

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO REFERENTE ÀS
MOLÉCULAS IFN- γ , IL-13 E CXCL10 ASSOCIADO À
TOXOPLASMOSE OCULAR

MARCELA SANTANA BASTOS BOECHAT

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

ABRIL DE 2014

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO REFERENTE ÀS
MOLÉCULAS IFN- γ , IL-13 E CXCL10 ASSOCIADO À
TOXOPLASMOSE OCULAR

MARCELA SANTANA BASTOS BOECHAT

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

Orientadora: Dr^a Lílian Maria Garcia Bahia de Oliveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

ABRIL DE 2014

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO REFERENTE ÀS
MOLÉCULAS IFN- γ , IL-13 E CXCL10 ASSOCIADO À
TOXOPLASMOSE OCULAR

MARCELA SANTANA BASTOS BOECHAT

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

Aprovada em 29 de abril de 2014.

Comissão Examinadora:

Renato Augusto DaMatta (Doutor em Ciências) – UENF

Milton Masahiko Kanashiro (Doutor em Biociências e Biotecnologia) -
UENF

Maria Luiza Petzl-Erler (Doutora em Antropologia e Genética Humana) –
UFPR

Lilian Maria Garcia Bahia de Oliveira (Doutora em Bioquímica e
Imunologia) – UENF (Orientadora)

Dedico esta tese aos meus pais, Suely e Edimar, que por uma vida de dedicação, trabalho e amor incondicional, sempre possibilitaram a seus filhos a oportunidade de realizar sonhos!

AGRADECIMENTOS

Interessante como os agradecimentos de uma tese nos remete a momentos de reflexão e nos dá a oportunidade de rapidamente tomar ciência de todo processo pelo qual passamos. É hora do reconhecimento que uma tese não é resultado apenas de um esforço individual...ela nasce de significativas contribuições!

Assim, começo meu agradecimento à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela infraestrutura e oportunidade de realização do curso. Também agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro para realização deste trabalho.

Agradeço a Prof^a Lilian pela orientação respeitosa, pelo incentivo e pertinentes sugestões e pelo entusiasmo que tem pela Ciência. Obrigada por me permitir concretizar esta difícil, mas gratificante, etapa em minha vida!

Agradeço a Prof^a Alba pelos socorros na imunogenética e ainda por exercer o papel de revisora atenta e criteriosa.

Agradeço ao Prof Renato DaMatta, ao Prof Milton Kanashiro e a Prof^a Maria Luiza Petzl-Erlar que prontamente aceitaram participar da banca examinadora deste trabalho.

Agradeço a Dr^a Laura Duarte, a Prof^a Rosalee Istoe e ao Sr Sérgio Nery, responsáveis, respectivamente, pelo hemocentro do Hospital Ferreira Machado, Projeto Terceira Idade em Ação/UENF e Asilo do Carmo, os quais nos permitiram o acesso para coleta do material biológico.

Aos voluntários deste projeto que foram prestimosos e pacientes em colaborar na realização dos exames sorológicos e oftalmológicos, apesar das suas ocupações diárias.

Agradeço aos amigos da 201, Alba, Bianca, Flávia, Francielle, Larissa, Liliane, Lívia, Rebeka, Rhônia, Fabrício, Maycon e Ricardo com os quais tive a oportunidade de unir uma convivência agradável a um ambiente produtivo. Especialmente, agradeço ao Maycon e a Liliane pelo carinho e cuidado com os pacientes durante as coletas de sangue, ao Ricardo pela disponibilidade em realizar os exames oftalmológicos apesar da sua rotina pesada, a Alba e Francielle companheiras de viagem e incansáveis “extratoras de DNA”, a Bianca e Flávia pelo auxílio com as sorologias, a Lívia pelas leituras no

citômetro mesmo que nas madrugadas e a Rhônia companheira de experimentos e organizadora oficial das nossas agendas e eventos do laboratório. Finalmente, agradeço a todos pelas constantes idas e vindas ao Hospital Geral de Guarus, ao Hemocentro do Hospital Ferreira Machado e ao ambulatório da UENF e pelo *tour* na cidade de Campos em visitas aos lares dos pacientes. Apesar de todo trabalho, sem dúvida alguma, vocês fizeram parte dos melhores momentos desta jornada. Espero não perdê-los de vista.

À Juliana, pelo carinho e prontidão com que sempre me auxiliou no uso do citômetro de fluxo e nas análises dos resultados de citometria.

Aos demais alunos e técnicos do LBR pelos agradáveis momentos de convivência, especialmente aos amigos Franz e Thiago, os quais os longos anos de estudo fez a relação de “coleguismo” se transformar em amizade daquelas muito especiais.

Agradeço ainda aos amigos e familiares que não contribuíram diretamente para este trabalho, mas que proporcionaram momentos de descontração entre desabafos, “papos-cabeça”, piadas e boas gargalhadas, me permitindo muitas e muitas vezes recarregar as energias.

Agradeço a meus pais, Suely e Edimar, que sempre primaram pela minha educação, oferecendo a mim oportunidade de estudar sem nunca demonstrar o tamanho do esforço e dificuldades que passaram para cumprir este objetivo. Ouvei com atenção os conselhos de que eu fosse, de alguma forma, “doutora” no que fazia. Não medi esforços para me formar no nível que eles desejaram. Eu só tenho a agradecer. Amo vocês!

Agradeço ao meu irmão Lucas e a minha cunhada Layara pelos esforços empreendidos na reta final deste trabalho, quando na etapa de escrita da tese meu notebook resolveu não mais funcionar!

Agradeço ao meu amor, Júnior, pelo zelo, por cada gesto carinhoso, pelas palhaçadas que me fizeram sorrir apesar das preocupações da pós e pela compreensão e ternura sempre manifestadas, apesar da minha falta de atenção em alguns momentos.

Agradeço a DEUS por poder citar todas essas pessoas num momento tão importante. Obrigada por colocá-las tão caprichosamente em minha vida. É com fé que peço a DEUS todos os dias para livrar-me do mal e Ele atende enviando anjos na forma de amigos!

RESUMO

Estima-se que 30% da população mundial esteja infectada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Em Campos dos Goytacazes a endemicidade da toxoplasmose atinge 57,2% da população. Estudos indicam que as manifestações oculares da toxoplasmose em Campos podem atingir cerca de 30% da população infectada. Neste trabalho, investigamos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes de *IFNG*, *IL13* e *CXCL10* e avaliamos os níveis das citocinas IFN- γ e IL-13 produzidas por células do sangue periférico da população de estudo. Os parâmetros imunológicos e genéticos foram comparados em indivíduos de diferentes faixas etárias, agrupados quanto à sorologia para toxoplasmose e presença ou ausência de lesão ocular toxoplásmica. Foi observado que indivíduos com lesões cicatrizadas da retina apresentando alto, médio ou baixo grau de severidade, identificadas como tipo A, B ou C, respectivamente, apresentavam respostas imunes diferenciadas, sugerindo que as lesões retinianas tenham sido originadas por mecanismos de destruição distintos. Não ficou claro o mecanismo que leva às lesões tipo A, podendo estas ser decorrentes de uma resposta inflamatória exacerbada ou por danos diretos causados por *T. gondii*. Os indivíduos com lesão tipo B apresentaram uma resposta Th1/Th2 desbalanceada, com alta produção de IFN- γ e baixa produção de IL-13, o que pode levar a lesão por mecanismos de autoagressão. Em indivíduos com lesões tipo C, o padrão de secreção de IFN- γ e IL-13 é mais equilibrado, de forma que se consiga evitar danos severos ao tecido ocular e também a multiplicação do parasita. Foi visto ainda que a idade é um importante fator de risco para doença ocular, uma vez que foi notado decréscimo significativo na produção de IFN- γ e IL-13 com o envelhecimento. SNPs em genes codificadores das citocinas IFN- γ e IL-13 e da quimiocina CXCL10 também mostraram associação com a susceptibilidade às manifestações oculares da toxoplasmose. O estudo combinado de parâmetros imunológicos e genéticos cria a perspectiva de se poder controlar os processos inflamatórios e possíveis lesões no tecido retiniano provenientes da infecção por *Toxoplasma gondii*.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, retinocoroidite, SNP, IFN- γ , IL-13, CXCL10.

ABSTRACT

It is estimated that 30% of world population is infected with *T gondii*. In Campos dos Goytacazes, toxoplasmosis is endemic, reaching 57.2% of the city population. Studies indicate that ocular manifestations of toxoplasmosis in Campos can reach about 30% of the population infected with the parasite *T gondii*. This work we investigated Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in genes of *IFNG*, *IL13* and *CXCL10* and evaluate the levels of cytokines IFN- γ and IL-13 produced by peripheral blood cells from the study population. The immunological and genetic parameters were compared among individuals from different ages, which were grouped according to the serology for toxoplasmosis and the presence or absence of retinochoroidal scar lesions. It was observed that individuals with retinal scar lesions showing high, medium and low degree of severity (respectively, types A, B and C), presented differential specific *in vitro* immune responses. This fact suggests that the retinal lesions can be originated from distinct tissue destruction mechanisms. It was unclear the mechanism that leads to type A lesions, these may be due to an exacerbated inflammatory response or direct damages caused by *T. gondii*. Individuals with type B lesion had an imbalanced Th1/Th2 response, with high production of IFN- γ and low IL-13 production, which can lead to lesion by mechanisms of self-aggression. In individuals with type C lesions, the pattern of secretion of IFN- γ and IL-13 is more balanced so that it can prevent severe damage to the ocular tissue and also the multiplication of the parasite. It was also noticed that age is an important risk factor for the ocular disease, because it was detected a significant decrease of the production of cytokines IFN- γ and IL-13 with aging. SNPs in genes coding for cytokines IFN- γ and IL-13 and chemokine CXCL10 have also presented association with the susceptibility to the manifestation of toxoplasmic retinochoroiditis. The combined study of immunological and genetic parameters open new perspective for controlling inflammation processes and possibly lesions in retinal tissue caused by *Toxoplasma gondii* infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, retinochoroiditis, SNP, IFN- γ , IL-13, CXCL10.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das lesões oculares decorrentes da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	28
Figura 2: Mapa de desequilíbrio de ligação da população CEU para SNPs do gene <i>IFNG</i> obtidos pelo software <i>Haploview</i> a partir da base de dados <i>Hapmap</i>	48
Figura 3: Mapa de desequilíbrio de ligação da população CEU para SNPs do gene <i>IL13</i> obtidos pelo software <i>Haploview</i> a partir da base de dados <i>Hapmap</i>	48
Figura 4: Mapa de desequilíbrio de ligação da população CEU para SNPs do gene <i>CXCL10</i> obtidos pelo software <i>Haploview</i> a partir da base de dados <i>Hapmap</i>	49
Figura 5: Esquema representativo do ensaio <i>KASP™</i> (LCG GENOMICS).....	51
Figura 6: Perfil dos doadores de sangue em Campos dos Goytacazes/RJ quanto à sorologia para toxoplasmose e fundoscopia.	54
Figura 7: Produção de IFN- γ e IL-13 em sobrenadantes de células sanguíneas de indivíduos soronegativos para toxoplasmose (Neg), soropositivos sem cicatrizes de lesão ocular (SL) e soropositivos com presença de cicatrizes de lesão (CL), após estímulo por STAg.	55
Figura 8: Produção de IFN- γ e IL-13 em sobrenadantes de células sanguíneas de indivíduos soropositivos sem cicatrizes de lesão ocular (SL) e soropositivos com presença de cicatrizes de lesão tipo A, tipo B ou tipo C, após estímulo por STAg.	57
Figura 9: Produção de IFN- γ e IL-13 em sobrenadantes de células sanguíneas de indivíduos soropositivos, independente da presença de lesão, agrupados por faixa etária, após estímulo por STAg.	59
Figura 10: Produção de IFN- γ e IL-13 em sobrenadantes de células sanguíneas de indivíduos soropositivos sem cicatrizes de lesão ocular (SL) e soropositivos com presença de cicatrizes de lesão tipo A, tipo B ou tipo C, agrupados quanto a faixa etária, após estímulo por STAg.....	60
Figura 11: Frequência genotípica e alélica dos SNPs <i>IFNG</i> <i>rs2069718</i> , <i>rs3181035</i> e <i>rs1861493</i> em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (A, B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (controle).....	69

Figura 12: Frequência genotípica e alélica dos SNPs <i>IFNG</i> <i>rs24305</i> e <i>rs2069705</i> em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasma portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (A, B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (controle).	70
Figura 13: Frequência genotípica e alélica dos SNPs <i>IL13</i> <i>rs1295687</i> e <i>rs1800925</i> em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (A, B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (controle).	73
Figura 14: Frequência genotípica e alélica dos SNPs <i>IL13</i> <i>rs7719175</i> e <i>rs3091307</i> em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (A, B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (controle).	74
Figura 15: Frequência genotípica e alélica dos SNPs <i>CXCL10</i> <i>rs3921</i> , <i>rs4256246</i> e <i>rs4508917</i> em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (A, B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (controle).....	76
Figura 16: Frequência de indivíduos apresentando números variados de genótipos de risco em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (SL).....	80
Figura 17: Relação entre genótipos de SNPs presentes no gene <i>IFNG</i> e produção de IFN- γ	82
Figura 18: Relação entre genótipos de SNPs presentes no gene <i>IL13</i> e produção de IL-13.	84
Figura 19: Associação entre a produção de IFN- γ em grupos de indivíduos afetados e controles e genótipos de SNPs no gene <i>IFNG</i> relacionados à toxoplasmose ocular.	86
Figura 20: Associação entre a produção de IL-13 em grupos de indivíduos afetados e controles e genótipos de SNPs no gene <i>IL13</i> relacionados à toxoplasmose ocular.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequências alélica para SNPs de <i>IFNG</i> obtidas a partir de indivíduos de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.....	62
Tabela 2: Frequências alélica para SNPs de <i>IL13</i> obtidas a partir de indivíduos de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.	63
Tabela 3: Frequências alélica para SNPs de <i>CXCL10</i> obtidas a partir de indivíduos de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.....	64
Tabela 4: Análises de associação genética entre SNPs selecionados no gene de <i>IFNG</i> e manifestação ocular da toxoplasmose.....	66
Tabela 5: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão A e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP <i>IFNG_rs2069718</i>	67
Tabela 6: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP <i>IFNG_rs3181035</i>	67
Tabela 7: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP <i>IFNG_rs1861493</i>	68
Tabela 8: Análises de associação genética entre SNPs selecionados no gene de <i>IL13</i> e manifestação ocular da toxoplasmose.	71
Tabela 9: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão B e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP <i>IL13_rs1295687</i>	72
Tabela 10: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão B e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP <i>IL13_rs7719175</i>	72
Tabela 11: Análises de associação genética entre SNPs selecionados no gene de <i>CXCL10</i> e manifestação ocular da toxoplasmose.....	76

Tabela 12: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP <i>CXCL10_rs3921</i>	76
Tabela 13: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP <i>CXCL10_rs4256246</i>	77
Tabela 14: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão B e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP <i>CXCL10_rs4508917</i>	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Grupos de indivíduos envolvidos no estudo genético, agrupados quanto à sorologia para toxoplasmose e fundoscopia.	43
Quadro 2: Grupos de indivíduos envolvidos no estudo imunológico, agrupados quanto à sorologia para toxoplasmose, fundoscopia e faixa etária.	43
Quadro 3: Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) selecionados nos genes candidatos <i>IFNG</i> , <i>IL13</i> e <i>CXCL10</i>	47
Quadro 4: Grupo de análises dos indivíduos infectados por <i>Toxoplasma gondii</i> segundo perfil clínico obtido por exames oftalmológicos.	52
Quadro 5: Perfil da população de estudo quanto à sorologia para toxoplasmose e fundoscopia.	53
Quadro 6: Comparação entre parâmetros imunológicos e genéticos associados aos diferentes fenótipos de lesões oculares toxoplásmica.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
CBA	Cytometric Beads Array
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CL	Indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de lesão ocular
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
CXCL-10	C-X-C motif Chemokine 10
Da	Daltons
DL	Desequilíbrio de Ligação
DMEM	Dubelcco`s Modified Essencial Medium (Meio Essencial Modificado Dubelcco`s)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphat (Desoxinucleotídeo Trifosfato)
EDTA	Ethylenedinitrilotetraacetic acid (Ácido Etilenodiaminotetracético)
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
Fas-L	Ligante de Faz
HCl	Hydrochloric Acid (Ácido Clorídrico)
IC	Intervalo de Confiança
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
IFNGR1	Cadeia 1 do receptor de IFN- γ
IFNGR2	Cadeia 2 do receptor de IFN- γ

IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL13R α 1	Cadeia alfa 1 do receptor de IL-13
IL13R α 2	Cadeia alfa 2 do receptor de IL-13
IL-15	Interleucina 15
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
KASP	Kompetitive Allele Specific
KCl	Potassium Chloride (Cloreto de Potássio)
kDa	Quilo Daltons
MAF	Minor Allele Frequency (Frequência do alelo menor)
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Proteína quimiotática de monócitos-1)
MgCl ₂	Magnesium Chloride (Cloreto de Magnésio)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

MIP-2	Mouse Macrophage Inflammatory Protein-2 (Proteína Inflamatória de Macrófagos-2)
mRNA	RNA mensageiro
Neg	Indivíduos soronegativos para toxoplasmose
NK	Natural Killer
NKT	Natural killer T
OR	Odds Ratio (Razão de Chance)
PB	Pares de bases
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato de Sódio)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
RNA _m	RNA mensageiro
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SL	Indivíduos soropositivos para toxoplasmose sem lesão ocular
SNP	Single Nucleotide Polimorphism (Polimorfismo em Nucleotídeo Único)
STAg	Soluble Toxoplasma Antigen (Antígeno Solúvel de Toxoplasma)
TBE	Tris/Borato/EDTA
TGF- β	Transforming Growth Factor beta (Fator de Transformação do Crescimento beta)
TLR	Toll Like Receptors (Receptores Tipo-Toll)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha (Fator de Necrose Tumoral alfa)
VP	Vacúolo Parasitóforo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	21
2.2 Ciclo biológico	23
2.3 Transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i>	24
2.4 Manifestações oculares da toxoplasmose.....	25
2.5 Classificação das lesões oculares toxoplásmicas	27
2.6 Resposta imune ao protozoário <i>Toxoplasma gondii</i>	29
2.6.1 Citocinas IFN- γ e IL-13 e o balanço Th1/Th2.....	29
2.6.2 Resposta imune sistêmica contra <i>Toxoplasma gondii</i>	32
2.6.3 Resposta imune intraocular contra <i>Toxoplasma gondii</i>	37
2.7 Genética e susceptibilidade a infecções parasitárias	38
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 POPULAÇÃO DE ESTUDO, MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 População de estudo.....	42
4.2 Manutenção de parasitas e preparo do antígeno solúvel de <i>Toxoplasma gondii</i>	44
4.3 Culturas de células sanguíneas para dosagem de citocinas.....	45
4.4 Análise das citocinas IFN- γ e IL-13 nos sobrenadantes das culturas celulares.....	45
4.5 Análises estatísticas.....	45
4.6 Extração e quantificação de DNA genômico	46
4.7 Seleção dos SNPs	46
4.8 Genotipagem.....	49

4.9	Análise da frequência alélica na população de Campos dos Goytacazes	50
4.10	Análises estatísticas	50
5	RESULTADOS	53
5.1	Perfil da população de estudo quanto a detecção de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> e exames oftalmológicos	53
5.2	Produção das citocinas IFN- γ e IL-13	54
5.2.1	Comparação da produção de citocinas entre grupos de indivíduos soronegativos e soropositivos para <i>Toxoplasma gondii</i> com presença ou ausência de cicatrizes de lesão ocular	55
5.2.2	Comparação da produção de citocinas entre grupos de indivíduos soropositivos para <i>Toxoplasma gondii</i> sem cicatrizes de lesão ocular e com cicatrizes do tipo A, B ou C	56
5.2.3	Comparação da produção de citocinas entre indivíduos soropositivos para <i>Toxoplasma gondii</i> sem cicatrizes de lesão ocular e com cicatrizes do tipo A, B ou C, agrupados por faixa etária	56
5.3	Comparações entre frequências alélicas da população de Campos dos Goytacazes, CEU e YRI	61
5.4	Estudo de associação genética com SNPs dos genes <i>IFNG</i> , <i>IL13</i> e <i>CXCL10</i>	64
5.3	Relação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos nos genes <i>IFNG</i> e <i>IL13</i> e produção das citocinas IFN- γ e IL-13	80
5.3	Relação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos associados a toxoplasmose ocular e produção das citocinas IFN- γ e IL-13 em grupos de afetados e controles	84
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÕES	109
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	111

1 INTRODUÇÃO

O protozoário *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular com ampla distribuição geográfica e alta prevalência sorológica mundial. Estima-se que um terço da população mundial esteja cronicamente infectada por *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000). Em Campos dos Goytacazes a toxoplasmose é endêmica, apresentando prevalência de 57,2% de infectados. Considerando apenas a população de baixo poder aquisitivo, que recebe pouca atenção médica e sanitária, o nível de prevalência desta infecção atinge 84,8% (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

A toxoplasmose é uma das principais causas de uveíte em várias partes do mundo (Holland *et al.* 1999) e é responsável por mais de 85% dos casos de uveíte posterior no sul do Brasil (Silveira, 1988; Melamed, 2009). Nos Estados Unidos, a prevalência da doença ocular é de 2% para a população soropositiva (Holland, 2003) e em Erechim, sul do Brasil, 17,7% (Glasner *et al.*, 1992). Em Campos dos Goytacazes, a ocorrência da forma ocular é frequente, podendo atingir 30% dos indivíduos infectados (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). Estes valores percentuais favorecem estudos acerca do perfil de resposta imune e *background* genético de indivíduos expostos a fatores de risco para infecção.

As respostas imunes às infecções são frequentemente dominadas por populações de linfócitos Th1 ou Th2 e as proporções relativas dessas subpopulações durante a resposta imune são os principais determinantes para o desfecho de uma infecção (Infante-Duarte e Kamradt, 1999). As células Th1 apresentam um perfil pró-inflamatório e produzem citocinas como IFN- γ , as quais estimulam a atividade microbicida dos fagócitos e induzem a produção de anticorpos opsonizantes e fixadores de complemento pelas células B. Por outro lado, as células Th2 secretam citocinas anti-inflamatórias, como a IL-13, as quais inibem a ativação de macrófagos e reações mediadas por células Th1 (Abbas *et al.*, 2008; Paul e Seder, 1994). As citocinas produzidas em resposta a uma infecção são de importância crítica para proteção ou susceptibilidade a doenças, pois desempenham importantes funções na regulação da resposta imune. Alterações nos níveis de produção destas moléculas podem contribuir para o início e/ou agravamento de doenças de etiologias diversas (Infante-Duarte e Kamradt, 1999).

Uma característica central na infecção por *T. gondii* é a indução de uma forte resposta imune Th1, marcada pela produção IFN- γ , dentre outras citocinas pró-inflamatórias (Munoz *et al.* 2011). Essa resposta imune pró-inflamatória é contrabalanceada pela ação de citocinas anti-inflamatórias do padrão Th2, as quais controlam a produção do IFN- γ (Munoz *et al.* 2011). No contexto da toxoplasmose ocular, a resposta imune local desenvolvida contra *T. gondii* torna-se bastante complexa, pois o ambiente ocular é um sítio imunoprivilegiado, porém, a polarização da resposta para o perfil Th1 é requerida para controle do número de parasitas. Assim sendo, o padrão pró-inflamatório Th1 pode comprometer o privilégio imune e causar danos teciduais (Lyons *et al.*, 2001). A quimiocina CXCL10, produzida em resposta ao estímulo de células por IFN- γ também pode ter importante papel nas respostas imunes intraoculares, uma vez que são quimioatraente para células T ativadas, principalmente do perfil Th1 (Dufour *et al.* 2002). O papel da IL-13 no controle da resposta inflamatória intraocular já foi mostrada por Lemaitre (2001). Foi demonstrado, em modelo experimental de uveíte induzida por endotoxina, que IL-13 modula a inflamação intraocular promovendo decréscimo de moléculas pró-inflamatórias do padrão Th1 (Lemaitre, 2001). O melhor entendimento do balanço entre as respostas Th1 e Th2 pode contribuir para a mais perfeita compreensão da patogenia da toxoplasmose ocular.

A análise de polimorfismos em genes que codificam citocinas e quimiocinas, bem como a dosagem da produção de moléculas de padrões antagônicos de resposta, como IFN- γ e IL-13, poderão contribuir para a produção de conhecimento relacionada à susceptibilidade de manifestações oculares da toxoplasmose. O estudo combinado de parâmetros imunológicos e genéticos poderá elucidar aspectos relevantes associados com a manifestação e/ou agravamento da retinocoroidite toxoplásmica, o que certamente auxiliará na elaboração de estratégias de intervenções imunológicas que possam favorecer o manejo clínico da doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório e um dos protozoários parasitas mais bem sucedidos, com ampla distribuição geográfica e alta prevalência sorológica mundial. Estima-se que um terço da população mundial esteja cronicamente infectada por *T. gondii* (Tenter *et al.*, 2000). Em Campos dos Goytacazes-RJ, 57,2% de uma amostragem populacional de 1436 indivíduos apresenta sorologia positiva para *T. gondii*. Na população de baixo poder aquisitivo, que recebe pouca atenção médica e sanitária, o nível de prevalência desta infecção atinge 84,8% (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

Na Europa e América do Norte, a infecção por *T. gondii* está relacionada, principalmente, a três linhagens genéticas classificadas como tipo I, tipo II e tipo III, as quais apresentam, experimentalmente, virulência e capacidade de formação de cistos diferentes (Howe e Sibley, 1995). A linhagem do tipo I é a mais virulenta em modelo murino e camundongos infectados com esta linhagem não desenvolvem infecção crônica. Por esse motivo, tem-se especulado que tal linhagem não produza oocistos (Johnson, 1997). Já as cepas dos tipos II e III são menos virulentas, com maior tendência a diferenciação em bradizoítos, encistamento nos tecidos e estabelecimento da infecção crônica (Grigg *et al.*, 2001). Nestas regiões, as linhagens do tipo I, II e III são encontradas em mais de 95% dos isolados e devido a esta pequena variabilidade genética, o parasita foi previamente considerado clonal, sendo que isolados não-clonais eram considerados atípicos (Howe e Sibley, 1995). Porém, estudos mais recentes com parasitas isolados de humanos e animais em outras regiões geográficas têm mostrado variabilidade genética bem superior à descrita anteriormente. Pena e colaboradores (2008) mostraram que, em 125 isolados de gatos, galinhas e cachorros no Brasil, 48 genótipos distintos foram identificados pela técnica PCR-RFLP. Os genótipos mais frequentes foram categorizados em grupos denominados BrI, BrII, BrIII e BrIV, os quais correspondiam a um quarto dos genótipos identificados. Nenhuma linhagem genética semelhante à linhagem do tipo II da Europa e América do Norte foi encontrada no Brasil (Pena *et al.*, 2008). Em modelo murino, a linhagem BrI é altamente virulenta, a linhagem BrIII é avirulenta e as linhagens BrII e BrIV apresentam virulência intermediária (Pena *et*

al., 2008).

O protozoário *Toxoplasma gondii* pode ser encontrado na natureza sob três formas distintas: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. O taquizoíto é a principal forma encontrada durante a fase aguda da infecção, o qual invade a célula hospedeira ativamente. A multiplicação é rápida e se dá por endodiogenia, processo pelo qual duas células filhas são originadas dentro de uma célula mãe que ao se romper origina dois organismos (Dubey *et al.*, 1977). O bradizoíto é a forma encontrada durante a fase crônica da infecção em vários tecidos, tais como retina, músculo esquelético, sistema nervoso central e coração. A multiplicação é lenta e também se dá por endodiogenia (Frenkel, 1973). Encontram-se no interior dos cistos que são formados dentro das células hospedeiras, os quais podem persistir por anos nos tecidos (Remington e Laison, 1961). O esporozoíto é a forma resultante da reprodução sexuada que ocorre no intestino dos felídeos. São organizados no interior dos oocistos, os quais são liberados nas fezes dos felídeos. Os oocistos sofrem esporulação no meio ambiente entre o 1º e 21º dia após serem eliminados com as fezes e depois de maduros contém dois esporocistos, com quatro esporozoítos cada um (Dubey *et al.*, 1970). Estes oocistos são muito estáveis e altamente infecciosos, permanecendo viáveis por até 18 meses no solo em condições adversas de pH, salinidade, umidade e temperatura, podendo contaminar água, alimentos e animais (Dubey *et al.*, 1996).

O sucesso de *T. gondii* como patógeno é atribuído à sua capacidade de invadir os mais diversos tipos de células nucleadas (Dubey e Beattie, 1988). Ao invadir a célula hospedeira o parasita permanece no interior do vacúolo parasitóforo (VP) (Nichols *et al.*, 1983). Este compartimento especializado forma-se por incorporação dos fosfolipídios da célula hospedeira, porém, as proteínas transmembranas são excluídas do vacúolo pelo parasita, o qual continua a modificar a composição do VP inserindo proteínas e lipídios provenientes de suas organelas secretoras. Tais moléculas contribuem para transformar o VP em um compartimento que não se funde com os compartimentos endocíticos e, assim, torna-se um local seguro para a replicação do parasita (Lingelbach e Joiner, 1998).

2.2 Ciclo biológico

O protozoário *Toxoplasma gondii* tem como hospedeiro definitivo o gato e outros felídeos. Nestes hospedeiros o ciclo evolutivo do parasita inclui reprodução sexuada e assexuada. Os humanos e muitos outros animais são hospedeiros intermediários, nos quais apenas o ciclo assexuado ocorre (Dubey, 1998).

Qualquer hospedeiro susceptível adquire a infecção ao entrar em contato com taquizoítos, cistos contendo bradizoítos ou oocistos contendo esporozoítos. As formas infectantes invadem várias células do organismo e formam o VP, onde se multiplicam por endodiogenia dando origem a novos taquizoítos. Após a multiplicação, *T. gondii* deixa a célula hospedeira e infecta células adjacentes. Esta fase inicial é denominada aguda e taquizoítos podem ser encontrados em diferentes tecidos, onde provocam reação inflamatória constituída essencialmente por infiltrado de células mononucleares (Gazzinelli *et al.*, 1993). A eliminação dos taquizoítos ocorre pelo desenvolvimento da imunidade do hospedeiro, levando ao desaparecimento dos parasitas livres e reduzindo a multiplicação intracelular dos mesmos. Nesta fase ocorre diminuição da sintomatologia e a formação dos cistos teciduais, o que caracteriza o início da fase crônica (Dubey, 1998). A reativação da fase aguda pode ocorrer em qualquer época e está relacionada a fatores como à diminuição da imunidade do hospedeiro, a predisposição genética e a virulência do parasita (Bhopale, 2003).

A reprodução sexuada do parasita ocorre somente nas células epiteliais do intestino delgado de gatos e outros felídeos (Tenter *et al.*, 2000). Não é conhecida a razão pela qual a reprodução sexuada só ocorre nestes animais, mas devido a este fato, os felídeos têm papel crucial na transmissão de *T. gondii*, já que eles são os únicos hospedeiros capazes de excretar em suas fezes os oocistos do parasita (Tenter *et al.*, 2000). O gato pode se infectar pela ingestão de cistos teciduais na carne de pássaros e roedores ou pela ingestão de oocistos esporulados do ambiente (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). Estas formas infectivas ao atingirem o intestino do gato penetram nas células epiteliais, onde se multiplicam assexuadamente dando origem a vários merozoítos. O conjunto dos merozoítos dentro do VP é denominado esquizonte. Com o rompimento da célula ocorre a liberação dos merozoítos

que invadem outras células e se transformam em gametócitos (microgametas e macrogametas). Após a maturação, os microgametas masculinos fecundam os macrogametas femininos formando o ovo ou zigoto, o qual é envolvido em uma rígida membrana cística e é eliminado como um oocisto não esporulado junto com as fezes do animal (Ferguson, 2009). O gato elimina oocistos por aproximadamente um mês, com o pico de produção ocorrendo entre o 5º e o 8º dias de infecção. Estes oocistos, após sofrerem esporulação no ambiente, contêm os esporozoítos e se ingeridos por gatos ou qualquer outro animal, dará origem a formas multiplicativas pelo ciclo sexuado ou assexuado (Ferguson *et al.*, 1975).

2.3 Transmissão de *Toxoplasma gondii*

A principal fonte de contaminação ambiental por *T. gondii* se dá pelos oocistos liberados juntamente com as fezes dos felídeos e a infecção de humanos e outros animais pode ocorrer pelo contato com solo, água e alimentos contaminados com estes oocistos (Jackson e Hutchison, 1989). Estudos realizados no Município de Campos dos Goytacazes mostraram associação entre a ingestão de água não tratada e a ocorrência de toxoplasmose em população de baixo poder aquisitivo, vivendo em condições precárias de saneamento básico (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Moura, Bahia-Oliveira e colaboradores (2006) mostraram também a relação entre toxoplasmose e o consumo de água contaminada com oocistos, em Santa Isabel do Ivaí/PR. Esses dados, juntamente com o relato da sobrevivência de oocistos em água salgada permanecendo esporulado por meses (Boyer *et al.*, 2005), reforçam a importância da contaminação dos reservatórios de água na epidemiologia da toxoplasmose.

O protozoário *T. gondii* pode ser transmitido também pela ingestão de cistos teciduais presentes em carne crua ou mal cozida (Weiman e Chandler, 1954). A infecção transplacentária é outra importante via de transmissão do parasita, principalmente quando a infecção é adquirida pela mãe durante a gestação (Desmonts e Couvreur, 1974). As mulheres que apresentam sorologia positiva antes da gravidez têm pouco risco de contaminar o feto, pois o parasita tende a permanecer em sua forma encistada sob controle do sistema imunológico (Remington *et al.*, 2001).

Outras formas de infecção de menor importância epidemiológica também podem ser citadas, tais como: transfusão sanguínea (Neto *et al.*, 1963), ingestão de taquizoítos em leite ou saliva contaminada (Cathie, 1954, Chiari e Neves, 1984), inalação de taquizoítos por lambedura ou perdigotos (Levi *et al.*, 1968), deposição de taquizoítos na mucosa vaginal junto com esperma (Kawazoe, 2003), acidentes de laboratório (Frenkel *et al.*, 1960) e transplante de órgãos (Remington *et al.*, 2001).

2.4 Manifestações oculares da toxoplasmose

A infecção causada por *T. gondii* geralmente é assintomática em hospedeiros imunocompetentes (Luder e Gross, 1998), sendo que, na fase aguda, podem aparecer sintomas que se confundem com os da gripe comum (McCabe *et al.*, 1987). Entretanto, este parasita é capaz de causar infecção disseminada em fetos em desenvolvimento (Desmont e Couvreur, 1974), severas complicações neurológicas em indivíduos imunocomprometidos ou imunossuprimidos (Luft *et al.*, 1993) e patologias oculares graves em indivíduos saudáveis (Roberts e McLeod, 1999).

Quando há doença ocular, a retina é o sítio primário de infecção por *T. gondii*, porém, com o curso da lesão, pode ocorrer o comprometimento secundário da coroide, levando a quadros de retinocoroidite com diferentes graus de severidade (Nussenblatt e Belfort, 1994). O parasita atinge o olho por meio da circulação sanguínea, na condição de parasitas livres e também dentro de leucócitos circulantes, ou pelo nervo óptico, a partir de focos infecciosos intracranianos (Mets *et al.*, 1996). Dados experimentais sugerem que uma das formas do parasita evadir o sistema imune e chegar ao olho é por meio da modulação de moléculas de adesão de macrófagos infectados (Da Gama *et al.*, 2004). Uma vez infectados em áreas de entrada do parasita no organismo, como mucosa intestinal, os macrófagos sofrem alteração na sua fisiologia, capaz de fazer com que eles se difundam pelos tecidos sem o comprometimento da sua viabilidade, o que exporia o parasita ao sistema imune do hospedeiro. Dessa forma, o protozoário *T. gondii* seria carregado para sítios imunoprivilegiados, atravessando as barreiras teciduais naturais, protegido do sistema imune por estar dentro do leucócito do hospedeiro, que pode funcionar como “cavalo de Tróia” (Da Gama *et al.*, 2004).

A toxoplasmose é uma das principais causas de uveíte em várias partes do mundo (Holland *et al.*, 1999) e é responsável por mais de 85% dos casos de uveíte posterior no sul do Brasil (Silveira *et al.*, 1988; Melamed, 2009). Nos Estados Unidos, a prevalência da doença ocular é de 2% para a população soropositiva (Holland, 2003) e em Erechim, sul do Brasil, 17,7% (Glasner *et al.*, 1992). Em Campos dos Goytacazes, Bahia-Oliveira e colaboradores (2012) mostraram que a prevalência de doença ocular pode atingir 30% da população soropositiva.

