

ASSOCIAÇÃO DA TOXOPLASMOSE OCULAR COM LINFÓCITOS T $\gamma\delta$   
E COM POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NOS GENES  
*IL10* E *TNFA* EM INDIVÍDUOS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS

**RHÔNIA FRANÇA GOMES ROSA**

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

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

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Alba Lucínia Peixoto Rangel

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

MAIO 2014

ASSOCIAÇÃO DA TOXOPLASMOSE OCULAR COM LINFÓCITOS T $\gamma\delta$   
E COM POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NOS GENES  
*IL10* E *TNFA* EM INDIVÍDUOS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS

**RHÔNIA FRANÇA GOMES ROSA**

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

**Aprovada em 30 de maio de 2014.**

Banca Examinadora:

---

Dr<sup>a</sup> Regina Célia de Souza Campos Fernandes (FMC)

---

Dr. Renato Augusto DaMatta (UENF)

---

Dr. Milton Masahiko Kanashiro (UENF)

---

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Alba Lucínia Peixoto Rangel (UENF)

---

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Lílian Maria Garcia Bahia de Oliveira (UENF)

**Dedico este trabalho:**

**À Deus por me abençoar a cada dia.**

**Aos meus pais e irmão pelo amor, apoio e incentivo.**

**E, ao meu lindo filho Rafael, por deixar minha vida mais bonita, mais alegre e  
mais divertida!**

*"A verdadeira felicidade está na própria casa, entre  
as alegrias da família." (Leon Tolstói)*

*Rosa, R.F.G.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª Lilian Bahia pelos ensinamentos transmitidos, pela oportunidade e confiança.

À Profª Alba pela amizade, pelo incentivo e pela co-orientação deste trabalho.

Aos amigos de laboratório: Bianca, Flávia, Juliana, Liliane, Lívia, Marcela, Maycon Bruno, Núbia, Rebeka, Ricardo e Rita pela amizade, companheirismo e colaboração nas etapas deste trabalho.

À Profª Patrícia Damasceno Ribeiro que revisou esse trabalho.

Aos professores Regina Célia Fernandes, Renato DaMatta e Milton Kanashiro que prontamente aceitaram participar da banca examinadora deste trabalho.

Às pessoas que contribuíram voluntariamente com este estudo, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído.

*"Nossa vida é uma constante viagem...  
A paisagem muda, as pessoas mudam, as necessidades  
se transformam, mas o trem segue adiante."*

*(Paulo Coelho)*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	3
2.2. Caracterização da Toxoplasmose .....	5
2.2.1. Caracterização da Toxoplasmose Ocular .....	7
2.2.2. Classificação das Lesões .....	8
2.3. Resposta imune ao <i>Toxoplasma gondii</i> .....	10
2.3.1. Participação das células na imunidade ao <i>T. gondii</i> .....	10
2.3.2. O papel das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$ e a imunidade ao <i>T. gondii</i> .....	15
2.4. Susceptibilidade Genética a Infecções Parasitárias.....	17
3. JUSTIFICATIVA.....	21
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo geral .....	23
4.2 Objetivos específicos .....	23
5. POPULAÇÃO DE ESTUDO, MATERIAL E MÉTODOS .....	24
5.1. Indivíduos sujeitos da pesquisa .....	24
5.2. Exames oftalmológicos para detecção da lesão ocular .....	24
5.3. Coleta de amostras de sangue periférico e sorologia. ....	26
5.4. Estudo Imunológico.....	26
5.4.1. Preparo do Antígeno Solúvel de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	26
5.4.2. Cultura de Células do Sangue Periférico.....	28
5.4.3. Determinação Fenotípica de Células T $\gamma\delta$ com marcação intracelular das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$ .....	28
5.4.4. Análises Estatísticas.....	29
5.5. Seleção dos SNPs .....	30
5.6. Extração de DNA a partir de amostras de sangue total .....	33

5.7. Quantificação de DNA por Nanodrop .....	33
5.8. Reação em cadeia da polimerase (PCR) Touchdown.....	34
5.9. Gel de agarose.....	35
5.10. Ensaio TaqMan .....	35
5.11. Análises de associação genética baseado em estudo de população .....	37
6. RESULTADOS .....	39
6.1. Estudo imunológico .....	39
6.1.1. População do estudo imunológico .....	39
6.1.2. Análise <i>in vitro</i> dos linfócitos T $\gamma\delta$ do sangue periférico .....	39
6.1.3. Avaliação do padrão de citocinas intracelulares em linfócitos T $\gamma\delta$ do sangue periférico após cultura <i>in vitro</i> .....	41
6.2. Estudo genético .....	44
6.2.1. Frequências alélicas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) .....	44
6.2.2. Estudo de associação genética com SNPs de <i>IL10</i> e <i>TNFA</i> .....	45
6.2.2.1. Estudo de associação genética com SNPs do gene <i>IL10</i> .....	47
6.2.2.2. Estudo de associação genética com SNPs do gene <i>TNFA</i> .....	48
7. DISCUSSÃO.....	51
8. CONCLUSÕES.....	60
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
10. ANEXOS.....	75

