma Gondii', *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **Vol. 41, No. 3**, 175-7, 1999.
- BLOCH-MICHEL, E., AND R. B. NUSSENBLATT. 'International Uveitis Study Group Recommendations for the Evaluation of Intraocular Inflammatory Disease', *Am J Ophthalmol* **Vol. 103, No. 2**, 234-5, 1987.
- BOBIĆ, B., D. SIBALIĆ, AND O. DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ. 'High Levels of Igm Antibodies Specific for Toxoplasma Gondii in Pregnancy 12 Years after Primary Toxoplasma Infection. Case Report', *Gynecol Obstet Invest* **Vol. 31, No. 3**, 182-4, 1991.
- BOOTHROYD, J. C., AND M. E. GRIGG. 'Population Biology of Toxoplasma Gondii and Its Relevance to Human Infection: Do Different Strains Cause Different Disease?', *Curr Opin Microbiol* **Vol. 5, No. 4**, 438-42, 2002.
- BOSCH-DRIESSEN, L. E., T. T. BERENDSCHOT, J. V. ONGKOSUWITO, AND A. ROTHOVA. 'Ocular Toxoplasmosis: Clinical Features and Prognosis of 154 Patients', *Ophthalmology* **Vol. 109, No. 5**, 869-78, 2002.
- BOTTOS, J., R. H. MILLER, R. N. BELFORT, A. C. MACEDO, R. BELFORT, JR., M. E. GRIGG, AND UNIFESP TOXOPLASMOSIS GRP. 'Bilateral Retinochoroiditis Caused by an Atypical Strain of Toxoplasma Gondii', *British Journal of Ophthalmology* **Vol. 93, No. 11**, 1546-1550, 2009.
- BOU, G., M. S. FIGUEROA, P. MARTÍ-BELDA, E. NAVAS, AND A. GUERRERO. 'Value of Pcr for Detection of Toxoplasma Gondii in Aqueous Humor and Blood Samples from Immunocompetent Patients with Ocular Toxoplasmosis', *J Clin Microbiol* **Vol. 37, No. 11**, 3465-8, 1999.
- BOURDIN, C., A. BUSSE, E. KOUAMOU, F. TOUAFÉK, B. BODAGHI, P. LE HOANG, D. MAZIER, L. PARIS, AND A. FEKKAR. 'Pcr Detection of Toxoplasma Gondii Dna in Blood and Ocular Samples for the Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis', *J Clin Microbiol*, 2014.
- BOWIE, W. R., A. S. KING, D. H. WERKER, J. L. ISAAC-RENTON, A. BELL, S. B. ENG, AND S. A. MARION. 'Outbreak of Toxoplasmosis Associated with Municipal Drinking Water. The Bc Toxoplasma Investigation Team', *Lancet* **Vol. 350, No. 9072**, 173-7, 1997.
- BOWIE, W. R., A. S. KING, D. H. WERKER, J. L. ISAACRENTON, A. BELL, S. B. ENG, AND S. A. MARION. 'Outbreak of Toxoplasmosis Associated with Municipal Drinking Water', *Lancet* **Vol. 350, No. 9072**, 173-177, 1997.
- BOYLE, J. P., J. P. SAEIJ, M. D. CLEARY, AND J. C. BOOTHROYD. 'Analysis of Gene Expression During Development: Lessons from the Apicomplexa', *Microbes Infect* **Vol. 8, No. 6**, 1623-30, 2006.
- BRÉZIN, A. P., C. E. EQWUAGU, C. SILVEIRA, P. THULLIEZ, M. C. MARTINS, R. M. MAHDI, R. BELFORT, AND R. B. NUSSENBLATT. 'Analysis of Aqueous Humor in Ocular Toxoplasmosis', *N Engl J Med* **Vol. 324, No. 10**, 699, 1991.
- BURNETT, A. J., S. G. SHORTT, J. ISAAC-RENTON, A. KING, D. WERKER, AND W. R. BOWIE. 'Multiple Cases of Acquired Toxoplasmosis Retinitis Presenting in an Outbreak', *Ophthalmology* **Vol. 105, No. 6**, 1032-1037, 1998.
- CAI, G., R. KASTELEIN, AND C. A. HUNTER. 'Interleukin-18 (Il-18) Enhances Innate Il-12-Mediated Resistance to Toxoplasma Gondii', *Infect Immun* **Vol. 68, No. 12**, 6932-8, 2000.

- CALLEGARI-JACQUES, S. M., D. GRATTAPAGLIA, F. M. SALZANO, S. P. SALAMONI, S. G. CROSSETTI, M. E. FERREIRA, AND M. H. HUTZ. 'Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population', *American Journal of Human Biology* **Vol. 15, No. 6**, 824-834, 2003.
- CARVALHO-SILVA, D. R., F. R. SANTOS, J. ROCHA, AND S. D. J. PENA. 'The Phylogeography of Brazilian Y-Chromosome Lineages', *American Journal of Human Genetics* **Vol. 68, No. 1**, 281-286, 2001.
- COBAN, C., K. J. ISHII, T. KAWAI, H. HEMMI, S. SATO, S. UEMATSU, M. YAMAMOTO, O. TAKEUCHI, S. ITAGAKI, N. KUMAR, T. HORII, AND S. AKIRA. 'Toll-Like Receptor 9 Mediates Innate Immune Activation by the Malaria Pigment Hemozoin', *Journal of Experimental Medicine* **Vol. 201, No. 1**, 19-25, 2005.
- COOK, A. J., R. E. GILBERT, W. BUFFOLANO, J. ZUFFEREY, E. PETERSEN, P. A. JENUM, W. FOULON, A. E. SEMPRINI, AND D. T. DUNN. 'Sources of Toxoplasma Infection in Pregnant Women: European Multicentre Case-Control Study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis', *BMJ* **Vol. 321, No. 7254**, 142-7, 2000.
- CORDEIRO, C. A., P. R. MOREIRA, M. S. ANDRADE, W. O. DUTRA, W. R. CAMPOS, F. ORÉFICE, AND A. L. TEIXEIRA. 'Interleukin-10 Gene Polymorphism (-1082g/a) Is Associated with Toxoplasmic Retinochoroiditis', *Invest Ophthalmol Vis Sci* **Vol. 49, No. 5**, 1979-82, 2008.
- CORDEIRO, C. A., P. R. MOREIRA, T. F. BESSA, G. C. COSTA, W. O. DUTRA, W. R. CAMPOS, F. ORÉFICE, L. H. YOUNG, AND A. L. TEIXEIRA. 'Interleukin-6 Gene Polymorphism (-174 G/C) Is Associated with Toxoplasmic Retinochoroiditis', *Acta Ophthalmol* **Vol. 91, No. 4**, e311-4, 2013.
- CORDEIRO, C. A., P. R. MOREIRA, G. C. COSTA, W. O. DUTRA, W. R. CAMPOS, F. ORÉFICE, AND A. L. TEIXEIRA. 'Tnf-Alpha Gene Polymorphism (-308g/a) and Toxoplasmic Retinochoroiditis', *Br J Ophthalmol* **Vol. 92, No. 7**, 986-8, 2008.
- CORDEIRO, F. D., O. A. MARTINS-FILHO, M. O. D. ROCHA, S. J. ADAD, R. CORREA-OLIVEIRA, AND A. J. ROMANHA. 'Anti-Trypanosoma Cruzi Immunoglobulin G1 Can Be a Useful Tool for Diagnosis and Prognosis of Human Chagas' Disease', *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **Vol. 8, No. 1**, 112-118, 2001.
- COSTA, JEAN-MARC, AND STEPHANE BRETAGNE. 'Variation of B1 Gene and Af146527 Repeat Element Copy Numbers According to Toxoplasma Gondii Strains Assessed Using Real-Time Quantitative Pcr', *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 50, No. 4**, 1452-1454, 2012.
- COZON, G. J., J. FERRANDIZ, P. THULLIEZ, AND F. PEYRON. 'Flow Cytometric Application of the Sabin and Feldman Dye Test in the Diagnosis of Toxoplasmosis', *J Microbiol Methods* **Vol. 38, No. 1-2**, 131-6, 1999.
- COZON, G., C. ROURE, G. LIZARD, T. GREENLAND, D. LARGET-PIET, F. GANDILHON, AND F. PEYRON. 'An Improved Assay for the Detection of Toxoplasma Gondii Antibodies in Human Serum by Flow Cytometry', *Cytometry* **Vol. 14, No. 5**, 569-75, 1993.
- COELHO, R. A., M. KOBAYASHI, AND L. B. CARVALHO. 'Prevalence of IgG Antibodies Specific to Toxoplasma Gondii among Blood Donors in Recife, Northeast Brazil', *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **Vol. 45, No. 4**, 229-31, 2003.
- DAVIDSON, M. G., M. R. LAPPIN, R. V. ENGLISH, AND M. B. TOMPKINS. 'A Feline Model of Ocular Toxoplasmosis', *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **Vol. 34, No. 13**, 3653-3660, 1993.
- DAWSON, H. D., E. BESHAI, S. NISHI, G. SOLANO-AGUILAR, M. MORIMOTO, A. P. ZHAO, K. B. MADDEN, T. K. LEDBETTER, J. P. DUBEY, T. SHEA-DONOHUE, J. K. LUNNEY, AND J. F. URBAN. 'Localized Multigene Expression Patterns Support an Evolving Th1/Th2-Like Paradigm in Response to Infections with Toxoplasma Gondii and Ascaris Suum', *Infection and Immunity* **Vol. 73, No. 2**, 1116-1128, 2005.