Manifestações oculares da toxoplasmose podem resultar de infecção congênita ou adquirida após o nascimento (Montoya e Remington, 1996). A forma ocular da toxoplasmose congênita pode ser subdividida em: forma neonatal, quando a lesão está presente ao nascimento; forma de aparição tardia, que ocorre em qualquer época da vida, principalmente entre a 2ª e 3ª décadas de vida. Nunca se deve subestimar a toxoplasmose congênita sem lesões oculares, pois cistos teciduais contendo parasitas podem estar quiescentes nas células retinianas e alterações imunológicas podem provocar o rompimento destes cistos, levando a quadros de toxoplasmose ocular (Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005). Já a toxoplasmose ocular adquirida após o nascimento pode ser subdividida em: concomitante, quando ocorre junto com a doença sistêmica; tardia, quando há um intervalo variável de tempo entre as doenças sistêmica e ocular (Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005).

Existem graves problemas visuais associados à toxoplasmose como, formação secundária de catarata, glaucoma e vasculite retiniana (Garweg, 2005). Caso o parasita atinja a mácula, região da retina responsável pela visão de maior precisão, os prejuízos são ainda maiores, podendo levar à cegueira (Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005). Relatos da literatura sugerem que a localização da lesão não ocorre como um evento randômico. Mets e colaboradores (1996) mostraram que 58%, de uma amostragem de 89 recém-nascidos com retinocoroidite toxoplásmica congênita, tinham lesões maculares. Considerando que a mácula compõe apenas 5% da área total da retina, sugere-se que a presença de lesão nesta região não seja aleatória. Outros autores mostraram também a desproporcionalidade da frequência de lesões na mácula (Dodds *et al.*, 2008; Friedmann, 1969). A infecção congênita, em estágios recentes de desenvolvimento da retina, pode favorecer o envolvimento

macular devido à possibilidade da vascularização da retina periférica estar ainda incompleta (Holland, 2009). Diferenças histológicas entre mácula e retina periférica pode também influenciar na predominância de lesões maculares, até mesmo nos casos de infecção pós-natal. Um estudo feito com olhos de indivíduos pós-morte mostrou que macrófagos, os quais participam da defesa contra infecção por *T. gondii*, foram encontrados significativamente em menor número na mácula do que na retina posterior (Yang *et al.*, 2000).

Os motivos pelos quais algumas pessoas desenvolvem a doença ocular, enquanto outras permanecem assintomáticas não estão completamente elucidados. A idade, *background* genético e o estado imunológico do hospedeiro, genótipo do protozoário, número de parasitas e via de infecção podem explicar algumas destas diferenças (Holland, 2004). Estudo desenvolvido no Brasil mostrou que a idade elevada foi maior fator de risco para a doença ocular entre indivíduos infectados com *T. gondii* (Portela *et al.*, 2004), tendo sido a prevalência de toxoplasmose ocular significativamente mais alta em indivíduos com mais de 50 anos. Dados na literatura sugerem que indivíduos mais velhos, de fato, têm um risco maior de envolvimento ocular, seguido de infecção recentemente adquirida do que indivíduos jovens. Bosch-Driessen e colaboradores (2002) observaram que nos indivíduos com média de idade de 29,9 anos, a toxoplasmose ocular foi primeiramente vista quando esses indivíduos tinham evidência sorológica de infecção adquirida remotamente. Já os indivíduos com média de idade de 50,6 anos a toxoplasmose ocular foi primeiramente detectada quando eles tiveram evidência sorológica de infecção recente. Esses dados sugerem que, em se tratando de uma primo-infecção pós-natal, indivíduos mais velhos estão sob maior risco de envolvimento ocular, do que indivíduos jovens (Bosch-Driessen *et al.*, 2002). Além disso, tem sido mostrado que em indivíduos mais velhos a doença ocular é mais severa (Holland 2004, 2009, Dodds *et al.*, 2008).

2.5 Classificação das lesões oculares toxoplásmicas

As cicatrizes de retinocoroidite toxoplásmica carecem de uma classificação que considere a diversidade de manifestações clínicas. O critério adotado por estudos epidemiológicos tem sido subjetivo categorizando-as, frequentemente, em termos da probabilidade de serem causadas pela

manifestação ocular da toxoplasmose (Glasner *et al.*, 1992, Bahia-Oliveira *et al.*, 2001). No entanto, esforços vêm sendo feitos por parte de grupos de pesquisas para classificar tais cicatrizes (Glasner *et al.*, 1992, Aleixo *et al.*, 2009, Bahia-Oliveira *et al.*, 2009, Bahia-Oliveira *et al.*, 2012, Dutra *et al.*, 2013). Nesse estudo foi utilizada a classificação proposta por Bahia-Oliveira e colaboradores (2009, 2012) que reflete o estado de destruição da retina. Lesões cicatrizadas da retina apresentando alto, médio ou baixo grau de severidade, foram classificadas como tipo A, B ou C, respectivamente (Figura 1).

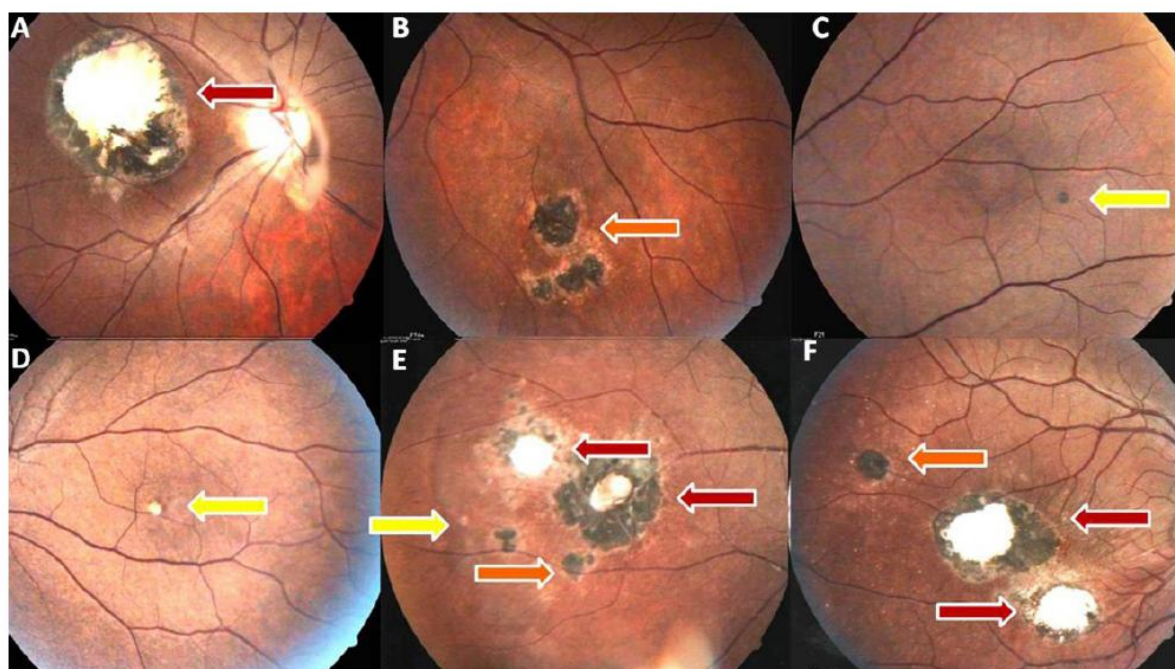


Figura 1: Classificação das lesões oculares decorrentes da infecção por *Toxoplasma gondii*. **A:** Cicatrizes de lesão tipo A (seta vermelha); **B:** Cicatrizes de lesão tipo B (seta laranja); **C e D:** Cicatrizes de lesão tipo C (seta amarela); **E e F:** Cicatrizes de lesões múltiplas. Fonte: Bahia-Oliveira *et al.*, 2012.

As lesões cicatrizadas do tipo A apresentam limites bem marcados, usualmente circundadas por um halo pigmentado e com uma área central clara, a qual representa uma área de atrofia coriorretiniana, permitindo a visualização da esclera. O halo pigmentado pode ser explicado pela rápida proliferação do epitélio pigmentar da retina mobilizando-se para recompor o tecido danificado, o que pode causar hiperpigmentação (Figura 1A). As lesões cicatrizadas do tipo B são caracterizadas por uma área central tipicamente hiperpigmentada

circundada por um halo hipopigmentado. Nesse caso, a reação inflamatória é provavelmente de menor intensidade e o reparo tecidual parece ser mais eficaz que na lesão tipo A (Figura 1B). As lesões cicatrizadas do tipo C possuem aspecto morfológico inespecífico, podendo apresentar-se pigmentadas e/ou atróficas, sendo os danos causados ao tecido retiniano menos severos que os causados pelas lesões A e B (Figura 1C e 1D). Os indivíduos afetados pela toxoplasmose ocular podem apresentar cicatrizes de um único tipo de lesão (Figura 1A-D) ou cicatrizes de lesões com múltiplos graus de severidade (Figura 1E e 1F).

2.6 Resposta imune ao protozoário *Toxoplasma gondii*

A resposta imune do hospedeiro à infecção por *T. gondii* pode variar muito entre os indivíduos e parece depender fortemente do *background* genético e do estado imunológico do hospedeiro (Munoz *et al.*, 2011). Uma característica central na infecção por *T. gondii* é a indução de uma forte resposta imune Th1, marcada pela produção IFN- γ dentre outras citocinas pró-inflamatórias (Munoz *et al.* 2011). Essa resposta imune pró-inflamatória é contrabalanceada pela ação de citocinas anti-inflamatórias do padrão Th2 induzidas simultaneamente pelo parasita, as quais controlam a produção do IFN- γ (Munoz *et al.*, 2011). A ação combinada destas citocinas protege o hospedeiro da rápida proliferação do parasita e de alterações patológicas decorrentes da resposta imune (Montoya e Liesenfeld, 2004).

2.6.1 Citocinas IFN- γ e IL-13 e o balanço Th1/Th2

A hipótese Th1/Th2 emergiu no final de 1980, decorrentes de observações, em modelo murino, de subtipos de células T CD4⁺ ou *T helper* que apresentavam padrões de secreção de citocinas distintos (Kidd, 2003). As células *T helper* (Th) podem se diferenciar, basicamente, em dois subconjuntos de células (Th1 ou Th2) que produzem conjuntos diferentes citocinas e, portanto, desempenham funções efetoras distintas (Mosmann *et al.*, 1986). Sabe-se, atualmente, que existem outros subconjuntos celulares, com padrão heterogêneo de produção de citocinas, entretanto, as respostas imunológicas são frequentemente dominadas por uma das duas populações, Th1 ou Th2 e as proporções relativas dessas subpopulações durante a resposta imune são

os principais determinantes para o desfecho de uma infecção (Infante-Duarte e Kamradt, 1999).

As células Th1 apresentam um perfil pró-inflamatório e produzem citocinas como IFN- γ , IL-2, TNF- α , as quais estimulam a atividade microbicida dos fagócitos e induzem a produção de anticorpos opsonizantes e fixadores de complemento pelas células B. Por outro lado, as células Th2 secretam as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, as quais estimulam a produção de anticorpos da classe IgE, favorecem ativação de eosinófilos e mastócitos e inibem a ativação de macrófagos e reações mediadas por células Th1 (Mosmann *et al.*, 1986, Abbas *et al.*, 2008; Paul e Seder, 1994).

As citocinas produzidas por células *T helper* são de importância crítica para proteção ou manifestação de doenças, pois desempenham importantes funções na regulação da resposta imune. Alterações nos níveis de produção destas moléculas podem contribuir para o início e/ou agravamento de doenças de etiologias diversas (Infante-Duarte e Kamradt, 1999). Um balanço entre as respostas Th1 e Th2 é necessário para erradicar eficazmente um patógeno: geralmente o padrão de resposta inicialmente necessário para eliminar o parasita pode causar dano se a resposta for muito intensa. Por isso precisa ser devidamente regulado pelo padrão de resposta oposto, garantindo tanto a eliminação do agente infeccioso quanto o equilíbrio da resposta imune, evitando, dessa forma, possíveis mecanismos de autoagressão (Infante-Duarte e Kamradt, 1999).

O IFN- γ é a principal citocina do subgrupo Th1 das células T CD4+, mas também é produzido por células T CD8+ e células NK (Commins *et al.*, 2010). Há evidências de que ainda outras células, tais como células B, células NKT e células apresentadoras de antígenos produzam IFN- γ (Carnaud *et al.*, 1999, Harris *et al.*, 2000, Frucht *et al.*, 2001). O IFN- γ medeia o aumento da expressão de moléculas de MHC de classe I e II, estimula a apresentação de antígenos e a produção de citocinas por células apresentadoras de antígenos. Acentua, ainda, a função microbicida de fagócitos mediante estímulo da síntese de intermediários reativos de oxigênio e produção óxido nítrico, resultando em reações inflamatórias ricas em macrófagos ativados no sítio da infecção, capazes de matar patógenos intracelulares. Além disso, o IFN- γ estimula atividade de células NK e neutrófilos e inibe a proliferação de células do padrão

de resposta Th2 (Abbas *et al.*, 2008; Commins *et al.*, 2010). O IFN- γ estimula ainda a produção de CXCL10, uma importante quimiocina relacionada ao recrutamento de células do padrão Th1 de resposta imune para sítios de infecção (Khan *et al.*, 2000).

Relatos da literatura têm sugerido que há um decréscimo na produção do IFN- γ durante o processo de envelhecimento do sistema imune (imunossenescência). Segundo Rink e colaboradores (1998), durante o envelhecimento, há queda na produção das citocinas IL-2, IL-12, IFN- α , além do IFN- γ , comprometendo a resposta imune adaptativa e possibilitando o aparecimento de doenças relacionadas à idade, em humanos. Diminuição na produção de IL-2, IL-12, IFN- γ por células T CD4⁺ foi descrita por Torres e colaboradores (2011). Pawelec e colaboradores (1998) relataram que há um déficit na produção de IFN- γ associado à idade, por células NK de camundongos e de humanos, que secundariamente pode levar a disfunções de macrófagos. Borrego e colaboradores (1999) também mostraram que células NK de idosos tiveram produção reduzida de IFN- γ . Krishnaraj e Bhooma (1996) mostraram que a produção, *in vitro*, de IFN- γ induzida por IL-2 recombinante foi diminuída em células NK de indivíduos mais velhos. Foi visto, tanto em modelo experimental quanto em humanos, que há menor produção de IFN- γ por células NKT de indivíduos mais velhos (Mocchegiani e Malavolta 2004). Após estímulo com o mitógeno concanavalina A, esplenócitos de camundongos mais velhos também apresentaram decréscimo na produção de IFN- γ quando comparados a camundongos jovens (Sharma *et al.*, 2013). Abb e colaboradores (1984) também demonstraram declínio na secreção, *in vitro*, de IFN- γ e IFN- α por células mononucleares do sangue periférico de indivíduos mais velhos quando comparadas às células de indivíduos mais jovens, sugerindo que essa deficiência possa estar envolvida na susceptibilidade dos idosos a infecções virais e doenças malignas.

A IL-13 é produzida principalmente por células T CD4⁺ do subgrupo Th2, mas outros tipos de células, incluindo células T CD8⁺ e células NKT, podem produzir esta molécula. Outras fontes celulares desta citocina incluem basófilos, eosinófilos e células NK (Abbas *et al.*, 2008, Hoshino *et al.*, 1999). IL-13 tem como características funcionais o estímulo à troca de classe da cadeia

pesada das imunoglobulinas para o isotipo IgE, ativação de mastócitos e eosinófilos, inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias do padrão Th1, estímulo a secreção de muco e estímulo da produção de colágeno por macrófagos e fibroblastos, levando a fibrose (Abbas *et al.*, 2008; Wynn, 2003). Exerce um papel dominante na resistência a nematódeos gastrointestinais e por regular a imunidade mediada por células do padrão Th1, modula a resistência a organismos intracelulares (Wynn, 2003).

Poucos trabalhos na literatura relatam a influência da idade sobre a produção de IL-13. Sugawara e colaboradores (2011), após inoculação de camundongos com larvas do helminto *Heligmosomoides polygyrus*, observaram aumento na expressão dos genes de IL-4 e IL-13, porém em camundongos mais velhos esta expressão foi significativamente menor do que em jovens. Foi também mostrado que quando camundongos de diferentes idades foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina, a produção de IL-4 aumentou, mas a de IL-5 e IL-13 diminuiu com a idade (Kang *et al.*, 2013).

2.6.2 Resposta imune sistêmica contra *Toxoplasma gondii*

A infecção de indivíduos imunocompetentes resulta em uma cascata de eventos que levam ao desenvolvimento integrado da resposta imune inata e adaptativa (Wynn, 2003). Esta resposta é complexa e envolve várias células e fatores solúveis que têm a função de controlar a replicação do parasita. Os mecanismos efetores pró-inflamatórios, por sua vez, devem ser devidamente contrabalanceados por mecanismos anti-inflamatórios (Munoz *et al.*, 2011).

Os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e granulócitos (basófilos e eosinófilos) são as primeiras células fagocíticas recrutadas ao sítio da infecção (Munoz *et al.*, 2011). Foi observado *in vitro* que, quando estimulados com antígenos de *T. gondii*, os leucócitos polimorfonucleares liberam rapidamente IL-12 e IFN- γ , sugerindo que estas células estejam envolvidas na produção de citocinas no início do processo infeccioso, podendo exercer importante papel no estabelecimento inicial de uma rede de citocinas induzidas pela infecção por *T. gondii* (Bliss *et al.*, 1999). A depleção dos leucócitos polimorfonucleares resultou em uma resposta imune desregulada com aumento da susceptibilidade a *T. gondii*. Contudo, a remoção de neutrófilos em estágio tardio de infecção não interferiu na susceptibilidade a *T. gondii*, indicando que a

principal função desta célula está associada à resposta inicial ao parasita (Munoz *et al.*, 2011).

As células dendríticas são a principal fonte de IL-12 em resposta a infecção por *T. gondii*. Foi mostrado que o parasita *T. gondii* pode induzir a produção *in vitro* de IL-12 por estas células e também por macrófagos, e neutrófilos (Denkers, 2003). A citocina IL-12 promove a ativação de linfócitos T CD8+, aumentando a sua citotoxicidade e estimulando a produção de IFN- γ . Além disso, IL-12 tem a importante função de induzir a diferenciação de linfócitos T naive em linfócitos T CD4+ do subgrupo Th1, os quais são produtores de IFN- γ . A depleção de células dendríticas, em modelo murino, suprimiu a produção de IL-12 e aumentou a susceptibilidade ao parasita. Além disso, a transferência de células dendríticas de camundongos selvagens para camundongos depletados, previamente à infecção, restaurou a produção de IL-12 e IFN- γ , o que aumentou a resistência à infecção (Munoz *et al.*, 2011). As células dendríticas têm ainda função crucial na disseminação sistêmica do parasita dentro do hospedeiro (Lambert *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* com células humanas e murinas revelaram que a invasão de células dendríticas por *T. gondii* induz uma hiper-motilidade nestas células, capacitando a transmigração das células infectadas através do endotélio na ausência de estímulos quimiotáticos. Foi visto também que a transferência adotiva de células dendríticas infectadas pelo parasita resultou na disseminação mais rápida do parasita para órgãos distantes do que a inoculação de parasitas livres. Estes dados mostram que o parasita *T. gondii* é capaz de subverter e explorar uma via natural de migração celular do hospedeiro para disseminação do parasita (Lambert *et al.*, 2006).

O estímulo de macrófagos por *T. gondii* induz a produção de TNF- α e IL-12, os quais agem sinergicamente estimulando células NK a secretarem IFN- γ , que por sua vez intensifica a ativação de macrófagos infectados (Denkers e Sher, 1997) e ativam macrófagos não infectados por estímulo do seu metabolismo oxidativo. O reconhecimento de moléculas de *T. gondii* por receptores da família TLR (*Toll-Like Receptors*) promove a ativação de macrófagos, além de células dendríticas e neutrófilos, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1 β e TNF- α . Esses receptores exercem papel crítico na imunidade inata de mamíferos, pois ativam uma

casca de transdução de sinais que induzem a expressão de genes da resposta imune após o reconhecimento de seus respectivos ligantes (Medzhitov, 2001). Os membros da família TLR possuem como principal ligante, a proteína adaptadora citoplasmática MyD88. A deficiência da proteína MyD88 em camundongos geneticamente modificados está associada à baixa produção de IL-12 e à multiplicação parasitária descontrolada resultando em alta susceptibilidade à infecção por *T. gondii* (Scanga *et al.*, 2002). Os macrófagos também já foram descritos como importantes disseminadores do parasita para sítios imunoprivilegiados (Da Gama *et al.*, 2004).

As células NK são as principais produtoras do IFN- γ na infecção recente (Munoz *et al.*, 2011). A produção de IFN- γ é de extrema importância na resistência à infecção aguda por *Toxoplasma* e camundongos nocautes para IFN- γ não sobrevivem à infecção (Sharton-Kersten *et al.*, 1996). Durante a fase crônica da infecção, a depleção desta citocina mediada por anticorpos mostrou que a produção contínua de IFN- γ é necessária para a sobrevivência por longo prazo (Gazzinelli *et al.*, 1992). Portanto, IFN- γ é o principal mediador da proteção contra *T. gondii*, sendo sua produção dependente de IL-12, com importante papel de IL-2 e TNF- α como cofatores (Khan *et al.*, 1994, Hunter *et al.*, 1994, 1995, Gazzinelli *et al.*, 1994). Pfefferkorn e Guyre (1984) mostraram que o IFN- γ bloqueia o crescimento do *T. gondii* pela indução da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que leva a degradação, pelas células hospedeiras, do triptofano, aminoácido indispensável para uma variedade de processos metabólicos do parasita. Interações entre células dendríticas e células NK aumentam a produção de IFN- γ por células NK, bem como a produção de IL-12 por células dendríticas. Esta interação é mediada via receptor NKG2D das células NK que interage com ligantes na superfície das células dendríticas (Munoz *et al.*, 2011). Foi mostrado que camundongos SCID, portadores de imunodeficiência severa, com ausência de linfócitos T e B apresentaram resistência a *T. gondii* devido à produção de IFN- γ por células NK (Sher *et al.*, 1993). Células NK também são capazes de secretar IL-13 (Hoshino *et al.*, 1999), citocina relacionada à resposta Th2 e portanto, relacionada ao controle da resposta inflamatória Th1 (Abbas *et al.*, 2008). Além da produção de citocinas, as células NK exibem atividade citotóxica contra células-alvo. A citotoxicidade pode ser resultado da secreção de grânulos de

perforina e granzima, que são moléculas designadas para auxiliar na eliminação de células-alvo por meio de apoptose. As perforinas formam poros na membrana, permitindo a entrada das granzimas. A granzima B é uma serino-protease que cliva proteínas imediatamente após resíduos de ácido aspártico e pode ativar diretamente a cascata de caspases (Lieberman, 2003). Atividade citotóxica de NK é regulada positivamente por IL-18 e IL-15 produzidas por macrófagos e células dendríticas (Munoz *et al.*, 2011).

Os linfócitos T $\gamma\delta$ são encontrados em alto número dispersos pelo tecido epitelial, sendo esta localização ideal para a atuação destas células como arma da primeira linha de defesa contra infecções (Munoz *et al.*, 2011). Foi visto que camundongos infectados por *T. gondii* aumentaram o número de células T $\gamma\delta$ e a depleção destas células resultou na redução da produção de óxido nítrico (Munoz *et al.*, 2011). O óxido nítrico não somente mata diretamente o parasita, mas também promove a transformação de taquizoítos em bradizoítos pela inibição da respiração mitocondrial (Bohne *et al.*, 1994). Foi demonstrado que linfócitos T $\gamma\delta$ são expandidos e ativados *in vitro* quando cultivados com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) que internalizaram parasitas mortos. Estes linfócitos desenvolveram atividade citotóxica contra as células infectadas por *T. gondii*, por via independente de MHC, e produziram as citocinas IFN- γ , IL-12 e TNF- α , sugerindo que esta subpopulação possa ser importante no início da resposta imune protetora contra *T. gondii* (Subauste *et al.*, 1995).

Tanto os linfócitos T CD4⁺ quanto os linfócitos T CD8⁺ são cruciais para a sobrevivência do hospedeiro, por longo prazo, à infecção por *T. gondii* (Munoz *et al.*, 2011). Camundongos nude atímicos são extremamente susceptíveis a cepas virulentas e avirulentas de *T. gondii* (Lindberg e Frenkel, 1977). Adicionalmente, a transferência adotiva de células T imunes, principalmente a subpopulação de linfócitos T CD8⁺, é capaz de proteger camundongos desafiados com cepas virulentas do *T. gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1991). A geração de populações celulares específicas T CD4⁺ e T CD8⁺ contribui para defesa do hospedeiro através da produção de IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-6 e IL-1. As células T CD4⁺ têm como principal função a regulação da resposta imune a *T. gondii*, enquanto que as células T CD8⁺ são mais importantes pela função efetora contra o parasita

(Munoz *et al.*, 2011). Estas células desempenham atividade citotóxica sobre as células infectadas, por mecanismos citotóxicos similares aos apresentados por células NK (Alexander e Hunter, 1998). A participação de células T CD4⁺ foi demonstrada ser também de grande importância, visto que camundongos cronicamente infectados por *T. gondii* apresentaram danos no sistema nervoso central, que acarretaram em morte, quando tiveram suas células T CD4⁺ depletadas (Vollmer *et al.*, 1987). Segundo Gazzinelli e colaboradores (1992) o controle completo da toxoplasmose crônica é resultante da ação sinérgica de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, células NK e da síntese de IFN- γ (Gazzinelli *et al.* 1992). Em modelos experimentais, *T. gondii* mostrou ser potente indutor da expressão da quimiocina CXCL10, relacionada à migração de células T (Brenier-Pinchart *et al.*, 2001). Este dado foi confirmado por Khan e colaboradores (2000), os quais mostraram que o desafio oral de camundongos com cistos de *T. gondii*, induziu o aumento nos níveis de RNAm para CXCL10. Foi visto ainda que a neutralização desta quimiocina em camundongos infectados inibiu o influxo de células T para os tecidos, além de prejudicar as funções efetoras destas células, resultando em um aumento da carga parasitária e mortalidade (Khan *et al.*, 2000). Esses achados sugerem uma função adicional para o IFN- γ na defesa do hospedeiro a *T. gondii*, uma vez que a produção de CXCL10 é induzida por esta citocina (Khan *et al.*, 2000).

Os linfócitos B secretam anticorpos específicos de diferentes isotipos, como IgM, IgG e IgA contra *T. gondii*. Assim, taquizoítos extracelulares podem ser destruídos por mecanismos dependentes de anticorpos. Durante a fase aguda da infecção ocorre predomínio de anticorpos IgM, assim como de anticorpos IgG durante a fase crônica (Couto *et al.*, 2006). Após inoculação intraperitoneal com *T. gondii*, camundongos IgM^{-/-} exibiram significativamente menos parasitas no peritônio do que camundongos tipo selvagem, o que estava correlacionado com o aumento da disseminação de taquizoítos para o fígado, pulmão e baço em camundongos IgM^{-/-} (Couper *et al.*, 2005). A produção do isotipo IgA tem sido encontrada precocemente sobre superfícies de mucosa, sugerindo atividade protetora desta imunoglobulina contra reinfecções do hospedeiro (Mineo *et al.*, 1993). A incubação de taquizoítos com IgA purificada de indivíduos infectados reduziu em 50 a 75% a infecção de enterócitos *in vitro* (Munoz *et al.*, 2011). Além da função de secretar anticorpos,

os linfócitos B estão envolvidos em outras funções imunes, como apresentação de antígenos a linfócitos T e produção de citocinas (Abbas *et al.*, 2008). Harris e colaboradores (2000) mostraram células B de camundongos produzindo IFN- γ em resposta a infecção por *T. gondii*.

Os mecanismos acima mencionados refletem uma variedade de respostas pró-inflamatórias evocadas pela infecção por *T. gondii*, porém, mecanismos contrarreguladores são simultaneamente induzidos pelo parasita. *T. gondii* desencadeia a produção de citocinas anti-inflamatórias incluindo IL-10 e TGF- β que inibe a produção de IFN- γ e prejudica a ativação de macrófagos. IL-10 e TGF- β também inibem a atividade de células NK e produção de IFN- γ por este tipo celular (Munoz *et al.*, 2011). Além disso, camundongos nocautes para IL-10 tiveram mortalidade aumentada durante fase aguda da infecção, confirmando a importância da indução simultânea de citocinas reguladoras durante a infecção com *T. gondii* (Munoz *et al.*, 2011).

Conclui-se, portanto, que grande variedade de citocinas é produzida em consequência da resposta imune do hospedeiro contra *T. gondii*. Estas citocinas podem atuar no curso da infecção controlando tanto o crescimento dos parasitas, quanto a magnitude da resposta imune contra o mesmo, sendo que a resposta imune contra os parasitas pode se tornar lesiva para o hospedeiro gerando processos de autoagressão caso ela não seja devidamente balanceada.

2.6.3 Resposta imune intraocular contra *Toxoplasma gondii*

O olho é um ambiente imunoprivilegiado sendo a resposta imune intraocular suprimida para prevenir a destruição tecidual (Vincent e Peek, 2001). Inúmeros fatores contribuem para esse privilégio imune, incluindo barreiras anatômicas (Barragan e Sibley, 2003). Em circunstâncias normais, células presentes em várias estruturas do olho, como córnea, íris, corpos ciliares, retina, além de células T e macrófagos, expressam constitutivamente ligante de Fas (Fas-L), o qual pode promover a deleção de células T e células NK presentes no ambiente intraocular, por estas expressarem Fas quando ativadas, induzindo morte por apoptose. Além disso, foi mostrado que o fluido intraocular contém citocinas como TGF- β e outros mediadores que têm propriedades imunossupressoras. O TGF- β induz a regulação negativa de

moléculas de MHC classe I e, portanto, respostas imunes citotóxicas intraoculares são mediadas, preferencialmente, por células NK em detrimento de células T CD8⁺ citotóxicas, as quais dependem de MHC-I para serem ativadas (Abbas *et al.*, 2008). Níveis menores de TGF- β foram encontrados em fluidos oculares de indivíduos portadores de uveítes (De Boer *et al.*, 1994). Lemaitre (2001) mostrou, em modelo experimental de uveíte induzida por endotoxina, que a IL-13 também é uma importante citocina moduladora da inflamação intraocular, promovendo decréscimo de moléculas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 e MIP-2 no corpo ciliar, íris e retina (Lemaitre, 2001).

O parasita *Toxoplasma gondii*, por sua vez, pode promover a produção de fatores que anulem ou comprometam este privilégio imune, como o IFN- γ . Esta citocina é um antagonista potente de TGF- β e pode regular positivamente a expressão de moléculas de MHC em células do sítio imunoprivilegiado (Hooks *et al.*, 1988, Roberts e McLeod, 1999). Percebe-se, portanto, que a resposta imunológica desenvolvida contra *T. gondii* no olho, é bastante complexa, devido aos vários mecanismos requeridos para controle do número de parasitas poderem também influenciar no privilégio imune e causar danos teciduais (Lyons *et al.*, 2001). Sendo assim, o dano no tecido ocular pode resultar tanto da multiplicação do parasita quanto da resposta imunológica.

2.7 Genética e susceptibilidade a infecções parasitárias

As doenças infecciosas são uma das principais causas de morbidade e mortalidade, exercendo uma grande pressão seletiva sobre a população (Burgner *et al.*, 2006). A base para diferenças na susceptibilidade às doenças observadas na população humana é, pelo menos em parte, geneticamente determinada (Kinane *et al.*, 2003, Dutra *et al.*, 2009). Genes envolvidos na resposta imune são os mais numerosos e diversificados do genoma humano e após a exposição a um agente infeccioso há uma enorme variação individual das consequências desta infecção. Esta susceptibilidade diferencial mostra a diversidade genética de genes relacionados à resposta imune (Burgner *et al.* 2006).

Polimorfismos genéticos são definidos pela presença de dois ou mais alelos para um determinado gene em consequência de alterações na

sequência de nucleotídeos, tal que o alelo mais frequente não ultrapassa a frequência de 99% na população (Futuyma, 1992). A forma mais comum de polimorfismo é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), caracterizada por uma alteração em um único par de bases no DNA (Nielsen 2004).

O polimorfismo genético em genes que codificam citocinas tem importante papel na susceptibilidade às infecções, uma vez que pode ter efeito no nível de produção destas moléculas, na ligação de citocinas a seus ligantes, e na expressão de proteínas modificadas (Dutra et al. 2009). As citocinas podem modular positivamente ou negativamente a divisão, crescimento, diferenciação, migração e morte celular, bem como a produção de outras citocinas e diversos produtos celulares. Uma rede de citocinas funcional é um elemento central na homeostase da resposta imune e sua alteração pode conduzir ao desenvolvimento de uma resposta imune anormal (Henaó *et al.*, 2006).

O parasita *Toxoplasma gondii* geralmente provoca uma infecção crônica assintomática em seus hospedeiros (Luder e Gross, 1998). Em alguns indivíduos, no entanto, os mesmos parasitas podem causar doença ocular grave (Roberts e McLeod, 1999). Por isso, há um grande interesse em tentar identificar os fatores que causam o desenvolvimento da doença em apenas uma fração da população que está exposta aos parasitas. As citocinas IFN- γ e IL-13, bem como a quimiocina CXCL10, são importantes no contexto da toxoplasmose. Portanto, análises de associação entre manifestação clínica da toxoplasmose ocular e polimorfismos em genes que codificam tais moléculas são pertinentes.

O gene *IFNG* está localizado no cromossomo 12, região 12q14, contém quatro exons e três introns, com um total de 5,4 Kb (Schrijver *et al.*, 2004). Este gene codifica a proteína IFN- γ que contém 166 aminoácidos, incluindo uma sequência sinal de 23 aminoácidos (Gray *et al.*, 1982) e está relacionada ao padrão Th1 de resposta imune (Abbas *et al.*, 2008). Os receptores para IFN- γ são codificados pelos genes *IFNGR1* e *IFNGR2*, os quais estão localizados nos cromossomos 6 e 21, regiões 6q23 e 21q22, respectivamente (Schrijver *et al.*, 2004).

O gene *IL13* está localizado no cromossomo 5, região 5q31 e encontra-se organizado em quatro exons e três introns, perfazendo um total de 3 kb

(Minty *et al.*, 1993). O seu produto é a citocina IL-13, uma proteína de 146 aminoácidos e de massa molecular relativa de 10 kDa (McKenzie *et al.*, 1993) relacionada ao padrão Th2 de resposta imune (Abbas *et al.*, 2008). Os produtos gênicos do *IL13* interagem com a cadeia α do receptor de IL-4 (Pritchard *et al.*, 1991) bem como com seu receptor específico constituído pela cadeia $\alpha 1$ do receptor de IL-13 (IL-13R $\alpha 1$) associada à cadeia $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$) (Grünig *et al.*, 2003). Diferentes polimorfismos nos genes destes receptores, bem como no gene que codificam o ligante IL-13 podem interferir de um modo complexo na regulação da IL-13 e contribuir para a manifestação de um fenótipo de doença.

O gene *CXCL10* contém quatro éxons e está localizado no cromossomo 4, região 4q21. Este gene codifica a quimiocina CXCL10, uma proteína de 98 aminoácidos e 10 KDa produzida por vários tipos celulares em resposta ao estímulo por IFN- γ (Weng *et al.*, 1998). O receptor para a quimiocina CXCL10 é o CXCR3 e segundo Brück e colaboradores (2009) polimorfismos no gene *CXCL10* ou em *CXCR3*, bem como a expressão diferencial de RNAm dos respectivos genes podem exercer importante função na patogênese de doenças diversas.

Os níveis de produção de citocinas, *in vitro*, por células de indivíduos apresentando diferentes formas clínicas de uma determinada doença, têm-se mostrado vinculados à apresentação de polimorfismos nos genes que codificam para tais citocinas (Pravica *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2001; López-Maderuelo *et al.*, 2003; Henao *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2006). Portanto, o estudo de polimorfismos em genes de citocinas pode ser crucial para o melhor entendimento da patogênese e manifestação clínica da toxoplasmose ocular.

Os motivos pelos quais algumas pessoas desenvolvem a doença ocular toxoplásmica, enquanto outras permanecem assintomáticas não estão completamente elucidados. A idade, *background* genético e o estado imunológico do hospedeiro, genótipo do protozoário, número de parasitas e via de infecção podem explicar algumas destas diferenças (Holland, 2004). Nesse cenário, a natureza multifatorial da toxoplasmose ocular justifica a proposta deste estudo de investigar conjuntamente fatores genéticos e imunológicos potencialmente envolvidos na manifestação da doença ocular causada pela infecção por *T. gondii*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

A fim de contribuir para a produção de conhecimento relacionada à susceptibilidade às manifestações oculares da toxoplasmose, propôs-se, neste trabalho, investigar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *IFNG*, *IL13* e *CXCL10* e seus potenciais efeitos sobre a produção de citocinas, relacionando com a manifestação da retinocoroidite toxoplásmica em indivíduos de diferentes faixas etárias.