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida de <i>T. gondii</i> .....	5
<b>Figura 2:</b> Fotografias de lesões cicatriciais não ativas de fundo de olho (retinocoroidianas) .	9
<b>Figura 3:</b> Representação das células e citocinas do sistema imune envolvidas na toxoplasmose e na destruição do parasito .....	15
<b>Figura 4:</b> Mapa de desequilíbrio de ligação da população CEU para <i>IL10</i> e <i>TNFA</i> gerado no <i>Haploview</i> .....	32
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo do ensaio TaqMan. ....	36
<b>Figura 6:</b> Gráfico gerado de uma tabela de resultados obtida a partir do programa <i>SNPviewer</i> .....	37
<b>Figura 7:</b> Percentual de linfócitos T $\gamma\delta$ circulantes no sangue periférico de indivíduos infectados com lesão (CL), sem lesão (SL) ou não infectados (Neg) por <i>T. gondii</i> , sob estímulo do STAg (imediatamente após a coleta do sangue periférico).....	40
<b>Figura 8:</b> Percentual de linfócitos T $\gamma\delta$ circulantes no sangue periférico, produtores de IL-10, de indivíduos infectados com lesão (CL), sem lesão (SL) ou não infectados (Neg) por <i>T. gondii</i> , sob estímulo do STAg (imediatamente após a coleta do sangue periférico).....	42
<b>Figura 9:</b> Percentual de linfócitos T $\gamma\delta$ circulantes no sangue periférico, produtores de TNF- $\alpha$ , de indivíduos infectados com lesão (CL), sem lesão (SL) ou não infectados (Neg) por <i>T. gondii</i> , sob estímulo do STAg (imediatamente após a coleta do sangue periférico).....	43
<b>Figura 10:</b> Frequência dos genótipos homozigoto para o alelo 1 (TT), heterozigoto para os alelos 1 e 2 (TC) ou homozigoto para o alelo 2 (CC) do SNP <i>IL10_rs1800894</i> em grupos de indivíduos positivos para toxoplasmose, portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B, C e Controle SL).....	47
<b>Figura 11:</b> Modelos de herança genética dominante e recessivo para o SNP <i>IL10_rs1800894</i> em grupos de indivíduos positivos para toxoplasmose com lesão ocular tipo A (afetados – barra cinza) e no grupo de indivíduos positivos sem lesão ocular (não afetados - barra branca).....	48
<b>Figura 12:</b> Frequência dos genótipos homozigoto para o alelo 1 (CC), heterozigoto para os alelos 1 e 2 (CA) ou homozigoto para o alelo 2 (AA) do SNP <i>TNF_rs928815</i> em grupos de indivíduos positivos para toxoplasmose, portadores de diferentes tipos de cicatrizes da lesão ocular toxoplásmica (A, B, C) e Controle SL. ....	49
<b>Figura 13:</b> Modelos de herança genética dominante e recessivo para o SNP <i>TNFA_rs928815</i> em grupos de indivíduos positivos para toxoplasmose com lesão ocular tipo C (afetados – barra cinza) e no grupo de indivíduos sem lesão ocular (não afetados - barra branca).....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características dos indivíduos participantes dos estudos genético e imunológico, agrupados de acordo com a sorologia para toxoplasmose, sexo e ausência ou presença de lesões cicatriciais retinocoroidianas. ....	25
<b>Tabela 2:</b> Anticorpos anti-marcadores fenotípicos e anti-citocinas intracelulares .....	29
<b>Tabela 3:</b> Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) selecionados para <i>IL10</i> e <i>TNFA</i> . ...	31
<b>Tabela 4:</b> Características dos indivíduos participantes do estudo imunológico, agrupados de acordo com a sorologia para toxoplasmose, ausência ou presença de lesões cicatriciais retinocoroidianas, idade e sexo.....	39
<b>Tabela 5:</b> Frequências alélicas no Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (EHW) e frequências dos Alelos de Menor Frequência (MAF) para cada SNP.....	45
<b>Tabela 6:</b> Grupos de indivíduos formados a partir do perfil clínico obtido por exames de oftalmoscopia a fim de utilizá-los nas análises de associação genética a serem feitas neste estudo.....	46
<b>Tabela 7:</b> Distribuição alélica e fenotípica na análise C1 (CL tipo A <i>versus</i> SL) para SNP <i>IL10_rs1800894</i> .....	48
<b>Tabela 8:</b> Distribuição alélica e fenotípica na análise C3 (CL tipo C <i>versus</i> SL) para SNP <i>TNFA_rs928815</i> .. .....	50