- DE ANDRADE, R. A., A. B. REIS, C. M. F. GONTIJO, L. B. BRAGA, R. D. R. ROCHA, M. S. S. ARAUJO, L. R. VIANNA, AND O. A. MARTINS. 'Clinical Value of Anti-Leishmania (Leishmania) Chagasi IgG Titers Detected by Flow Cytometry to Distinguish Infected from Vaccinated Dogs', *Veterinary Immunology and Immunopathology* **Vol. 116, No. 1-2**, 85-97, 2007.
- DE MOURA, L., L. M. G. BAHIA-OLIVEIRA, M. Y. WADA, J. L. JONES, S. H. TUBOI, E. H. CARMO, W. M. RAMALHO, N. J. CAMARGO, R. TREVISAN, R. M. T. GRACA, A. J. DA SILVA, I. MOURA, J. P. DUBEY, AND D. O. GARRETT. 'Waterborne Toxoplasmosis, Brazil, from Field to Gene', *Emerging Infectious Diseases* **Vol. 12, No. 2**, 326-329, 2006.
- DE-LA-TORRE, A., A. SAUER, A. W. PFAFF, T. BOURCIER, J. BRUNET, C. SPEEG-SCHATZ, L. BALLONZOLI, O. VILLARD, D. AJZENBERG, N. SUNDAR, M. E. GRIGG, J. E. GOMEZ-MARIN, AND E. CANDOLFI. 'SEVERE SOUTH AMERICAN OCULAR TOXOPLASMOSIS IS ASSOCIATED WITH DECREASED Ifn- $\gamma$ /Il-17a and Increased Il-6/Il-13 Intraocular Levels', *PLoS Negl Trop Dis* **Vol. 7, No. 11**, e2541, 2013.
- DECOSTER, A., B. SLIZEWICZ, J. SIMON, C. BAZIN, F. DARCY, G. VITTU, C. BOULANGER, Y. CHAMPEAU, J. L. DEMORY, M. DUHAMEL, AND A. CAPRON. 'Platelia-Toxo Iga, a New Kit for Early Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Detection of Anti-P-30 Immunoglobulin-a Antibodies', *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 29, No. 10**, 2291-2295, 1991.
- DEFRANCE, T., B. VANBERVLIET, F. BRIERE, I. DURAND, F. ROUSSET, AND J. BANCHEREAU. 'Interleukin-10 and Transforming Growth-Factor-Beta Cooperate to Induce Anti-Cd40 Activated Naive Human B-Cells to Secrete Immunoglobulin-A', *Journal of Experimental Medicine* **Vol. 175, No. 3**, 671-682, 1992.
- DELIBAS, SONGUL BAYRAM, HATICE ERTABAKLAR, AND SEMA ERTUG. 'Evaluation of Antigenic Variations between Two Virulent Toxoplasma Strains', *Journal of Medical Microbiology* **Vol. 55, No. 10**, 1333-1335, 2006.
- DEMARCO, A. L., M. E. L. RODRIGUES, J. F. FIGUEIREDO, N. H. DEGHAIDE, M. B. DE MENEZES, L. A. DEMARCO, A. P. FERNANDES, AND E. A. DONADI. 'Susceptibility to Toxoplasmic Retinochoroiditis Is Associated with Hla Alleles Reported to Be Implicated with Rapid Progression to Aids', *Dis Markers* **Vol. 33, No. 6**, 309-12, 2012.
- DOS SANTOS, T. R., C. M. NUNES, M. C. LUVIZOTTO, A. B. DE MOURA, W. D. LOPES, A. J. DA COSTA, AND K. D. BRESCIANI. 'Detection of Toxoplasma Gondii Oocysts in Environmental Samples from Public Schools', *Vet Parasitol* **Vol. 171, No. 1-2**, 53-7, 2010.
- DUBEY, J. P. 'Toxoplasma Gondii Oocyst Survival under Defined Temperatures', *Journal of Parasitology* **Vol. 84, No. 4**, 862-865, 1998.
- DUBEY, J. P., D. H. GRAHAM, C. R. BLACKSTON, T. LEHMANN, S. M. GENNARI, A. M. RAGOZO, S. M. NISHI, S. K. SHEN, O. C. KWOK, D. E. HILL, AND P. THULLIEZ. 'Biological and Genetic Characterisation of Toxoplasma Gondii Isolates from Chickens (Gallus Domesticus) from São Paulo, Brazil: Unexpected Findings', *Int J Parasitol* **Vol. 32, No. 1**, 99-105, 2002.
- DUBEY, J. P., D. H. GRAHAM, D. S. DA SILVA, AND L. M. G. BAHIA-OLIVEIRA. 'Toxoplasma Gondii Isolates of Free-Ranging Chickens from Rio De Janeiro, Brazil: Mouse Mortality, Genotype, and Oocyst Shedding by Cats', *Journal of Parasitology* **Vol. 89, No. 4**, 851-853, 2003.
- DUBEY, J. P., AND J. L. JONES. 'Toxoplasma Gondii Infection in Humans and Animals in the United States', *Int J Parasitol* **Vol. 38, No. 11**, 1257-78, 2008.
- DUBEY, J. P., A. W. KOTULA, A. SHARAR, C. D. ANDREWS, AND D. S. LINDSAY. 'Effect of High-Temperature on Infectivity of Toxoplasma-Gondii Tissue Cysts in Pork', *Journal of Parasitology* **Vol. 76, No. 2**, 201-204, 1990.