3.2 Objetivos específicos

- Recrutar indivíduos, de diferentes faixas etárias, distribuídos em grupos de indivíduos não infectados e infectados por *Toxoplasma gondii*, com ausência ou presença de lesão ocular;
- Selecionar SNPs nos genes de *IFNG*, *IL13* e *CXCL10* a partir da literatura científica e da base de dados *HapMap*;
- Comparar as frequências alélicas obtidas na população de Campos dos Goytacazes/RJ com as frequências alélicas da população CEU e YRI;
- Verificar se SNPs nos genes *IFNG*, *IL13* e *CXCL10* estão associados com a ocorrência e/ou severidade da toxoplasmose ocular;
- Avaliar se os níveis das citocinas IFN- γ e IL-13, produzidas por células do sangue periférico de indivíduos não infectados e infectados por *Toxoplasma gondii*, com ausência ou presença de lesão ocular, são influenciados pela idade;
- Verificar se SNPs selecionados estão associados aos níveis de produção de IFN- γ e IL-13 dentre os indivíduos com sorologia positiva para *T. gondii*, independente da presença de lesão ocular;
- Verificar se os níveis das citocinas IFN- γ e IL-13, em grupos de indivíduos soropositivos para *T. gondii* acometidos ou não por toxoplasmose ocular, são influenciados pelos genótipos dos SNPs selecionados.

4 POPULAÇÃO DE ESTUDO, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de estudo

O presente estudo foi realizado com a participação de indivíduos residentes no município de Campos dos Goytacazes/RJ. A população de estudo foi recrutada a partir de domicílios localizados em áreas previamente estudadas (n=254), do hemocentro municipal, situado no Hospital Ferreira Machado (n=447), de um asilo municipal, Asilo do Carmo (n=18) e do projeto Terceira Idade em Ação/UENF (n=46). Amostras de sangue foram coletadas por venopunção e sorologia para toxoplasmose foi determinada usando o kit comercial *ELFA VIDAS (BioMerieux)* para detecção de anticorpos IgG contra *Toxoplasma gondii*. Exame em oftalmoscópio binocular indireto (*Welch Allyn*) foi realizado nos indivíduos participantes do estudo, a fim de se identificar cicatrizes de lesões oculares decorrentes da infecção por *T. gondii*. Quando constatada a presença de tais cicatrizes era realizado o registro fotográfico por meio do retinógrafo (*Visucam – Zeiss*). Posteriormente, as imagens foram analisadas, e as cicatrizes das lesões foram classificadas de acordo com o grau de destruição da retina, como descrito por Bahia-Oliveira *et al.*, (2009), Aleixo *et al.*, (2009), Bahia-Oliveira *et al.*, (2012) e Dutra *et al.*, (2013). Por esta classificação, lesões cicatrizadas da retina apresentando alto, médio ou baixo grau de severidade, são identificadas como tipo A, B ou C, respectivamente. Neste estudo, indivíduos que apresentavam cicatrizes com múltiplos graus de severidade foram alocados no grupo correspondente ao tipo mais grave.

Um total de 765 indivíduos foi subdividido em grupos considerando-se como critérios: 1) sorologia para toxoplasmose 2) fundoscopia para verificação de cicatrizes de lesões oculares decorrentes da infecção por *T. gondii*; 3) classificação das lesões oculares; 4) faixa etária (estudo imunológico). Ocorreram perdas no número de indivíduos inicialmente recrutados devido ao não comparecimento dos mesmos quando solicitados em etapas posteriores à coleta de sangue. Por esse motivo, o número de indivíduos utilizados para as análises variou de acordo com o nível de exames exigidos em cada etapa do estudo (Quadro 1 e Quadro 2).

Quadro 1: Grupos de indivíduos envolvidos no estudo genético, segundo a sorologia para toxoplasmose e fundoscopia.

Sorologia para toxoplasmose	Fundoscopia	Estudo da Frequência Alélica	Estudo de Associação Genética
Soronegativos	SL	171	-
Soropositivos	SL ¹	271	271
	Lesão Tipo A ²	49 ⁵	49 ⁵
	Lesão Tipo B ³	36 ⁶	36 ⁶
	Lesão Tipo C ⁴	50	50
	Sem fundoscopia	188	-
TOTAL		765	406

¹Indivíduos soropositivos para *T. gondii* sem cicatrizes de lesão ocular.

^{2,3,4}Indivíduos soropositivos para *T. gondii* com cicatrizes de lesão ocular classificadas respectivamente como tipo A, tipo B ou tipo C.

⁵No grupo com cicatrizes de lesão tipo A foram incluídos indivíduos com apenas cicatrizes de lesão A (n=22) e indivíduos com cicatrizes de múltiplas lesões: tipo AB (n=12), ABC (n=12) e AC (n=3), totalizando os 49 indivíduos mostrados da tabela.

⁶No grupo com cicatrizes de lesão tipo B foram incluídos indivíduos com apenas cicatrizes de lesão B (n=28) e indivíduos com cicatrizes de lesões múltiplas tipo BC (n=8), totalizando os 36 indivíduos mostrados da tabela.

Quadro 2: Grupos de indivíduos envolvidos no estudo imunológico, segundo a sorologia para toxoplasmose, fundoscopia e faixa etária.

Sorologia	Fundoscopia	Faixa Etária		Total
		< 60 anos	≥ 60 anos	
Soronegativos	SL	6	10	16
Soropositivos	SL ¹	30	39	69
	Lesão Tipo A ²	6 ⁵	4	10
	Lesão Tipo B ³	5	2	7
	Lesão Tipo C ⁴	9	8	17
TOTAL		56	63	119

¹Indivíduos soropositivos para *T. gondii* sem cicatrizes de lesão ocular.

^{2,3,4}Indivíduos soropositivos para *T. gondii* com cicatrizes de lesão ocular classificadas respectivamente como tipo A, tipo B ou tipo C

⁵No grupo com cicatriz de lesão tipo A foram incluídos indivíduos com apenas cicatrizes de lesão A (n=4) e indivíduos com cicatrizes de múltiplas lesões: tipo AB (n=1), ABC (n=1), totalizando os 6 indivíduos mostrados da tabela.

Os objetivos do estudo foram explicados a todos os indivíduos (ou seus responsáveis) e consentimento informado foi obtido a partir daqueles que

concordaram em participar (Anexo 1). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (Portaria nº 347/06) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde (Portaria nº 013/07) (Anexo 2).

ESTUDO IMUNOLÓGICO

4.2 Manutenção de parasitas e preparo do antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* foram mantidos por meio de passagens sucessivas em camundongos suíços e em monocamadas de fibroblastos provenientes de prepúcio humano (HFS-F).

Células HFS-F foram cultivadas em meio *DMEM/F-12* (*GIBCO*®), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (*GIBCO*®) e mantidas em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO₂. Paralelamente, camundongos suíços, com média de 4 semanas de vida, foram infectados, por via intraperitoneal, com taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH. Após 3 dias de infecção, foi realizada a lavagem peritoneal nos camundongos, usando 5mL de PBS (0,1M; pH 7,2). O material coletado contendo os taquizoítos foi centrifugado a 500g, por 5 min, à temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi submetido a nova centrifugação: 900g, por 30 min, a 4°C. Os parasitas que se encontravam no precipitado foram contados em câmara de Neubauer e adicionados às células HFS-F, previamente cultivadas, numa proporção de 5-10 parasitas por fibroblasto. Aproximadamente, 3 dias após a infecção das células HFS-F, os taquizoítos foram coletados e novamente preparados, como descrito acima, para infectar outra cultura de células HFS-F. Passados, aproximadamente, 3 dias pós-infecção da segunda cultura, os taquizoítos foram coletados como descrito acima, estocados a 70°C negativos e posteriormente, usados para produzir o antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg). O material estocado foi, então, submetido a 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-Maria a 37°C. A massa contendo os parasitas lisados, após o último ciclo, foi ressuspensa em PBS gelado e ultracentrifugada a 40000g, durante 70 minutos, à temperatura de 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi dialisado, contra PBS por 48 horas, a 4°C.

O extrato antigênico foi, então, esterilizado por filtração em membrana de nitrocelulose de 0,22 µm (Millipore). Dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Após a dosagem, alíquotas do extrato foram armazenadas a 20°C negativos até o uso.

4.3 Culturas de células sanguíneas para dosagem de citocinas

Células sanguíneas, provenientes de 200µL de sangue periférico dos indivíduos alocados nos diferentes grupos do estudo, foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços, utilizando meio RPMI suplementado com L-glutamina 1,6%. As culturas celulares foram estimuladas antígenicamente pela adição de STAg (2µg/ml). Culturas de células não estimuladas antígenicamente foram mantidas como controles experimentais. As células foram, então, incubadas por 6 dias em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO₂.

Suspensões celulares foram colhidas no sexto dia de cultura e transferidas para microtubos. Os sobrenadantes foram separados das células sanguíneas por centrifugação a 13000g, por 5 min, 18°C. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a 70°C negativos, para posterior análise de produção de citocinas.

4.4 Análise das citocinas IFN-γ e IL-13 nos sobrenadantes das culturas celulares

A detecção das citocinas IFN-γ e IL-13 em sobrenadantes de culturas celulares colhidos após sexto dia de cultura foi feita, respectivamente, por uso dos Kits *Human IFN-γ Flex Set* e *Human IL-13 Flex Set (BD™)*, segundo normas do fabricante. Leituras foram realizadas usando o citômetro de fluxo *FACSCalibur (BD™)* e o software de análise *CellQuest (BD™)*.

4.5 Análises estatísticas

O software *GraphPad Prism 4* foi utilizado para análise dos resultados obtidos. Os dados de produção das citocinas IL-13 e IFN-γ foram comparados tanto intergrupos quanto intragrupos. Nas análises intergrupos, diferenças nos níveis de produção das citocinas, por indivíduos agrupados quanto à sorologia e fundoscopia, foram avaliadas pelo teste *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de *Dunn*. Nas análises intragrupos, foi avaliado pelo teste *Mann-Whitney* se havia

diferença significativa de produção entre duas faixas etárias selecionadas para o estudo (< 60 ou ≥ 60 anos). A produção de citocinas foi avaliada ainda em cinco faixas etárias (< 40 anos, 40-59 anos, 60-69 anos, 70-79 anos e > 80 anos) pelo teste *Kruskal-Wallis* seguido por *Dunn*. Para todas as análises valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

ESTUDO GENÉTICO

4.6 Extração e quantificação de DNA genômico

Amostras de DNA de 765 indivíduos foram extraídas utilizando o kit comercial *DNeasy Blood Tissue (Qiagen)*, segundo normas do fabricante. O DNA foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)*. Amplificação do gene da β-globina foi realizada para avaliar a integridade do DNA genômico pós-extração, sendo obtido um fragmento de 365pb. Para isso, foi feita uma PCR *Touchdown* com temperatura de anelamento variando entre 63°C a 56°C (decréscimo de 0,5°C/ciclo). Em cada reação, com volume final de 25µL, foram utilizados 5µL de DNA (5ng/µL), 1µL do *primer forward* (10mM) e 1µL do *primer reverse* (10mM), 12,05µL de água ultrapura, 0,75µL de MgCl₂ (50mM), 2,5µL de tampão 10X (200mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 500mM de KCl), 0,2µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL) e 2,5µL de dNTPs (2mM). A visualização dos produtos da PCR *Touchdown* foi feita por meio de gel de agarose a 2% em tampão TBE 1X (0,44M Tris-HCL; 0,44M H₃BO₃; 10mM EDTA) e aquecida até a completa dissolução. Para cada 100mL de gel de agarose, foi acrescentado 2µL de brometo de etídio (10µg/ml). Dois microlitros de amostras previamente misturadas a 6µL de corante (6X Cresol-Red) foram aplicados ao gel solidificado e submetidos à voltagem de 120V, por 60 min. As imagens foram obtidas pelo fotodocumentador *Luminescent Image Analyzer (GE)* utilizando o *software Image Quant LAS 4000 (GE)*.

4.7 Seleção dos SNPs

Amostras de DNA de 406 indivíduos foram genotipadas para 12 SNPs presentes nos genes *IFNG*, *IL13* e *CXCL10* (Quadro 3). A seleção de SNPs foi realizada baseada em pesquisas de polimorfismos na literatura científica e

através da base de dados *HapMap* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Utilizou-se o software *Haploview* 4.2 (Barrett *et al.*, 2005) para checar desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNPs selecionados, sendo que SNPs com MAF (*Minor Allele Frequency*) menor que 0,05 na população CEU não foram incluídos no mapa de DL. Mapas de DL de SNPs presentes nos genes *IFNG*, *IL13* e *CXCL10* são mostrados abaixo (Figuras 2, 3 e 4, respectivamente). Alguns SNPs presentes nos genes candidatos foram selecionados apenas com base na literatura científica, devido à ausência de dados disponíveis sobre valores de r^2 no banco de dados *HapMap*.

Quadro 3: Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) selecionados nos genes *IFNG*, *IL13* e *CXCL10*.

SNP	Posição no cromossomo ¹	Localização do SNP	Alelo 1	Alelo 2
<i>IFNG (forward strand Chr 12q14)</i>				
<i>IFNG_rs2069718</i>	68550162	Intron 3	G	A
<i>IFNG_rs3181035</i>	68546396	Intron	T	C
<i>IFNG_rs1861493</i>	68551196	Intron 3	A	G
<i>IFNG_rs2430561</i>	68552522	Intron 1	T	A
<i>IFNG_rs2069705</i>	68555011	Região Promotora	C	T
<i>IL13 (forward strand Chr 5q23.3)</i>				
<i>IL13_rs1295687</i>	131994462	Intron 1	G	C
<i>IL13_rs1800925</i>	131992809	Região Promotora	C	T
<i>IL13_rs7719175</i>	131986463	Região Promotora	T	G
<i>IL13_rs3091307</i>	131989136	Região Promotora	A	G
<i>CXCL10 (forward strand Chr 4q21)</i>				
<i>CXCL10_rs3921</i>	76942943	3'UTR	C	G
<i>CXCL10_rs4256246</i>	76945522	Região Promotora	G	A
<i>CXCL10_rs4508917</i>	76946097	Região Promotora	A	G

¹Localização do SNP retirada do banco de dados *Ensembl*.



Figura 2: Mapa de desequilíbrio de ligação da população CEU para SNPs do gene *IFNG* 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 ($0 < r^2 < 1$). Quadros vermelhos indicam SNPs selecionados para o estudo.

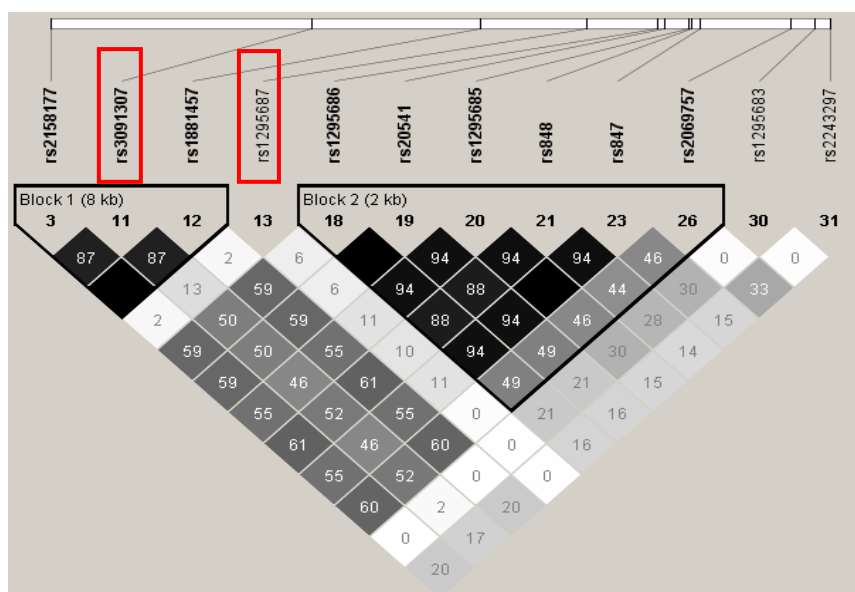


Figura 3: Mapa de desequilíbrio de ligação da população CEU para SNPs do gene *IL13* obtidos pelo software *Haploview* a partir da base de dados *Hapmap*. Valores r^2 ($\times 100$) estão indicados nos quadrados da matriz: quadrado preto indica $r^2 = 1$; branco, $r^2 = 0$; tons de cinza, r^2 com valores intermediários ($0 < r^2 < 1$). Quadros vermelhos indicam SNPs selecionados para o estudo.

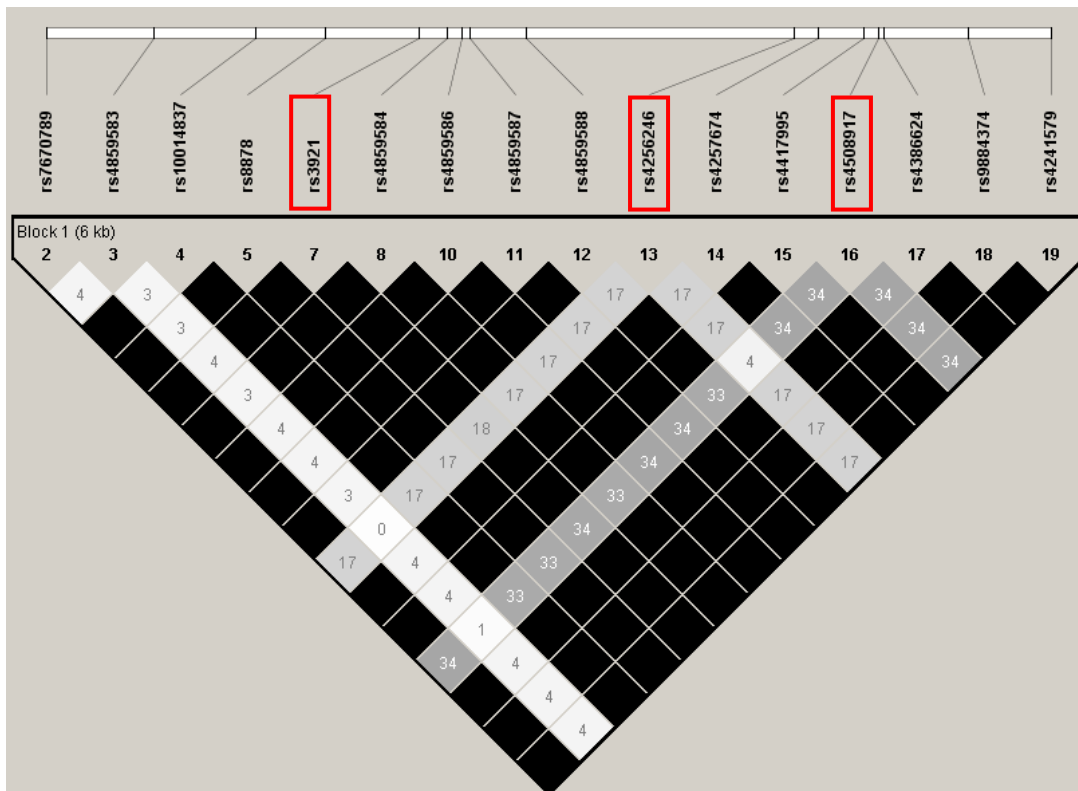


Figura 4: Mapa de desequilíbrio de ligação da população CEU para SNPs do gene *CXCL10* obtidos pelo software *Haploview* a partir da base de dados *Hapmap*. Valores r^2 ($\times 100$) estão indicados nos quadrados da matriz: quadrado preto indica $r^2=1$; branco, $r^2=0$; tons de cinza, r^2 com valores intermediários ($0 < r^2 < 1$). Quadros vermelhos indicam SNPs selecionados para o estudo.

4.8 Genotipagem

No presente estudo 12 SNPs em genes candidatos foram genotipados pela empresa *LGC Genomics*, utilizando a metodologia *KASP™* (*Kompetitive Allele Specific PCR*), patenteada pela empresa.

Basicamente, neste ensaio a discriminação alélica é feita através do anelamento de 2 *primers* alelo-específicos com sequência distintas na cauda o que determinará a ligação de oligonucleotídeos marcados com corantes *reporter* diferentes (FAM® dye ou HEX® dye) (Figura 5). Os oligonucleotídeos marcados contêm um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e na extremidade 3' da fita complementar tem um corante *quencher* (silenciador). Assim, no oligonucleotídeo dupla fita a proximidade do *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo corante *repórter*. Porém, se a sequência alvo complementar a este oligonucleotídeo estiver presente na fita molde, este se

anela ao DNA, separando o corante *reporter* do corante *quencher*, resultando num aumento da intensidade de fluorescência pelo *reporter* (Figura 5). O tipo de fluorescência emitido é determinado pela ligação dos primers alelos específicos, os quais têm caldas distintas que servem de molde para fita complementar a um oligonucleotídeo marcado com fluoróforos distintos (FAM® dye ou HEX® dye).

4.9 Análise da frequência alélica na população de Campos dos Goytacazes

As frequências alélicas apresentadas pelos SNPs presentes nos genes candidatos foram calculadas por meio de planilha customizada no *software Microsoft Excel*. Nesta análise, especificamente, foram utilizadas amostras de 765 indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes/RJ. A fim de avaliar o perfil genético predominante na população de Campos, as frequências alélicas obtidas nesta população foram comparadas às frequências de uma população com ascendência europeia ocidental ou nórdica, moradores de Utah (CEU) e com os lorubás africanos, moradores de Ibadan/Nigéria (YRI). As informações das populações CEU e YRI foram obtidas na base de dados *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

4.10 Análises estatísticas

A frequência alélica e genotípica em casos e controles foi comparada entre 3 grupos de análise (Quadro 4), usando o teste do χ^2 . O software utilizado para estas análises foi *GraphPad Prism 4*. Este software foi utilizado também para o cálculo da razão de chance (*odds ratio* - OR) dentro de um intervalo de confiança (IC) de 95% entre grupos de indivíduos apresentando diferentes fenótipos clínicos de lesão ocular. Devido à realização de múltiplos testes dentro de um mesmo cromossomo para o mesmo grupo de amostras, foi aplicado o método de Bonferroni para correção do valor de p . Para os SNPs do gene *IFNG* o valor de p obtido nas análises foi multiplicado por 5, para SNPs do gene *IL13* o valor de p foi multiplicado por 4 e para SNPs do gene *CXCL10* o valor de p foi multiplicado por 3.

Genótipos do grupo controle (indivíduos soropositivos para *T. gondii* sem presença de cicatrizes de lesões oculares) foram usados para teste do

equilíbrio de *Hardy-Weinberg (EHW)* para cada SNPs, calculados a partir de uma planilha customizada no *software Microsoft Excel*. Desvio do equilíbrio era considerado se valores de p fossem menores que 0,05.

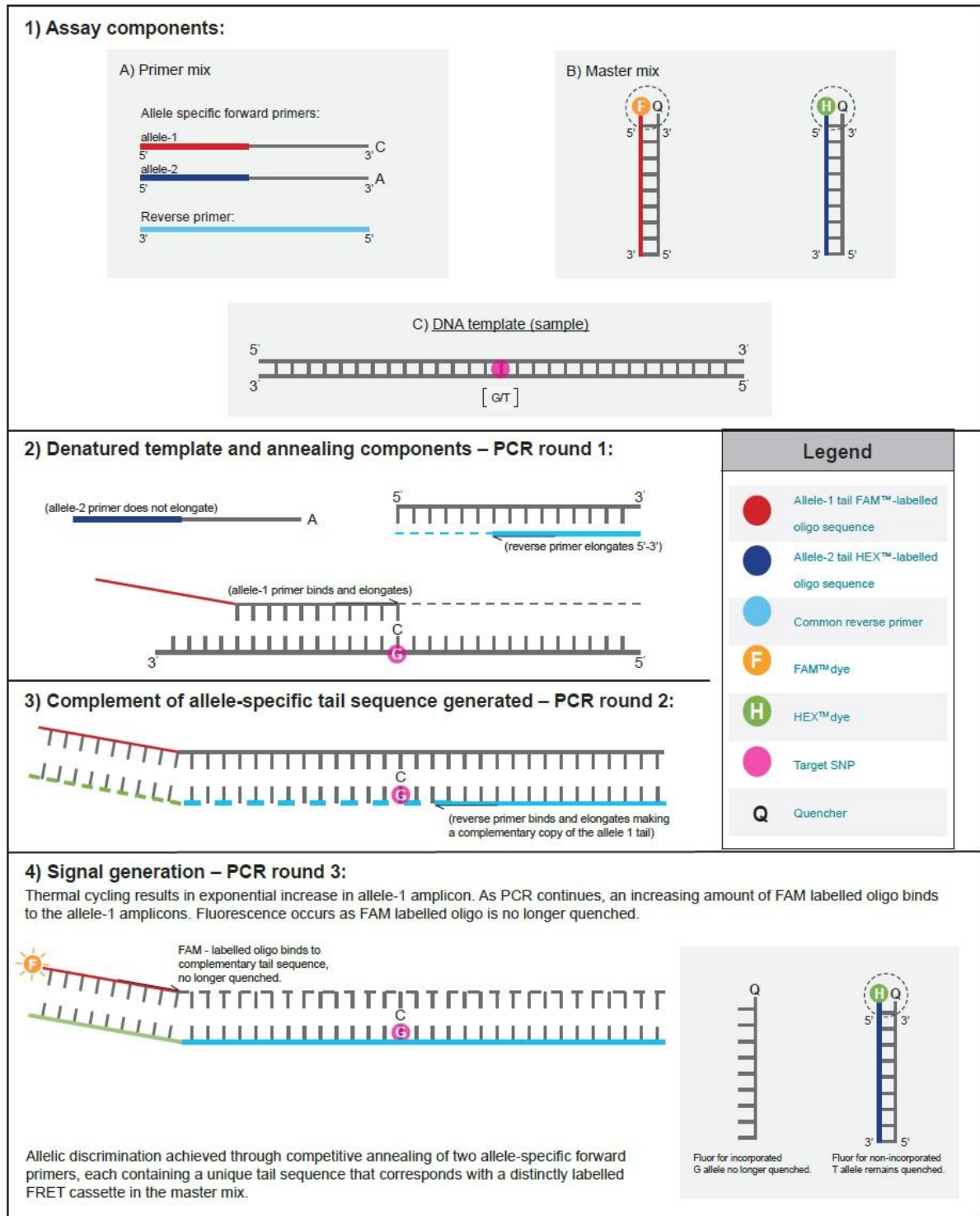


Figura 5: Esquema representativo do ensaio *KASP™* (LCG GENOMICS).

Quadro 4: Grupo de análises dos indivíduos infectados por *Toxoplasma gondii* segundo perfil clínico obtido por exames oftalmológicos.

Grupos de Análises	Controles <i>versus</i> Casos
G1	SL ¹ <i>versus</i> tipo A ²
G2	SL ¹ <i>versus</i> tipo B ³
G3	SL ¹ <i>versus</i> tipo C ⁴

¹Indivíduos soropositivos para *T. gondii* sem cicatrizes de lesão ocular.

^{2,3,4}Indivíduos soropositivos para *T. gondii* com cicatrizes de lesão ocular classificadas respectivamente como tipo A, tipo B ou tipo C.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil da população de estudo quanto a detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* e exames oftalmológicos

Sorologia (detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii*) foi realizada na população de estudo, provenientes de domicílios localizados em áreas previamente estudadas (n=254), do hemocentro municipal, situado no Hospital Ferreira Machado (n=447), de um asilo municipal chamado Asilo do Carmo (n=18) e do projeto Terceira Idade em Ação/UENF (n=46). Foram também realizados exames oftalmológicos. Contudo, parte dos voluntários não aderiu ao projeto quando solicitados para realização do exame de fundo do olho.

No total, 765 indivíduos realizaram testes sorológicos, sendo 171 soronegativos e 594 soropositivos para toxoplasmose. Dos 594 soropositivos obtivemos o retorno de 406 indivíduos para os exames oftalmológicos, sendo a taxa de perda de 32%, se considerarmos apenas os indivíduos soropositivos. Quanto à fundoscopia, 271 indivíduos não apresentaram cicatrizes de lesão ocular e 135 apresentaram cicatrizes de lesão decorrente da infecção por *T. gondii*, com diferentes graus de severidade (Quadro 5).

Quadro 5: Perfil da população de estudo quanto à sorologia para toxoplasmose e fundoscopia.

Sorologia para toxoplasmose	Fundoscopia			
	Perfil clínico	N	%	Tipo da cicatriz
Soronegativos	Sem lesão	171	22,35	
Soropositivos	Sem lesão	271	35,42	
	Com lesão	49	6,41	A ¹
		36	4,71	B ²
		50	6,54	C
	Sem fundoscopia	188	24,58	
Total		765	100	

¹No grupo com cicatrizes de lesão tipo A foram incluídos indivíduos com apenas cicatrizes de lesão A (n=22) e indivíduos com cicatrizes de múltiplas lesões: tipo AB (n=12), ABC (n=12) e AC (n=3), totalizando os 49 indivíduos mostrados da tabela.

²No grupo com cicatrizes de lesão tipo B foram incluídos indivíduos com apenas cicatrizes de lesão B (n=28) e indivíduos com cicatrizes de lesões múltiplas tipo BC (n=8), totalizando os 36 indivíduos mostrados da tabela.

Vale ressaltar a alta soroprevalência para toxoplasmose encontrada entre doadores de sangue abordados aleatoriamente no Hemocentro do Hospital Ferreira Machado. Num total de 447 indivíduos, 320 indivíduos apresentaram sorologia positiva, o que representa 71,6% dos doadores de sangue voluntários do projeto. Exames fundoscópicos revelaram alta prevalência de doença ocular: 21% entre os doadores que apresentaram sorologia positiva e retornaram para realização dos exames de fundo de olho (Figura 6).

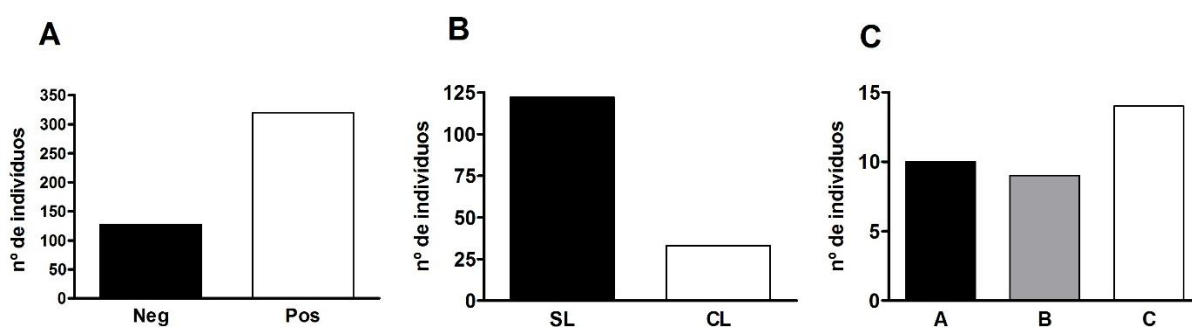


Figura 6: Perfil dos doadores de sangue em Campos dos Goytacazes/RJ quanto à sorologia para toxoplasmose e fundoscopia. **A:** Status sorológico dos indivíduos. Neg: indivíduos soronegativos para toxoplasmose e Pos: indivíduos soropositivos para toxoplasmose; **B:** Prevalência da doença ocular. SL: indivíduos soropositivos sem cicatrizes de lesão ocular e CL: indivíduos soropositivos com cicatrizes de lesão ocular; **C:** Classificação das lesões oculares. A: indivíduos que apresentam cicatriz de lesão tipo A; B: indivíduos com cicatrizes de lesão tipo B e C indivíduos que apresentam cicatrizes de lesão tipo C.

5.2 Produção das citocinas IFN- γ e IL-13

Para o estudo imunológico, células de amostras do sangue periférico provenientes de 16 indivíduos não infectados por *T. gondii* e de 103 indivíduos infectados foram mantidas em cultura na presença ou ausência de estímulo antigênico específico (STAg). No sexto dia, as citocinas IFN- γ e IL-13 foram dosadas no sobrenadante da cultura.

5.2.1 Comparação da produção de citocinas entre grupos de indivíduos soronegativos e soropositivos para *Toxoplasma gondii* com presença ou ausência de cicatrizes de lesão ocular

As dosagens de citocinas em sobrenadantes do sexto dia de células sanguíneas em cultura mostraram que, sob estímulo de STAg, células provenientes de indivíduos soropositivos para *T. gondii*, independente da presença de cicatrizes de lesão ocular, apresentaram significativamente maior produção de IFN- γ (Figura 7A) e de IL-13 (Figura 7B) do que os indivíduos soronegativos. A razão entre os níveis de ambas as citocinas (IFN- γ /IL-13) foi calculado e também revelou diferença significativa entre indivíduos negativos e os indivíduos com presença ou ausência de cicatrizes de lesão ocular (Figura 7C).

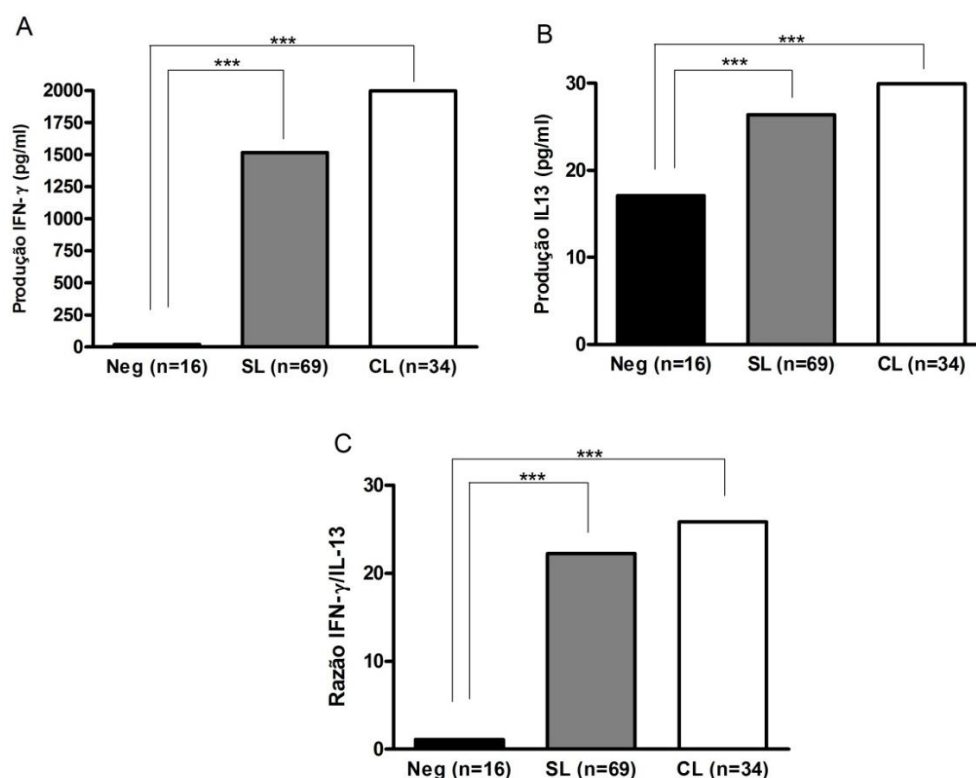


Figura 7: Produção de IFN- γ e IL-13 em sobrenadantes de células sanguíneas de indivíduos soronegativos para toxoplasmose (Neg), soropositivos sem cicatrizes de lesão ocular (SL) e soropositivos com presença de cicatrizes de lesão (CL), após estímulo por STAg. **A:** Produção de IFN- γ ; **B:** Produção de IL-13; **C:** Razão entre os níveis de IFN- γ e IL-13. Barras representam as medianas das dosagens obtidas. O símbolo *** indica que níveis de produção foram estatisticamente diferentes ($p < 0,001$; teste *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunn*).

A produção de citocinas IFN- γ e de IL-13 por culturas celulares que não receberam STAg (grupo controle) foi inferior a 6 pg/mL e 3,5 pg/mL, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre os grupos de análise (dados não mostrados).

5.2.2 Comparação da produção de citocinas entre grupos de indivíduos soropositivos para *Toxoplasma gondii* sem cicatrizes de lesão ocular e com cicatrizes do tipo A, B ou C

Nesta análise, os indivíduos soropositivos para toxoplasmose que apresentaram cicatrizes de lesão ocular foram desmembrados em 3 grupos: grupo com cicatriz do tipo A, do tipo B ou do tipo C, sendo comparados com indivíduos soropositivos sem lesão ocular. Indivíduos que apresentaram cicatrizes decorrentes de lesões múltiplas foram agrupados considerando a lesão mais severa.

Os resultados indicam que os grupos de indivíduos com cicatrizes do tipo A e do tipo B apresentam maior produção da citocina IFN- γ do que indivíduos com cicatrizes de lesão C ou sem lesão, embora sem significância estatística (Figura 8A). O grupo com cicatriz do tipo A apresentou novamente maior produção, quando avaliados os níveis de IL-13, sendo estatisticamente diferente do grupo com cicatriz do tipo C, o qual apresentou menor produção (Figura 8B). Para esta citocina, porém, o grupo com cicatrizes do tipo B, não apresentou alta produção como para o IFN- γ (Figura 8B). Quando calculada a razão entre as duas citocinas, observou-se que o grupo com cicatrizes do tipo B apresentou o maior nível de IFN- γ em relação ao IL-13 (alta razão IFN- γ /IL-13), embora sem significância estatística (Figura 8C).