- DUBEY, J. P., S. P. SHARMA, D. D. JURANEK, A. J. SULZER, AND S. M. TEUTSCH. 'Characterization of Toxoplasma Gondii Isolates from an Outbreak of Toxoplasmosis in Atlanta, Georgia', *Am J Vet Res* **Vol. 42, No. 6**, 1007-10, 1981.
- DUBEY, J. P., G. V. VELMURUGAN, A. CHOCKALINGAM, H. F. J. PENA, L. N. DE OLIVEIRA, C. A. LEIFER, S. M. GENNARI, LMGB OLIVEIRA, AND C. SU. 'Genetic Diversity of Toxoplasma Gondii Isolates from Chickens from Brazil', *Veterinary Parasitology* **Vol. 157, No. 3-4**, 299-305, 2008.
- DUBREMETZ, J. F., AND M. LEBRUN. 'Virulence Factors of Toxoplasma Gondii', *Microbes Infect* **Vol. 14, No. 15**, 1403-10, 2012.
- EBRAHIM ZADEH, A., T. BAMEDI, S. ETEMADI, M. SHAHRAKIPOUR, AND K. SARYAZDIPOUR. 'Toxoplasmosis as a Complication of Transfusion in Hemodialysis Patients', *Iran J Ped Hematol Oncol* **Vol. 4, No. 1**, 22-5, 2014.
- ELHENCE, P., P. AGARWAL, K. N. PRASAD, AND R. K. CHAUDHARY. 'Seroprevalence of Toxoplasma Gondii Antibodies in North Indian Blood Donors: Implications for Transfusion Transmissible Toxoplasmosis', *Transfus Apher Sci* **Vol. 43, No. 1**, 37-40, 2010.
- ELMORE, S. A., J. L. JONES, P. A. CONRAD, S. PATTON, D. S. LINDSAY, AND J. P. DUBEY. 'Toxoplasma Gondii: Epidemiology, Feline Clinical Aspects, and Prevention', *Trends Parasitol* **Vol. 26, No. 4**, 190-6, 2010.
- EWALD, S. E., J. CHAVARRIA-SMITH, AND J. C. BOOTHROYD. 'Nlrp1 Is an Inflammasome Sensor for Toxoplasma Gondii', *Infect Immun* **Vol. 82, No. 1**, 460-8, 2014.
- FARDEAU, C., S. ROMAND, N. A. RAO, N. CASSOUX, O. BETTEMBOURG, P. THULLIEZ, AND P. LEHOANG. 'Diagnosis of Toxoplasmic Retinochoroiditis with Atypical Clinical Features', *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 134, No. 2**, 196-203, 2002.
- FEKKAR, A., D. AJZENBERG, B. BODAGHI, F. TOUAFÉK, P. LE HOANG, J. DELMAS, P. Y. ROBERT, M. L. DARDÉ, D. MAZIER, AND L. PARIS. 'Direct Genotyping of Toxoplasma Gondii in Ocular Fluid Samples from 20 Patients with Ocular Toxoplasmosis: Predominance of Type Ii in France', *J Clin Microbiol* **Vol. 49, No. 4**, 1513-7, 2011.
- FIGUEROA, M. S., G. BOU, P. MARTI-BELDA, R. LOPEZ-VELEZ, AND A. GUERRERO. 'Diagnostic Value of Polymerase Chain Reaction in Blood and Aqueous Humor in Immunocompetent Patients with Ocular Toxoplasmosis', *Retina-the Journal of Retinal and Vitreous Diseases* **Vol. 20, No. 6**, 614-619, 2000.
- FILISETTI, D., AND E. CANDOLFI. 'Immune Response to Toxoplasma Gondii', *Ann Ist Super Sanita* **Vol. 40, No. 1**, 71-80, 2004.
- FLEGR, J. 'How and Why Toxoplasma Makes Us Crazy', *Trends Parasitol* **Vol. 29, No. 4**, 156-63, 2013.
- FLEGR, J., AND A. MARKOŠ. 'Masterpiece of Epigenetic Engineering - How Toxoplasma Gondii Reprogrammes Host Brains to Change Fear to Sexual Attraction', *Mol Ecol* **Vol. 23, No. 24**, 5934-6, 2014.
- FOUDRINIER, F., C. MARXCHEMLA, D. AUBERT, A. BONHOMME, AND J. M. PINON. 'Value of Specific Immunoglobulin-a Detection by 2 Immunocapture Assays in the Diagnosis of Toxoplasmosis', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **Vol. 14, No. 7**, 585-590, 1995.
- FURTADO, J. M., A. S. BHARADWAJ, L. M. ASHANDER, A. OLIVAS, AND J. R. SMITH. 'Migration of Toxoplasma Gondii-Infected Dendritic Cells across Human Retinal Vascular Endothelium', *Invest Ophthalmol Vis Sci* **Vol. 53, No. 11**, 6856-62, 2012.
- FURTADO, J. M., A. S. BHARADWAJ, T. J. CHIPPS, Y. PAN, L. M. ASHANDER, AND J. R. SMITH. 'Toxoplasma Gondii Tachyzoites Cross Retinal Endothelium Assisted by Intercellular Adhesion Molecule-1 in Vitro', *Immunol Cell Biol* **Vol. 90, No. 9**, 912-5, 2012.
- GARWEG, J. G. 'Determinants of Immunodiagnostic Success in Human Ocular Toxoplasmosis', *Parasite Immunology* **Vol. 27, No. 3**, 61-68, 2005.

- GIBSON, AMANDA K., STEPHEN RAVERTY, DYANNA M. LAMBOURN, JESSICA HUGGINS, SPENCER L. MAGARGAL, AND MICHAEL E. GRIGG. 'Polyparasitism Is Associated with Increased Disease Severity in Toxoplasma Gondii-Infected Marine Sentinel Species', *Plos Neglected Tropical Diseases* **Vol. 5, No. 5**, 2011.
- GILBERT, R. E., D. D. T. DUNN, S. LIGHTMAN, P. I. MURRAY, C. E. PAVESIO, P. D. GORMLEY, J. MASTERS, S. P. PARKER, AND M. R. STANFORD. 'Incidence of Symptomatic Toxoplasma Eye Disease: Aetiology and Public Health Implications', *Epidemiology and Infection* **Vol. 123, No. 2**, 283-289, 1999.
- GLASNER, P. D., C. SILVEIRA, D. KRUSZON-MORAN, M. C. MARTINS, M. BURNIER JUNIOR, S. SILVEIRA, M. E. CAMARGO, R. B. NUSSENBLATT, R. A. KASLOW, AND R. BELFORT JUNIOR. 'An Unusually High Prevalence of Ocular Toxoplasmosis in Southern Brazil', *Am J Ophthalmol* **Vol. 114, No. 2**, 136-44, 1992.
- GOV, L., A. KARIMZADEH, N. UENO, AND M. B. LODOEN. 'Human Innate Immunity to Toxoplasma Gondii Is Mediated by Host Caspase-1 and Asc and Parasite Gra15', *MBio* **Vol. 4, No. 4**, 2013.
- GRIGG, M. E., S. BONNEFOY, A. B. HEHL, Y. SUZUKI, AND J. C. BOOTHROYD. 'Success and Virulence in Toxoplasma as the Result of Sexual Recombination between Two Distinct Ancestries', *Science* **Vol. 294, No. 5540**, 161-165, 2001.
- GRIGG, M. E., AND J. C. BOOTHROYD. 'Rapid Identification of Virulent Type I Strains of the Protozoan Pathogen Toxoplasma Gondii by Pcr-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis at the B1 Gene', *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 39, No. 1**, 398-400, 2001.
- GRIGG, M. E., J. GANATRA, J. C. BOOTHROYD, AND T. P. MARGOLIS. 'Unusual Abundance of Atypical Strains Associated with Human Ocular Toxoplasmosis', *Journal of Infectious Diseases* **Vol. 184, No. 5**, 633-639, 2001.
- GUAY, J. M., D. DUBOIS, M. J. MORENCY, S. GAGNON, J. MERCIER, AND R. C. LEVESQUE. 'Detection of the Pathogenic Parasite Toxoplasma-Gondii by Specific Amplification of Ribosomal Sequences Using Comultiplex Polymerase Chain-Reaction', *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 31, No. 2**, 203-207, 1993.
- HALOS, L., A. THEBAULT, D. AUBERT, M. THOMAS, C. PERRET, R. GEERS, A. ALLIOT, S. ESCOTTE-BINET, D. AJZENBERG, M. L. DARDE, B. DURAND, P. BOIREAU, AND I. VILLENA. 'An Innovative Survey Underlining the Significant Level of Contamination by Toxoplasma Gondii of Ovine Meat Consumed in France', *Int J Parasitol* **Vol. 40, No. 2**, 193-200, 2010.
- HEGAB, S. M., AND S. A. AL-MUTAWA. 'Immunopathogenesis of Toxoplasmosis', *Clinical and Experimental Medicine* **Vol. 3, No. 2**, 84-105, 2003.
- HERBORT, C. P. '[Classification and Differential Diagnosis of Uveitis]', *Rev Med Suisse Romande* **Vol. 116, No. 1**, 5-15, 1996.
- HERRMANN, D. C., P. MAKSIMOV, A. HOTOP, U. GROß, W. DÄUBENER, O. LIESENFELD, U. PLEYER, F. J. CONRATHS, AND G. SCHARES. 'Genotyping of Samples from German Patients with Ocular, Cerebral and Systemic Toxoplasmosis Reveals a Predominance of Toxoplasma Gondii Type II', *Int J Med Microbiol*, 2014.
- HILL, D., C. COSS, J. P. DUBEY, K. WROBLEWSKI, M. SAUTTER, T. HOSTEN, C. MUÑOZ-ZANZI, E. MUI, S. WITHERS, K. BOYER, G. HERMES, J. COYNE, F. JAGDIS, A. BURNETT, P. MCLEOD, H. MORTON, D. ROBINSON, AND R. MCLEOD. 'Identification of a Sporozoite-Specific Antigen from Toxoplasma Gondii', *J Parasitol* **Vol. 97, No. 2**, 328-37, 2011.
- HITT, J. A., AND G. A. FILICE. 'Detection of Toxoplasma-Gondii Parasitemia by Gene Amplification, Cell-Culture, and Mouse Inoculation', *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 30, No. 12**, 3181-3184, 1992.
- HOGAN, M. J., S. J. KIMURA, and G. R. O'CONNOR. 'Ocular Toxoplasmosis', *Arch Ophthalmol* **Vol. 72**, 592-600, 1964.

- HOHLFELD, P., F. DAFFOS, J. M. COSTA, P. THULLIEZ, F. FORESTIER, AND M. VIDAUD. 'Prenatal-Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis with a Polymerase-Chain-Reaction Test on Amniotic-Fluid', *New England Journal of Medicine* **Vol. 331, No. 11**, 695-699, 1994.
- HOLLAND, G. N. 'Lx Edward Jackson Memorial Lecture - Ocular Toxoplasmosis: A Global Reassessment. Part 1: Epidemiology and Course of Disease', *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 136, No. 6**, 973-988, 2003.
- HOLLAND, G. N. 'Ocular Toxoplasmosis: A Global Reassessment. Part I: Epidemiology and Course of Disease', *Am J Ophthalmol* **Vol. 136, No. 6**, 973-88, 2003.
- HOLLAND, G. N. 'Lx Edward Jackson Memorial Lecture - Ocular Toxoplasmosis: A Global Reassessment - Part II: Disease Manifestations and Management', *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 137, No. 1**, 1-17, 2004.
- HOLUB, D., J. FLEGR, E. DRAGOMIRECKÁ, M. RODRIGUEZ, M. PREISS, T. NOVÁK, J. ČERMÁK, J. HORÁČEK, P. KODYM, J. LIBIGER, C. HÖSCHL, AND L. B. MOTLOVÁ. 'Differences in Onset of Disease and Severity of Psychopathology between Toxoplasmosis-Related and Toxoplasmosis-Unrelated Schizophrenia', *Acta Psychiatr Scand* **Vol. 127, No. 3**, 227-38, 2013.
- HUNTER, C. A., E. CANDOLFI, C. SUBAUSTE, V. VANCLEAVE, AND J. S. REMINGTON. 'Studies on the Role of Interleukin-12 in Acute Murine Toxoplasmosis', *Immunology* **Vol. 84, No. 1**, 16-20, 1995.
- HUNTER, C. A., C. S. SUBAUSTE, AND J. S. REMINGTON. 'The Role of Cytokines in Toxoplasmosis', *Biotherapy* **Vol. 7, No. 3-4**, 237-247, 1994.
- HUSBAND, A. J., AND J. L. GOWANS. 'The Origin and Antigen-Dependent Distribution of Iga-Containing Cells in the Intestine', *J Exp Med* **Vol. 148, No. 5**, 1146-60, 1978.
- JACQUET, A., L. COULON, J. DE NEVE, V. DAMINET, M. HAUMONT, L. GARCIA, A. BOLLEN, M. JURADO, AND R. BIEMANS. 'The Surface Antigen Sag3 Mediates the Attachment of Toxoplasma Gondii to Cell-Surface Proteoglycans', *Molecular and Biochemical Parasitology* **Vol. 116, No. 1**, 35-44, 2001.
- JAMIESON, S. E., A. L. PEIXOTO-RANGEL, A. C. HARGRAVE, L. A. ROUBAIX, E. J. MUI, N. R. BOULTER, E. N. MILLER, S. J. FULLER, J. S. WILEY, L. CASTELLUCCI, K. BOYER, R. G. PEIXE, M. J. KIRISITS, L. E. S. ELIAS, J. J. COYNE, R. CORREA-OLIVEIRA, M. SAUTTER, N. C. SMITH, M. P. LEES, C. N. SWISHER, P. HEYDEMANN, A. G. NOBLE, D. PATEL, D. BARDO, D. BURROWES, D. MCLONE, N. ROIZEN, S. WITHERS, L. M. BAHIA-OLIVEIRA, R. MCLEOD, AND J. M. BLACKWELL. 'Evidence for Associations between the Purinergic Receptor P2x(7) (P2rx7) and Toxoplasmosis', *Genes Immun* **Vol. 11, No. 5**, 374-83, 2010.
- KAPPERUD, G., P. A. JENUM, B. STRAY-PEDERSEN, K. K. MELBY, A. ESKILD, AND J. ENG. 'Risk Factors for Toxoplasma Gondii Infection in Pregnancy. Results of a Prospective Case-Control Study in Norway', *Am J Epidemiol* **Vol. 144, No. 4**, 405-12, 1996.
- KARIM, K. A., AND G. B. LUDLAM. 'Relationship and Significance of Antibody Titers as Determined by Various Serological Methods in Glandular and Ocular Toxoplasmosis', *Journal of Clinical Pathology* **Vol. 28, No. 1**, 42-49, 1975.
- KHAN, A., J. P. DUBEY, C. SU, J. W. AJIOKA, B. M. ROSENTHAL, AND L. D. SIBLEY. 'Genetic Analyses of Atypical Toxoplasma Gondii Strains Reveal a Fourth Clonal Lineage in North America', *Int J Parasitol* **Vol. 41, No. 6**, 645-55, 2011.
- KHAN, A., C. JORDAN, C. MUCCIOLI, A. L. VALLOCHI, L. V. RIZZO, R. BELFORT, R. W. A. VITOR, C. SILVEIRA, AND L. D. SIBLEY. 'Genetic Divergence of Toxoplasma Gondii Strains Associated with Ocular Toxoplasmosis, Brazil', *Emerging Infectious Diseases* **Vol. 12**, 942-949, 2006.
- KIJLSTRA, AIZE, AND ESKILD PETERSEN. 'Epidemiology, Pathophysiology, and the Future of Ocular Toxoplasmosis', *Ocular Immunology and Inflammation* **Vol. 22, No. 2**, 138-147, 2014.

- KIKUCHI, K., Z. X. LIAN, Y. KIMURA, C. SELMI, G. X. YANG, S. C. GORDON, P. INVERNIZZI, M. PODDA, R. L. COPPEL, A. A. ANSARI, S. IKEHARA, H. MIYAKAWA, AND M. E. GERSHWIN. 'Genetic Polymorphisms of Toll-Like Receptor 9 Influence the Immune Response to Cpg and Contribute to Hyper-Igm in Primary Biliary Cirrhosis', *Journal of Autoimmunity* **Vol. 24, No. 4**, 347-352, 2005.
- KIM, T. H., K. H. JEONG, S. K. KIM, S. H. LEE, C. G. IHM, T. W. LEE, J. Y. MOON, Y. C. YOON, J. H. CHUNG, S. J. PARK, S. W. KANG, AND Y. H. KIM. 'Tlr9 Gene Polymorphism (Rs187084, Rs352140): Association with Acute Rejection and Estimated Glomerular Filtration Rate in Renal Transplant Recipients', *International Journal of Immunogenetics* **Vol. 40, No. 6**, 502-508, 2013.
- KIRBY, TONY. 'Calls for More Detailed Studies on Toxoplasmosis', *Lancet Infectious Diseases* **Vol. 12, No. 12**, 912-913, 2012.
- KONG, J. T., M. E. GRIGG, L. UYETAKE, S. PARMLEY, AND J. C. BOOTHROYD. 'Serotyping of Toxoplasma Gondii Infections in Humans Using Synthetic Peptides', *J Infect Dis* **Vol. 187, No. 9**, 1484-95, 2003.
- KOTULA, A. W., J. P. DUBEY, A. K. SHARAR, C. D. ANDREWS, S. K. SHEN, AND D. S. LINDSAY. 'Effect of Freezing on Infectivity of Toxoplasma-Gondii Tissue Cysts in Pork', *Journal of Food Protection* **Vol. 54, No. 9**, 687-690, 1991.
- LABALETTE, P., L. DELHAES, F. MARGARON, B. FORTIER, AND J. F. ROULAND. 'Ocular Toxoplasmosis after the Fifth Decade', *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 133, No. 4**, 506-515, 2002.
- LAI, ZENG-ZHEN, ZHANG NI, XIAO-LING PAN, AND LIANG SONG. 'Toll-Like Receptor 9 (Tlr9) Gene Polymorphisms Associated with Increased Susceptibility of Human Papillomavirus-16 Infection in Patients with Cervical Cancer', *Journal of International Medical Research* **Vol. 41, No. 4**, 1027-1036, 2013.
- LATZ, E., T. S. XIAO, AND A. STUTZ. 'Activation and Regulation of the Inflammasomes', *Nat Rev Immunol* **Vol. 13, No. 6**, 397-411, 2013.
- LEE, Y. H., H. S. LEE, S. J. CHOI, J. D. JI, AND G. G. SONG. 'Associations between Tlr Polymorphisms and Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Clinical and Experimental Rheumatology* **Vol. 30, No. 2**, 262-265, 2012.
- LU, F. L., S. G. HUANG, AND L. H. KASPER. 'Cd4(+) T Cells in the Pathogenesis of Murine Ocular Toxoplasmosis', *Infection and Immunity* **Vol. 72, No. 9**, 4966-4972, 2004.
- MAENZ, M., D. SCHLÜTER, O. LIESENFELD, G. SCHARES, U. GROSS, AND U. PLEYER. 'Ocular Toxoplasmosis Past, Present and New Aspects of an Old Disease', *Prog Retin Eye Res* **Vol. 39**, 77-106, 2014.
- MAHGOUB, A. M., S. M. AUFY, M. G. SAADI, AND M. ADEL ELMALLAWANY. 'Risk Factors Predisposing to Toxoplasmosis in Chronic Renal Failure Patients and Renal Transplant Recipients', *J Egypt Soc Parasitol* **Vol. 39, No. 3**, 963-73, 2009.
- MARTINS, L M. 'Avaliação Comparativa Do Perfil De Isotipos Anti-Toxoplasma Gondii Por Elisa E Citometria De Fluxo Em Indivíduos Portadores De Uveítes Toxoplásmicas', UENF, 2009.
- MARTINS-FILHO, O. A., S. M. ELOI-SANTOS, A. TEIXEIRA CARVALHO, R. C. OLIVEIRA, A. RASSI, A. O. LUQUETTI, G. G. RASSI, AND Z. BRENER. 'Double-Blind Study to Evaluate Flow Cytometry Analysis of Anti-Live Trypomastigote Antibodies for Monitoring Treatment Efficacy in Cases of Human Chagas' Disease', *Clin Diagn Lab Immunol* **Vol. 9, No. 5**, 1107-13, 2002.
- MARTINS-FILHO, O. A., M. E. S. PEREIRA, J. F. CARVALHO, J. R. CANCADO, AND Z. BRENER. 'Flow-Cytometry, a New Approach to Detect Anti-Live Trypomastigote Antibodies and Monitor the Efficacy of Specific Treatment in Human Chagas-Disease', *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **Vol. 2, No. 5**, 569-573, 1995.