5.2.3 Comparação da produção de citocinas entre indivíduos soropositivos para *Toxoplasma gondii* sem cicatrizes de lesão ocular e com cicatrizes do tipo A, B ou C, agrupados por faixa etária

Foi investigado, inicialmente se o nível de produção das citocinas IFN- γ e IL-13 era influenciado pela idade. Para isto foram dosadas as citocinas produzidas, sob estímulo de STAg, por células sanguíneas de indivíduos soropositivos para toxoplasmose, independente da presença de lesão ocular agrupados em 5 faixas etárias: < 40 anos, 40-59 anos, 60-69 anos, 70-79 anos e

> 80 anos (Figura 9A e 9B). Observou-se que há um decréscimo na produção de citocinas com a idade. Para a citocina IFN- γ , foi visto que os indivíduos mais velhos (> 80 anos) apresentaram produção significativamente menor quando comparados a indivíduos com menos de 40 anos ou com idade entre 40 e 59 anos (Figura 9A). Os indivíduos com menos de 40 anos produziram significativamente mais IFN- γ também que os indivíduos agrupados na faixa entre 70-79 anos (Figura 9A). Quanto à citocina IL-13 também houve queda na produção relacionada à idade, porém a partir dos 69 anos não foi observado decréscimo na produção (Figura 9B). Os indivíduos alocados na faixa etária entre 60-69 anos produziram significativamente menos IL-13 que indivíduos com menos de 40 anos e com idade entre 40-50 anos (Figura 9B).

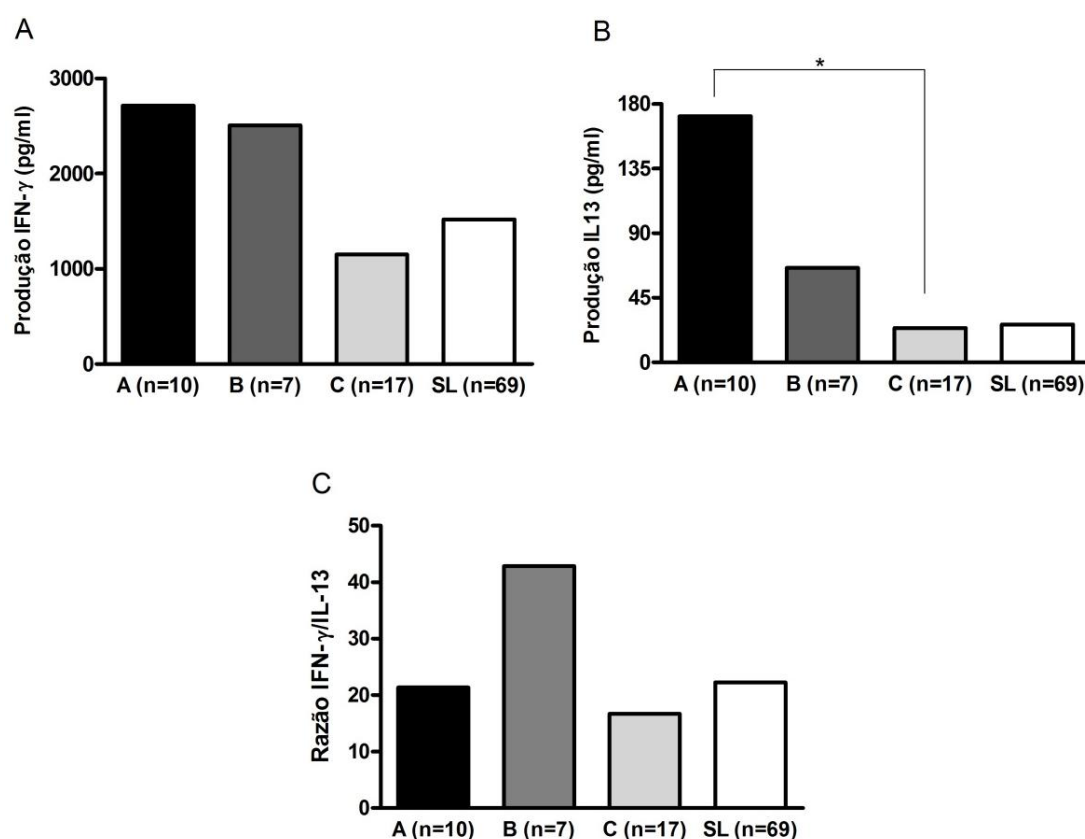


Figura 8: Produção de IFN- γ e IL-13 em sobrenadantes de células sanguíneas de indivíduos soropositivos sem cicatrizes de lesão ocular (SL) e soropositivos com presença de cicatrizes de lesão tipo A, tipo B ou do tipo C, após estímulo por STAg. **A:** Produção de IFN- γ ; **B:** Produção de IL-13; **C:** Razão entre os níveis de IFN- γ e IL-13. Barras representam as medianas das dosagens obtidas. O símbolo * indica que níveis de produção foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$; teste *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunn*).

Análises considerando apenas 2 faixas etárias também foram realizadas, a fim de se aumentar o número amostral dentro de cada faixa etária. Neste caso, os indivíduos foram alocados em grupos com menos de 60 anos (< 60) e com 60 anos ou mais (≥ 60). Diferença significativa na produção foi observada para ambas as citocinas, sendo os níveis de IFN- γ e IL-13 maiores no grupo com menos de 60 anos (Figura 9C e 9D).

Para análise de associação da produção de citocinas à doença ocular toxoplásmica, os indivíduos soropositivos para toxoplasmose sem cicatrizes de lesão ocular ou com cicatrizes de lesão tipo A, B ou C foram agrupados quanto à faixa etária em indivíduos com menos de 60 anos (< 60) ou indivíduos com idade a partir de 60 anos (≥ 60). O uso de duas faixas etárias foi selecionado, pois o desmembramento dos indivíduos em grupos de lesões inviabiliza o uso do agrupamento em 5 faixas etárias, uma vez que não se teria número suficiente de indivíduos em cada grupo de análise. Neste caso, além das comparações entre grupos de indivíduos apresentando diferentes níveis de severidade das lesões (comparações intergrupos), foram feitas comparações dentro de um mesmo grupo de lesão com indivíduos separados pela faixa etária (comparações intragrupos).

Foi visto que, independente da citocina avaliada, os indivíduos mais jovens (< 60 anos) apresentaram maiores níveis destas moléculas, sendo a diferença significativa no grupo com cicatrizes do tipo C, quando avaliada a produção de IFN- γ , e no grupo sem lesão ocular, para ambas as citocinas (Figura 10A e 10B).

Quanto à comparação dos níveis de IFN- γ entre os diferentes grupos de lesões observa-se que a produção é maior no grupo com menos de 60 anos apresentando cicatriz do tipo B, embora não haja significância estatística (Figura 10A). Já a produção de IL-13 foi maior no grupo de indivíduos apresentando cicatriz do tipo A, principalmente nos mais jovens (Figura 10B).

O cálculo de razão entre as citocinas mostrou que indivíduos com idade a partir dos 60 anos apresentando cicatriz do tipo B tinham a mais alta razão IFN- γ /IL-13, seguidos de indivíduos com menos de 60 anos apresentando cicatriz de lesão tipo C e do tipo B (Figura 10C). Diferença estatisticamente significativa foi observada nos valores de razão IFN- γ /IL-13 entre as faixas etárias do grupo com cicatrizes de lesão tipo C (Figura 10C).

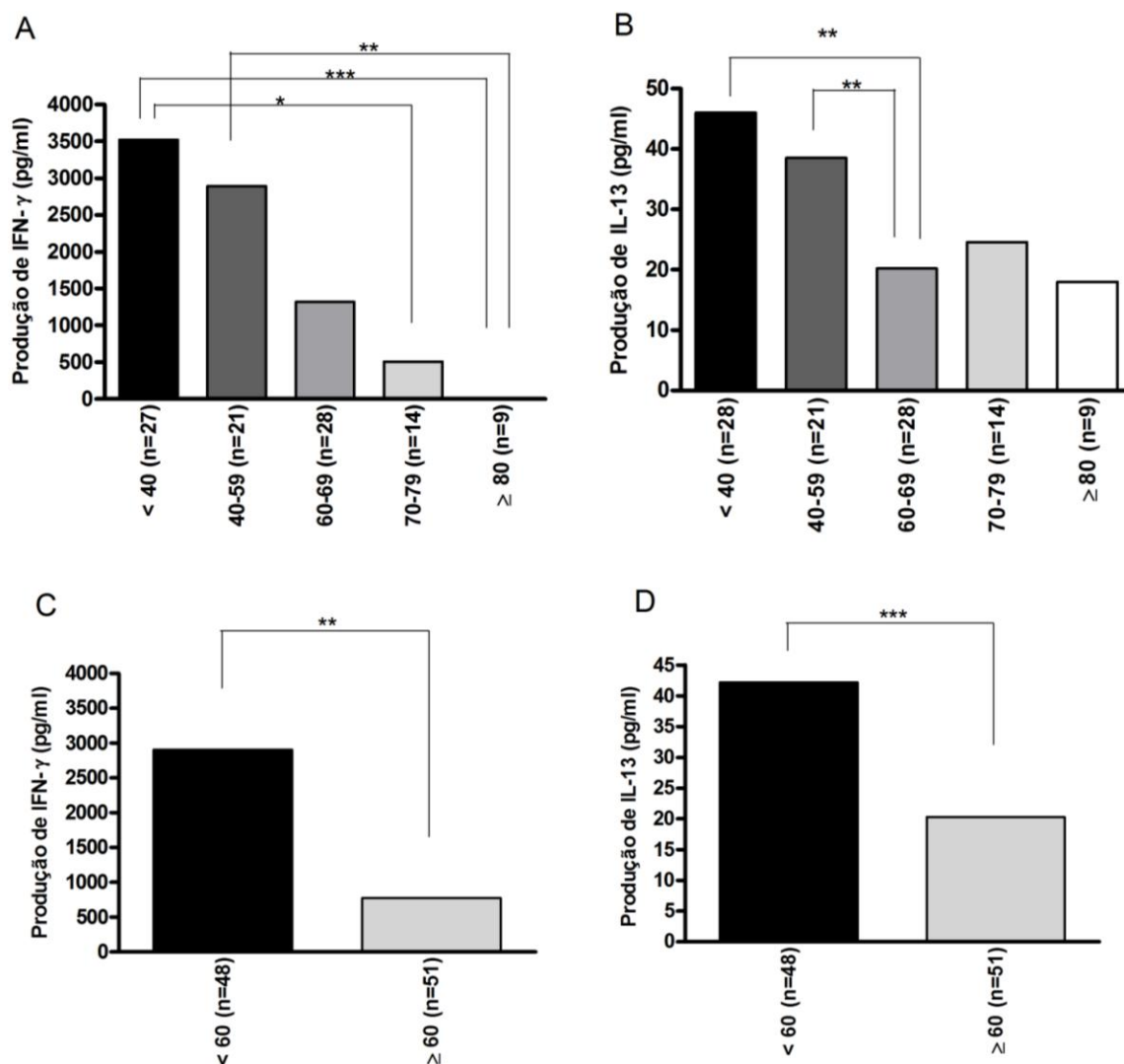


Figura 9: Produção de IFN- γ e IL-13 em sobrenadantes de células sanguíneas de indivíduos soropositivos, independente da presença de lesão, agrupados por faixa etária, após estímulo por STAg. **A:** Produção de IFN- γ em indivíduos agrupados em 5 faixas etárias (< 40 anos, 40-59 anos, 60-69 anos, 70-79 anos e ≥ 80 anos); **B:** Produção de IL-13 em indivíduos agrupados em 5 faixas etárias (< 40 anos, 40-59 anos, 60-69 anos, 70-79 anos e ≥ 80 anos); **C:** Produção de IFN- γ em indivíduos agrupados em 2 faixas etárias (< 60 anos e ≥ 60 anos); **D:** Produção de IL-13 em indivíduos agrupados em 2 faixas etárias (< 60 anos e ≥ 60 anos). Os símbolos *, ** e *** indicam que níveis de produção foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente). Os testes estatísticos utilizados para comparação entre as 5 faixas etárias (A e B) foram *Kruskal-Wallis* seguido de *Dunn*, enquanto o teste aplicado para comparação entre 2 faixas etárias (C e D) foi o *Mann-Whitney*.

Para os indivíduos com cicatrizes do tipo B não foi possível realizar comparações entre faixas etárias, pois o grupo a partir de 60 anos tinha apenas 2 indivíduos, não sendo possível realizar o teste estatístico *Mann-Whitney*.

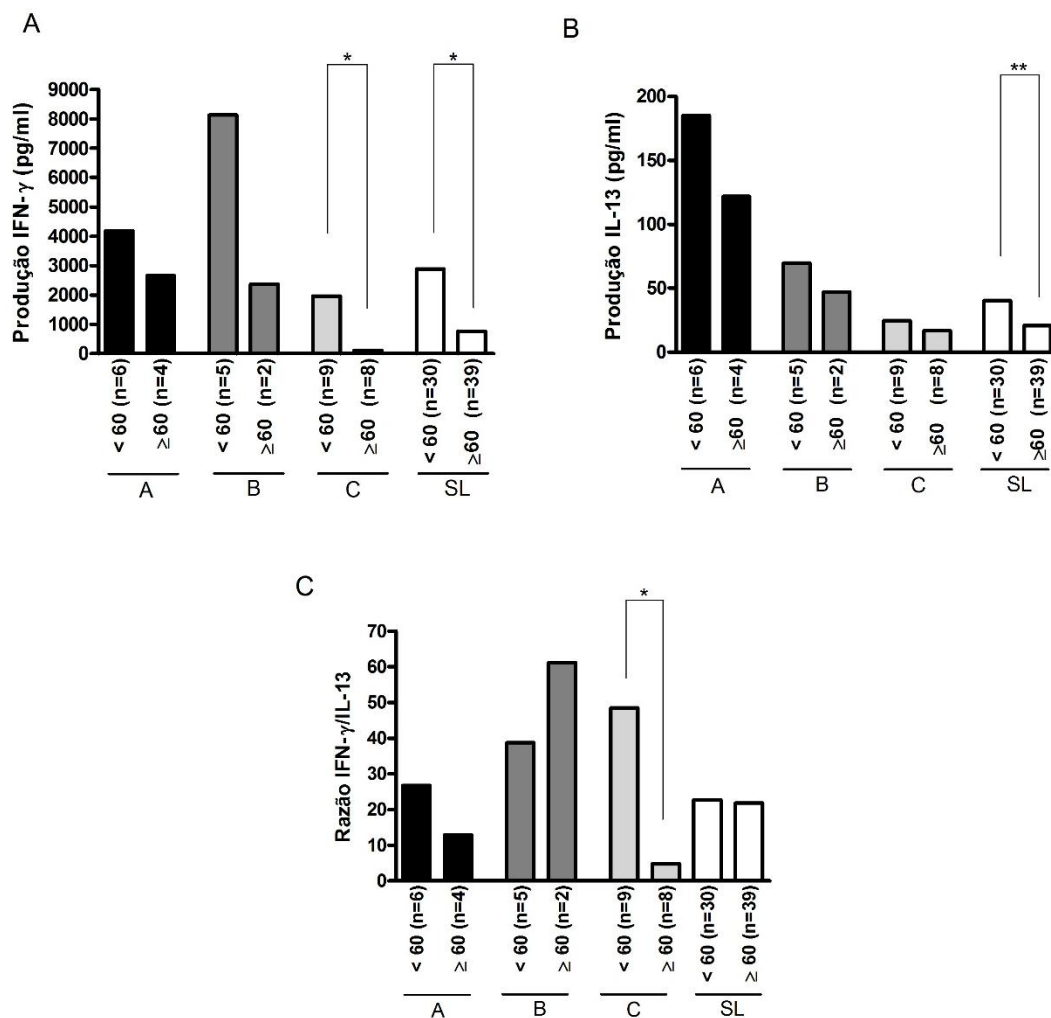


Figura 10: Produção de IFN- γ e IL-13 em sobrenadantes de células sanguíneas de indivíduos soropositivos sem cicatrizes de lesão ocular (SL) e soropositivos com presença de cicatrizes de lesão tipo A, B ou C, agrupados quanto a faixa etária, após estímulo por STAg. **A:** Produção de IFN- γ ; **B:** Produção de IL-13; **C:** Razão entre os níveis de IFN- γ e IL-13. Barras representam as medianas das dosagens obtidas. Os símbolos * e ** indicam que níveis de produção foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Os testes estatísticos utilizados foram *Kruskal-Wallis* seguido de *Dunn* para comparação entre os diferentes grupos de lesões, enquanto para entre faixas etárias dentro de um grupo o teste aplicado foi *Mann-Whitney*.

5.3 Comparações entre frequências alélicas das populações de Campos dos Goytacazes, CEU e YRI

Frequências alélicas de 765 indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes/RJ, incluindo indivíduos soronegativos para toxoplasmose (n=171) e indivíduos soropositivos que realizaram (n=406) ou não exames oftalmológicos (n=188), foram calculadas para 12 marcadores selecionados para este estudo (Tabela 1, 6 e 7). As frequências obtidas na população de Campos dos Goytacazes foram, então, comparadas as da população CEU, com ascendência europeia e da população YRI, os lorubás africanos.

Quanto aos marcadores do gene *IFNG* (Tabela 1) foi observado que para o SNP *rs2069718* o alelo G foi o mais frequente (51%) nos indivíduos de Campos. Este alelo é o mais frequente também na população CEU (61%) e na população YRI tem menor frequência (35%). Para o marcador *rs3181035* a frequência alélica dos indivíduos de Campos foi intermediária entre as populações com ascendência europeia e africana e o alelo mais frequente nas três populações foi o alelo C (84%, 96% e 72%, para as populações de Campos, CEU e YRI, respectivamente). A população de Campos apresentou também frequência intermediária entre CEU e YRI para os marcadores *rs1861493* e *rs2430561*. Para o *rs1861493* o alelo mais frequente nas três populações foi o alelo A, com frequência de 82%, 68% e 96% para as populações de Campos, CEU e YRI, respectivamente. O marcador *rs2430561* teve o alelo T como o mais frequente nas 3 populações, o qual apresentou frequência de 68%, 57% e 80%, para indivíduos de Campos, CEU e YRI, respectivamente. Para o marcador *rs2069705* a frequência alélica na população de Campos foi muito semelhante a população CEU e alelo T foi o mais frequente nas três populações, com frequência de 64%, 62% e 54%, para indivíduos de Campos, CEU e YRI, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Frequências alélicas para SNPs de *IFNG* obtidas a partir de indivíduos de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.

SNPs <i>IFNG</i>	Alelos	Frequência dos alelos em Campos/RJ	Frequência dos alelos no CEU ¹	Frequência dos alelos no YRI ²
<i>rs2069718</i>	A	0,487	0,390	0,650
	G	0,513	0,610	0,350
<i>rs3181035</i>	C	0,844	0,956	0,721
	T	0,156	0,044	0,279
<i>rs1861493</i>	A	0,821	0,683	0,958
	G	0,179	0,317	0,042
<i>rs2430561</i>	A	0,322	0,433	0,195
	T	0,678	0,567	0,805
<i>rs2069705</i>	C	0,362	0,376	0,464
	T	0,638	0,624	0,536

¹CEU: Moradores de Utah, com ascendência europeia ocidental ou nórdica;

²YRI: Moradores de Ibadan, Nigéria. Pertencentes à etnia Iorubá.

Em relação aos SNPs presentes no gene *IL13* (Tabela 2) foi observado que para os marcadores *rs1295687* e *rs1800925* a população de Campos tem frequência alélica intermediária entre as populações CEU e YRI. Para o primeiro marcador o alelo mais frequente nas três populações foi o C, apresentando frequência de 85%, 94% e 69% para as populações de Campos, CEU e YRI, respectivamente. O SNP *rs1800925* teve como alelo mais frequente em todas as populações supracitadas o alelo C, com frequência de 75%, 82% e 52% nas populações de Campos, CEU e YRI. O marcador *rs7719175* tem o alelo T como o mais frequente nas populações de Campos e YRI, e na população CEU este alelo está fixado (100% de frequência). A frequência na população de Campos também foi muito alta (98%) e a população YRI apresentou frequência de 77% para o alelo T. Para o SNP *rs3091307* o alelo A foi o mais frequente na população de Campos e CEU, 64% e 78%, respectivamente. Na população YRI este alelo A foi o menos frequente (25%) e o alelo G o mais frequente (75%) (Tabela 2).

Tabela 2: Frequências alélicas para SNPs de *IL13* obtidas a partir de indivíduos de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.

SNPs <i>IL13</i>	Alelos	Frequência dos alelos em Campos/RJ	Frequência dos alelos no CEU ¹	Frequência dos alelos no YRI ²
<i>rs1295687</i>	C	0,853	0,938	0,686
	G	0,147	0,062	0,314
<i>rs1800925</i>	C	0,755	0,825	0,517
	T	0,245	0,175	0,483
<i>rs7719175</i>	G	0,024	0,000	0,230
	T	0,976	1,000	0,770
<i>rs3091307</i>	A	0,641	0,783	0,250
	G	0,359	0,217	0,750

¹CEU: Moradores de Utah, com ascendência europeia ocidental ou nórdica;

²YRI: Moradores de Ibadan, Nigéria. Pertencentes à etnia lorubá.

A frequência alélica para o marcador *rs3921* do gene *CXCL10* (Tabela 3) foi muito semelhante entre a população de Campos e a população YRI, sendo o alelo C o mais comum, com frequência de 67% e 69% nas populações de Campos e YRI, respectivamente. Na população CEU o alelo C foi o menos frequente (48%) e o alelo G foi o mais frequente (52%). Para o marcador *rs4256246* o alelo G foi o mais frequente nas três populações, sendo que a frequência alélica da população de Campos foi mais próxima a população CEU. As frequências para o alelo G foram 89%, 85% e 99% para as populações de Campos, CEU e YRI, respectivamente. Quanto ao SNP *rs4508917* foi visto que o alelo A foi o mais frequente nas três populações e a população de Campos apresentou a frequência mais baixa para este alelo quando comparada as outras duas. As frequências para o alelo A foram 68%, 77% e 79% para as populações de Campos, CEU e YRI, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Frequências alélicas para SNPs de *CXCL10* obtidas a partir de indivíduos de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.

SNPs <i>CXCL10</i>	Alelos	Frequência dos alelos em Campos/RJ	Frequência dos alelos no CEU ¹	Frequência dos alelos no YRI ²
<i>rs3921</i>	C	0,669	0,482	0,690
	G	0,331	0,518	0,310
<i>rs4256246</i>	A	0,115	0,153	0,008
	G	0,885	0,847	0,992
<i>rs4508917</i>	A	0,684	0,767	0,792
	G	0,316	0,233	0,208

¹CEU: Moradores de Utah, com ascendência europeia ocidental ou nórdica;

²YRI: Moradores de Ibadan, Nigéria. Pertencentes à etnia Iorubá.

5.4 Estudo de associação genética com SNPs dos genes *IFNG*, *IL13* e *CXCL10*

Para as análises de associação genética foram utilizados os genótipos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose que realizaram exames oftalmológicos (n=406), sendo que destes 271 não apresentaram cicatrizes de lesão ocular (controles) e 132 apresentaram cicatrizes de lesão decorrente da infecção por *T. gondii* (casos).

As frequências alélicas e genóticas dos grupos soropositivos para toxoplasmose exibindo cicatrizes de lesões do tipo A, B ou C foram comparadas as frequências do grupo soropositivo sem lesão ocular (controle) a fim de se investigar a influência de polimorfismos de nucleotídeo único na propensão ao desenvolvimento da forma ocular da toxoplasmose e sua correlação com os diferentes tipos de lesões toxoplásmicas.

Observou-se diferença significativa, para o gene *IFNG*, na frequência genotípica do SNP *rs2069718* ($p=0,024$) entre indivíduos portadores de cicatrizes de lesão A e indivíduos sem lesão ocular (controles) (Tabela 4). A diferença da frequência dos genótipos AG *versus* GG entre afetados e controle se manteve significativa mesmo após a correção de Bonferroni ($p_{\text{corrigido}}=0,035$), sendo o genótipo homozigoto mais frequente no grupo afetado (Tabela 5 e Figura 11A). A presença do genótipo GG estava associada a uma

probabilidade 2,3 vezes superior de desenvolver lesões oculares do tipo A comparados com genótipos AA e AG, sendo esta diferença significativa mesmo após correção de Bonferroni ($OR=2,3$; $p_{\text{corrigido}}=0,04$) (Tabela 5). Inversamente, a presença do alelo A em homozigose ou heterozigose parece ser protetora: a probabilidade de indivíduos carregando o alelo A (AA+AG) de desenvolverem lesões do tipo A é aproximadamente 60% menor do que indivíduos com genótipo GG ($OR=0,43$; $p_{\text{corrigido}}=0,04$). O efeito protetor do alelo A é dominante, enquanto o aumento da susceptibilidade associado ao alelo G tem caráter recessivo (Tabela 5).

Para o marcador *rs3181035* do gene *IFNG* observou-se diferença significativa na frequência genotípica ($p=0,048$) e alélica ($p=0,013$) entre indivíduos portadores de cicatrizes de lesão C e indivíduos controle sem lesão ocular (Tabela 4). O alelo T foi significativamente mais frequente ($p=0,013$) nos indivíduos com lesão tipo C do que no grupo controle (Tabela 6 e Figura 11D). A presença deste alelo em homozigose ou heterozigose está associado a uma probabilidade 2 vezes maior de desenvolver lesão tipo C ($OR=2,1$; $p=0,015$), enquanto a presença do alelo C em homozigose parece conferir proteção ($OR=0,47$; $p=0,015$). O efeito protetor do alelo C é recessivo e o fenótipo "susceptibilidade aumentada" do alelo T é dominante (Tabela 6).

O marcador *rs1861493* do gene *IFNG* apresentou diferença significativa na frequência alélica ($p=0,003$) e genotípica ($p=0,016$) entre indivíduos portadores de cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão ocular (grupo controle) sendo a diferença na frequência alélica significativa mesmo após correção de Bonferroni ($p=0,015$) (Tabela 4). O genótipo AA e o alelo A foram os mais frequentes no grupo com lesão C (Figura 11E e 11F, respectivamente). A presença do genótipo AA estava associada a uma probabilidade 3,4 vezes superior de desenvolver lesões oculares do tipo C comparados com a presença de genótipos GG e AG, sendo esta diferença significativa mesmo após correção de Bonferroni ($OR=3,38$; $p_{\text{corrigido}}=0,025$) (Tabela 7). Inversamente, a presença do alelo G em homozigose ou heterozigose parece ser protetora, sendo que a probabilidade de indivíduos carregando o alelo G (GG+AG) de desenvolverem lesões do tipo C é 70% menor do que indivíduos com genótipo GG ($OR=0,29$; $p_{\text{corrigido}}=0,025$). É possível que o efeito protetor do alelo G seja dominante, enquanto o aumento da

susceptibilidade associado ao alelo A tenha caráter recessivo (Tabela 7). Para os demais SNPs presentes no gene *IFNG* avaliados nesse estudo (*rs2430561* e *rs2069705*) não foi observada significância estatística entre grupos de indivíduos acometidos por doença ocular toxoplásmica e indivíduos controles (Tabela 4 e Figura 12). As frequências observadas para os genótipos de todos os 5 SNPs não diferiu das frequências esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) no grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4: Análises de associação genética entre SNPs selecionados no gene de *IFNG* e manifestação ocular da toxoplasmose.

SNP <i>IFNG</i>	Grupos análises	Valor de p Teste χ^2		Valor de p (x5) <i>Bonferroni</i>		EHW (grupo controle)
		Alelo	Genótipo	Alelo	Genótipo	
<i>rs2069718</i>	G1	0,082	0,024	0,41	0,12	0,27
	G2	0,702	0,863	3,51	4,315	
	G3	0,801	0,249	4,01	1,245	
<i>rs3181035</i>	G1	0,902	0,393	4,51	1,965	0,56
	G2	0,675	0,393	3,375	1,965	
	G3	0,013	0,048	0,065	0,24	
<i>rs1861493</i>	G1	0,096	0,257	0,48	1,285	0,34
	G2	0,401	0,389	2,005	1,945	
	G3	0,003	0,016	0,015	0,08	
<i>rs2430561</i>	G1	0,697	0,922	3,485	4,61	0,62
	G2	0,656	0,902	3,28	4,51	
	G3	0,239	0,438	1,195	2,19	
<i>rs2069705</i>	G1	0,229	0,253	1,145	1,265	0,24
	G2	0,509	0,772	2,545	3,86	
	G3	0,083	0,096	0,415	0,48	

Nota: valor de p com significância estatística em negrito ($p < 0,05$).

Tabela 5: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão A e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP *IFNG_rs2069718*.

	Lesão A (n=49)		Controle (n=266)		<i>p</i>	<i>p (x5) Bonferroni</i>	Odds Ratio	IC (95%)
	n	%	n	%				
AA	11	22	63	24	0,126	0,63	0,532	0,235 - 1,204
AG	18	37	142	53	0,007	0,035	0,387	0,191 - 0,782
GG	20	41	61	23			1	
A	40	41	268	50	0,082	0,41	0,679	0,439 - 1,05
G	58	59	264	50			1	
GG + AG	38	78	203	76	0,85	4,25	1,072	0,517 - 2,221
AA	11	22	63	24			0,933	0,45- 1,932
GG	20	41	61	23	0,008	0,04	2,318	1,225 - 4,385
AA + AG	29	59	205	77			0,431	0,228 - 0,816

Nota: valor de *p* com significância estatística em negrito ($p < 0,05$).

Tabela 6: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP *IFNG_rs3181035*.

	Lesão C (n=50)		Controle (n=269)		<i>p</i>	<i>p (x5) Bonferroni</i>	Odds Ratio	IC (95%)
	n	%	n	%				
CC	27	54	192	71			1	
CT	20	40	69	26	0,025	0,125	2,061	1,086 - 3,911
TT	3	6	8	3	0,151	0,755	2,667	0,666 - 10,67
C	74	74	453	84	0,013	0,065	0,534	0,323 - 0,883
T	26	26	85	16			1	
TT + CT	23	46	77	29	0,015	0,075	2,124	1,147 - 3,933
CC	27	54	192	71			0,471	0,254 - 0,872
TT	3	6	8	3	0,281	1,405	2,082	0,533 - 8,14
CC + CT	47	94	261	97			0,480	0,123 - 1,878

Nota: valor de *p* com significância estatística em negrito ($p < 0,05$).

Tabela 7: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP *IFNG_rs1861493*.

	Lesão C (n=49)		Controle (n=265)		p	p (x5) Bonferroni	Odds Ratio	IC (95%)
	n	%	n	%				
AA	43	88	180	68			1	
AG	6	12	74	28	0,014	0,07	0,339	0,138 - 0,832
GG	0	0	11	4	0,107	0,535	0,18	0,010 - 3,123
A	92	94	434	82	0,003	0,015	3,392	1,442 - 7,976
G	6	6	96	18			1	
AA + AG	49	100	254	96	0,146	0,73	4,473	0,259 - 77,22
GG	0	0	11	4			0,223	0,013 - 3,859
AA	43	88	180	68	0,005	0,025	3,384	1,386 - 8,262
GG + AG	6	12	85	32			0,295	0,121 - 0,721

Nota: valor de p com significância estatística em negrito ($p < 0,05$).

Quanto ao gene *IL13* foi observada significância para 2 SNPs avaliados neste estudo. O marcador *rs1295687* apresentou diferença significativa na frequência genotípica ($p=0,006$) e alélica ($p=0,018$) entre indivíduos portadores de cicatrizes de lesão B e indivíduos controle sem lesão ocular (Tabela 8). A diferença na frequência alélica entre esses grupos se manteve significativa mesmo após correção de Bonferroni ($p=0,024$) (Tabela 8). Os genótipos CC e CG e o alelo C foram os mais frequentes no grupo com lesão B (Figura 13A e 13B, respectivamente). A presença do genótipo CC estava associada a uma probabilidade aproximadamente 6 vezes maior de desenvolver lesões oculares do tipo B quando comparado com a presença do genótipo GG, sendo esta diferença significativa mesmo após correção de Bonferroni (OR=5,8; $p_{\text{corrigido}}=0,04$) (Tabela 9). A susceptibilidade do heterozigoto CG é intermediária (OR=1,943), um indício que há ausência de dominância. Já a presença do genótipo GG confere proteção à doença ocular.

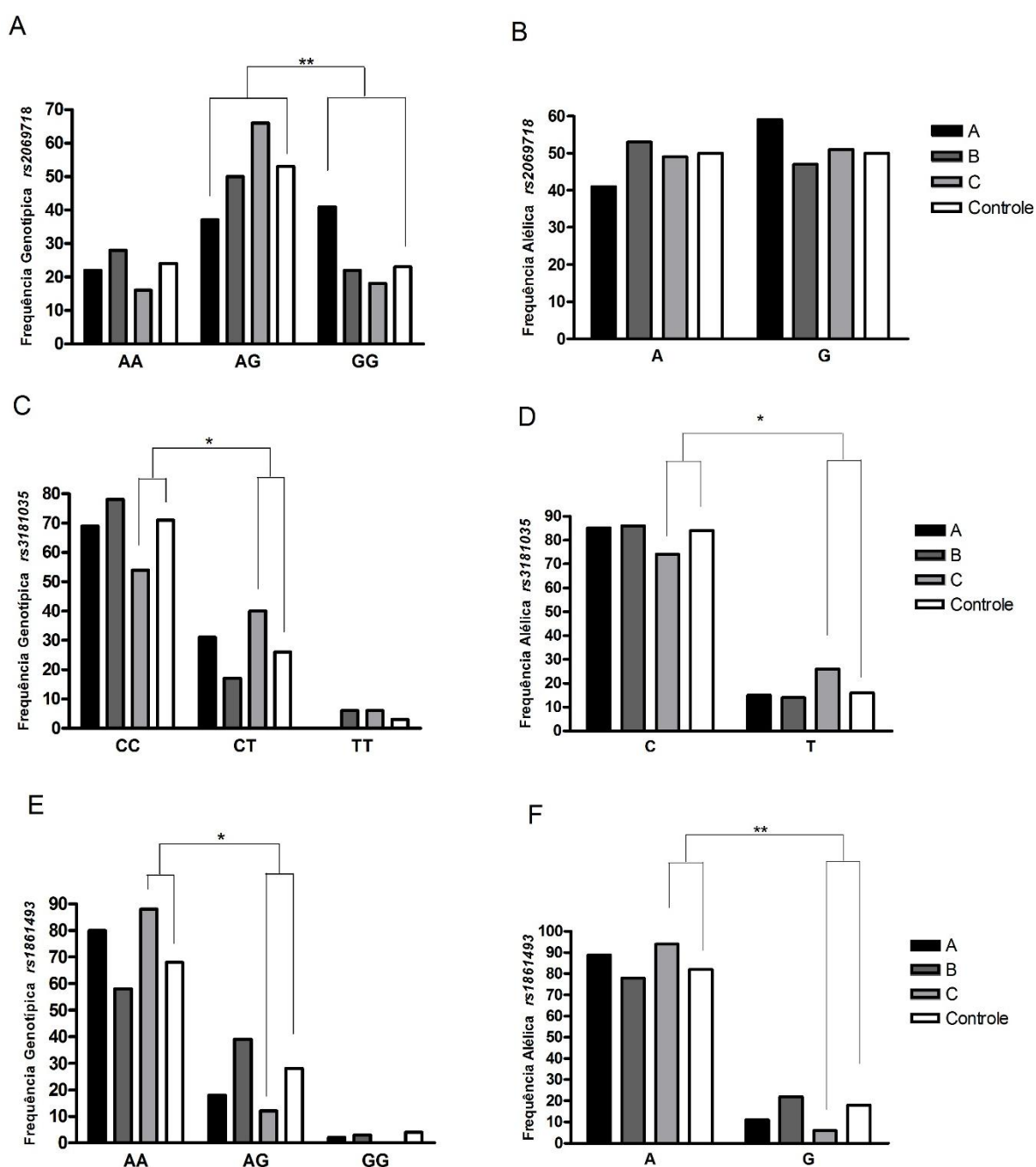


Figura 11: Frequência genotípica e alélica dos SNPs *IFNG* *rs2069718*, *rs3181035* e *rs1861493* em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (A, B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (controle). **A e B:** frequência genotípica e alélica do SNP *rs2069718*, respectivamente; **C e D:** frequência genotípica e alélica do SNP *rs3181035*, respectivamente; **E e F:** frequência genotípica e alélica do SNP *rs1861493*, respectivamente. Os símbolos * e ** indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente; teste χ^2).