- MCDONALD, C. P., J. A. BARBARA, M. CONTRERAS, AND S. BROWN. 'Provision of a Panel of Anti-Toxoplasma-Negative Blood Donors', *Vox Sang* **Vol. 57, No. 1**, 55-8, 1989.
- MELAMED, J. 'Contributions to the History of Ocular Toxoplasmosis in Southern Brazil', *Mem Inst Oswaldo Cruz* **Vol. 104, No. 2**, 358-63, 2009.
- MELAMED, J., G. U. ECKERT, V. S. SPADONI, E. G. LAGO, AND F. UBERTI. 'Ocular Manifestations of Congenital Toxoplasmosis', *Eye (Lond)* **Vol. 24, No. 4**, 528-34, 2010.
- MELO, M. B., P. KASPERKOVITZ, A. CERNY, S. KÖNEN-WAISMAN, E. A. KURT-JONES, E. LIEN, B. BEUTLER, J. C. HOWARD, D. T. GOLENBOCK, AND R. T. GAZZINELLI. 'Unc93b1 Mediates Host Resistance to Infection with Toxoplasma Gondii', *PLoS Pathog* **Vol. 6, No. 8**, e1001071, 2010.
- METS, M. B., E. HOLFELS, K. M. BOYER, C. N. SWISHER, N. ROIZEN, L. STEIN, M. STEIN, J. HOPKINS, S. WITHERS, D. MACK, R. LUCIANO, D. PATEL, J. S. REMINGTON, P. MEIER, AND R. MCLEOD. 'Eye Manifestations of Congenital Toxoplasmosis', *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 122, No. 3**, 309-324, 1996.
- MINNS, L. A., L. C. MENARD, D. M. FOUREAU, S. DARCHE, C. RNET, D. W. MIELCARZ, D. BUZONI-GATEL, AND L. H. KASPER. 'Tlr9 Is Required for the Gut-Associated Lymphoid Tissue Response Following Oral Infection of Toxoplasma Gondii', *Journal of Immunology* **Vol. 176, No. 12**, 7589-7597, 2006.
- MONTOYA, J. G. 'Laboratory Diagnosis of Toxoplasma Gondii Infection and Toxoplasmosis', *Journal of Infectious Diseases* **Vol. 185**, S73-S82, 2002.
- MONTOYA, J. G., AND O. LIESENFELD. 'Toxoplasmosis', *Lancet* **Vol. 363, No. 9425**, 1965-1976, 2004.
- MONTOYA, J. G., S. PARMLEY, O. LIESENFELD, G. J. JAFFE, AND J. S. REMINGTON. 'Use of the Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis', *Ophthalmology* **Vol. 106, No. 8**, 1554-1563, 1999.
- MONTOYA, J. G., AND J. S. REMINGTON. 'Toxoplasmic Chorioretinitis in the Setting of Acute Acquired Toxoplasmosis', *Clinical Infectious Diseases* **Vol. 23, No. 2**, 277-282, 1996.
- NAGASAWA, H., T. MANABE, Y. MAEKAWA, M. OKA, AND K. HIMENO. 'Role of L3t4+ and Lyt-2+ T-Cell Subsets in Protective Immune-Responses of Mice against Infection with a Low or High Virulent-Strain of Toxoplasma-Gondii', *Microbiology and Immunology* **Vol. 35, No. 3**, 215-222, 1991.
- NGUYEN, T. D., G. BIGAIGNON, J. VAN BROECK, M. VERCAMMEN, T. N. NGUYEN, M. DELMEE, M. TURNEER, S. F. WOLF, AND J. P. COUTELIER. 'ACUTE AND CHRONIC PHASES OF TOXOPLASMA GONDII INFECTION IN MICE MODULATE the Host Immune Responses', *Infection and Immunity* **Vol. 66, No. 6**, 2991-2995, 1998.
- NOVAIS, EDUARDO A., ALESSANDRA G. COMMODARO, FABIO SANTOS, CRISTINA MUCCIOLI, ANDRE MAIA, HELOISA NASCIMENTO, CECILIA T. A. MOELLER, LUIZ V. RIZZO, MICHAEL E. GRIGG, AND RUBENS BELFORT, JR. 'Patients with Diffuse Uveitis and Inactive Toxoplasmic Retinitis Lesions Test Pcr Positive for Toxoplasma Gondii in Their Vitreous and Blood', *British Journal of Ophthalmology* **Vol. 98, No. 7**, 937-940, 2014.
- NUSSENBLATT, R. B., K. K. MITTAL, S. FUHRMAN, S. D. SHARMA, AND A. G. PALESTINE. 'Lymphocyte Proliferative Responses of Patients with Ocular Toxoplasmosis to Parasite and Retinal Antigens', *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 107, No. 6**, 632-641, 1989.
- OMAR, AHMEDDIN H., MICHIO YASUNAMI, AKIKO YAMAZAKI, HIROKI SHIBATA, MICHAEL F. OFORI, BARTHOLOMEW D. AKANMORI, MOHAMMED NASIR SHUAIBU, MIHOKO KIKUCHI, AND KENJI HIRAYAMA. 'Toll-Like Receptor 9 (Tlr9) Polymorphism Associated with Symptomatic Malaria: A Cohort Study', *Malaria Journal* **Vol. 11**, 2012.