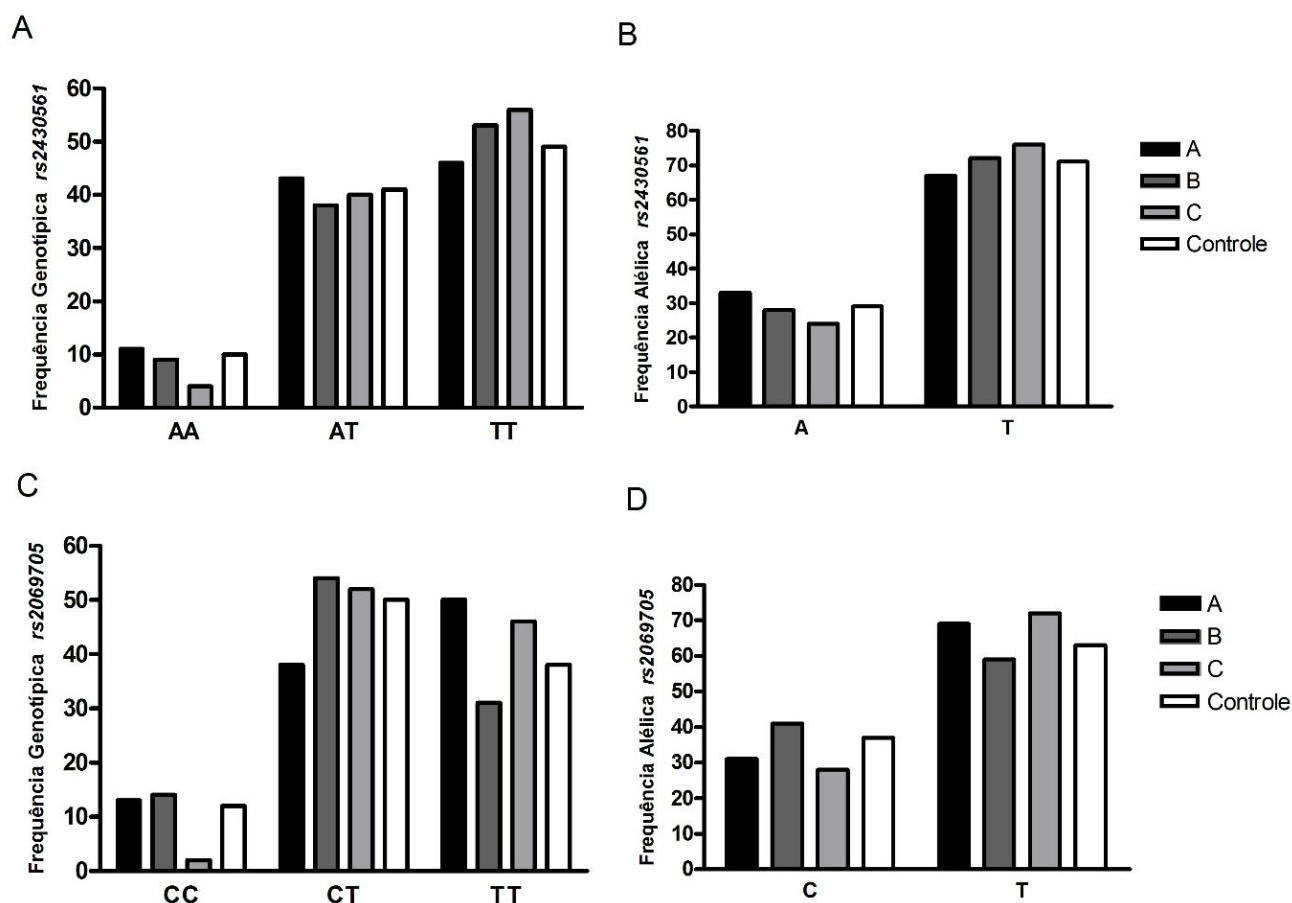


Figura 12: Frequência genotípica e alélica dos SNPs *IFNG* *rs2430561* e *rs2069705* em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (A, B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (controle). **A e B:** frequência genotípica e alélica do SNP *rs2430561*, respectivamente; **C e D:** frequência genotípica e alélica do SNP *rs2069705*, respectivamente.

Para o marcador *rs7719175* do gene *IL13* observou-se diferença significativa na frequência alélica ($p=0,013$) entre indivíduos portadores de cicatrizes de lesão B e indivíduos controle sem lesão ocular, sendo esta significância mantida após correção de Bonferroni ($p=0,016$) (Tabela 8). Não foi possível, porém, verificar o possível efeito de homozigose GG, uma vez que este genótipo não foi encontrado na população de estudo. O genótipo GT e o alelo G foram significativamente mais frequentes nos indivíduos com lesão tipo B do que no grupo controle (Figura 14A e 14B, respectivamente). A presença do alelo G estava associada a uma probabilidade 4,4 vezes maior de desenvolver lesão tipo B (OR=4,36; $p_{\text{corrigido}}=0,012$), enquanto a presença do

alelo T em homozigose conferiu redução da chance de desenvolver lesão B em aproximadamente 80% (OR=0,23; $p_{\text{corrigido}}=0,012$) (Tabela 10).

Para os demais SNPs avaliados presentes no gene *IL13* (*rs1800925* e *rs3091307*) não foi observada significância estatística entre grupos de indivíduos acometidos por doença ocular toxoplásmica e indivíduos controles (Tabela 8 e Figura 13 e 14). As frequências observadas para os genótipos de todos os 4 SNPS não diferiu das frequências esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p>0,05$) no grupo controle (Tabela 8).

Tabela 8: Análises de associação genética entre SNPs selecionados no gene de *IL13* e manifestação ocular da toxoplasmose.

SNP <i>IL13</i>	Grupos análises	Valor de p Teste χ^2		Valor de p (x4) <i>Bonferroni</i>		EHW (grupo controle)
		Alelo	Genótipo	Alelo	Genótipo	
<i>rs1295687</i>	G1	0,945	0,996	3,78	3,984	0,81
	G2	0,006	0,018	0,024	0,072	
	G3	0,422	0,223	1,688	0,892	
<i>rs1800925</i>	G1	0,626	0,717	2,504	2,868	0,85
	G2	0,96	0,963	3,84	3,852	
	G3	0,629	0,731	2,516	2,924	
<i>rs7719175</i>	G1	0,427	***	1,708	***	0,71
	G2	0,004	***	0,016	***	
	G3	0,891	***	3,564	***	
<i>rs3091307</i>	G1	0,728	0,946	2,912	3,784	0,07
	G2	0,887	0,61	3,548	2,44	
	G3	0,471	0,572	1,884	2,288	

Nota: *** não foi possível calcular o χ^2

Valor de p com significância estatística em negrito ($p<0,05$)

Tabela 9: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão B e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP *IL13_rs1295687*.

	Lesão B (n=36)		Controle (n=269)		<i>p</i>	<i>p (x4)</i> <i>Bonferroni</i>	Odds Ratio	IC (95%)
	n	%	n	%				
CC	3	8	5	2	0,01	0,04	5,829	1,30 - 26,14
CG	12	33	60	22	0,085	0,34	1,943	0,903 - 4,178
GG	21	58	204	76			1	
C	18	25	70	13	0,006	0,024	2,229	1,236 - 4,019
G	54	75	468	87			1	
CC + CG	15	42	65	24	0,025	0,1	2,242	1,092 - 4,602
GG	21	58	204	76			0,446	0,217 - 0,916
CC	3	8	5	2	0,022	0,088	4,800	1,096 - 21, 02
CG + GG	33	92	264	98			0,208	0,048 - 0,912

Nota: valor de *p* com significância estatística em negrito ($p < 0,05$).

Tabela 10: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão B e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP *IL13_rs7719175*.

	Lesão B (n=35)		Controle (n=265)		<i>p</i>	<i>p (x4)</i> <i>Bonferroni</i>	Odds Ratio	IC (95%)
	n	%	n	%				
TT	29	83	253	95			1	
GT	6	17	12	5	0,003	0,012	4,362	1,522 - 12,50
GG	0	0	0	0	***		***	***
T	64	91	518	98	0,004	0,016	0,247	0,090 - 0,681
G	6	9	12	2			1	
GG + GT	6	17	12	5	0,003	0,012	4,362	1,522 - 12,50
TT	29	83	253	95			0,229	0,080 - 0,657
GG	0	0	0	0	***	***	***	***
TT + GT	35	100	265	100				

Nota: *** não foi possível calcular o χ^2
Valor de *p* com significância estatística em negrito ($p < 0,05$).

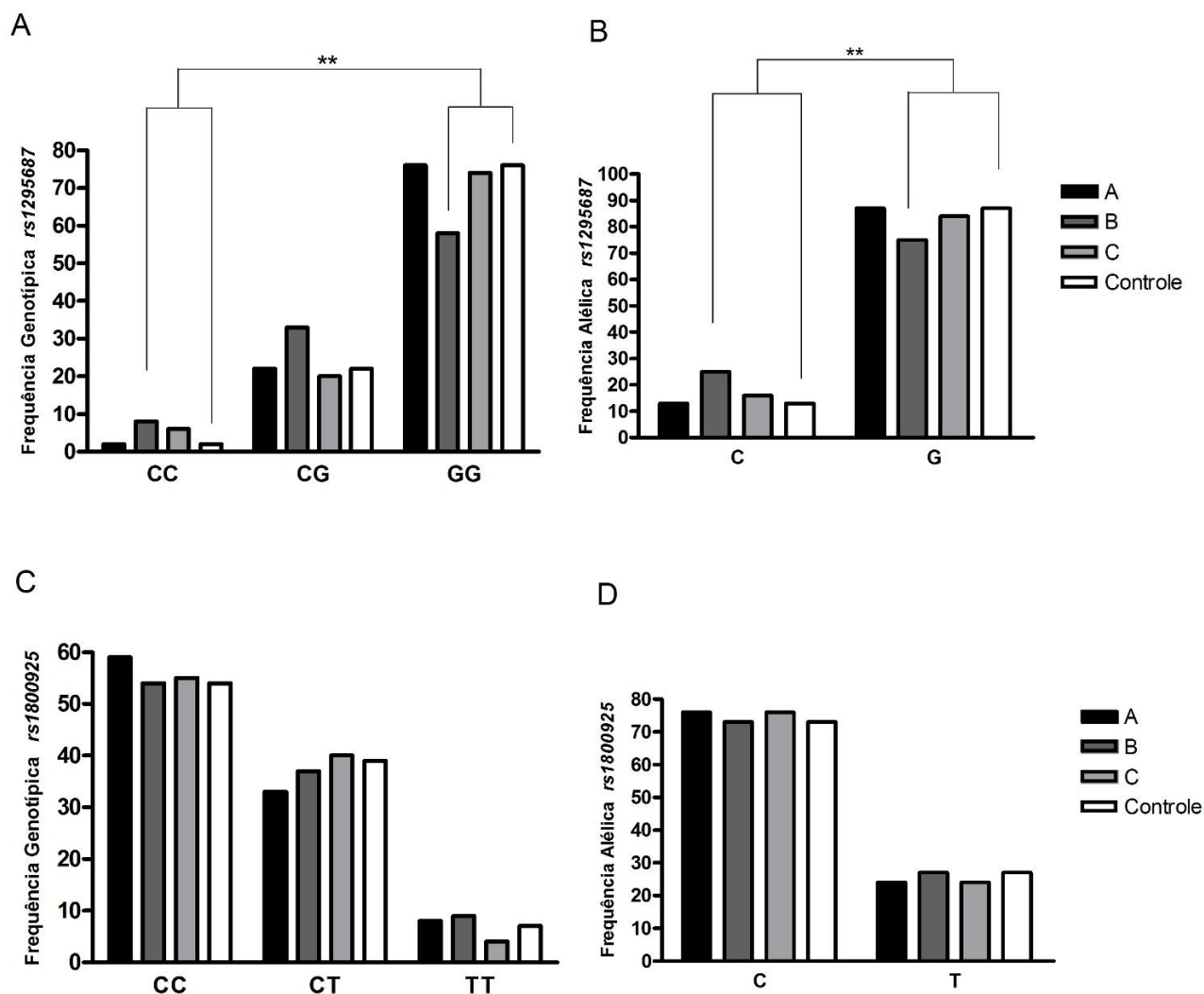


Figura 13: Frequência genotípica e alélica dos SNPs *IL13 rs1295687* e *rs1800925* em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (A, B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (controle). **A e B:** frequência genotípica e alélica do SNP *rs1295687*, respectivamente; **C e D:** frequência genotípica e alélica do SNP *rs1800925*, respectivamente. O símbolo ** indica resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,01$; teste χ^2).

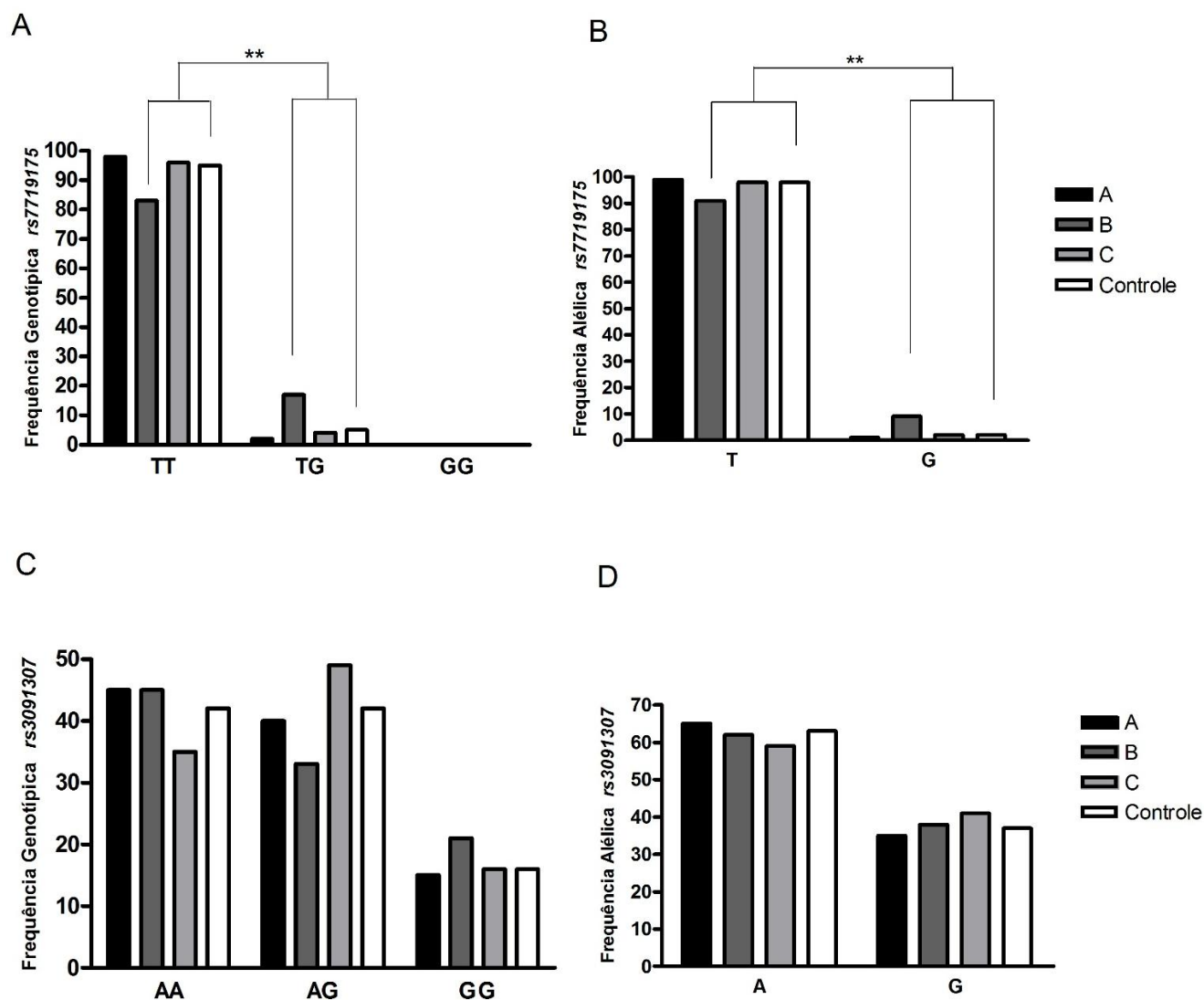


Figura 14: Frequência genotípica e alélica dos SNPs *IL13* *rs7719175* e *rs3091307* em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (A, B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (controle). **A** e **B**: frequência genotípica e alélica do SNP *rs7719175*, respectivamente; **C** e **D**: frequência genotípica e alélica do SNP *rs3091307*, respectivamente. O símbolo ** indica resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,01$; teste χ^2).

Análises de polimorfismos no gene *CXCL10* revelaram significância estatística em todos os SNPs selecionados para este estudo. O marcador *rs3921* apresentou diferença significativa na frequência genotípica ($p = 0,036$) e alélica ($p = 0,029$) entre indivíduos portadores de cicatrizes de lesão C e indivíduos controle sem lesão ocular (Tabela 11). A diferença entre a frequência dos genótipos CC *versus* GG se manteve significativa mesmo após

a correção de Bonferroni ($p_{\text{corrigido}}=0,03$) (Tabela 12). O genótipo GG e o alelo G foram os mais frequentes no grupo com lesão C (Figura 15A e 15B, respectivamente). A presença do genótipo GG estava associado a uma probabilidade aproximadamente 3 vezes superior de desenvolver lesões oculares do tipo C (OR=2,82; $p_{\text{corrigido}}=0,04$), enquanto a presença do alelo C em homozigose ou heterozigose conferiu redução da chance de desenvolver lesão B em 65% (OR=0,35; $p_{\text{corrigido}}=0,042$) (Tabela 12). O efeito protetor do alelo C é dominante, enquanto o aumento da susceptibilidade associado ao alelo G tem caráter recessivo (Tabela 12).

Para o marcador *rs4256246* do gene *CXCL10* observou-se diferença significativa na frequência alélica ($p=0,037$) entre indivíduos portadores de cicatrizes de lesão C e indivíduos que não apresentaram cicatrizes de lesão ocular (controle) (Tabela 11). O genótipo GG e o alelo G foi significativamente mais frequente nos indivíduos com lesão tipo C do que no grupo controle (Figura 15C e 15D, respectivamente). A presença do alelo G em homozigose estava associada a uma probabilidade 2,6 vezes maior de desenvolver lesão tipo C (OR=2,6; $p=0,046$). Por outro lado, a presença do alelo A em homozigose ou heterozigose reduziu em aproximadamente 60% a probabilidade de desenvolver lesão C (OR=0,38; $p=0,046$) (Tabela 13). O efeito protetor do alelo A, possivelmente, é dominante e o fenótipo "susceptibilidade aumentada" do alelo G recessivo, entretanto, os IC 95% se sobrepõem (Tabela 13).

O marcador *rs4508917* do gene *CXCL10* apresentou diferença significativa na frequência genotípica ($p=0,04$) entre indivíduos portadores de cicatrizes de lesão B e indivíduos soropositivos para toxoplasmose sem lesão ocular (Tabela 11). O genótipo GG e o alelo G foram os mais frequente no grupo com lesão B (Figura 15E e 15F, respectivamente). A presença do alelo G em homozigose estava associada a uma probabilidade 3 vezes maior de desenvolver lesões oculares do tipo B (OR=3,02; $p_{\text{corrigido}}=0,036$), enquanto a presença do alelo A em homozigose ou heterozigose conferiu redução da chance de desenvolver lesão B em aproximadamente 70% (OR=0,331; $p_{\text{corrigido}}=0,036$) (Tabela 14). O efeito protetor do alelo A é dominante, enquanto o aumento da susceptibilidade associado ao alelo G tem caráter recessivo (Tabela 14). As frequências observadas para os genótipos de todos os 3 SNPs

de *CXCL10* não diferiu das frequências esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) no grupo controle (Tabela 11).

Tabela 11: Análises de associação genética entre SNPs selecionados no gene de *CXCL10* e manifestação ocular da toxoplasmose.

SNP <i>CXCL10</i>	Grupos análises	Valor de p Teste χ^2		Valor de p (x3) <i>Bonferroni</i>		EHW (grupo controle)
		Alelo	Genótipo	Alelo	Genótipo	
<i>rs3921</i>	G1	0,545	0,793	1,635	2,379	0,17
	G2	0,141	0,094	0,423	0,282	
	G3	0,029	0,036	0,087	0,108	
<i>rs4256246</i>	G1	0,552	0,188	1,656	0,564	0,54
	G2	0,928	0,606	2,784	1,818	
	G3	0,037	0,121	0,111	0,363	
<i>rs4508917</i>	G1	0,312	0,202	0,936	0,606	0,41
	G2	0,122	0,04	0,366	0,12	
	G3	0,128	0,296	0,384	0,888	

Nota: valor de p com significância estatística em negrito ($p < 0,05$).

Tabela 12: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP *CXCL10_rs3921*.

	Lesão C (n=45)		Controle (n=258)		p	p (x3) <i>Bonferroni</i>	Odds Ratio	IC (95%)
	N	%	n	%				
CC	15	33	116	45	0,01	0,03	0,302	0,117 - 0,779
CG	21	47	121	47	0,046	0,138	0,405	0,163 - 1,004
GG	9	20	21	8			1	
C	51	57	353	68	0,029	0,087	0,604	0,382 - 0,953
G	39	43	163	32			1	
GG + GC	30	67	142	55	0,146	0,438	1,634	0,839 - 3,182
CC	15	33	116	45			0,612	0,314 - 1,192
GG	9	20	21	8	0,014	0,042	2,821	1,198 - 6,642
CC + GC	36	80	237	92			0,354	0,151 - 0,834

Nota: valor de p com significância estatística em negrito ($p < 0,05$).

Tabela 13: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão C e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP *CXCL10_rs4256246*.

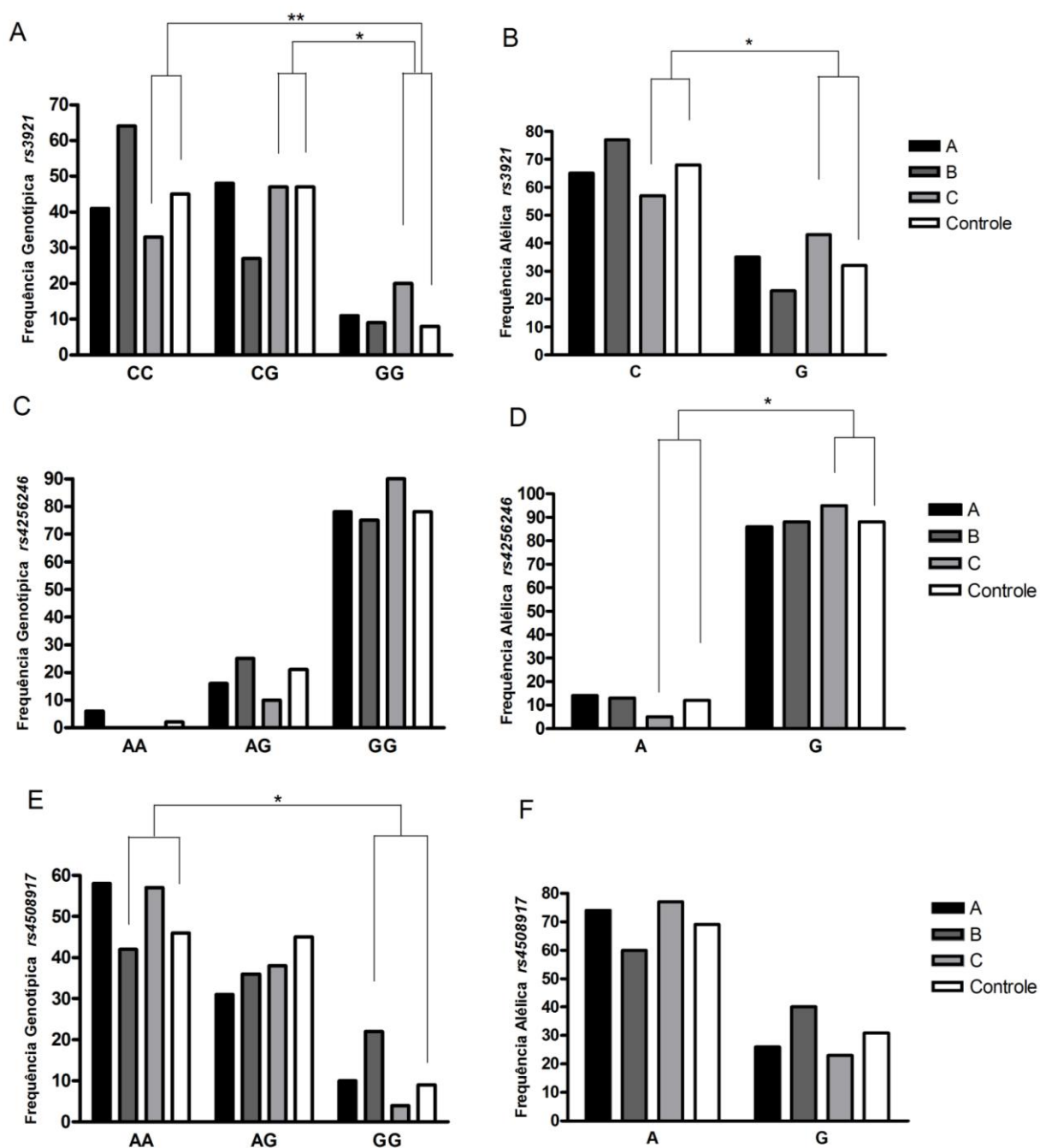
	Lesão C (n=50)		Controle (n=268)		<i>p</i>	<i>p (x3)</i> <i>Bonferroni</i>	Odds Ratio	IC (95%)
	n	%	n	%				
AA	0	0	5	2	0,299	0,897	0,416	0,023 - 7,674
AG	5	10	55	21	0,072	0,216	0,42	0,159 - 1,109
GG	45	90	208	78			1	
A	5	5	65	12	0,037	0,111	0,381	0,149 - 0,973
G	95	95	471	88			1	
GG + AG	50	100	263	98	0,33	0,99	2,108	0,115 - 38,75
AA	0	0	5	2			0,474	0,026 - 8,720
GG	45	90	208	78	0,046	0,138	2,596	0,986 - 6,833
AA + AG	5	10	60	22			0,385	0,146 - 1,014

Nota: valor de *p* com significância estatística em negrito ($p < 0,05$).

Tabela 14: Distribuição alélica e genotípica em indivíduos com cicatrizes de lesão B e indivíduos soropositivos sem lesão (controle) para SNP *CXCL10_rs4508917*.

	Lesão B (n=36)		Controle (n=266)		<i>p</i>	<i>p (x3)</i> <i>Bonferroni</i>	Odds Ratio	IC (95%)
	n	%	n	%				
AA	15	42	123	46			1	
AG	13	36	120	45	0,767	2,301	0,888	0,405 - 1,946
GG	8	22	23	9	0,028	0,084	2,852	1,085 - 7,501
A	43	60	366	69	0,122	0,366	0,672	0,406 - 1,115
G	29	40	166	31			1	
GG + AG	21	58	143	54	0,605	1,815	1,204	0,595 - 2,438
AA	15	42	123	46			0,830	0,410 - 1,681
GG	8	22	23	9	0,012	0,036	3,019	1,234 - 7,386
AA + AG	28	78	243	91			0,331	0,135 - 0,811

Nota: valor de *p* com significância estatística em negrito ($p < 0,05$).



Três SNPs avaliados neste trabalho apresentaram genótipos significativamente associados à probabilidade de desenvolver lesão B. São eles: genótipos CC e CG do SNP *rs1295687* (gene *IL13*); genótipo GT do SNP *rs7719175* (gene *IL13*) e genótipo GG do SNP *rs4508917* (gene *CXCL10*). Tendo em vista a influência destes polimorfismos na susceptibilidade à doença ocular, os indivíduos do estudo foram avaliados quanto ao número de genótipos de risco que apresentavam. Para isto, os indivíduos foram categorizados em: indivíduos com até um genótipo de risco ou indivíduos com dois ou mais genótipos de risco. A frequência de indivíduos com estes diferentes perfis de genótipo de risco foram comparadas entre os grupos de indivíduos com cicatrizes de lesão B e indivíduos controle sem lesão ocular (Figura 16A). Foi visto que o grupo portando cicatrizes de lesão B teve significativamente ($p < 0,0001$) maior frequência de indivíduos que apresentavam concomitantemente dois ou mais genótipos de risco para a doença ocular, enquanto o grupo sem lesão ocular tinha a maior frequência de indivíduos não portadores genótipo de risco ou portando apenas um (Figura 16A).

Quanto o desenvolvimento de lesão tipo C foi visto neste trabalho que quatro SNPs avaliados apresentaram genótipos significativamente associados a probabilidade de desenvolver a doença. São eles: genótipos CT e TT do SNP *rs3181035* (gene *IFNG*); genótipo AA do SNP *rs1861493* (gene *IFNG*), genótipo GG do SNP *rs3921* (gene *CXCL10*) e genótipo GG do SNP *rs4256246* (gene *CXCL10*). Neste caso, os indivíduos foram categorizados em três níveis: indivíduos que não apresentavam genótipo de risco, indivíduos com um ou dois genótipos de risco e indivíduos com mais de três genótipos de risco. Foi observado que a frequência de indivíduos no grupo de portadores de lesão C e grupo controle variou significativamente ($p = 0,0004$) quanto ao número de genótipos de risco (Figura 16B). Todos os indivíduos do grupo com lesão C apresentaram pelo menos um genótipo de risco para doença ocular e a frequência de indivíduos que apresentavam concomitantemente três ou mais genótipos de risco foi significativamente superior ao grupo sem lesão ocular (Figura 16B).

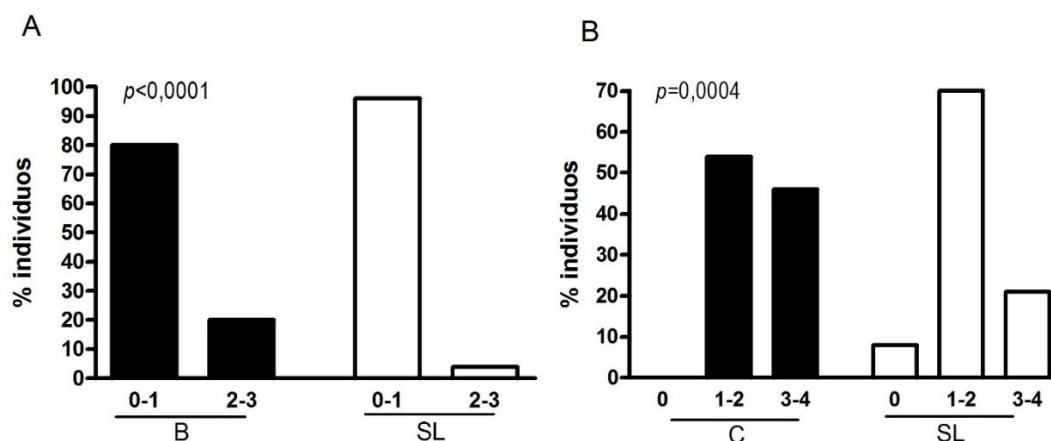


Figura 16: Frequência de indivíduos apresentando números variados de genótipos de risco em grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular (B ou C) e soropositivos para toxoplasmose não portadores de lesão (SL). **A:** Indivíduos apresentando até 1 (0-1) ou mais de 2 genótipos de risco (2-3) relacionados a lesão B; **B:** Indivíduos apresentando 0, até 2 (1-2) ou mais de 3 genótipos de risco (3-4) relacionados a lesão C. Valores de p foram obtidos pelo teste χ^2 .

5.3 Relação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos nos genes *IFNG* e *IL13* e produção das citocinas IFN- γ e IL-13

A fim de se estabelecer a relação entre genótipo e fenótipo, citocinas IFN- γ e IL-13 produzidas sob estímulo de STAg, por células sanguíneas de indivíduos soropositivos para toxoplasmose, independente da presença de lesão ocular, foram dosadas e a produção foi comparada entre os diferentes genótipos de SNPs nos genes *IFNG* e *IL13*. A análise dos gráficos de dispersão de pontos referentes à produção de IFN- γ e IL-13 (Figura 17 e 18, respectivamente) permitiu identificar grupamentos de indivíduos com valores mais elevados e valores mais baixos de produção para ambas as citocinas. Um ponto arbitrário de corte (*cut off*) foi determinado de acordo com a dispersão dos valores observados, tomando-se como base o padrão de distribuição do grupo de indivíduos apresentando cicatrizes de lesões oculares. Para a citocina IFN- γ foi estabelecido como *cut off* o valor 5000 (Figura 17) e para a citocina IL-13, o valor 200 (Figura 18). Os indivíduos pertencentes ao grupamento de valores mais elevados de IFN- γ (>5000) ou de IL-13 (>200) foram classificados como altos produtores de citocina e aqueles pertencentes ao grupamento de

valores abaixo da linha de corte foram classificados como baixos produtores de citocina.

Quanto ao percentual de indivíduos altos produtores de IFN- γ , foi visto que 22% dos indivíduos avaliados (21/95) apresentavam alta produção de IFN- γ . Em relação ao gene *IFNG* foi visto que para o SNP *rs2069718* (Figura 17A) todos os genótipos apresentaram produção de IFN- γ semelhante ($p=0,942$). Os genótipos AA e AG tiveram o maior percentual de indivíduos altos produtores, correspondendo a 26% (6/23) e 24,5% (13/53), respectivamente, de altos produtores dentro de cada um desses grupos (Figura 17A).

Para o marcador *rs3181035* foi observada maior produção de IFN- γ nos indivíduos portadores do genótipo TT, porém sem significância estatística ($p=0,539$), e cinquenta por cento (2/4) dos indivíduos que apresentaram este genótipo foram altos produtores de IFN- γ . Os genótipos CC e CT apresentaram 21% (14/66) e 19% (5/26), respectivamente, de indivíduos altos produtores de IFN- γ (Figura 17B).

Indivíduos com o genótipo AA do marcador *rs1861493* tiveram a maior produção de IFN- γ , mas esta diferença não foi significativa ($p=0,202$). Os genótipos AA e AG, por sua vez, apresentaram frequência semelhante de indivíduos altos produtores, 22% (16/74) e 25% (5/20), respectivamente. Nenhum indivíduo com o genótipo GG foi alto produtor de citocina (Figura 17C).

O marcador *rs2430561* teve como maior produtor de IFN- γ o genótipo TT, mas sem significância estatística ($p=0,384$). A maior frequência de indivíduos altos produtores de IFN- γ (25%; 10/44) foi observada em portadores desse genótipo, seguidos dos indivíduos portando o alelo T em heterozigose (20%; 9/44) e a menor frequência de altos produtores de IFN- γ (14%; 1/7) foi observada nos indivíduos com genótipo AA (Figura 17D).

Não foi observada relação ($p=0,989$) entre a produção de IFN- γ e os genótipos do marcador *rs2069705* (Figura 17E). A frequência de indivíduos altos produtores de IFN- γ foi praticamente a mesma entre os indivíduos portando os genótipos CC, CT e TT (22%, 22% e 21%, respectivamente).

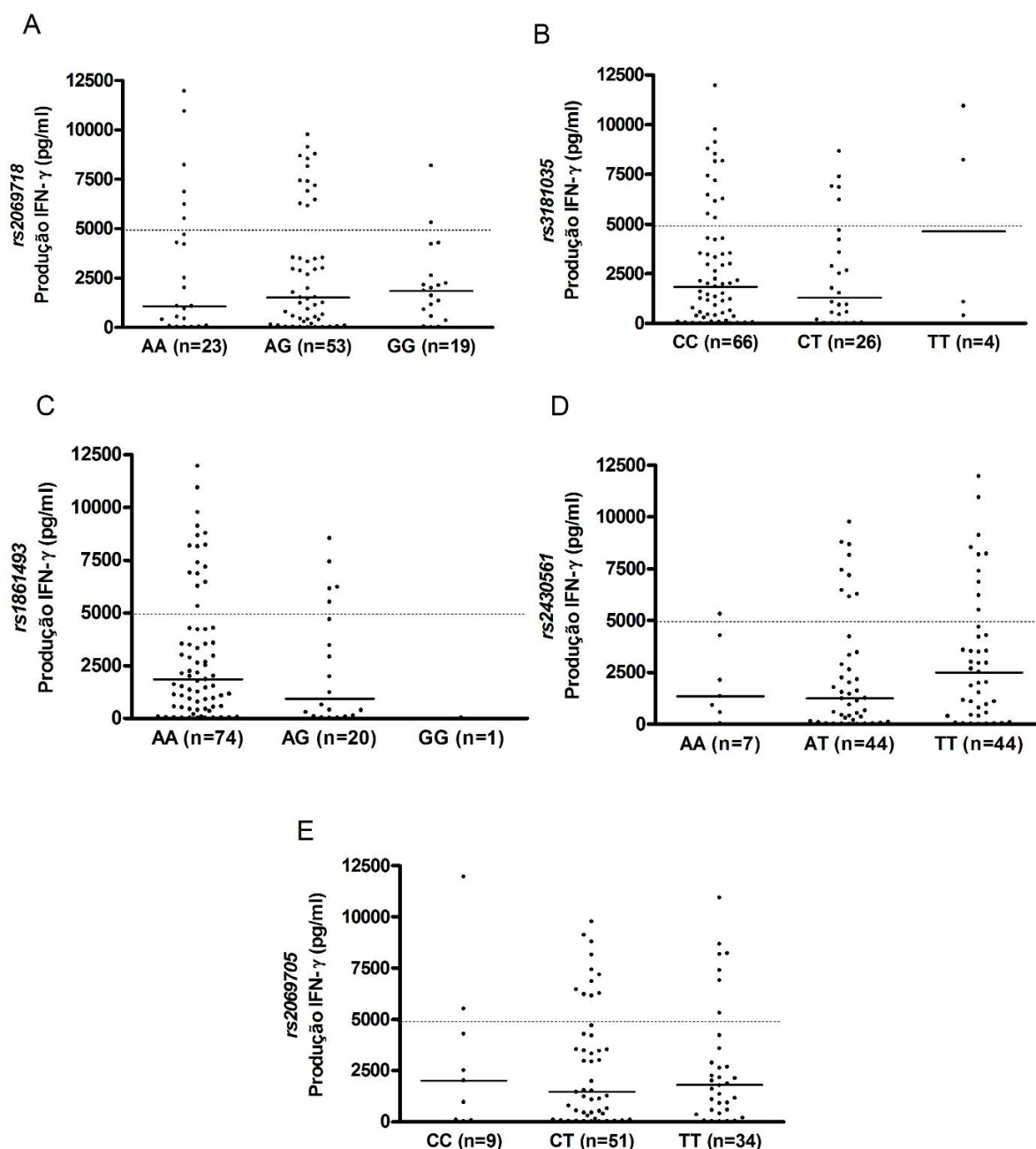


Figura 17: Relação entre genótipos de SNPs presentes no gene *IFNG* e produção de IFN- γ . **A:** Produção de IFN- γ associada aos genótipos do marcador *rs2069718*; **B:** Produção de IFN- γ associada aos genótipos do marcador *rs3181035*; **C:** Produção de IFN- γ associada aos genótipos do marcador *rs1861493*; **D:** Produção de IFN- γ associada aos genótipos do marcador *rs2430561* e **E:** Produção de IFN- γ associada aos genótipos do marcador *rs2069705*. As barras indicam valores de mediana e linha pontilhada indica valor de *cut off* (=5000), estabelecido para classificação dos indivíduos em alto ou baixo produtores de IFN- γ . Os testes estatísticos utilizados foram *Kruskal-Wallis* seguido de *Dunn*.

Quanto a IL-13 foi visto que 16,5% dos indivíduos avaliados (16/97) apresentavam alta produção desta citocina. Em relação aos genótipos foi observado que para o SNP *rs1295687*, os portadores do genótipo CC produziram maiores níveis de IL-13, mas sem significância estatística ($p=0,219$). Quanto à frequência de altos produtores de citocinas, os genótipos GG e CG tiveram o maior percentual de indivíduos (17%), sendo 12/72 e 4/23, respectivamente. Nenhum indivíduo com genótipo CC foi alto produtor de IL-13 (Figura 18A).

O marcador *rs1800925* teve como maiores produtores de IL-13 indivíduos portadores do genótipo TT, porém sem significância estatística ($p=0,182$). Portadores deste genótipo tiveram o maior percentual de indivíduos altos produtores de IL-13, correspondendo a 37,5% do grupo (3/8). Os genótipos CC e CT apresentaram 18% (8/45) e 12% (5/41), respectivamente, de indivíduos altos produtores de IL-13 (Figura 18B).

Para o marcador *rs7719175* a produção de IL-13 foi semelhante entre os genótipos ($p=0,69$). Quanto à frequência de altos produtores, foi observado que 19% (17/88) dos indivíduos com o genótipo TT tiveram o perfil de altos produtores de IL-13. Nenhum indivíduo com genótipo TG, por sua vez, foi alto produtor de citocina (Figura 18C).

Quanto ao marcador *rs3091307* foi observado que a produção de IL-13 foi estatisticamente maior nos indivíduos com os genótipos GG e AG ($p=0,039$). Em relação à frequência de altos produtores de IL-13 foi visto que 33% dos indivíduos portadores do genótipo GG (5/15) tinham alta produção desta citocina. Os genótipos AA e AG apresentaram 16% (6/37) e 11% (5/45), respectivamente, de indivíduos altos produtores (Figura 18D).

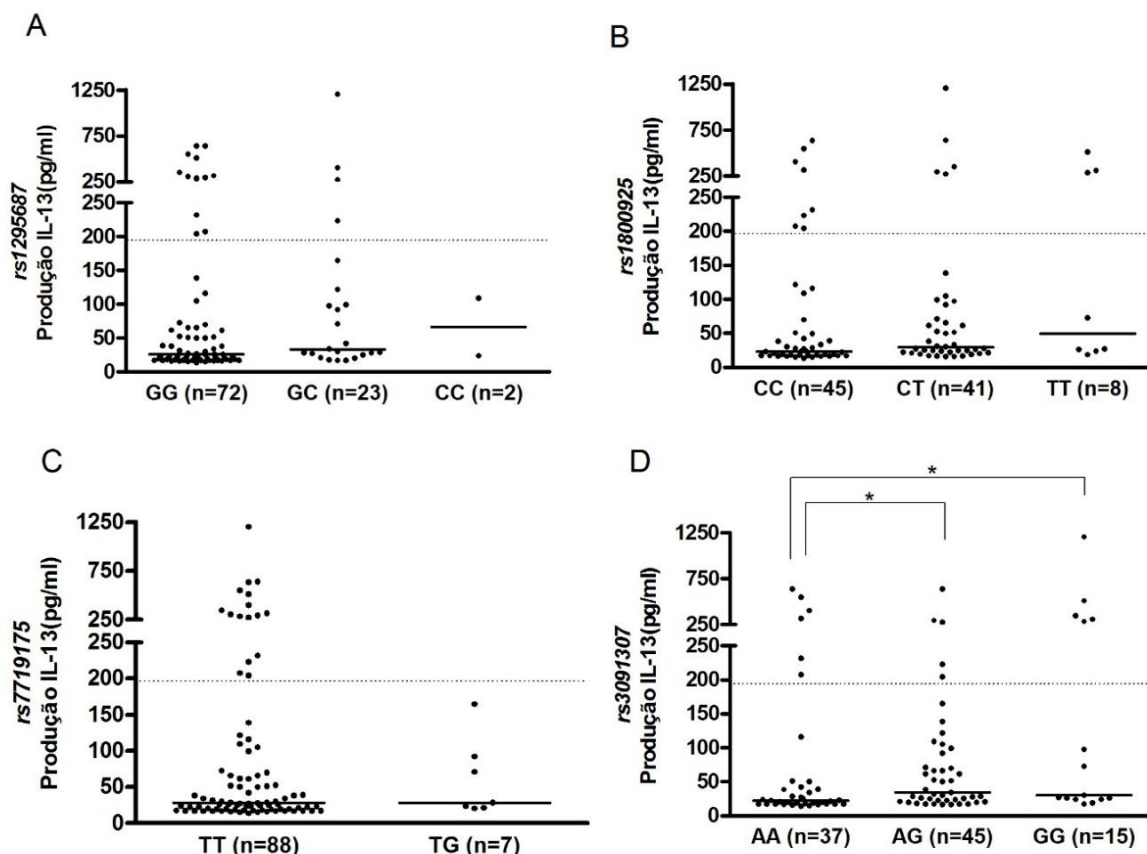


Figura 18: Relação entre genótipos de SNPs presentes no gene *IL13* e produção de IL-13. **A:** Produção de IL-13 associada aos genótipos do marcador *rs1295687*; **B:** Produção de IL-13 associada aos genótipos do marcador *rs1800925*; **C:** Produção de IL-13 associada aos genótipos do marcador *rs7719175* e **D:** Produção de IL-13 associada aos genótipos do marcador *rs3091307*. As barras indicam valores de mediana e linha pontilhada indica valor de *cut off* (=200), estabelecido para classificação dos indivíduos em alto ou baixo produtores de IL-13. Os testes estatísticos utilizados para comparação entre 3 genótipos foram *Kruskal-Wallis* seguido de *Dunn* e para comparação entre 2 genótipos foi *Mann-Whitney*.

5.3 Relação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos associados à toxoplasmose ocular e produção das citocinas IFN- γ e IL-13 em grupos de afetados e controles

A produção das citocinas IFN- γ e IL-13 foi então associada a polimorfismos nos genes *IFNG* e *IL13* que foram estatisticamente significativos em relação à propensão ao desenvolvimento de lesão ocular toxoplásmica. Os genótipos dos SNPs associados à doença foram relacionados aos níveis de

citocinas produzidos por células de indivíduos soropositivos para toxoplasmose sem lesão ocular (controle) e por células de indivíduos acometidos por lesão ocular (A, B ou C).

Em relação ao gene *IFNG* foi visto que para o SNP *rs2069718*, a produção de IFN- γ por portadores do genótipo AG, que confere proteção ao desenvolvimento de lesão A (Tabela 5), foi maior no grupo de indivíduos acometidos por este tipo de lesão ocular do que no grupo controle (Figura 19A).

Para o marcador *rs3181035* foi observado que a produção de IFN- γ por indivíduos carregando o genótipo CT, relacionado à manifestação clínica de lesões tipo C (Tabela 6), era maior no grupo de indivíduos com lesão ocular C quando estes eram comparados aos controles (Figura 19B).

Quanto ao SNP *rs1861493*, associado ao desenvolvimento de lesões oculares do tipo C (Tabela 7), a produção de IFN- γ por todos os genótipos deste marcador foi semelhante no grupo de indivíduos soropositivos sem lesão ocular (controle) e no grupo de indivíduos portadores de cicatriz de lesão C (Figura 19C).

Quanto a polimorfismos no gene *IL13* foi observado que para o marcador *rs1295687*, portadores do genótipo CG, relacionado às manifestações clínicas de lesões oculares tipo B (Tabela 9), tinham menor produção de IL-13 no grupo com lesão B do que no grupo controle (Figura 20A). Por outro lado, a alta produção de IL-13 por portadores do genótipo GG, relacionado à proteção (Tabela 9), não foi capaz de prevenir ao aparecimento da lesão tipo B (Figura 20A).

Para o marcador *rs7719175*, também associado à manifestação clínica de lesões tipo B (Tabela 10), foi visto que indivíduos do grupo acometido por lesão B, seja portadores do genótipo GT quanto do genótipo TT, produziram mais IL-13 do que o grupo controle (Figura 20B).

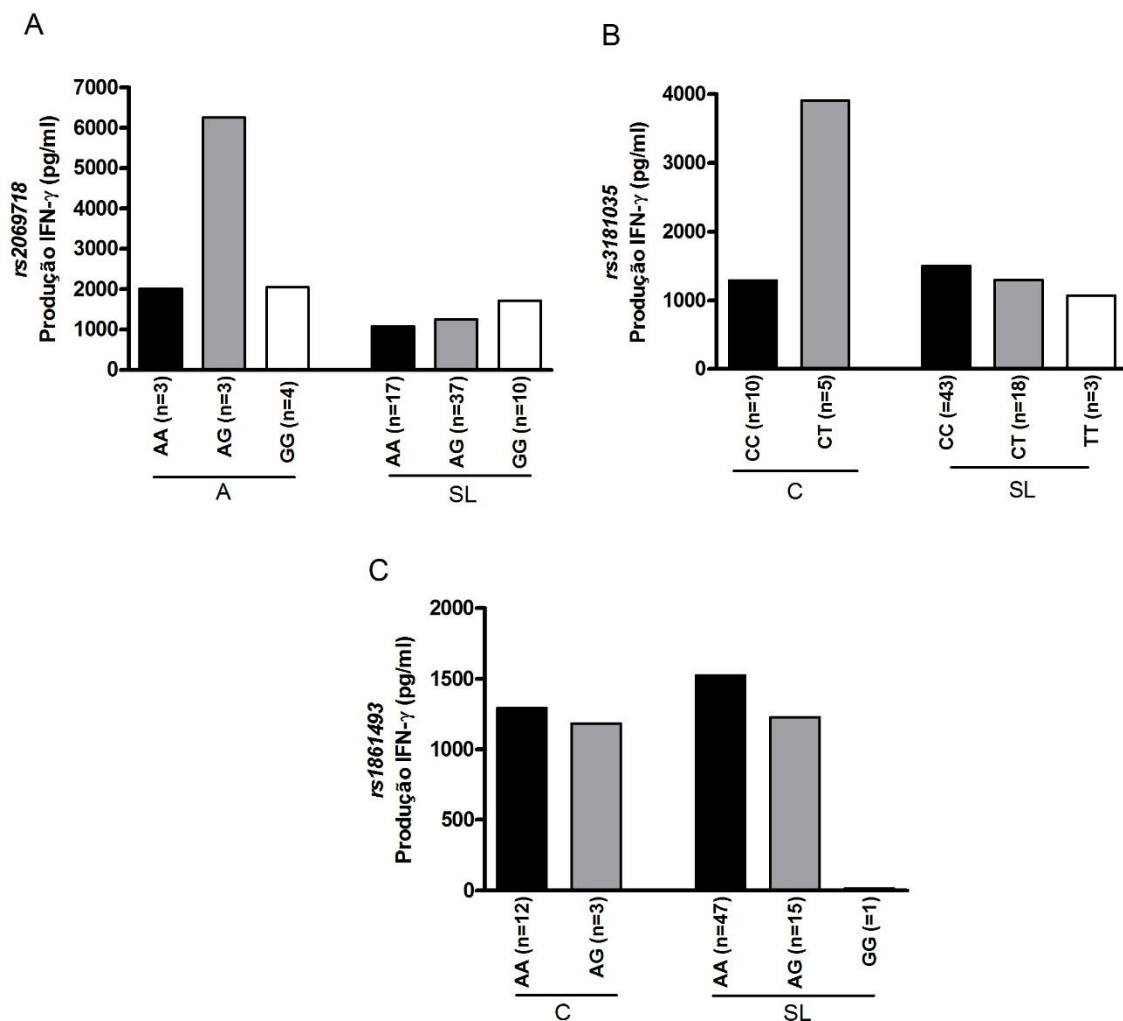


Figura 19: Associação entre a produção de IFN- γ em grupos de indivíduos afetados e controles e genótipos de SNPs no gene *IFNG* relacionados à toxoplasmose ocular. **A:** Produção de IFN- γ associada aos genótipos do marcador *rs2069718* em grupos de indivíduos com lesão A *versus* controle; **B:** Produção de IFN- γ associada aos genótipos do marcador *rs3181035* em grupos de indivíduos com lesão C *versus* controle; **C:** Produção de IFN- γ associada aos genótipos do marcador *rs1861493* em grupos de indivíduos com lesão B *versus* controle. As barras indicam valores de mediana.

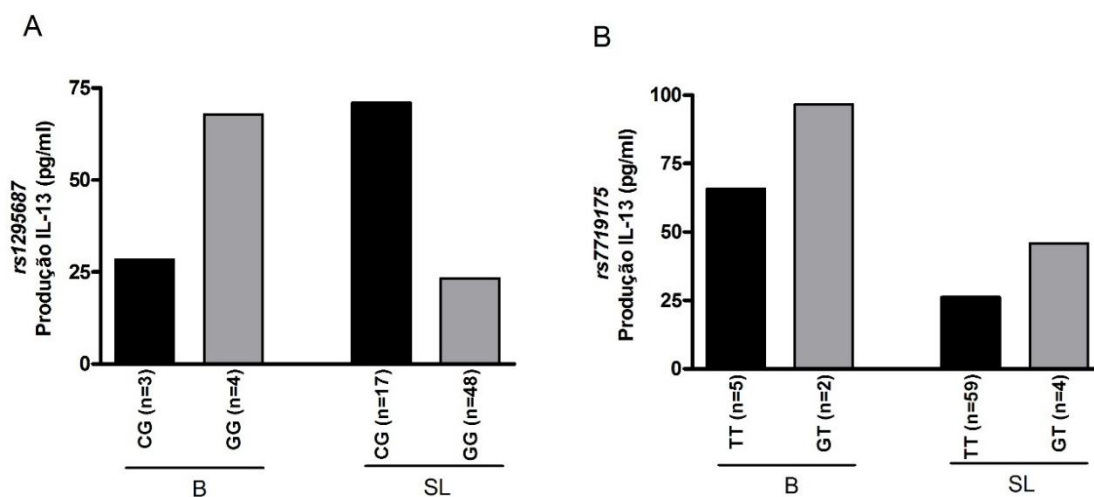


Figura 20: Associação entre a produção de IL-13 em grupos de indivíduos afetados e controles e genótipos de SNPs no gene *IL13* relacionados à toxoplasmose ocular. **A:** Produção de IL-13 associada aos genótipos do marcador *rs1295687* em grupos de indivíduos com lesão B *versus* controle; **B:** Produção de IL-13 associada aos genótipos do marcador *rs7719175* em grupos de indivíduos com lesão B *versus* controle. As barras indicam valores de mediana.

6 DISCUSSÃO

A toxoplasmose é considerada uma das mais comuns infecções parasitárias do mundo e estima-se que 30% da população mundial esteja infectada (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). Em Campos dos Goytacazes, a endemicidade da toxoplasmose é alta, atingindo 57,2% da população quando se considera conjuntamente as classes alta, média e baixa (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). No contingente populacional de baixo poder aquisitivo o nível de prevalência desta infecção atinge 84,8% (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

O presente estudo mostrou também ser alta, na cidade de Campos dos Goytacazes, a soroprevalência para toxoplasmose entre doadores de sangue abordados aleatoriamente no Hemocentro do Hospital Ferreira Machado: aproximadamente 70% dos doadores apresentaram sorologia positiva para *Toxoplasma gondii* (Figura 6). Neste trabalho, não foi avaliada a presença do parasita no sangue no momento da doação (infecção aguda), no entanto, a detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii* revela a alta prevalência da doença entre os doadores e aponta para o risco de transmissão de *T. gondii* por transfusão de sangue proveniente de indivíduos assintomáticos infectados pelo parasita. Relatos da literatura que mostram *T. gondii* circulando no sangue periférico de indivíduos cronicamente infectados por este parasita (Silveira *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012) confirmam o potencial da transmissão via doadores com toxoplasmose crônica. Além disso, o armazenamento do sangue nas unidades de refrigeração, após coleta, não pode evitar a transmissão, uma vez que o parasita pode sobreviver em sangue por 50 dias à 4°C (Kimball *et al.*, 1965; Räisänen, 1978). Há pouca informação sobre a epidemiologia da infecção por *T. gondii* em doadores de sangue no Brasil. Um estudo epidemiológico realizado em doadores de sangue de Recife mostrou prevalência similar à observada em Campos: 75% de um total de 120 indivíduos apresentaram sorologia positiva (IgG) para toxoplasmose (Coelho *et al.*, 2003). Em Natal, doadores de sangue apresentaram prevalência de 43,7% em um total de 183 indivíduos (De Araujo *et al.*, 1975).

A infecção por *T. gondii* em doadores de sangue representa um risco particularmente importante para transmissão a indivíduos imunocomprometidos ou imunossuprimidos que necessitem de transfusão, uma vez que para estes indivíduos a doença pode ser fatal. Segundo Tenter e colaboradores (2000), *T.*

gondii é um protozoário oportunista que provoca encefalite grave em até 40% dos pacientes com AIDS e 10-30% dos pacientes aidséticos infectados com *T. gondii* sucumbem à doença. Além, disso existe o risco da transmissão a mulheres grávidas soronegativas para *T. gondii*. Se o parasita é transmitido à mulher durante a gravidez, *T. gondii* pode também ser transmitida ao feto, com graves consequências (Tenter *et al.*, 2000). Cerca de 10% das infecções pré-natais resultam em aborto ou morte neonatal e os sinais da tríade clássica da toxoplasmose (retinocoroidite, calcificações intracranianas e hidrocefalia) se manifestam em até 10% dos recém-nascidos. Além disso, cerca de 12-16% dos recém-nascidos infectados morrem da doença (Tenter *et al.*, 2000). Os bebês que sobrevivem podem sofrer de retardo mental progressivo ou outras deficiências neurológicas, que muitas vezes, requerem educação especial e assistência residencial (Tenter *et al.*, 2000). Considerando que Campos dos Goytacazes é uma área altamente endêmica para toxoplasmose, pode ser adequado incluir a triagem para *T. gondii* no cronograma de testes pré-transfusionais para grupos que requerem atenção adicional (imunossuprimidos, imunocomprometidos, gestantes), uma vez que há o risco de morte caso haja contato com o parasita.

A manifestação clínica mais comum, em humanos imunocompetentes, decorrente da infecção pelo protozoário *Toxoplasma gondii* é a retinocoroidite, sendo esta a causa mais comum de uveíte posterior em várias partes do mundo, incluindo a América do Norte, América do Sul e regiões da Europa (Holland, 2003). Em Campos dos Goytacazes, Bahia-Oliveira e colaboradores (2012) mostraram que a prevalência da manifestação ocular da toxoplasmose pode atingir 30% da população soropositiva.

Foi proposto recentemente que parâmetros imunológicos e genéticos têm importante contribuição na diversidade das lesões oculares toxoplásmicas (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). Esta hipótese é reforçada pelos resultados do presente estudo, no qual se investigou se o perfil diferenciado de secreção das citocinas IFN- γ e IL-13, bem como se polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes que *IFNG*, *IL13* e *CXCL10*, estão associados à susceptibilidade ou proteção contra a retinocoroidite causada pela infecção por *T. gondii*. As citocinas são um grupo de proteínas moduladoras que se ligam a seus receptores em resposta a um estímulo, resultando na ativação de uma via de

transdução de sinal (Smith e Humphries, 2009). O nível basal de citocinas ou produzidas sob estímulo varia entre os indivíduos e tanto a influência ambiental quanto o *background* genético tem mostrado exercer função nesta variação (Smith e Humphries, 2009).

As citocinas avaliadas neste estudo pertencem a subconjuntos de células *T helper* distintos: o IFN- γ é a principal citocina do padrão Th1 de resposta imune e controla a resposta inflamatória contra patógenos intracelulares; as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 definem o padrão Th2 de resposta, o qual controla a resposta inflamatória do padrão Th1 (Abbas *et al.*, 2008). A infecção por *T. gondii* induz uma forte e persistente resposta Th1, marcada pela produção do IFN- γ , entre outras citocinas pró-inflamatórias como, IL-12 e TNF- α (Munoz *et al.*, 2011). Uma resposta imune efetiva contra os parasitas deve ser devidamente balanceada, caso contrário pode se tornar lesiva para o hospedeiro gerando processos de autoagressão. Isso é particularmente importante no contexto da toxoplasmose ocular, pois a resposta imunológica desenvolvida para o controle da multiplicação de *T. gondii* no olho pode desencadear quebra do privilégio imune e causar danos teciduais (Lyons *et al.*, 2001). Esse cenário elucida o importante papel de citocinas de padrões distintos (Th1 x Th2), como IFN- γ e IL-13 na toxoplasmose ocular: uma quantidade muito baixa de IFN- γ pode resultar em dano no tecido ocular por não ser capaz de conter a multiplicação do parasita. Por outro lado, o excesso desta citocina pode levar a mecanismos de autoagressão. Este papel paradoxal do IFN- γ já foi anteriormente descrito (Bahia-Oliveira *et al.*, 1998, Zaidi e Merlino, 2011). A citocina IL-13 desempenha importante papel no controle da resposta inflamatória Th1. O papel da IL-13 na resposta imune ocular já foi mostrada por Lemaitre (2001) em modelo experimental de uveíte induzida por endotoxina, em ratos. Foi demonstrado por este pesquisador que IL-13 modula a inflamação intraocular promovendo decréscimo de moléculas pró-inflamatórias (Lemaitre, 2001).

Foi visto no presente estudo, que as células sanguíneas provenientes de indivíduos soropositivos para *T. gondii*, independente da presença de cicatrizes de lesão ocular, apresentaram significativamente maior produção de IFN- γ e de IL-13 do que os indivíduos soronegativos, após estímulo com antígeno específico STAg. A razão entre os níveis de ambas as citocinas (IFN- γ /IL-13) foi também

calculada e revelou diferença significativa entre indivíduos soronegativos e soropositivos com presença ou ausência de cicatrizes de lesão ocular (Figura 7). Este resultado já era previsto, uma vez que linfócitos dos indivíduos soropositivos para *T. gondii* teriam a capacidade de responder (secretando citocinas, por exemplo) de forma rápida e efetiva, ao estímulo com antígenos do parasita, devido à persistência de populações clonais de linfócitos específicos resultantes de um contato prévio com *T. gondii* (memória imunológica). Esta análise, não responde, portanto, quanto à susceptibilidade às lesões oculares.

Os indivíduos soropositivos para toxoplasmose apresentando lesões oculares cicatrizadas foram, então, desmembrados em 3 grupos, tendo como critério o grau de destruição do tecido retiniano: cicatrizes da retina apresentando alto, médio ou baixo grau de severidade, foram identificadas como tipo A, B ou C, respectivamente. Indivíduos que apresentaram cicatrizes decorrentes de lesões múltiplas foram agrupados considerando a lesão de maior severidade. Nesta análise, foi possível observar que os grupos de indivíduos com cicatrizes do tipo A e do tipo B apresentaram o maior nível da citocina IFN- γ . Porém, quando avaliados os níveis de produção da citocina IL-13 foi visto que o grupo com cicatriz do tipo A apresentou novamente maior produção, mas o grupo com cicatrizes do tipo B, não apresentou alta produção da IL-13 como havia apresentado para o IFN- γ (Figura 8A e 8B). Quando calculada a razão entre as duas citocinas, observou-se que o grupo com cicatrizes do tipo B apresentou a mais alta razão IFN- γ /IL-13 (Figura 8C). Embora sem significância estatística, estes resultados podem indicar que as lesões que acometeram os indivíduos com cicatriz do tipo A tenham sido originadas por mecanismos de destruição do tecido retiniano distintos dos que ocasionaram as lesões nos indivíduos com cicatriz do tipo B. O cenário ideal é que os indivíduos produzam uma resposta Th1/Th2 equilibrada e adequada ao desafio antigênico. Porém, indivíduos que desenvolveram lesão tipo B parecem ter uma resposta desbalanceada, com predomínio da citocina pró-inflamatória IFN- γ , o que pode levar a destruição tecidual por mecanismos de autoagressão. O papel do IFN- γ em uveítes de origem autoimune já foi descrito por Hooks e colaboradores (1988). Segundo estes pesquisadores a presença da citocina IFN- γ , bem como de IL-2, estava associada a um infiltrado de linfócitos e ao aumento da expressão de moléculas

de MHC-II tanto em células do infiltrado como em células residentes como o epitélio pigmentar da retina e endotélio vascular retiniano de pacientes com uveíte (Hooks *et al.*, 1988). A função das moléculas de MHC-II é ligar peptídeos antigênicos e apresentá-los aos linfócitos, desencadeando a ativação destas células (Abbas *et al.*, 2008). Assim sendo, a citocina IFN- γ é requerida para modular a resposta imune do hospedeiro contra agentes infecciosos como *T. gondii*, mas, por outro lado, pode mediar processos imunopatológicos, levando a mecanismos de autoagressão.

Os indivíduos com cicatriz do tipo A, por sua vez, apresentaram a maior produção de IL-13 (Figura 8B) e a razão IFN- γ /IL-13 foi similar a dos indivíduos sem lesão ocular. Isso indica que os danos na retina neste grupo de indivíduos podem ter sido causados por mecanismos diferentes do que o proposto para indivíduos que desenvolveram lesão tipo B. Sugere-se a hipótese de que indivíduos que desenvolveram lesão A sofreram infecção intrauterina (congenita), sendo expostos ao parasita em condições desfavoráveis de defesa devido à imaturidade do sistema imunológico no momento da infecção. Nesta condição, dois possíveis mecanismos de lesão tecidual são sugeridos: 1) lesão por processos de autoagressão, possivelmente ocasionados por uma resposta inflamatória exacerbada, em decorrência de altos níveis de IFN- γ , incapaz de ser controlada pela citocina IL-13 ou 2) lesão por danos diretos causados replicação intensiva do *T. gondii* na retina, possivelmente devido à baixa produção de IFN- γ , regulado negativamente pela citocina IL-13.

Quanto aos indivíduos apresentando cicatrizes de lesões brandas (tipo C), foi visto que o padrão de secreção para ambas citocinas foi similar ao de indivíduos que não tiveram doença ocular (Figura 8A e 8B). Sugere-se, assim, que o perfil de resposta imune contra *T. gondii* exibida por indivíduos com cicatrizes do tipo C é capaz de conter a multiplicação parasitária e, ao mesmo tempo, manter uma resposta intraocular mais equilibrada, conseguindo evitar, dessa forma, danos severos aos tecidos oculares.

Posteriormente, foi avaliada a influência da idade no perfil de secreção de citocinas e conseqüentemente na severidade das lesões. Para isso, foi investigado, inicialmente, se o nível de produção das citocinas IFN- γ e IL-13 era influenciado pela idade, independente da presença de cicatrizes de lesão ocular. Níveis de citocinas produzidos, sob estímulo de STAg, por células sanguíneas de

indivíduos soropositivos para toxoplasmose agrupados em cinco faixas etárias distintas (< 40 anos, 40-59 anos, 60-69 anos, 70-79 anos e > 80 anos) foram comparados. Observou-se que há um decréscimo significativo na produção das citocinas IFN- γ (Figura 9A) e IL-13 (Figura 9B) com o avanço da idade. Diferença significativa foi observada também considerando apenas duas faixas etárias (< 60 anos e \geq 60 anos): tanto para IFN- γ quanto para IL-13 os níveis de citocinas foram significativamente maiores no grupo com menos de 60 anos (Figura 9C e 9D). A partir dos 60 anos se inicia a Terceira Idade, segundo a Organização Mundial de Saúde (Pereira *et al.*, 2003). Neste período a função imune parece estar alterada de um modo geral, processo conhecido como imunossenescência. Os resultados deste trabalho corroboram vários relatos da literatura que afirmam ser menor a produção das citocinas IFN- γ e IL-13 por indivíduos mais velhos (Abb *et al.*, 1984; Borrego *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2013; Krishnaraj e Bhooma, 1996; Mocchegiani e Malavolta, 2004; Pawelec *et al.*, 1998; Rink *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2013; Sugawara *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2011). O decréscimo das citocinas IFN- γ e IL-13 observado neste trabalho pode ser um dos motivos de a idade avançada ser maior fator de risco para o desenvolvimento de doença ocular entre indivíduos infectados por *T. gondii*, como descrito por Holland (2009) e Portela e colaboradores (2004). Bosch-Driessen e colaboradores (2002) mostraram que nos indivíduos com média de idade de 29,9 anos, a toxoplasmose ocular foi primeiramente vista quando estes tinham evidência sorológica de infecção adquirida remotamente. Já os indivíduos com média de idade de 50,6 anos a toxoplasmose ocular foi primeiramente detectada quando eles tiveram evidência sorológica de infecção recente. Esses dados sugerem que, em se tratando de uma primo-infecção pós natal, indivíduos mais velhos, de fato, estão sob maior risco de envolvimento ocular, do que indivíduos jovens. Os resultados aqui apresentados corroboram o que foi hipotetizado por Holland (2004), segundo o qual a diminuição da imunidade em indivíduos mais velhos poderia limitar reações inflamatórias levando a doença ocular mais severa por danos diretos.

Estas associações entre idade, resposta imune e susceptibilidade à toxoplasmose ocular podem ter implicações importantes para o tratamento da doença ocular. O método atual de tratamento das retinocoroidites toxoplásmica geralmente envolve um curso finito de uma ou mais drogas anti-*Toxoplasma*

gondii, podendo haver uso simultâneo de corticosteroides orais para reduzir o risco de danos nos tecidos associados à resposta inflamatória (Holland, 2009). Silveira e colaboradores (2002) propuseram, por sua vez, uma nova estratégia de tratamento que demonstrou reduzir a incidência de recidivas: um tratamento intermitente com drogas anti-*Toxoplasma gondii* a longo prazo. Esse tipo de profilaxia secundária poderia beneficiar pacientes idosos, os quais podem ter problemas com a terapia convencional. Segundo Holland (2009) as lesões grandes e de longa duração observada em pacientes idosos podem decorrer da replicação prolongada de parasitas, possivelmente devido a deficiências na resposta imune. Portanto, pode ser prudente retirar o uso concomitante dos corticosteroides em tais casos, para evitar maiores supressão das defesas do hospedeiro (Holland, 2009). Estudos adicionais se fazem necessários para expandir a compreensão e direcionar quais são as consequências práticas da associação entre envelhecimento e toxoplasmose ocular. Algumas questões práticas a serem respondidas são: 1) Há necessidade que o tratamento seja ajustado em função da idade do paciente? e 2) Existe diferença na resposta ao tratamento em função da idade? Esta questão é particularmente importante em estudos que comparam resposta ao tratamento, desconsiderando a idade dos indivíduos dos grupos avaliados, uma vez que esta pode ser uma variável que gere confusão nos resultados.

Investigada a influência da idade na produção de IFN- γ e IL-13, foi-se comparar os níveis dessas citocinas em diferentes faixas etárias em indivíduos agrupados quanto à ausência, presença e classificação das lesões oculares toxoplásmicas. Para isto indivíduos soropositivos para toxoplasmose sem cicatrizes de lesão ocular ou com cicatrizes de lesão tipo A, B ou C foram alocados em duas faixas etárias: menores que 60 anos ou indivíduos com idade a partir de 60 anos. Quando comparados os níveis de IFN- γ entre os diferentes grupos de lesões observou-se que a produção foi maior no grupo com menos de 60 anos apresentando cicatriz do tipo B, embora sem significância estatística, possivelmente devido ao número reduzido de indivíduos nos grupos (Figura 10A). Para melhor entender o balanço Th1/Th2 em diferentes faixas etárias, foi feito o cálculo de razão IFN- γ /IL-13, o qual mostrou que indivíduos com idade a partir dos 60 anos apresentando cicatriz do tipo B tinham a mais alta razão IFN- γ /IL-13, seguidos de indivíduos com menos de 60 anos apresentando cicatriz de lesão

tipo C e do tipo B (Figura 10C). Os valores de razão IFN- γ /IL-13 obtidos em indivíduos com menos de 60 anos apresentando cicatrizes de lesão C diferiram significativamente do observado em indivíduos a partir dos 60 anos com este mesmo tipo de lesão. Porém, os indivíduos mais jovens (< 60 anos) deste grupo tiveram valores de razão IFN- γ /IL-13 muito semelhantes aos indivíduos mais velhos (\geq 60 anos) do grupo com cicatrizes do tipo B (Figura 10C). Sugere-se que quando mais jovens, os indivíduos que desenvolvem lesões do tipo C, conseguem manter uma resposta imune desfavorável a replicação do parasita e devidamente regulada, resultando numa lesão mais branda. E embora tenham apresentado alta razão IFN- γ /IL-13, exibiram baixos níveis da citocina pró-inflamatória IFN- γ , a qual poderia ser facilmente contrabalanceada por outras citocinas anti-inflamatórias, além de IL-13. Tendo visto que o processo da imunossenescência vem acompanhado do decréscimo de produção de citocinas (Figura 9) pode-se supor que existam duas possibilidades de desfecho da doença ocular no grupo de indivíduos que apresentam lesão tipo C: na primeira, a condição de lesão de baixa severidade seria mantida pelo decréscimo de citocinas de maneira equilibrada, capaz de manter a latência de parasitas *T. gondii* alocados na retina e o equilíbrio Th1/Th2. Outra possibilidade seria que as alterações imunológicas, comuns durante o processo de envelhecimento, levassem a redução de citocinas anti-inflamatórias de forma dessincronizada com as citocinas pró-inflamatórias. Isso poderia culminar com a evolução da lesão C para uma lesão mais severa, como tipo B, explicando, assim, o padrão similar entre indivíduos com menos de 60 anos apresentando lesão C e indivíduos a partir de 60 anos com lesão B (Figura 10C). Para os demais grupos (sem lesão ocular e com cicatrizes de lesão A e B) não houve diferenças significativas entre as faixas etárias avaliadas.

Em relação aos parâmetros genéticos, foram avaliados neste trabalho polimorfismos de nucleotídeo único dos genes *IFNG*, *IL13* e *CXCL10*, que codificam, respectivamente, as moléculas IFN- γ , IL-13 e CXCL10. Segundo Smith e Humphries (2009), diferenças genéticas que resultem em alteração de estrutura ou do nível de expressão das citocinas podem levar a consequências patológicas evidentes, tais como aumento da susceptibilidade às infecções e determinação de desfecho de uma doença. Assim, torna-se pertinente avaliar

polimorfismos em genes de citocinas relacionadas à resposta imune a *T. gondii*.