- ORÉFICE, F, AND L M G BAHIA-OLIVEIRA. 'Toxoplasmosis', *Uveíte Clínica E Cirúrgica: Texto E Atlas*, Cultura Médica, 2005.
- PALANISAMY, M., B. MADHAVAN, M. B. BALASUNDARAM, R. ANDAVAR, AND N. VENKATAPATHY. 'Outbreak of Ocular Toxoplasmosis in Coimbatore, India', *Indian J Ophthalmol* **Vol. 54, No. 2**, 129-31, 2006.
- PAVESIO, C. E., AND S. LIGHTMAN. 'Toxoplasma Gondii and Ocular Toxoplasmosis: Pathogenesis', *British Journal of Ophthalmology* **Vol. 80, No. 12**, 1099-1107, 1996.
- PEIXE, R. G., M. S. BOECHAT, A. L. RANGEL, R. F. ROSA, M. L. PETZL-ERLER, AND L. M. BAHIA-OLIVEIRA. 'Single Nucleotide Polymorphisms in the Interferon Gamma Gene Are Associated with Distinct Types of Retinochoroidal Scar Lesions Presumably Caused by Toxoplasma Gondii Infection', *Mem Inst Oswaldo Cruz* **Vol. 109, No. 1**, 99-107, 2014.
- PEIXOTO-RANGEL, A. L., E. N. MILLER, L. CASTELLUCCI, S. E. JAMIESON, R. G. PEIXE, L. E S ELIAS, R. CORREA-OLIVEIRA, L. M. BAHIA-OLIVEIRA, AND J. M. BLACKWELL. 'Candidate Gene Analysis of Ocular Toxoplasmosis in Brazil: Evidence for a Role for Toll-Like Receptor 9 (Tlr9)', *Mem Inst Oswaldo Cruz* **Vol. 104, No. 8**, 1187-90, 2009.
- PENA, S. D. J., L. BASTOS-RODRIGUES, J. R. PIMENTA, AND S. P. BYDLOWSKI. 'Dna Tests Probe the Genomic Ancestry of Brazilians', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **Vol. 42, No. 10**, 870-876, 2009.
- PHAN, L., K. KASZA, J. JALBRZIKOWSKI, A. G. NOBLE, P. LATKANY, A. KUO, W. MIELER, S. MEYERS, P. RABIAH, K. BOYER, C. SWISHER, M. METS, N. ROIZEN, S. CEZAR, M. SAUTTER, J. REMINGTON, P. MEIER, R. MCLEOD, AND TOXOPLASMOSIS STUDY GROUP. 'Longitudinal Study of New Eye Lesions in Children with Toxoplasmosis Who Were Not Treated During the First Year of Life', *Am J Ophthalmol* **Vol. 146, No. 3**, 375-384, 2008.
- PICHYANGKUL, S., K. YONGVANITCHIT, U. KUM-ARB, H. HEMMI, S. AKIRA, A. M. KRIEG, D. G. HEPPNER, V. A. STEWART, AND H. HASEGAWA. 'Malaria Blood Stage Parasites Activate Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Murine Dendritic Cells through a Toll-Like Receptor 9-Dependent Pathway', *Journal of Immunology* **Vol. 172, No. 8**, 4926-4933, 2004.
- PINON, J. M., D. TOUBAS, C. MARX, G. MOUGEOT, A. BONNIN, A. BONHOMME, M. VILLAUME, F. FOUDRINIER, AND H. LEPAN. 'Detection of Specific Immunoglobulin-E in Patients with Toxoplasmosis', *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 28, No. 8**, 1739-1743, 1990.
- PIOTROWSKI, PIOTR, MARGARITA LIANERI, MARIUSZ WUDARSKI, MARZENA OLESINSKA, AND PAWEL P. JAGODZINSKI. 'Contribution of Toll-Like Receptor 9 Gene Single-Nucleotide Polymorphism to Systemic Lupus Erythematosus', *Rheumatology International* **Vol. 33, No. 5**, 1121-1125, 2013.
- PISSINATE, J. F., I. T. GOMES, V. PERUHYPE-MAGALHAES, R. DIETZE, O. A. MARTINS, AND E. M. LEMOS. 'Upgrading the Flow-Cytometric Analysis of Anti-Leishmania Immunoglobulins for the Diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis', *Journal of Immunological Methods* **Vol. 336, No. 2**, 193-202, 2008.
- PORTELA, R. W., J. BETHONY, M. I. COSTA, A. GAZZINELLI, R. W. VITOR, F. M. HERMETO, R. CORREA-OLIVEIRA, AND R. T. GAZZINELLI. 'A Multihousehold Study Reveals a Positive Correlation between Age, Severity of Ocular Toxoplasmosis, and Levels of Glycoinositolphospholipid-Specific Immunoglobulin A', *J Infect Dis* **Vol. 190, No. 1**, 175-83, 2004.
- RAHUMATULLAH, ANIZAH, BOON YIN KHOO, AND RAHMAH NOORDIN. 'Triplex Pcr Using New Primers for the Detection of Toxoplasma Gondii', *Experimental Parasitology* **Vol. 131, No. 2**, 231-238, 2012.
- REMINGTON, JACK S., RIMA MCLEOD, PHILIPPE THULLIEZ, AND GEORGE DESMONTES. 'Chapter 31 - Toxoplasmosis', In Jack S. Remington, Jerome O.

- Klein, Christopher B. Wilson and Carol J. Baker (Eds.), *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant (Sixth Edition)*, W.B. Saunders, 2006.
- RIBEIRO FERREIRA, ISABELLE MARTINS, JOSE ERNESTO VIDAL, CINARA DE CASSIA BRANDAO DE MATTOS, LUIZ CARLOS DE MATTOS, DAOFENG QU, CHUNLEI SU, AND VERA LUCIA PEREIRA-CHIOCCOLA. 'Toxoplasma Gondii Isolates: Multi Locus Rflp-Pcr Genotyping from Human Patients in Sao Paulo State, Brazil Identified Distinct Genotypes', *Experimental Parasitology* **Vol. 129**, **No. 2**, 190-195, 2011.
- ROBERT-GANGNEUX, F., AND M. L. DARDÉ. 'Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis', *Clin Microbiol Rev* **Vol. 25**, **No. 2**, 264-96, 2012.
- ROCHA, R. D. R., C. M. F. GONTIJO, S. M. ELOI-SANTOS, A. TEIXEIRA-CARVALHO, R. CORREA-OLIVEIRA, T. C. A. FERRARI, M. J. MARQUES, W. MAYRINK, AND O. A. MARTINS. 'Clinical Value of Anti-Live Leishmania (Viannia) Braziliensis Immunoglobulin G Subclasses, Detected by Flow Cytometry, for Diagnosing Active Localized Cutaneous Leishmaniasis', *Tropical Medicine & International Health* **Vol. 11**, **No. 2**, 156-166, 2006.
- RONDAY, M. J. H., J. V. ONGKOSUWITO, A. ROTHOVA, AND A. KIJLSTRA. 'Intraocular Anti-Toxoplasma Gondii Iga Antibody Production in Patients with Ocular Toxoplasmosis', *American Journal of Ophthalmology* **Vol. 127**, **No. 3**, 294-300, 1999.
- ROTHOVA, A. 'Ocular Involvement in Toxoplasmosis', *British Journal of Ophthalmology* **Vol. 77**, **No. 6**, 371-377, 1993.
- SABIN, A. B., AND H. A. FELDMAN. 'Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (Toxoplasma)', *Science* **Vol. 108**, **No. 2815**, 660-663, 1948.
- SARKARI, B., R. SHAFIEI, M. ZARE, S. SOHRABPOUR, AND L. KASRAIAN. 'Seroprevalence and Molecular Diagnosis of Toxoplasma Gondii Infection among Blood Donors in Southern Iran', *J Infect Dev Ctries* **Vol. 8**, **No. 4**, 543-7, 2014.
- SATO, DAISUKE, YUSUKE SUZUKI, TATSUYA KANO, HITOSHI SUZUKI, JOE MATSUOKA, HIDENORI YOKOI, SATOSHI HORIKOSHI, KATSUHIKA IKEDA, AND YASUHIKO TOMINO. 'Tonsillar Tlr9 Expression and Efficacy of Tonsillectomy with Steroid Pulse Therapy in Iga Nephropathy Patients', *Nephrology Dialysis Transplantation* **Vol. 27**, **No. 3**, 1090-1097, 2012.
- SEYFERTH, GIRALDA. 'Colonização, Imigração E Questão Racial No Brasil', *Revista USP* **Vol. 53**, 117-149, 2002.
- SHOBAB, L., U. PLEYER, J. JOHNSEN, S. METZNER, E. R. JAMES, N. TORUN, M. P. FAY, O. LIESENFELD, AND M. E. GRIGG. 'Toxoplasma Serotype Is Associated with Development of Ocular Toxoplasmosis', *J Infect Dis* **Vol. 208**, **No. 9**, 1520-8, 2013.
- SIBLEY, L. D., AND J. W. AJIOKA. 'Population Structure of Toxoplasma Gondii: Clonal Expansion Driven by Infrequent Recombination and Selective Sweeps', *Annu Rev Microbiol* **Vol. 62**, 329-51, 2008.
- SILVA-DOS-SANTOS, P. P., G. B. BARROS, J. R. MINEO, D. A. DE OLIVEIRA SILVA, M. H. MENEGAZ, J. C. SERUFO, R. DIETZE, O. A. MARTINS-FILHO, AND E. M. LEMOS. 'Flow Cytometry-Based Algorithm to Analyze the Anti-Fixed Toxoplasma Gondii Tachyzoites Igm and Igg Reactivity and Diagnose Human Acute Toxoplasmosis', *J Immunol Methods* **Vol. 378**, **No. 1-2**, 33-43, 2012.
- SILVEIRA, C., R. BELFORT, C. MUCCIOLI, M. T. ABREU, M. C. MARTINS, C. VICTORA, R. B. NUSSENBLATT, AND G. N. HOLLAND. 'A Follow-up Study of Toxoplasma Gondii Infection in Southern Brazil', *Am J Ophthalmol* **Vol. 131**, **No. 3**, 351-4, 2001.
- SILVEIRA, C., A. L. VALLOCHI, U. RODRIGUES DA SILVA, C. MUCCIOLI, G. N. HOLLAND, R. B. NUSSENBLATT, R. BELFORT, AND L. V. RIZZO. 'Toxoplasma Gondii in the Peripheral Blood of Patients with Acute and Chronic Toxoplasmosis', *Br J Ophthalmol* **Vol. 95**, **No. 3**, 396-400, 2011.