A frequência alélica de 765 indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes/RJ para cinco SNPs presentes no gene *IFNG*, quatro SNPs no gene *IL13* e três SNPs no gene *CXCL10* foi calculada e comparada às frequências das populações CEU, com ascendência europeia e YRI, os lorubás africanos. Pôde-se observar que para os marcadores *rs2069718* e *rs2069705* presentes no gene *IFNG* (Tabela 1), *rs7719175* e *rs3091307*, presentes no gene *IL13* (Tabela 2) e *rs4256246* do gene *CXCL10* (Tabela 3), as frequência alélicas na população de Campos foram semelhantes à população CEU. Quanto ao SNP *rs4508917* do gene *CXCL10* (Tabela 3) foi visto que o alelo mais frequente nas três populações (alelo A) apresentava frequência mais baixa na população de Campos do que nas populações CEU e YRI, embora a frequência alélica na população de Campos tenha sido mais próxima da observada na população CEU. Por outro lado, a população de Campos dos Goytacazes apresentou frequência alélica mais próxima a população YRI apenas para o SNP *rs3921* presente no gene *CXCL10* (Tabela 3). Para os demais marcadores *rs31810135*, *rs1861493* e *rs2430561*, presentes no gene *IFNG* (Tabela 1) e *rs1295687* e *rs1800925* presentes no gene *IL13* (Tabela 2) a frequência alélica na população de Campos dos Goytacazes apresentou-se como intermediária entre as populações CEU e YRI.

Os dados obtidos neste trabalho estão coerentes com a história de formação da população brasileira, segundo a qual a diversidade genética da população é resultante da miscigenação de etnias ancestrais (Ribeiro, 1995). A diversidade étnica da população brasileira é resultado de pelo menos 500 anos de história, em que aconteceu a mistura de basicamente três grupos, são eles: os índios (povos nativos), os europeus (sobretudo portugueses) e os africanos (escravos) (Ribeiro, 1995). Estudos prévios com a população brasileira mostram que a linhagem do cromossomo Y tem uma maior contribuição europeia (Carvalho-Silva *et al.*, 2001) e, a linhagem mitocondrial, apresenta similar contribuição europeia, africana e ameríndia (Alves-Silva *et al.*, 2000). Um estudo realizado com marcadores autossômicos na população de São Paulo mostrou uma maior contribuição europeia (79%), seguida por africana (14%) e ameríndia (7%) (Ferreira *et al.*, 2006). Para os marcadores analisados

neste trabalho foi visto que para 50% (6/12) deles as frequências alélicas na população de Campos foi mais próxima a população CEU, para 8%(1/12), as frequências alélicas dos indivíduos de Campos foi similar a população YRI e para 42% (5/12) dos marcadores a população de Campos apresentou frequência intermediária entre as populações CEU e YRI.

A fim de se investigar a influência de polimorfismos de nucleotídeo único presentes nos genes *IFNG*, *IL13* e *CXCL10* na manifestação clínica de retinocoroidites causada pela infecção por *T. gondii*, as frequências alélicas e genotípicas de grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose exibindo cicatrizes de lesões do tipo A (n=49), B (n=36) ou C (n=50) foram comparadas às frequências do grupo controle, formado por indivíduos soropositivo sem lesão ocular (n=271).

A presença do genótipo GG do SNP *rs2069718*, localizado em região intrônica (íntron 3), estava associado a uma probabilidade 2,3 vezes superior de desenvolver lesões oculares do tipo A comparados com genótipos AA e AG, sendo esta diferença significativa mesmo após correção de Bonferroni (OR=2,3; $p_{\text{corrigido}}=0,04$) (Tabela 5). Inversamente, a presença do alelo A em homozigose ou heterozigose confere 60% a menos de chance de desenvolver lesões do tipo A (OR=0,43; $p_{\text{corrigido}}=0,04$). Relatos na literatura mostraram associação significativa entre polimorfismos neste marcador e susceptibilidade à tuberculose (Shen *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2014) e ao lúpus eritematoso (Kim *et al.*, 2010). Porém, não foram encontrados relatos sobre susceptibilidade à toxoplasmose, sendo esta relação descrita pela primeira vez neste trabalho.

A frequência de indivíduos altos produtores de IFN- γ (>5000 pg/ml), independente da presença de lesão ocular, foi maior entre os indivíduos com os genótipos de *rs2069718* associados à proteção da toxoplasmose ocular AA e AG, correspondendo a 26% (6/23) e 24,5% (13/53), respectivamente, dos indivíduos dentro dos grupos (Figura 17A). Isso reforça o papel do IFN- γ no controle da replicação do parasita. Segundo Sharton-Kersten e colaboradores (1996) a produção de IFN- γ é de extrema importância na resistência à infecção aguda por *Toxoplasma* e camundongos nocautes para IFN- γ não sobrevivem. Gazzinelli e colaboradores (1992) mostrou que o IFN- γ é o principal mediador da proteção contra *T. gondii* e a produção contínua desta citocina é necessária para a sobrevivência a longo prazo de camundongos infectados.

Contudo a mera associação dos genótipos com a predisposição a produção de altos ou baixos níveis de citocinas não é suficiente para explicar a manifestação da doença ocular toxoplásmica. Por isso, comparação adicional foi realizada entre a produção de citocinas no grupo controle e no grupo de indivíduos acometidos (lesão A, no caso do SNP *rs2069718*) levando em consideração os diferentes genótipos do marcador. Foi visto que para o SNP *rs2069718*, a produção de IFN- γ por portadores do genótipo AG, relacionado à proteção, foi maior no grupo de indivíduos acometidos por lesão ocular do tipo A do que no grupo controle (Figura 19A). Assim, levantamos duas hipóteses alternativas: 1) indivíduos com cicatrizes de lesão A portadores do genótipo AG (alto produtor de IFN- γ) podem ter adquirido a infecção congenitamente, época em que a imaturidade do sistema imune impediu esses indivíduos de responderem com uma alta produção de IFN- γ , responsável por evitar danos aos tecidos oculares causados pela multiplicação do parasita; 2) indivíduos que se infectaram no útero podem ter perdido ou nunca desenvolvido a capacidade de regular a produção de IFN- γ . Em consequência, eles exibem uma forte e destrutiva resposta inflamatória contra o parasita, o que pode levar ao aparecimento de lesões severas, como do tipo A, por mecanismos de autoagressão.

O marcador *rs2069718*, encontra-se em desequilíbrio de ligação com outros 2 SNPs também avaliados neste estudo: o *rs2430561*, localizado no íntron 1, que é um sítio de ligação para o fator de transcrição NF- κ B (Kim *et al.*, 2010) e o *rs2069705*, localizado na região promotora do *IFNG* (Cooke *et al.*, 2006). Estes últimos marcadores, por sua vez não apresentaram associação com os diferentes perfis clínicos da toxoplasmose ocular (Tabela 4). Albuquerque e colaboradores (2009), no entanto, mostraram que a presença do alelo A em homozigose do marcador *rs2430561* estava associada à susceptibilidade ao desenvolvimento da toxoplasmose ocular, não discriminando, portanto o tipo de lesão. Outros relatos da literatura mostraram associação deste marcador com vários tipos de doenças, entre elas: tuberculose (Shen *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2014), lúpus eritomatoso (Kim *et al.*, 2010, da Silva *et al.*, 2014), sepsi induzida por pneumonia (Wang *et al.*, 2014), lepra (Cardoso *et al.*, 2010, Silva *et al.*, 2014) e rejeição aguda de órgãos (Ge *et al.*, 2013). Contudo, assim como neste trabalho, não foi encontrada

associação entre polimorfismos no SNP *rs2430561* e inflamação ocular em decorrência da doença inflamatória sistêmica Vogt-Koyanagi-Harada (Horie *et al.*, 2007). Quanto ao marcador *rs2069705* também existem relatos na literatura de associação entre polimorfismos e susceptibilidade a doenças, tais como câncer de mama (Erdei *et al.*, 2010), lúpus eritematoso (Kim *et al.*, 2010) e sepsi (Wang *et al.*, 2014). Porém, não foram encontrados relatos quanto à toxoplasmose.

Embora os marcadores *rs2430561* e *rs2069705* não tenham apresentado associação com a manifestação ocular da toxoplasmose (Tabela 4), a relação destes marcadores com a produção de IFN- γ por indivíduos soropositivos para toxoplasmose, independente da presença de lesão foi avaliada. O marcador *rs2430561* teve como maior produtor de IFN- γ o genótipo TT, mas sem significância estatística. A maior frequência de indivíduos altos produtores de IFN- γ (25%; 10/44) também foi observada em portadores desse genótipo, seguidos dos indivíduos portando o alelo T em heterozigose (20%; 9/44) e a menor frequência de altos produtores de IFN- γ (14%; 1/7) foi observada nos indivíduos com genótipo AA (Figura 17D). Esse resultado corrobora vários trabalhos na literatura que mostraram associação entre os níveis de produção do IFN- γ e o SNP *rs2430561*. Segundo Pravica e colaboradores (2000), López-Maderuelo e colaboradores (2003), Henao e colaboradores (2006) e Dai e colaboradores (2006) o genótipo TT do marcador *rs2430561* está associado a altos níveis de produção de IFN- γ , o genótipo AT está associado a níveis intermediários de produção e o genótipo AA, a níveis de produção mais baixos.

Não foi observada relação entre a produção de IFN- γ e os genótipos do marcador *rs2069705* (Figura 17E). A frequência de indivíduos altos produtores de IFN- γ foi praticamente a mesma entre os indivíduos portando os genótipos CC, CT e TT (22%, 22% e 21%, respectivamente).

Outro marcador avaliado neste estudo que apresentou diferença estatística entre indivíduos portando ou não cicatrizes de lesão ocular toxoplásmica foi o SNP *rs3181035*, localizado em região intrônica do gene *IFNG* (Tabela 6). A presença do alelo T deste marcador em homozigose ou heterozigose está associado a uma probabilidade 2 vezes maior de desenvolver lesão ocular do tipo C (OR=2,1; $p=0,015$), enquanto a presença do

alelo C em homozigose está associada a uma probabilidade 50% menor de apresentar lesão tipo C (OR=0,47; $p=0,015$). Como observado na Tabela 6, o valor de p para este marcador, bem como para outros avaliados neste trabalho, perde a significância após a correção de Bonferroni. Porém, não se deve desconsiderar a importância deste resultado pois não existe um consenso entre epidemiologistas e estatísticos sobre este método de correção. A correção de Bonferroni é um método estatístico indicado para quando se realiza comparações múltiplas (Perneger, 1998). A correção é indicada porque a realização de testes múltiplos aumenta as chances de ocorrer erros do tipo I. Este tipo de erro consiste em rejeitar a hipótese nula quando a mesma é verdadeira, ou seja, o resultado apresenta significância estatística quando na verdade a significância aconteceu por acaso. Porém, de acordo com Perneger (1998) erros do tipo I não podem diminuir (pela aplicação da correção de Bonferroni, por exemplo) sem aumentar os erros tipo II, que são igualmente importantes. O erro do tipo II consiste em não rejeitar a hipótese nula quando de fato ela é falsa, de modo que as diferenças realmente importantes são consideradas como não significativas. Além disso, quando estudos de associação genética são conduzidos com vários SNPs, como neste trabalho, geralmente os testes realizados para cada SNP não são independentes, pois eles apresentam alta taxa de desequilíbrio de ligação (Gao *et al.*, 2008). Esta violação da independência limita a habilidade da correção de Bonferroni controlar efetivamente o erro do tipo I (Gao *et al.*, 2008). Outro problema relacionado ao ajuste de Bonferroni é que a correção considera a hipótese nula como universal, segundo a qual as hipóteses nulas de todos os testes realizados são verdadeiras ao mesmo tempo, o que raramente é de interesse ou utilidade para o pesquisador (Perneger, 1998). Por exemplo, para o gene *IFGN* a hipótese nula universal seria “O grupo controle e o grupo com doença ocular são idênticos para todos os cinco SNPs avaliados?” Sendo que o que interessa de fato é saber se são idênticos ou diferentes para cada marcador de forma independente. Este é o principal ponto fraco da correção de Bonferroni, pois a comparação realizada será interpretada de forma diferente de acordo com o número de marcadores avaliados pelo pesquisador (Perneger, 1998).

Foi visto ainda para o SNP *rs3181035* que, independente da presença de lesão ocular, os indivíduos que apresentaram o genótipo TT, associado à

susceptibilidade à lesão C, produziram os maiores níveis de IFN- γ , embora sem significância estatística. Além disso, o maior percentual de indivíduos altos produtores de IFN- γ estava associado ao genótipo TT (Figura 17B). Não existe relato na literatura associando genótipos desse marcador com níveis de produção de IFN- γ . Comparando a produção de citocinas entre grupo de indivíduos com cicatrizes de lesão C e o grupo controle, foi observado que a produção de IFN- γ por indivíduos com o genótipo CT, também relacionado à manifestação clínica de lesões tipo C, foi maior no grupo com lesão ocular C quando comparados ao grupo controle (Figura 19B). Sugere-se, que o aumento do IFN- γ notado no grupo acometido por lesão C pode levar ao desbalanço das respostas imune Th1/Th2 o que pode culminar com a manifestação da doença ocular. O IFN- γ tem importante papel na proteção da toxoplasmose ocular, porém, como já descrito para outras doenças (Bahia-Oliveira *et al.*, 1998, Zaidi e Merlino, 2011), em níveis exacerbados pode causar a destruição e lesão tecidual por mecanismos de autoagressão.

Para o marcador *rs1861493*, localizado no íntron 3, a presença do genótipo AA estava associado a uma probabilidade 3,4 vezes superior de desenvolver lesões oculares do tipo C (OR=3,38; $p_{\text{corrigido}}=0,025$) (Tabela 7). Inversamente, a presença do alelo G em homozigose ou heterozigose mostrou ser protetora, sendo que a probabilidade de indivíduos carregando o alelo G desenvolverem lesões do tipo C é 70% menor do que indivíduos com genótipo GG (OR=0,29; $p_{\text{corrigido}}=0,025$). Polimorfismos neste marcador já mostraram associação com o risco à tuberculose (Abhimanyu *et al.*, 2012) e a miopia inflamatória (Chinoy *et al.*, 2007), porém não foram encontrados relatos prévios sobre associação com a toxoplasmose.

Indivíduos com o genótipo AA para o SNP *rs1861493*, associado a lesão tipo C, tiveram a maior produção de IFN- γ , mas sem diferença significativa (Figura 17C). Esse resultado suscita novamente o contraditório papel do IFN- γ (proteção *versus* susceptibilidade) no aparecimento de lesões oculares. Quando avaliada a produção de IFN- γ no grupo de indivíduos com lesão C e grupo controle foi observado produção semelhante entres esses grupos para os genótipos AA e AG (Figura 19C).

Quanto ao gene *IL13* foi observada que para o marcador *rs1295687*, a presença do genótipo CC estava associado a uma probabilidade aproximadamente 6 vezes superior de desenvolver lesões oculares do tipo B, quando comparado com a presença do genótipos GG, sendo esta diferença significativa mesmo após correção de Bonferroni (OR=5,8; $p_{\text{corrigido}}=0,04$) (Tabela 9). A susceptibilidade do heterozigoto CG é intermediária (OR=1,943), um indício que há ausência de dominância. Já a presença do genótipo GG confere proteção à doença ocular (Tabela 9). Não foram encontrados relatos na literatura sobre este SNP, sendo este o primeiro trabalho a associar polimorfismos nesta região com manifestação de doença.

Em relação à produção da citocina IL-13 foi visto que, independente da presença de lesão ocular, os portadores do genótipo CC do SNP *rs1295687* produziram maiores níveis de IL-13, embora sem significância estatística. Porém, os genótipos GG e CG tiveram o maior percentual (17%) de indivíduos altos produtores de IL-13 e nenhum indivíduo com genótipo CC foi alto produtor desta citocina (Figura 18A), não ficando clara a relação entre genótipo e níveis de produção de citocinas. O número reduzido de indivíduos ($n=2$) carregando genótipo GG foi limitante para esta análise. A comparação da produção de IL-13 em grupos de acometidos por lesão B e grupo controle mostrou que portadores do genótipo CG, relacionado às manifestações clínicas de lesões oculares tipo B, tinham menor produção de IL-13 no grupo com lesão B do que no grupo controle (Figura 20A). Por outro lado, a alta produção de IL-13 por portadores do genótipo GG, relacionado à proteção (Tabela 9), não foi capaz de prevenir ao aparecimento da lesão tipo B (Figura 20A), indicando natureza multifatorial da doença.

Para o marcador *rs7719175*, localizado em região promotora, a presença do alelo G estava associada a uma probabilidade 4,4 vezes maior de desenvolver lesão tipo B (OR=4,36; $p_{\text{corrigido}}=0,012$), enquanto a presença do alelo T em homozigose conferiu redução da probabilidade de desenvolver lesão B em aproximadamente 80% (OR=0,23; $p_{\text{corrigido}}=0,012$) (Tabela 10). Isnard e colaboradores (2011) relataram associação de polimorfismos neste marcador com a infecção por *Schistosoma haematobium*.

Foi visto no presente trabalho que, independente da presença de lesão ocular, os indivíduos que apresentaram o genótipo TT para o marcador

rs7719175, associado à proteção ao desenvolvimento de lesão B, tiveram o maior percentual (19%) de altos produtores de IL-13 dentro do grupo. Por sua vez, nenhum indivíduo portando o alelo G, associado à susceptibilidade de lesão B, foi alto produtor da citocina IL-13 (Figura 18C). A maior produção de IL-13 por indivíduos portadores do alelo protetor T está de acordo com o que foi descrito por Van der Pouw Kraan e colaboradores (1999) e Isnard colaboradores (2011). Segundo estes pesquisadores o alelo T do SNP *rs7719175* liga-se ao mesmo fator de transcrição do alelo G, porém com maior afinidade. Isso reforça o papel do IL-13 no controle da inflamação intraocular e, portanto, na prevenção às lesões oculares. Controversamente, comparando a produção de IL-13 em grupos de indivíduos acometidos e controle, foi visto que indivíduos do grupo acometido por lesão B, portadores do genótipo GT ou TT, produziram mais IL-13 do que o grupo controle (Figura 20B). Assim sendo, não ficou claro nesse trabalho a relação entre o marcador *rs7719175* e a produção de IL-13.

Para os demais SNPs avaliados presentes no gene *IL13* (*rs1800925* e *rs3091307*) não foi observada significância estatística entre grupos de indivíduos acometidos por doença ocular toxoplásmica e indivíduos controles (Tabela 8). Porém, embora sem relação com a toxoplasmose ocular, foi avaliada a associação entre genótipo e produção de IL-13 para estes marcadores. O marcador *rs1800925*, localizado em região promotora, teve como maiores produtores de IL-13 indivíduos portadores do genótipo TT, porém sem significância estatística. Portadores deste genótipo tiveram ainda a maior frequência de indivíduos altos produtores de IL-13 (Figura 18B). O alelo T deste polimorfismo desfaz um sítio de metilação do DNA, que consiste na adição de um grupamento metil na citosina que precede a uma guanina (sítio CpG) na região promotora do gene (Smith e Humphries, 2009). O resultado do presente trabalho está de acordo com o que foi proposto por Cameron e colaboradores (2006). Estes pesquisadores mostraram que o alelo T acentua a atividade na região promotora em células T CD4⁺, subtipo Th2 e que indivíduos homocigotos para o alelo T secretavam os maiores níveis de IL-13 (Cameron et al. 2006). Vários trabalhos da literatura mostraram ainda a associação de polimorfismos do marcador *rs1800925* com doenças diversas, entre elas asma (Cui et al., 2012, Tsai et al., 2013), doença pulmonar obstrutiva crônica (Gong

et al. 2013), fibrose pulmonar (Ding *et al.*, 2013), malária (Ohashi *et al.*, 2003), infecções por *Schistosoma mansoni* (Grant *et al.*, 2012) e *Schistosoma haematobium* (Isnard *et al.*, 2011). Contudo, nenhum relato foi encontrado sobre estudo de associação com a toxoplasmose.

Quanto ao marcador *rs3091307*, também localizado em região promotora, foi observado que a produção de IL-13 foi estatisticamente maior nos indivíduos carregando os genótipos GG e AG. Em relação a frequência de altos produtores de IL-13 foi visto que 33% dos indivíduos portadores do genótipo GG (5/15) tinham o perfil de altos produtores desta citocina, contra 16% (6/37) e 11% (5/45) nos genótipos AA e AG, respectivamente (Figura 18D). Já foi descrito na literatura associação de polimorfismos do SNP *rs3091307* com a dermatite atópica (Namkung *et al.*, 2011) e com o parto prematuro (Harmon *et al.*, 2013), porém é a primeira vez que se descreve diferença estatística nos níveis de produção da citocina IL-13 em relação aos genótipos deste marcador.

Acerca do gene *CXCL10* foi visto que para o marcador *rs3921*, localizado na região 3' UTR, a presença do genótipo GG estava associado a uma probabilidade aproximadamente 3 vezes superior de desenvolver lesões oculares do tipo C quando comparado ao grupo sem lesão (OR=2,82; $p_{\text{corrigido}}=0,04$), enquanto a presença do alelo C em homozigose ou heterozigose conferiu redução da chance de desenvolver lesão C em 65% (OR=0,35; $p_{\text{corrigido}}=0,042$) (Tabela 12). Foi mostrado associação entre este marcador e a infecção por *Aspergillus fumigatus* após transplante de células tronco alogênica (Mezger *et al.*, 2008), progressão da esclerose múltipla (Galimberti *et al.*, 2007) e cardiopatia chagásica crônica (Nogueira *et al.*, 2012). Contudo há poucos estudos a respeito da associação de polimorfismos no gene *CXCL10* e doenças e nenhum relato foi encontrado em relação à toxoplasmose.

Para o marcador *rs4256246*, localizado em região promotora, a presença do alelo G em homozigose mostrou estar associada a uma probabilidade 2,6 vezes maior de desenvolver lesão tipo C (OR=2,6; $p=0,046$), enquanto a presença do alelo A em homozigose ou heterozigose reduziu em aproximadamente 60% a chance de desenvolver lesão C (OR=0,38; $p=0,046$) (Tabela 13). Não foram encontrados relatos na literatura de associação

significativa entre doenças com este marcador, que se encontra na região promotora.

O marcador *rs4508917* do gene *CXCL10*, localizado em região promotora, também apresentou associação com a toxoplasmose ocular. A presença do alelo G em homozigose para este marcador estava associada a uma probabilidade 3 vezes maior de desenvolver lesões oculares do tipo B (OR=3,02; $p_{\text{corrigido}}=0,036$), enquanto a presença do alelo A em homozigose ou heterozigose conferiu redução da probabilidade de desenvolver lesão B em aproximadamente 70% (OR=0,331; $p_{\text{corrigido}}=0,036$) (Tabela 14). Este SNP se encontra em região promotora e existe relato da sua associação com a malária cerebral (Wilson *et al.*, 2013). A presença do alelo G, observada neste trabalho estar relacionada à susceptibilidade à toxoplasmose ocular, mostrou-se associada a maiores níveis de produção da proteína CXCL10 (Wilson *et al.*, 2013). Como a quimiocina CXCL10 é secretada por células estimuladas com IFN- γ (Dufour *et al.*, 2002), supõe-se que maiores níveis desta quimiocina estão relacionados também a maiores níveis de IFN- γ . CXCL10 é quimioatraente para células T ativadas (Dufour *et al.*, 2002), indicando um possível mecanismo deletério para IFN- γ em pacientes com lesão tipo B: sugere-se que altos níveis de IFN- γ estejam associados a altos níveis de CXCL10 e conseqüentemente grande infiltração de células T no ambiente ocular. Uma vez que indivíduos com lesão B mostraram apresentar níveis baixos de IL-13 (Figura 8), a resposta contrarreguladora Th2 não seria suficiente para controlar a magnitude da inflamação. Esse desbalanço entre as respostas Th1/Th2 pode levar a destruição do tecido retiniano.

Contudo, não foram avaliados neste trabalho os níveis da quimiocina CXCL10 em sobrenadantes das células sanguíneas dos indivíduos com diferentes perfis de fundoscopia e sorologia para toxoplasmose. O material encontra-se estocado para dosagens futuras. Trabalhos na literatura têm mostrado a importância desta quimiocina na resposta imune a *T. gondii* e em uveítes de etiologia diversa. Brenier-Pinchart e colaboradores (2001) mostraram, em modelo experimental, que *T. gondii* é um potente indutor da expressão das quimiocinas CXCL10, além de CXCL9. Isto foi confirmado por Khan e colaboradores (2000), os quais viram que após desafio oral de camundongos com cistos de *T.gondii*, houve aumento nos níveis de RNAm

para CXCL10. A neutralização desta quimiocina em camundongos infectados inibiu o influxo de células T para os tecidos, além de prejudicar as funções efetoras destas células, resultando em um aumento da carga parasitária e mortalidade (Khan *et al.*, 2000). Outro estudo experimental evidenciou a expressão das quimiocinas CCL5, CXCL10 e CCL2, após 14 dias da imunização, no extrato de partes do segmento posterior de olhos com uveíte experimental autoimune (UEA). Os receptores CCR2, CCR5 e CXCR3 também foram expressos. Os dados desse trabalho sugeriram que essas quimiocinas poderiam contribuir para o recrutamento de linfócitos Th1 responsáveis pela resposta inflamatória na UEA (Keino *et al.*, 2003). Níveis de CXCL10 também foram significativamente maiores em indivíduos com uveíte em atividade quando comparados aos que apresentavam a forma inativa (Verma *et al.*, 1997). Em concordância com estes dados, El-Asrar e colaboradores (2004) mostraram que no humor aquoso de pacientes com uveíte em atividade, níveis mais elevados de CXCL10 foram detectados quando comparado com o grupo controle.

As respostas imunológicas dos indivíduos que apresentam lesões cicatrizadas causadas pela infecção por *T. gondii* ilustram a natureza multifatorial da toxoplasmose ocular. Além da genética do hospedeiro, fatores como questões ambientais, a idade dos indivíduos, a carga parasitária no hospedeiro e o *background* genético do parasita são igualmente importantes para a manifestação da doença. A resposta imune está sujeita as influências de cada um desses fatores, além dos não mencionados aqui ou desconhecidos, e o perfil de resposta montada pelo hospedeiro certamente afetará a apresentação clínica da toxoplasmose ocular. Em conjunto, os resultados deste trabalho (Quadro 6), levam a hipótese de que indivíduos com *background* genético para baixos produtores de IL-13 estão associados ao desenvolvimento de lesões do tipo B e os genótipos de risco para lesão C estão associados a maior frequência de altos produtores de IFN- γ . Quanto a lesão tipo A, sugere-se que tenham sido causadas por infecção intrauterina. No entanto, o perfil imunológico apresentado por estes indivíduos na fase adulta não reflete, necessariamente, as respostas imunes na época da infecção devido a imaturidade do sistema imunológico. Não ficou esclarecido, portanto, os mecanismos que levam às lesões do tipo A.

Quadro 6: Comparação entre parâmetros imunológicos e genéticos associados aos diferentes fenótipos de lesões oculares toxoplásmica.

Perfil Clínico	Perfil Imunológico		Perfil Genético	
	IFN- γ	IL-13	Genótipo de Risco	Frequência de Altos Produtores
Lesão A	+++	+++	GG (<i>rs2069718_IFNG</i>)	↓ IFN- γ
Lesão B	+++	+	CC (<i>rs1295687_IL13</i>)	↓ IL-13
			GG+GT (<i>rs7719175_IL13</i>)	↓ IL-13
			GG (<i>rs4508917_CXCL10</i>)	NA
Lesão C	+	+	CT+TT (<i>rs3181035_IFNG</i>)	↑ IFN- γ
			AA (<i>rs1861493_IFNG</i>)	↑ IFN- γ
			GG (<i>rs3921_CXCL10</i>)	NA
			GG (<i>rs4256246_CXCL10</i>)	NA

NA: não avaliada a produção da quimiocina CXCL10;

+++ alta produção de citocinas e + baixa produção de citocinas;

↓ menor frequência de altos produtores de citocinas e ↑ maior frequência de altos produtores de citocinas.

Como mostrado no quadro 6, oito de doze marcadores avaliados neste trabalho estavam significativamente associados à manifestação ocular da toxoplasmose. Os genótipos relacionados a maior probabilidade de se desenvolver doença ocular do tipo B são: genótipos CC e CG do SNP *rs1295687* (gene *IL13*); genótipo GT do SNP *rs7719175* (gene *IL13*) e genótipo GG do SNP *rs4508917* (gene *CXCL10*). A comparação entre grupo controle e grupo com cicatrizes de lesão ocular do tipo B mostrou que o grupo de acometidos por doença ocular teve significativamente ($p < 0,0001$) maior frequência de indivíduos apresentando concomitantemente dois ou mais genótipos de risco para a doença ocular, enquanto o grupo sem lesão ocular tinha a maior frequência de indivíduos não portadores de genótipo de risco ou com apenas um (Figura 16A).

O mesmo foi observado em relação às lesões do tipo C. Quatro SNPs avaliados apresentaram genótipos significativamente associados à susceptibilidade ao desenvolvimento da doença. São eles: genótipos CT e TT do SNP *rs3181035* (gene *IFNG*); genótipo AA do SNP *rs1861493* (gene *IFNG*),

genótipo GG do SNP *rs3921* (gene *CXCL10*) e genótipo GG do SNP *rs4256246* (gene *CXCL10*). Todos os indivíduos do grupo com lesão C apresentaram pelo menos um genótipo de risco para doença ocular e a frequência de indivíduos que apresentavam concomitantemente três ou mais genótipos de risco foi significativamente superior ($p=0,0004$) ao grupo sem lesão ocular (Figura 16B).

Os dados aqui apresentados mostraram que polimorfismos em genes de citocinas têm importante papel na modulação da resposta imune, conduzindo a diferentes desfechos a infecção por *T. gondii*. Presume-se que uma das possíveis formas de influência dos marcadores avaliados neste estudo sobre a doença ocular toxoplásmica seria o fato da mudança de nucleotídeo poder influenciar no *splicing* de RNA ou modificar a afinidade de um fator de transcrição pela região promotora, o que certamente poderá alterar os níveis de expressão das citocinas. Outra possível explicação é que o marcador não tenha influência direta sobre a doença, mas por ele estar em desequilíbrio de ligação (DL) com a verdadeira variante causal da doença.

Os resultados descritos no presente trabalho são muito promissores, no entanto, para esclarecer e confirmar a influência da idade e dos polimorfismos avaliados na resposta imune e conseqüentemente na susceptibilidade à toxoplasmose ocular, um estudo caso-controle deverá ser conduzido na seqüência deste trabalho, com casuística maior a fim de se ampliar o número de indivíduos estudados e conseqüentemente o poder estatístico das análises. Faz-se necessário estudar em maiores detalhes a produção concomitante de IFN- γ e IL-13 considerando o potencial de ambas as citocinas para eliminação do parasita e proteção contra danos no tecido retiniano. O melhor entendimento da dinâmica de produção destas citocinas, bem como da quimiocina CXCL10 induzida por IFN- γ , com o avanço da idade cria a perspectiva de se poder controlar os processos inflamatórios e possíveis lesões no tecido retiniano provenientes da infecção com toxoplasma

7 CONCLUSÕES

- Indivíduos com cicatrizes do tipo A apresentaram altos níveis das citocinas IFN- γ e IL-13. Sugere-se que estes indivíduos tenham sofrido infecção intrauterina, sendo expostos ao parasita em condições desfavoráveis de defesa, devido à imaturidade do sistema imunológico no momento da infecção. No entanto, o perfil imunológico apresentado por estes indivíduos na fase adulta não reflete, necessariamente, as respostas imunes na época da infecção. Não ficou claro, portanto, o mecanismo que leva às lesões do tipo A, podendo estas ser decorrentes de uma resposta inflamatória exacerbada ou por danos diretos causados pela multiplicação de *T. gondii* na retina;

- Já no grupo de indivíduos com cicatrizes do tipo B, observou-se alta produção IFN- γ , porém baixa produção IL-13. Sugere-se assim que estes indivíduos apresentem uma resposta Th1/Th2 desbalanceada, com alta produção de IFN- γ e baixa produção de IL-13, o que pode levar a destruição tecidual por mecanismos de autoagressão;

- Em indivíduos com cicatrizes tipo C, o padrão de secreção para citocinas IFN- γ e IL-13 é mais equilibrado, de forma que se consiga evitar danos severos ao tecido ocular e também à multiplicação do parasita;

- A idade parece ser um importante fator de risco para doença ocular, uma vez que foi observado decréscimo significativo na produção das citocinas IFN- γ e IL-13 com o avanço da idade. Associações entre idade, resposta imune e susceptibilidade a toxoplasmose ocular podem ter implicações importantes para o tratamento da doença ocular toxoplásmica em idosos. A frequência alélica da maioria dos marcadores avaliados mostrou-se intermediária entre as populações de ascendência europeia e africana ou mais próxima da população com ascendência europeia;

- Foram verificadas associações significativas entre toxoplasmose ocular e SNPs nos genes *IFNG*, *IL13* e *CXCL10*, evidenciando o papel destas moléculas no controle da replicação parasitária e proteção contra danos no tecido retiniano;

- Considerando o potencial das citocinas IFN- γ , IL-13 e CXCL10, faz-se pertinente estudar em maiores detalhes a produção concomitante destas moléculas, na perspectiva de se poder controlar os processos inflamatórios e possíveis lesões no tecido retiniano provenientes da infecção por *Toxoplasma gondii*.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABB J, ABB H, DEINHARDT F. Age-related decline of human interferon alpha and interferon gamma production. *Blut* 48: 285–289, 1984.
- ABHIMANYU, BOSE M, JHA P. Footprints of genetic susceptibility to pulmonary tuberculosis: cytokine gene variants in north *Indians*. *Indian J. Med. Res.* 135: 763–770, 2012.
- ALBUQUERQUE MC DE, ALEIXO ALQDC, BENCHIMOL EI, LEANDRO ACCS, NEVES LB DAS, VICENTE RT, BONECINI-ALMEIDA MDG, AMENDOEIRA MRR. The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 451–455, 2009.
- ALEIXO A, BENCHIMOL E, NEVES E, SILVA C, COURA L, AMENDOEIRA M. Frequency of lesions suggestive of ocular toxoplasmosis among a rural population in the State of Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42: 165–169, 2009.
- ALEXANDER J, HUNTER CA. Immunoregulation during toxoplasmosis. *Chem Immunol* 70: 81-102, 1998.
- ALVES-SILVA J, SILVA SANTOS M DA, GUIMARÃES PE, FERREIRA A C, BANDELT HJ, PENA SD, PRADO VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 444–461, 2000.
- BAHIA-OLIVEIRA L, RANGEL, ALP, BOECHAT, MSB, MANGIAVACCHI, BM, MARTINS, LM, FERRAZ, FB, ALMEIDA, MB, PEIXOTO, EMW, VIEIRA, FP, PEIXE R. Immunological and Immunogenetic Parameters on the Diversity of Ocular Toxoplasmosis: Evidence to Support Morphological Criteria to Classify Retinal / Retinochoroidal Scar Lesions in Epidemiologic Surveys. In: *Toxoplasmosis – Recent Adv.* pp. 145–172, 2012.
- BAHIA-OLIVEIRA LMG, SILVA JA DA, PEIXOTO-RANGEL AL, BOECHAT MSB, OLIVEIRA AMWA, MASSARA CL, PEIXE RG. Host immune response to *Toxoplasma gondii* and *Ascaris lumbricoides* in a highly endemic area: evidence of parasite co-immunomodulation properties influencing the outcome of both infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 273–280, 2009.

- BAHIA-OLIVEIRA LMG, JONES JL, AZEVEDO-SILVA J, ALVES CCF, ORÉFICE F, ADDISS DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 55–62, 2003.
- BAHIA-OLIVEIRA LMG, OLIVEIRA AMWA, SILVA JA, OREFICE F. Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. In *Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. International Journal for Parasitology* 31: 133–136, 2001.
- BAHIA-OLIVEIRA LM, GOMES JA, ROCHA MO, MOREIRA MC, LEMOS EM, LUZ ZM, PEREIRA ME, COFFMAN RL, DIAS JC, CANÇADO JR, GAZZINELLI G, CORRÊA-OLIVEIRA R. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 31: 127–131, 1998.
- BARRAGAN A, SIBLEY LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology* 11: 426 – 430, 2003.
- BARRETT JC, FRY B, MALLER J, DALY MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263–265, 2005.
- BHOPALE GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes Infect* 5: 457-462, 2003.
- BLISS SK, MARSHALL AJ, ZHANG Y, DENKERS EY. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J Immunol* 162: 7369-75, 1999.
- BOHNE W, HEESEMANN J, GROSS U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect. Immun.* 62: 1761–1767, 1994.
- BORREGO F, ALONSO MC, GALIANI MD, CARRACEDO J, RAMIREZ R, OSTOS B, PEÑA J, SOLANA R. NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp. Gerontol.* 34: 253–265, 1999.

- BOSCH-DRIESSEN LEH, BERENDSCHOT TTJM, ONGKOSUWITO JV, ROTHOVA A. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. *Ophthalmology* 109: 869–878, 2002.
- BOYER KM, HOLFES E, ROIZEN N, SWISHER C, MACK D, REMINGTON J, WITHERS S, MEIER P, MCLEOD R. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: Implications for prenatal management and screening. *Am J Obstet Gynecol.*192: 564-571, 2005.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254,1976.
- BRENIER-PINCHART M, PELLOUX H, DEROUICH-GUERGOUR D, AMBROISE-THOMAS P. Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. *Trends Parasitol.* 117: 292-296, 2001.
- BRÜCK P, BARTSCH W, PENNA-MARTINEZ M, KAHLES H, SEIDL C, BÖHME A, BADENHOOP K, RAMOS-LOPEZ E. Polymorphisms of CXCR3-binding chemokines in type 1 diabetes. *Hum. Immunol.* 70: 552–555, 2009.
- BURGNER D, JAMIESON SE, BLACKWELL JM. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect. Dis.* 6: 653–663, 2006.
- CAMERON L, WEBSTER RB, STREMPER JM, KIESLER P, KABESCH M, RAMACHANDRAN H, YU L, STERN D A, GRAVES PE, LOHMAN IC, WRIGHT AL, HALONEN M, KLIMECKI WT, VERCELLI D. Th2 cell-selective enhancement of human IL13 transcription by IL13-1112C>T, a polymorphism associated with allergic inflammation. *J. Immunol.* 177: 8633–8642, 2006.
- CARDOSO CC, PEREIRA AC, BRITO-DE-SOUZA VN, DIAS-BAPTISTA IM, MANIERO VC, VENTURINI J, VILANI-MORENO FR, SOUZA FC DE, RIBEIRO-ALVES M, SARNO EN, PACHECO AG, MORAES MO. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum. Genet.* 128: 481–490, 2010.

- CARNAUD C, LEE D, DONNARS O, PARK SH, BEAVIS A, KOEZUKA Y, BENDELAC A. Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* 163: 4647–4650, 1999.
- CARVALHO-SILVA DR, SANTOS FR, ROCHA J, PENA SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 281–286, 2001.
- CATHIE IAG. Toxoplasmosis in childhood. *Lancet* 266: 813-814, 1954.
- CHIARI C, NEVES DP. Human toxoplasmosis acquired by ingestion of goat's milk. *Men. Inst. Oswaldo Cruz.* 79: 337-340, 1984.
- CHINOY H, SALWAY F, JOHN S, FERTIG N, TAIT BD, ODDIS C V, OLLIER WER, COOPER RG. Interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms in Caucasian idiopathic inflammatory myopathy patients in UK. *Ann. Rheum. Dis.* 66: 970–973, 2007.
- COÊLHO RAL, KOBAYASHI M, CARVALHO JR. LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 45, 2003.
- COMMINS SP, BORISH L, STEINKE JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: S53–72, 2010.
- COOKE GS, CAMPBELL SJ, SILLAH J, GUSTAFSON P, BAH B, SIRUGO G, BENNETT S, MCADAM KPWJ, SOW O, LIENHARDT C, HILL AVS. Polymorphism within the interferon-gamma/receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174: 339–343, 2006.
- COUPER KN, ROBERTS CW, BROMBACHER F, ALEXANDER J, JOHNSON LL. *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. *Infect. Immun.* 73: 8060–8068, 2005.
- COUTO JCF, AVELINO MM, FERREIRA QT. In: *Infecções Perinatais*. Guanabara/Koogan, 2006.
- CUI L, JIA J, MA C-F, LI S-Y, WANG Y-P, GUO X-M, LI Q, YU H-B, LIU W-H, GAO L-B. IL-13 polymorphisms contribute to the risk of asthma: a meta-analysis. *Clin. Biochem.* 45: 285–288, 2012.

- DA GAMA LM, RIBEIRO-GOMES FL, GUIMARÃES JR U, ARNHOLDT ACV. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection* 6: 1287–1296, 2004.
- DA SILVA HDA, DA SILVA AP, DA SILVA HA, ASANO NMJ, MAIA M DE MD, DE SOUZA PRE. Interferon gamma and Interleukin 10 polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Mol. Biol. Rep.* 2014.
- DAI C-Y, CHUANG W-L, HSIEH M-Y, LEE L-P, HOU N-J, CHEN S-C, LIN Z-Y, HSIEH M-Y, WANG L-Y, TSAI J-F, CHANG W-Y, YU M-L. Polymorphism of interferon-gamma gene at position +874 and clinical characteristics of chronic hepatitis C. *Transl. Res.* 148: 128–133, 2006.
- DE ARAUJO IF, ANNA BS, HYAKUTAKE S. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in blood donors of Natal (RN). *Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo* 13: 417–425, 1975.
- DE BOER JH, LIMPENS J, ORENGO-NANIA S, DE JONG PT, LA HEIJ E, KIJLSTRA A. Low mature TGF-beta 2 levels in aqueous humor during uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35: 3702-3710, 1994.
- DENKERS EY. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39: 193–203, 2003.
- DENKERS EY, SHER A. Role of natural killer and NK1+ T-cells in regulating cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Biochem Soc Trans* 25: 699-703, 1997.
- DESMONTS G, COUVREUR J. Congenital Toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *New England J. Med.* 4: 1110-1116, 1974.
- DING M, SHENG H, SHEN W, ZHEN J, XI L, ZENG J, ZHANG Y, WU D, DENG L. Association of the SNP rs1800925(C/T) in the interleukin-13 gene promoter with pulmonary function in Chinese Han patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Biochem. Biophys.* 67: 905–909, 2013.
- DODDS EM, HOLLAND GN, STANFORD MR, YU F, SIU WO, SHAH KH, DAM-VAN LOON N TEN, MUCCIOLI C, HOVAKIMYAN A, BARISANI-ASENBAUER T. Intraocular inflammation associated with ocular

- toxoplasmosis: relationships at initial examination. *Am. J. Ophthalmol.* 146: 856–865, 2008.
- DUBEY JP. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J Parasitol.* 82: 957-961, 1998.
- DUBEY JP, JENKINS MC, THAYER DW, KWOK CH, SHEN SK. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. *Journal of Parasitology* 82: 724-727, 1996.
- DUBEY JP, BEATTIE CP. *Toxoplasmosis of animals and man.* CRC, Boca Raton, 1988.
- DUBEY JP, CHRISTIE E, PAPPAS PW. Characterization of *Toxoplasma gondii* from the feces of naturally infected cats. *J Infect Dis.* 136: 432-435, 1977.
- DUBEY JP, MILLER NL, FRENKEL JK. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 157: 1767-1770, 1970.
- DUFOUR JH, DZIEJMAN M, LIU MT, LEUNG JH, LANE TE, LUSTER AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J. Immunol.* 168: 3195–3204, 2002.
- DUTRA MS, BÉLA SR, PEIXOTO-RANGEL AL, FAKIOLA M, CRUZ AG, GAZZINELLI A, QUITES HF, BAHIA-OLIVEIRA LMG, PEIXE RG, CAMPOS WR, HIGINO-ROCHA AC, MILLER NE, BLACKWELL JM, ANTONELLI LR, GAZZINELLI RT. Association of a NOD2 gene polymorphism and T-helper 17 cells with presumed ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 207: 152–163, 2013.
- DUTRA WO, MOREIRA PR, SOUZA PE A, GOLLOB KJ, GOMEZ RS. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: lessons learned from oral diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20: 223–232, 2009.
- EL-ASRAR AMA, STRUYF S, DESCAMPS FJ, AL-OBEIDAN SA, PROOST VAN DAMME J, OPDENAKKER G, GEBOES K. Chemokines and gelatinases in the aqueous humor of patients with active uveitis. *Am. J. Ophthalmol.* 138: 401-411, 2004.
- ERDEI E, KANG H, MEISNER A, WHITE K, PICKETT G, BACA C, ROYCE M, BERWICK M. Polymorphisms in cytokine genes and serum cytokine

- levels among New Mexican women with and without breast cancer. *Cytokine* 51: 18–24, 2010.
- FERGUSON DJP. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 133-148, 2009.
- FERGUSON DJP, HUTCHISON WM, SIIM JC. The ultrastructural development of the macrogamete and formation of oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect.* 83: 491-505, 1975.
- FERREIRA LB, MENDES-JUNIOR CT, WIEZEL CEV, LUIZON MR, SIMÕES AL. Genomic ancestry of a sample population from the state of São Paulo, Brazil. *Am. J. Hum. Biol.* 18: 702–705, 2006.
- FRENKEL JK. Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology and immunology. In: *The Coccidia. Eimeria, Isospora, Toxoplasma and Related Genera.* University Park Press, Baltimore, 343, 1973.
- FRENKEL JK, WEBER RW, LUNDE MN. Acute toxoplasmosis. Effective treatment with pyrimethamine, sulfadiazine, leucovorin, calcium, and yeast. *JAMA.* 173: 1471-1476, 1960.
- FRIEDMANN CT, KNOX DL. Variations in recurrent active toxoplasmic retinochoroiditis. *Arch. Ophthalmol.* 81: 481-493, 1969.
- FRUCHT DM, FUKAO T, BOGDAN C, SCHINDLER H, O'SHEA JJ, KOYASU S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 22: 556–560, 2001.
- FUTUYMA, D. J. *Biologia Evolutiva.* Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética /CNPq, 1992.
- GALIMBERTI D, SCALABRINI D, FENOGLIO C, COMI C, RIZ M DE, VENTURELLI E, LOVATI C, MARIANI C, MONACO F, BRESOLIN N, SCARPINI E. CXCL10 haplotypes and multiple sclerosis: association and correlation with clinical course. *Eur. J. Neurol.* 14: 162–167. 2007.
- GAO X, STARMER J, MARTIN ER. A multiple testing correction method for genetic association studies using correlated single nucleotide polymorphisms. *Genet. Epidemiol.* 32: 361–369, 2008.
- GARWEG JG. Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunology.* 27: 61-68, 2005.
- GAZZINELLI RT, WYSOCKA M, HAYASHI S, DENKERS EY, HIENY S, CASPAR P, TRINCHIERI G, SHER A. Parasite-induced IL-12 stimulates

- early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 153: 2533–2543, 1994.
- GAZZINELLI RT, DENKERS EY, SHER A. Host resistance to *T. gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. *Infectious Agents and Disease* 2: 139-149, 1993.
- GAZZINELLI RT, XU Y, HIENY S, CHEEVER A, SHER A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 149: 175-180, 1992.
- GAZZINELLI RT, HAKIM FT, HIENY S, SHEARER GM, SHER A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *The Journal of immunology* 146: 286-292, 1991.
- GE Y-Z, WU R, JIA R-P, LIU H, YU P, ZHAO Y, FENG Y-M. Association between interferon gamma +874 T>A polymorphism and acute renal allograft rejection: evidence from published studies. *Mol. Biol. Rep.* 40: 6043–6051, 2013.
- GLASNER PD, SILVEIRA C, KRUSZON-MORAN D, MARTINS MC, BURNIER JUNIOR M, SILVEIRA S, CAMARGO ME, NUSSENBLATT RB, KASLOW RA, BELFORT JUNIOR R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 114: 136-144, 1992.
- GONG Y, SHI G, WAN H, YANG K, PAN C, CHENG Q, DAI R, LI Q, LI M, ZHOU M, GUO Y. Association between the interleukin-13 gene and development of chronic obstructive pulmonary disease in southern Chinese Han population: a case-control study. *Chin. Med. J. (Engl).* 126: 4403–4408, 2013.
- GRANT A V, ARAUJO MI, PONTE EV, OLIVEIRA RR, GAO P, CRUZ A A, BARNES KC, BEATY TH. Functional polymorphisms in IL13 are protective against high *Schistosoma mansoni* infection intensity in a Brazilian population. *PLoS One* 7: e35863, 2012.
- GRAY PW, LEUNG DW, PENNICA D, YELVERTON E, NAJARIAN R, SIMONSEN CC, DERYNCK R, SHERWOOD PJ, WALLACE DM, BERGER SL, LEVINSON AD, GOEDDEL DV. Expression of human

- immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature* 295: 503–508, 1982.
- GRIGG, M. E., BONNEFOY, S., HEHL, A. B., SUZUKI, Y., BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 294: 161–165, 2001.
- GRÜNIG G, DE VRIER JE, MALEFYT RW. Interleukin-13. In: *The cytokine handbook* 4th edition. 2003.
- HARMON QE, ENGEL SM, OLSHAN AF, MORAN T, STUEBE AM, LUO J, WU MC, AVERY CL. Association of polymorphisms in natural killer cell-related genes with preterm birth. *Am. J. Epidemiol.* 178: 1208–1218, 2013.
- HARRIS DP, HAYNES L, SAYLES PC, DUSO DK, EATON SM, LEPAK NM, JOHNSON LL, SWAIN SL, LUND FE. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* 1: 475–482, 2000.
- HENAO MI, MONTES C, PARÍS SC, GARCÍA LF 2006. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 86: 11–19.
- HOFFMANN KF, MCCARTY TC, SEGAL DH, CHIARAMONTE M, HESSE M, DAVIS EM, CHEEVER AW, MELTZER PS, MORSE HCRD, WYNN TA. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEB J.* 15(13): 2545-7, 2001.
- HOLLAND GN. Ocular toxoplasmosis: the influence of patient age. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 351–357, 2009.
- HOLLAND GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. *Am. J. Ophthalmol.* 137: 1–17, 2004.
- HOLLAND GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: Epidemiology and course of disease. *Am. J. Ophthalmol.* 136: 973–988, 2003.
- HOLLAND GN, MUCCIOLI C, SILVEIRA C, WEISZ JM, BELFORT R, O'CONNOR GR. Intraocular inflammatory reactions without focal

- necrotizing retinochoroiditis in patients with acquired systemic toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol.* 128: 413–420, 1999.
- HOOKS JJ, CHAN CC, DETRICK B. Identification of the lymphokines, interferon-gamma and interleukin-2, in inflammatory eye diseases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29: 1444–1451, 1988.
- HORIE Y, KITAICHI N, TAKEMOTO Y, NAMBA K, YOSHIDA K, HIROSE S, HASUMI Y, OTA M, INOKO H, MIZUKI N, OHNO S. Polymorphism of IFN-gamma gene and Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Mol. Vis.* 13: 2334–2338, 2007.
- HOSHINO T, WINKLER-PICKETT RT, MASON AT, ORTALDO JR, YOUNG AH. IL-13 Production by NK Cells: IL-13-Producing NK and T Cells Are Present in Vivo in the Absence of IFN-gama. *Journal of Immunology* 162: 51–59, 1999.
- HOWE DK, SIBLEY LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 172: 1561-1566, 1995.
- HUNTER CA, CANDOLFI E, SUBAUSTE C, CLEAVE V VAN, REMINGTON JS. Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. *Immunology* 84: 16–20, 1995.
- HUNTER CA, SUBAUSTE CS, CLEAVE VH VAN, REMINGTON JS. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 62: 2818–2824, 1994.
- INFANTE-DUARTE C, KAMRADT T. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Semin. Immunopathol.* 21: 317–338, 1999.
- ISNARD A, KOURIBA B, DOUMBO O, CHEVILLARD C. Association of rs7719175, located in the IL13 gene promoter, with *Schistosoma haematobium* infection levels and identification of a susceptibility haplotype. *Genes Immun.* 12: 31–39, 2011.
- JACKSON MH, HUTCHISON WM. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv. Parasitol.* 28: 55 - 105, 1989.
- JOHNSON AM. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. *Parasitol Today* 13: 393-397, 1997.

- KAWAZOE, U. *Toxoplasma Gondii* In: Parasitologia Humana, 9^o edição, São Paulo: Atheneu, 147-156, 2003.
- KANG JY, LEE SY, RHEE CK, KIM SJ, KWON SS, KIM YK. Effect of aging on airway remodeling and muscarinic receptors in a murine acute asthma model. Clin. Interv. Aging 8: 1393–1403, 2013.
- KEINO H, TAKEUCHI M, KEZUKA T, YAMAKAWA N, TSUKAHARA R, USUI M. Chemokine and chemokine receptor expression during experimental autoimmune uveoretinitis in mice. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 241: 111–115, 2003.
- KHAN IA, MACLEAN JA, LEE FS, CASCIOTTI L, DEHAAN E, SCHWARTZMAN JD, LUSTER AD. IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection. Immunity 12: 483–494, 2000.
- KHAN IA, MATSUURA T, KASPER LH. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. Infect. Immun. 62: 1639–1642, 1994.
- KIDD P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern. Med. Rev. 8: 223–246, 2003.
- KIM K, CHO S-K, SESTAK A, NAMJOU B, KANG C, BAE S-C. Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. 69: 1247–1250, 2010.
- KIMBALL AC, KEAN BH, KELLNER A. The risk of transmitting toxoplasmosis by blood transfusion. Transfusion 5: 447–451, 1965.
- KINANE DF, HART TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 14: 430–449, 2003.
- KRISHNARAJ R, BHOOMA T. Cytokine sensitivity of human NK cells during immunosenescence. 2. IL2-induced interferon gamma secretion. Immunol. Lett. 50: 59–63, 1996.
- LAMBERT H, HITZIGER N, DELLACASA I, SVENSSON M, BARRAGAN A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. Cell. Microbiol. 8: 1611–1623, 2006.
- LEE S-W, CHUANG T-Y, HUANG H-H, LEE K-F, CHEN TT-W, KAO Y-H, WU LS-H. Interferon gamma polymorphisms associated with susceptibility to

- tuberculosis in a Han Taiwanese population. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2014.
- LEE S-E, HONG S-H, LEE S-H, JEONG Y-I, LIM SJ, KWON OW, KIM SH, YOU YS, CHO S-H, LEE W-J. Detection of ocular *Toxoplasma gondii* infection in chronic irregular recurrent uveitis by PCR. *Korean J. Parasitol.* 50: 229–231, 2012.
- LEMAITRE C, GOLDENBERG BT, NAUD MC, KOZAK Y. The effect of intraocular injection of interleukin-13 on endotoxin-induced uveitis in rats. *Investigative Ophthalmology e Visual Science* 42: 2022-2030, 2001.
- LEVI GC, HYAKUTAKE S, NETO VA, CORREA MO. Presence of *Toxoplasma gondii* in the saliva of patients with toxoplasmosis. Eventual importance of such verification concerning the transmission of the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 10: 54-58, 1968.
- LGC GENOMICS. Disponível em: <
<http://www.lgcgenomics.com/genotyping/kasp-genotyping-reagents/how-does-kasp-work/>>. Acesso em: 03 jan. 2014.
- LIEBERMAN J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 3: 361-370. 2003.
- LINDBERG RE, FRENKEL JK. Toxoplasmosis in nude mice. *J Parasitol* 63: 219-21, 1977.
- LINGELBACH K, JOINER KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111: 1467–1475, 1998.
- LÓPEZ-MADERUELO D, ARNALICH F, SERANTES R, GONZÁLEZ A, CODOCEO R, MADERO R, VÁZQUEZ JJ, MONTIEL C. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167: 970–975, 2003.
- LÜDER CGK, GROSS U. Toxoplasmosis: From Clinics to Basic Science. *Parasitology Today* 14: 43-45, 1998.
- LUFT BJ, HAFNER R, KORZUN AH, LEPORC C, ANTONISKI D, BOSLER EM, BOURLAND R, UTTAMCHANDANI R, FUHRER J, JACOBSON J et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 329: 995-1000, 1993.

- LYONS RE, ANTHONY JP, FERGUSON DJP, BYRNE N, ALEXANDER J, ROBERTS F, ROBERTS CW. Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complex class I and transforming growth factor β and a protective role for interleukin-6. *Infect and Immunity* 69: 2589-2595, 2001.
- MCCABE RE, BROOKS RG, DORFMAN RF. Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis.* 9: 754, 1987.
- MCKENZIE AN, CULPEPPER JA, WAAL MALEFYT R DE, BRIÈRE F, PUNNONEN J, AVERSA G, SATO A, DANG W, COCKS BG, MENON S. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 3735–3739, 1993.
- MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1(2): 135-45, 2001.
- MELAMED J. Contributions to the history of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104 (2), 358-363, 2009.
- METS MB, HOLFELS E, BOYER KM, SWISHER CN, ROIZEN N, STEIN L, STEIN M, HOPKINS J, WITHERS S, MACK D, LUCIANO R, PATEL D, REMINGTON JS, MEIER P, MCLEOD R. Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol.* 122: 309-324, 1996.
- MEZGER M, STEFFENS M, BEYER M, MANGER C, EBERLE J, TOLIAT M-R, WIENKER TF, LJUNGMAN P, HEBART H, DORNBUSCH HJ, EINSELE H, LOEFFLER J. Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 111: 534–536, 2008.
- MINEO JR, MCLEOD R, MACK D, SMITH J, KHAN IA, ELY KH, KASPER LH. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J. Immunol.* 150: 3951-3964, 1993.
- MINTY A, CHALON P, DEROCQ JM, DUMONT X, GUILLEMOT JC, KAGHAD M, LABIT C, LEPLATOIS P, LIAUZUN P, MILOUX B. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 362: 248–250, 1993.

- MOCCHIGIANI E, MALAVOLTA M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell* 3: 177–184, 2004.
- MONTOYA JG, LIESENFELD O. Toxoplasmosis. *The Lancet* 363: 1965-1975, 2004.
- MONTOYA JG, REMINGTON JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 23: 277-282, 1996.
- MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol* 136: 2348–2357, 1986.
- MOURA L, BAHIA-OLIVEIRA LMG, WADA MY, JONES JL, TUBOI SH, CARMO EH, RAMALHO WM, CAMARGO NJ, TREVISAN R, GRAÇA RMT, SILVA AJ, MOURA I, DUBEY JP, GARRET DO. Waterborne Toxoplasmosis, Brazil, from Field to Gene *Emerging Infectious Diseases* 12: 326-329, 2006.
- MUNOZ M, LIESENFELD O, HEIMESAAT MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol. Rev.* 240: 269–285, 2011.
- NAMKUNG J-H, LEE J-E, KIM E, KIM H-J, SEO E-Y, JANG H-Y, SHIN E-S, CHO E-Y, YANG J-M. Association of polymorphisms in genes encoding IL-4, IL-13 and their receptors with atopic dermatitis in a Korean population. *Exp. Dermatol.* 20: 915–919, 2011.
- NETO VA, COTRIM JX, LAUS WC. Nota scircumflex obre o encontro de *Toxoplasma gondii* en sangue destinado a transfusao. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 5: 68-69, 1963.
- NICHOLS BA, CHIAPPINO ML, O'CONNOR GR. Secretion from Roptires of *Toxoplasma gondii* during Host-Cell Invasion. *Journal of Ultrastructure Research* 83: 85-98. 1983.
- NIELSEN R. Population genetic analysis of ascertained SNP data. *Hum. Genomics* 1: 218–224, 2004.
- NOGUEIRA LG, SANTOS RHB, IANNI BM, FIORELLI AI, MAIRENA EC, BENVENUTI LA, FRADE A, DONADI E, DIAS F, SABA B, WANG H-TL, FRAGATA A, SAMPAIO M, HIRATA MH, BUCK P, MADY C, BOCCHI EA, STOLF NA, KALIL J, CUNHA-NETO E. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are

- controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e18672012.
- NUSSENBLATT RB, BELFORT RJR. Ocular toxoplasmosis. An old disease revisited. *JAMA* 1: 304-307, 1994.
- OHASHI J, NAKA I, PATARAPOTIKUL J, HANANANTACHAI H, LOOAREESUWAN S, TOKUNAGA K. A single-nucleotide substitution from C to T at position -1055 in the IL-13 promoter is associated with protection from severe malaria in Thailand. *Genes Immun.* 4: 528–531, 2003.
- ORÉFICE F, BAHIA-OLIVEIRA LMG. Toxoplasmose. In: *Uveíte Clínica e Cirúrgica – Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica* 619-680, 2005.
- PAUL WE, SEDER RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241–251, 1994.
- PAWELEC G, SOLANA R, ED R, ERMINIA M. Aging and immunity - Impact of behavioral intervention. *Brain. Behav. Immun.* 64: 703–712, 1998.
- PENA HF, GENNARI SM, DUBEY JP, SU C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol* 38: 561-569, 2008.
- PEREIRA RS, CURIONI CC, VERAS R. Perfil demográfico da população idosa no Brasil e no Rio de Janeiro em 2002. Disponível em <<http://www.unati.uerj.br/tse/scielo>>. Acesso em 04 jan. 2014.
- PERNEGER T V. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ* 316: 1236–1238, 1998.
- PFEFFERKORN ER, GUYRE PM. Inhibition of Growth of *Toxoplasma gondii* in Cultured Fibroblasts by Human Recombinant gamma-Interferon. *Infection and Immunity* 44: 211-216, 1984.
- PORTELA RWD, BETHONY J, COSTA MI, GAZZINELLI A, VITOR RWA, HERMETO FM, CORREA-OLIVEIRA R, GAZZINELLI RT. A multihousehold study reveals a positive correlation between age, severity of ocular toxoplasmosis, and levels of glycoinositolphospholipid-specific immunoglobulin A. *J. Infect. Dis.* 190: 175–183, 2004.
- PRAVICA V, PERREY C, STEVENS A, LEE J, HUTCHINSON I V. A Single Nucleotide Polymorphism in the First Intron of the Human IFN-gamma

- Gene : Absolute Correlation with a Polymorphic CA Microsatellite Marker of High IFN-gamma Production. *Humam Immunol.* 61: 863–866, 2000.
- PRITCHARD MA, BAKER E, WHITMORE SA, SUTHERLAND GR, IDZERDA RL, PARK LS, COSMAN D, JENKINS NA, GILBERT DJ, COPELAND NG. The interleukin-4 receptor gene (IL4R) maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of mouse chromosome 7. *Genomics* 10: 801–806, 1991.
- RÄISÄNEN S. Toxoplasmosis transmitted by blood transfusions. *Transfusion* 18: 329–332, 1978.
- REMINGTON JS, MCLEOD R, THULLIEZ P, DESMONTS G. Toxoplasmosis. In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 5rd ed. The W. B. Saunders Co. Philadelphia, Pa. 206-346, 2001.
- REMINGTON JS, LAISON R. Observations on the nature and transmission of *Toxoplasma* in the light of its wide hosts and geographical range. *Surv Ophthalmol* 6: 721-758, 1961.
- RIBEIRO D. *O povo brasileiro: formação e o sentido do Brasil*. Companhia das Letras, São Paulo, 1995.
- RINK L, CAKMAN I, KIRCHNER H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 102: 199–209, 1998.
- ROBERT-GANGNEUX F, DARDÉ M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25: 264–296, 2012.
- ROBERTS F, McLEOD R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol Today* 15: 51-57, 1999.
- SCANGA CA, ALIBERTI J, JANKOVIC D, TILLOY F, BENNOUNA S, DENKERS EY, MEDZHITOV R, SHER A. MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168:5997, 2002.
- SCHARTON-KERSTEN TM, WYNN TA, DENKERS EY, BALA S, GRUNVALD E, HIENY S, GAZZINELLI RT, SHER A. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J. Immunol.* 157: p. 4045-4054, 1996.
- SCHRIJVER HM, HOOPER-VAN VEEN T, BELZEN MJ VAN, CRUSIUS JB A, PEÑA A S, BARKHOF F, POLMAN CH, UITDEHAAG BMJ. Polymorphisms in the genes encoding interferon-gamma and interferon-

- gamma receptors in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunogenet.* 31: 133–140, 2004.
- SHARMA R, KAPILA R, HAQ MRU, SALINGATI V, KAPASIYA M, KAPILA S. Age-associated aberrations in mouse cellular and humoral immune responses. *Aging Clin. Exp. Res.*, 2013.
- SHEN C, JIAO W-W, FENG W-X, WU X-R, XIAO J, MIAO Q, SUN L, WANG B-B, WANG J, LIU F, SHEN D, SHEN A-D. IFNG polymorphisms are associated with tuberculosis in Han Chinese pediatric female population. *Mol. Biol. Rep.* 40: 5477–5482, 2013.
- SHER A, OSWALD IP, HIENY S, GAZZINELLI RT. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumour necrosis factor alpha. *J Immunol* 150: 3982 – 3992, 1993.
- SILVA GA V, NAVECA FG, RAMASAWMY R, BOECHAT AL. Association between the IFNG +874A/T gene polymorphism and leprosy resistance: A meta-analysis. *Cytokine* 65: 130–133, 2014.
- SILVEIRA C, VALLOCHI AL, RODRIGUES DA SILVA U, MUCCIOLI C, HOLLAND GN, NUSSENBLATT RB, BELFORT R, RIZZO LV. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. *Br. J. Ophthalmol.* 95: 396–400, 2011.
- SILVEIRA C, BELFORT R, MUCCIOLI C, HOLLAND GN, VICTORA CG, HORTA BL, YU F, NUSSENBLATT RB. The effect of long-term intermittent trimethoprim/sulfamethoxazole treatment on recurrences of toxoplasmic retinochoroiditis. *Am. J. Ophthalmol.* 134: 41–46, 2002.
- SILVEIRA C, BELFORT RJR, BURNIER MJR, NUSSENBLATT RB. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. *Am J Ophthalmol* 106: 362-364, 1988.
- SMITH AJP, HUMPHRIES SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20: 43–59, 2009.
- SUBAUSTE CS, CHUNG JY, DO D, KONIARIS AH, HUNTER CA, MONTOYA JG, PORCELLI S, REMINGTON JS. Preferential activation and expansion of human peripheral blood gamma delta T cells in response to

- Toxoplasma gondii* in vitro and their cytokine production and cytotoxic activity against *T. gondii*-infected cells. *J Clin Invest* 96: 610-619, 1995.
- SUGAWARA Y, AZUMA N, ONODERA S, TSUNOKA Y, MORIMOTO M. Th2 immune responses and alternatively activated macrophages (AAMacs) in helminth infection in aged mice. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 511–516, 2011.
- TENTER A, HECKEROTH A, WEISS L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30: 1217–1258, 2000.
- TORRES KCL, PEREIRA PA, LIMA GSF, SOUZA BR, MIRANDA DM, BAUER ME, ROMANO-SILVA ME. Immunosenescence. *Geriatrics e Gerontologia* 5(3):163-169, 2011.
- TSAI C-H, TUNG K-Y, SU M-W, CHIANG B-L, CHEW FT, KUO N-W, LEE YL. Interleukin-13 genetic variants, household carpet use and childhood asthma. *PLoS One* 8: e51970, 2013.
- VAN DER POUW KRAAN TC, VEEN A VAN, BOEIJE LC, TUYL S A VAN, GROOT ER DE, STAPEL SO, BAKKER A, VERWEIJ CL, AARDEN L A, ZEE JS VAN DER. An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes Immun.* 1: 61–65, 1999.
- VERMA MJ, LLOYD A, RAGER H, STREITER R, KUNKEL S, TAUB D, WAKEFIELD D. Chemokines in acute anterior uveitis. *Curr. Eye Res.* 16: 1202-1208, 1997.
- VINCENT NAK, PEEK R. Evidence for a compartmentalized B cell response as characterized by IgG epitope specificity in human ocular toxoplasmosis. *J. Immunol.* 167: 6263-6269, 2001.
- VOLLMER TL, WALDOR MK, STEINMANN L, CONLEY FK. Depletion of T-4+ Lymphocytes with Monoclonal Antibody Reactivates Toxoplasmosis in the Central Nervous System: a Model of Superinfection in AIDS. *J. Immunol.* 138: 3737-3741, 1987.
- WANG D, ZHONG X, HUANG D, CHEN R, BAI G, LI Q, YU B, FAN Y, SUN X. Functional polymorphisms of interferon-gamma affect pneumonia-induced sepsis. *PLoS One* 9: e87049, 2014.
- WEIMAN D, CHANDLER AH. Toxoplasmosis in swine and rodents. Reciprocal oral infection and potential human hazard. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 87: 211, 1954.

- WENG Y, SICILIANO SJ, WALDBURGER KE, SIROTINA-MEISHER A, STARUCH MJ, DAUGHERTY BL, GOULD SL, SPRINGER MS, DEMARTINO JA. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* 273: 18288–18291, 1998.
- WILSON N, DRISS A, SOLOMON W, DICKINSON-COPELAND C, SALIFU H, JAIN V, SINGH N, STILES J. CXCL10 Gene Promoter Polymorphism - 1447A>G Correlates with Plasma CXCL10 Levels and is Associated with Male Susceptibility to Cerebral Malaria. *PLoS One* 8: e81329, 2013.
- WYNN TA 2003. IL-13 effector functions. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 425–456.
- YANG P, DAS PK, KIJLSTRA A. Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina. *Ocul Immunol Inflamm.* 8: 149-157, 2000.
- ZAIDI MR, MERLINO G. The two faces of interferon- γ in cancer. *Clin. Cancer Res.* 17: 6118–6124, 2011.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO Livre e Esclarecido

Eu,....., respondendo por..... recebi informações sobre o projeto de pesquisa intitulado “Toxoplasmose ocular em Campos dos Goytacazes: investigação de fatores imunogenéticos e ambientais determinantes na manifestação de retinocoroidites toxoplásmicas”. Estou ciente de que as informações obtidas por este tipo de pesquisa podem auxiliar na compreensão dos mecanismos que contribuem para maior ou menor possibilidade de desenvolvimento da doença ocular causada pela toxoplasmose. Concordo em participar como voluntário no referido projeto de pesquisa desenvolvido na Universidade Estadual do Norte Fluminense. A minha participação é voluntária e será limitada à doação de amostras de sangue venoso (no máximo trinta mililitros) e aos exames oftalmológicos, sobre os quais recebi a orientação dos possíveis riscos e desconfortos. Tais desconfortos podem ser pequena dor no momento da picadura e a formação de hematomas, após a coleta do sangue e, visão turva durante um período de minutos ou alguma horas, após o exame oftalmológico.

Tenho consciência que a minha participação como voluntário(a) não me trará nenhum benefício financeiro. No entanto, conhecer a minha sorologia para toxoplasmose traz-me o benefício de poder planejar, caso eu seja imune, visitas regulares a oftalmologistas para acompanhamento. Bem como estou consciente de que 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 pacientes não imunes.

Caso eu concorde em participar como voluntário(a) neste projeto de pesquisa, os meus dados não serão revelados a ninguém e a minha identidade será preservada. Sei também que para preservar minha identidade, serão utilizados códigos, ao invés de nomes, durante todas as etapas do estudo.

Fui informado(a) de que não devo esperar resultados imediatos ou pessoais a não ser o do diagnóstico sorológico e do exame ocular, e que poderei a qualquer momento me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete em prejuízo à continuidade do meu acompanhamento médico como também a nenhum outro paciente do meu convívio ou membro de minha família. Estou ciente que o sangue que forneci, para o referido projeto de pesquisa, será enviado ao exterior, onde parte das análises será feita e, posteriormente, armazenado ou eliminado, segundo minha

autorização expressa no termo de consentimento para estocagem e uso futuro de espécimes coletadas.

Qualquer dúvida dirigir-se ao Laboratório de Biologia do Reconhecer (UENF) ou aos pesquisadores envolvidos referidos abaixo:

Profa. Lílian Maria Garcia Bahia Oliveira

Telefone: (22)27397255 / 27397165

Campos dos Goytacazes, _____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador responsável

Consentimento para Estocagem e Uso Futuro de Espécimes Coletadas

Caso o sangue que eu forneci para o projeto de pesquisa intitulado, “*Toxoplasmose ocular em Campos dos Goytacazes: investigação de fatores imunogenéticos e ambientais determinantes na manifestação de retinocoroidites toxoplásmicas*”, não seja totalmente utilizado, eu autorizo que o restante seja:

- Eliminado.
- Destruído depois de ____ anos.
- Armazenado e possa ser usado em pesquisas futuras com o mesmo propósito do atual projeto de pesquisa
- Armazenado e possa ser usado em pesquisas futuras de qualquer tipo.
- Armazenado indefinidamente
- Armazenado somente com autorização do CEP

Quero que minha identidade seja:

- Removida do material restante.
- Mantida no material restante

NOME DO PARTICIPANTE: _____ P: ID:
ASSINATURA DO PARTICIPANTE: _____
NOME DO RESPONSÁVEL: _____
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL: _____
NOME DA TESTEMUNHA: _____
ASSINATURA DA TESTEMUNHA: _____
DATA: ____/____/____

ANEXO 2



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 013/2007

Registro CONEP: 13391 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE - não informado. **Processo nº 25000.164899/2006-12**
Projeto de Pesquisa: *"Toxoplasmose ocular em campos dos Goytacazes: investigação de fatores imunogenéticos e ambientais determinantes na manifestação de retinocoroidites toxoplásmicas"*.
Pesquisador Responsável: Dra. Lílian M. Garcia Bahia Oliveira
Instituição: Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ
Área Temática Especial: Cooperação estrangeira e Genética Humana

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 1103/2006, relativo ao projeto em questão, cabem as seguintes considerações:

1. Nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) contempla redação sob forma de convite e com linguagem mais acessível ao nível sócio-cultural dos sujeitos e informa dados do armazenamento de acordo com a Res. CNS 347/2005;
2. O orçamento detalhado foi apresentado com as fontes de fomento;
3. O cronograma apresentado é compatível com a proposta de atividades, todavia está apresentado em língua inglesa. Solicita-se sua tradução para o vernáculo (Res. CNS 196/96, VI) e apresentação ao CEP;
4. Solicita-se ao CEP anexar ao protocolo o número do CAAE.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa.

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 22 de janeiro de 2007.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora Interina da CONEP/CNS/MS