- STAVNEZER, J. 'Regulation of Antibody-Production and Class Switching by Tgf-Beta', *Journal of Immunology* **Vol. 155, No. 4**, 1647-1651, 1995.
- STEPICK-BIEK, P., P. THULLIEZ, F. G. ARAUJO, AND J. S. REMINGTON. 'Iga Antibodies for Diagnosis of Acute Congenital and Acquired Toxoplasmosis', *J Infect Dis* **Vol. 162, No. 1**, 270-3, 1990.
- SU, C., A. KHAN, P. ZHOU, D. MAJUMDAR, D. AJZENBERG, M. L. DARDÉ, X. Q. ZHU, J. W. AJIOKA, B. M. ROSENTHAL, J. P. DUBEY, AND L. D. SIBLEY. 'Globally Diverse Toxoplasma Gondii Isolates Comprise Six Major Clades Originating from a Small Number of Distinct Ancestral Lineages', *Proc Natl Acad Sci U S A* **Vol. 109, No. 15**, 5844-9, 2012.
- SUKHUMAVASI, W., C. E. EGAN, A. L. WARREN, G. A. TAYLOR, B. A. FOX, D. J. BZIK, AND E. Y. DENKERS. 'Tlr Adaptor Myd88 Is Essential for Pathogen Control During Oral Toxoplasma Gondii Infection but Not Adaptive Immunity Induced by a Vaccine Strain of the Parasite', *J Immunol* **Vol. 181, No. 5**, 3464-73, 2008.
- SWITAJ, K., A. MASTER, P. K. BORKOWSKI, M. SKRZYPCZAK, J. WOJCIECHOWICZ, AND P. ZABOROWSKI. 'Association of Ocular Toxoplasmosis with Type I Toxoplasma Gondii Strains: Direct Genotyping from Peripheral Blood Samples', *J Clin Microbiol* **Vol. 44, No. 11**, 4262-4, 2006.
- TALABANI, H., T. MERGEY, H. YERA, E. DELAIR, A. P. BREZIN, G. LANGSLEY, AND J. DUPOUY-CAMET. 'Factors of Occurrence of Ocular Toxoplasmosis. A Review', *Parasite* **Vol. 17, No. 3**, 177-82, 2010.
- TENTER, A. M., A. R. HECKEROTH, AND L. M. WEISS. 'Toxoplasma Gondii: From Animals to Humans', *International Journal for Parasitology* **Vol. 30, No. 12-13**, 1217-1258, 2000.
- VALLOCHI, A. L., C. MUCCIOLI, M. C. MARTINS, C. SILVEIRA, R. BELFORT, AND L. V. RIZZO. 'The Genotype of Toxoplasma Gondii Strains Causing Ocular Toxoplasmosis in Humans in Brazil', *Am J Ophthalmol* **Vol. 139, No. 2**, 350-1, 2005.
- VELGEROUSSEL, F., T. CHARDES, P. MEVELEC, M. BRILLARD, J. HOEBEKE, AND D. BOUT. 'Epitopic Analysis of the Toxoplasma-Gondii Major Surface-Antigen Sag1', *Molecular and Biochemical Parasitology* **Vol. 66, No. 1**, 31-38, 1994.
- WALLE, F., N. KEBEDE, A. TSEGAYE, AND T. KASSA. 'Seroprevalence and Risk Factors for Toxoplasmosis in Hiv Infected and Non-Infected Individuals in Bahir Dar, Northwest Ethiopia', *Parasit Vectors* **Vol. 6, No. 1**, 15, 2013.
- WALZER, K. A., AND J. P. BOYLE. 'A Single Chromosome Unexpectedly Links Highly Divergent Isolates of Toxoplasma Gondii', *MBio* **Vol. 3, No. 1**, 2012.
- WAN, GUO-XING, YU-WEN CAO, WEN-QIN LI, YU-CONG LI, WEN-JIE ZHANG, AND FENG LI. 'Associations between Tlr9 Polymorphisms and Cancer Risk: Evidence from an Updated Meta-Analysis of 25,685 Subjects', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **Vol. 15, No. 19**, 8279-8285, 2014.
- WARE, P. L., AND L. H. KASPER. 'Strain-Specific Antigens of Toxoplasma-Gondii', *Infection and Immunity* **Vol. 55, No. 3**, 778-783, 1987.
- WENDTE, J. M., A. K. GIBSON, AND M. E. GRIGG. 'Population Genetics of Toxoplasma Gondii: New Perspectives from Parasite Genotypes in Wildlife', *Vet Parasitol* **Vol. 182, No. 1**, 96-111, 2011.
- WHITTLE, R. M., G. R. WALLACE, R. A. WHISTON, D. C. DUMONDE, AND M. R. STANFORD. 'Human Antiretinal Antibodies in Toxoplasma Retinochoroiditis', *British Journal of Ophthalmology* **Vol. 82, No. 9**, 1017-1021, 1998.
- WONG, S. Y., M. P. HAJDU, R. RAMIREZ, P. THULLIEZ, R. MCLEOD, AND J. S. REMINGTON. 'Role of Specific Immunoglobulin-E in Diagnosis of Acute Toxoplasma Infection and Toxoplasmosis', *Journal of Clinical Microbiology* **Vol. 31, No. 11**, 2952-2959, 1993.
- XIAO, H. W., Y. LUO, X. Y. LAI, J. M. SHI, Y. M. TAN, J. S. HE, W. Z. XIE, W. Y. ZHENG, X. J. YE, X. H. YU, Z. CAI, M. F. LIN, AND H. HUANG. 'Donor Tlr9 Gene Tagsnps Influence Susceptibility to Agvhd and Cmv Reactivation in the Allo-Hsct Setting

- without Polymorphisms in the Tlr4 and Nod2 Genes', *Bone Marrow Transplantation* **Vol. 49, No. 2**, 241-247, 2014.
- XIN, L. F., AND R. H. SONG. '[Prevalence of Igg Antibodies Specific to Toxoplasma Gondii among College Student Blood Donors in Shijiazhuang City]', *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi* **Vol. 25, No. 3**, 254, 258, 2013.
- XU, CHANG-JUAN, WEN-HUI ZHANG, HAI-FENG PAN, XIANG-PEI LI, JIAN-HUA XU, AND DONG-QING YE. 'Association Study of a Single Nucleotide Polymorphism in the Exon 2 Region of Toll-Like Receptor 9 (Tlr9) Gene with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus among Chinese', *Molecular Biology Reports* **Vol. 36, No. 8**, 2245-2248, 2009.
- YANO, A., F. AOSAI, M. OHTA, H. HASEKURA, K. SUGANE, AND S. HAYASHI. 'Antigen Presentation by Toxoplasma Gondii-Infected Cells to Cd4+ Proliferative T Cells and Cd8+ Cytotoxic Cells', *J Parasitol* **Vol. 75, No. 3**, 411-6, 1989.
- YUODELIS, C., AND A. HENDRICKSON. 'A Qualitative and Quantitative Analysis of the Human Fovea During Development', *Vision Res* **Vol. 26, No. 6**, 847-55, 1986.
- ZAINODINI, N., M. ZARE-BIDAKI, S. H. ABDOLLAHI, M. AFROOZ, N. ZIAALI, M. EBRAHIMIAN, AND M. K. ARABABADI. 'Molecular and Serological Detection of Acute and Latent Toxoplasmosis Using Real-Time Pcr and Elisa Techniques in Blood Donors of Rafsanjan City, Iran, 2013', *Iranian Journal of Parasitology* **Vol. 9, No. 3**, 336-341, 2014.

## ANEXO I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: “Relação entre alta produção de IgM e a apresentação clínica da Toxoplasmose ocular: abordagem imunodiagnóstica e imunogenética”

A toxoplasmose é uma doença causada por um protozoário parasita chamado *Toxoplasma gondii*. Apesar de ser muito comum em Campos dos Goytacazes, apenas algumas pessoas tem sintomas da doença. Entre os sintomas mais comuns está o desenvolvimento de doença ocular. As lesões oculares causadas pela toxoplasmose em adultos podem levar a perda da capacidade visual e em casos extremos à cegueira. Entender os mecanismos que levam ao surgimento da doença ocular é importante para o desenvolvimento de futuras estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento da toxoplasmose ocular. Especificamente pretendemos investigar a relação entre níveis de IgM e a presença de toxoplasmose ocular, bem como a relação de IgM e TLR9 no desenvolvimento de doença ocular.

Sua participação é muito importante e consistirá na doação de 15 ml de sangue venoso. Serão coletados ainda dados de identificação básica como nome, idade e sexo. Seu sangue será utilizado para realização de teste sorológico para toxoplasmose, análise de componentes do seu sistema imunológico e para obtenção de seu material genético (DNA). Seu DNA será extraído do sangue e enviado para uma empresa na Inglaterra, onde o gene TLR9 será analisado. Os seus resultados, juntamente com os dos outros participantes do estudo será utilizado para um estudo de genética populacional e não está relacionado a nenhuma doença ou condição genética previamente conhecida.

O procedimento de coleta do sangue venoso se dará por meio de sistema de coleta vácuo durante o procedimento de doação de sangue no Hemocentro Regional do Hospital Ferreira Machado em Campos dos Goytacazes-RJ.

Os riscos e desconfortos associados à sua participação incluem pequena dor no momento da picadura e a formação de hematomas, após a coleta do sangue, e raramente tromboflebite na veia punccionada, celulite local e punção acidental de outras estruturas anatômicas tais como artérias e nervos. Caso alguma destas

situações ocorra você será prontamente assistido por profissionais do Hemocentro Regional do Hospital Ferreira Machado.

Sua participação como voluntário(a) não te trará nenhum benefício financeiro. No entanto, conhecer sua sorologia para toxoplasmose pode ser importante para que você possa se planejar, caso eu seja imune, para visitas regulares a oftalmologistas. E caso você seja mulher, conhecer a condição de imunidade ao *Toxoplasma gondii* previamente à gravidez traz o benefício da orientação de prevenção da infecção congênita (isto é, durante a gravidez) necessária em mulheres não imunes.

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O material coletado, bem como toda informação obtida por meio deste é de sua propriedade e seu acesso a ele é irrestrito.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. O resultado do seu exame sorológico para toxoplasmose serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Laboratório de Biologia do Reconhecer, na Universidade Estadual do Norte Fluminense e outra será fornecida a você.

Toda dúvida a respeito desta pesquisa, poderá ser perguntada diretamente para Dr. Lilian Maria Garcia Bahia de Oliveira, no telefone: 22- 2739-7255. Qualquer objeção ou dúvida a respeito da conduta ética poderá ser questionada junto ao Comitê de Ética em Pesquisa Na Faculdade de Medicina de Campos/Fundação Benedito Pereira Nunes, no endereço Avenida Dr. Alberto Torres, 217, centro, Campos dos Goytacazes, ou pelo telefone: (22)2101-2948.

O Comitê de Ética é a instância que tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da

dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade.

A participação no estudo não acarretará custos para você e qualquer despesa que você venha a ter como consequência de sua participação será ressarcida, como transporte, alimentação, hospedagem será ressarcida. No caso você sofrer algum dano decorrente dessa pesquisa você será indenizado.

#### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Eu, \_\_\_\_\_ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O professor orientador Lilian Maria Bahia Garcia de Oliveira, e à sua aluna de doutorado Livia Mattos Martins certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

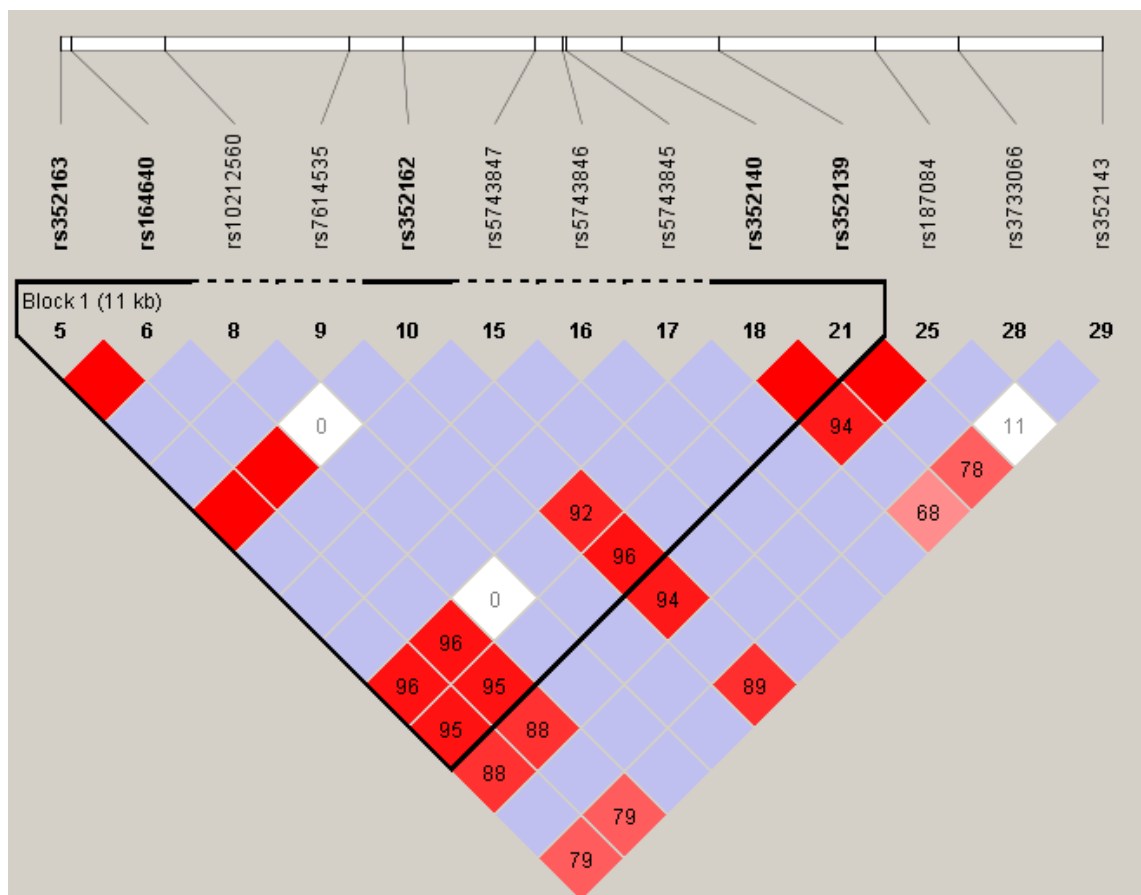
Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a estudante Livia Mattos Martins ou a professora Lilian Maria Garcia Bahia de Oliveira no telefone ( 22 ) 2739-7255. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Campos, na Avenida Alberto Torres, 217, centro Campos dos Goytacazes, ou pelo telefone (22) 2101-2948.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

## ANEXO II

Mapa de desequilíbrio de ligação da população CEU para SNP rs352140 do gene *TLR9*



Mapa de desequilíbrio de ligação da população CEU para SNP rs352140 do gene *TLR9* obtidos pelo *software Haploview* a partir da base de dados *Hapmap*. Valores  $r^2$  ( $\times 100$ ) estão indicados nos quadrados da matriz: quadrado preto indica  $r^2 = 1$ ; branco,  $r^2 = 0$ ; tons de cinza,  $r^2$  com valores intermediários ( $0 < r^2 < 1$ ).