## RESUMO

O protozoário *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório com ampla distribuição geográfica. Estima-se que 30% da população mundial esteja infectada por este parasito. Em Campos dos Goytacazes a endemicidade da toxoplasmose é alta, atingindo 57,2% da população. No contingente populacional de baixo poder aquisitivo o nível de prevalência desta infecção atinge 84,8%. A toxoplasmose é uma das principais causas de uveítes em várias partes do mundo em especial no Brasil. A prevalência das manifestações oculares presumivelmente causadas pela toxoplasmose em Campos dos Goytacazes pode atingir até 30% da população soropositiva para *T. gondii*. Estes valores percentuais favorecem estudos acerca do perfil imune e *background* genético de indivíduos expostos a fatores de risco para infecção. Neste trabalho, investigamos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *IL10* e *TNFA*, bem como comparamos o percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produzindo estas citocinas em associação com a apresentação de diferentes tipos de cicatrizes retinocoroidais presumivelmente causadas pela infecção toxoplásmica. Tais parâmetros imunológicos e genéticos foram comparados em um total de 528 indivíduos de diferentes faixas etárias, agrupados quanto a sorologia para toxoplasmose e presença ou ausência de lesão ocular. 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, apresentaram percentuais diferentes de linfócitos T $\gamma\delta$  produzindo as citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$ . Em indivíduos acima de 60 anos apresentando cicatrizes de lesão tipo C o percentual de células T $\gamma\delta$  produzindo IL-10 foi mais elevado em comparação com os demais grupos estudados, tanto mais jovens quanto também na mesma faixa etária. Em indivíduos mais jovens (abaixo de 60 anos) o percentual de células T $\gamma\delta$  produzindo a citocina TNF- $\alpha$  foi significativamente mais elevado entre os portadores de cicatrizes de lesões tipo A. Polimorfismos de nucleotídeo único nos genes codificadores das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$ , também mostraram associação com a susceptibilidade às manifestações oculares da toxoplasmose sendo que com significância estatística, após correção para múltiplas análises, somente o SNP para o gene *TNFA* rs928815 apresentou associação com a manifestação de cicatrizes de lesões tipo C. Em conclusão, os dados apresentados reforçam a importância que estudos genéticos associados a estudos imunológicos de base populacional podem contribuir para o melhor entendimento e planejamento do manejo da toxoplasmose ocular em áreas de alta endemicidade para a infecção por *T. gondii*.

**Palavras chave:** *Toxoplasma gondii*, retinocoroidite, SNP, faixa etária, T $\gamma\delta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ .

## ABSTRACT

The protozoan *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite with a wide geographic distribution. It is estimated that 30% of the world population is infected with this parasite. In Campos the endemicity of toxoplasmosis is high, reaching 57.2% of the whole population. In the population living in low income level, the seroprevalence reaches 84.8%. Toxoplasmosis is a major cause of uveitis in various parts of the world especially in Brazil. The prevalence of ocular manifestations presumably caused by toxoplasmosis in Campos can reach 30% of *T. gondii* seropositive population. These percentages stimulate studies on the immune profile and genetic background of individuals exposed to risk factors for infection. In this work, we investigated single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *IL10* and *TNFA* genes and compared the percentage of T $\gamma\delta$  lymphocytes producing these cytokines in association with the presentation of different types of retinochoroidal scars presumably caused by *T. gondii* infection. Such immunological and genetic parameters were compared in a total of 528 individuals of different ages, grouped according to the serology for toxoplasmosis and presence or absence of eye disease. It was observed that individuals with high, medium or low degree of severity of scar lesions of the retina, identified as type A, B or C, respectively, showed different percentages of T $\gamma\delta$  lymphocytes producing IL-10 and TNF- $\alpha$ . In subjects over 60 years presenting scars lesion type C, the percentage of T $\gamma\delta$  cells producing IL-10 was higher compared with both younger as also in the same age group. In younger patients (below 60 years) the percentage of  $\gamma\delta$  T cells producing the cytokine TNF- $\alpha$  was significantly higher among patients with type A scar lesions. Single nucleotide polymorphisms in genes encoding the cytokines IL-10 and TNF- $\alpha$ , also showed association with susceptibility to ocular manifestations of toxoplasmosis whereas statistically significant, after correction for multiple analyzes only rs928815 *TNFA* SNP was associated with the manifestation of scars lesions type C. In conclusion, the present data reinforce the importance of genetic studies in association to immunological study population investigation may contribute to a better understanding of the planning and management of ocular toxoplasmosis in areas highly endemic for infection with *T. gondii*.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, retinochoroiditis, SNP, age, T $\gamma\delta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ .

## 1. INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um parasito intracelular obrigatório, considerado um dos parasitos mais bem sucedidos do mundo. Este sucesso ocorre por sua ampla distribuição geográfica, do ártico às áreas quentes do deserto, incluindo ilhas isoladas (Dubey, 2010). *T. gondii* também está entre os parasitos mais prevalentes na população humana global, com cerca de um terço da população infectada (Tenter *et al.*, 2000). Estudos em toxoplasmose (infecção causada por *T. gondii*) são de grande importância porque essa doença apesar de ser geralmente assintomática, pode apresentar graves consequências, tais como: abortos espontâneos, deficiências visuais, auditivas e/ou neurológicas, além de séria repercussão em indivíduos imunocomprometidos, nos quais se observa a reagudização da doença (Alexander e Hunter, 1998).

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 TNF- $\alpha$ . Por outro lado, as células Th2 secretam citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, as quais inibem 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 de IFN- $\gamma$  dentre outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  (Munoz *et al.*, 2011). Essa resposta imune pró-inflamatória é contrabalanceada pela ação de citocinas anti-inflamatórias do padrão Th2 (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).

Os linfócitos T $\gamma\delta$  participam da imunidade celular contra *T. gondii* em humanos durante a fase aguda da infecção (Scalise *et al.*, 1992; De Paoli *et al.*, 1992). Estes linfócitos desenvolvem ação citotóxica contra as células infectadas por *T. gondii* por meio de via independente de MHC e produzem IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , sugerindo que esta subpopulação possa ser importante no início da resposta imune protetora contra *T. gondii* (Subauste *et al.*, 1995). Porém, apesar dos esforços, muitos estudos ainda são necessários para se conhecer o papel exato dessas células na imunidade contra infecções por *T. gondii*. Um estudo mais detalhado dos linfócitos T $\gamma\delta$  na toxoplasmose e o padrão de citocinas, produzido por essas células, poderá ser utilizado na padronização de novos parâmetros laboratoriais para avaliação clínica e prognóstica de pacientes infectados.

A investigação de polimorfismos em genes que codificam citocinas, bem como do perfil de secreção destas citocinas pelos linfócitos T $\gamma\delta$  no contexto da idade dos pacientes infectados por *T. gondii* e apresentando ou não lesão ocular podem trazer contribuições importantes na elaboração de estratégias de intervenções imunológicas que possam favorecer o manejo clínico da doença com o avanço da idade por exemplo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Toxoplasma gondii*

O protozoário *T. gondii* é taxonomicamente classificado como pertencendo ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma*. Assim como outros protozoários do filo Apicomplexa, *T. gondii* tem um ciclo de vida complexo que envolve replicação assexuada que ocorre basicamente em todos os animais homeotérmicos até hoje estudados (hospedeiros intermediários e definitivos) e reprodução sexuada que ocorre apenas nos felinos, hospedeiros definitivos. Esses felinos liberam oocistos no ambiente onde eles amadurecem e persistem como formas altamente infecciosas (Elmore *et al.*, 2010).

As características morfológicas de *T. gondii* variam de acordo com o estágio do ciclo de vida no qual esteja passando. Existem três formas distintas: os oocistos (contendo esporozoítos) que são formados no intestino dos hospedeiros definitivos e ganham o meio ambiente como forma oocística com potencial de infecção, os taquizoítos e os cistos teciduais (contendo bradizoítos).

Os oocistos representam o produto da reprodução sexuada que ocorre no intestino dos felídeos e são eliminados nas fezes destes animais. São ovóides com um diâmetro de 10 a 12  $\mu\text{m}$ , e sobrevivem por mais de um ano em solo quente e úmido. Tornam-se não infecciosos por calor úmido ou seco, acima de 66 °C. A ingestão de oocistos esporulados contendo esporozoítos pode causar infecção em hospedeiros definitivos ou intermediários (Dubey *et al.*, 1998).

O taquizoíto é a forma intracelular obrigatória do parasito, sendo aquela com a capacidade de invadir os tecidos do hospedeiro; tem a forma de lua crescente, com 7 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento, por 2,5 a 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Sua forma arqueada foi responsável pelo nome do gênero *Toxoplasma* (do grego “toxon” que significa arco). É uma forma móvel, de rápida multiplicação, encontrada dentro de vacúolos no citoplasma de várias células de hospedeiros definitivos e intermediários (Dubey *et al.*, 1998). A multiplicação se dá por endodiogenia que é um processo pelo qual duas células filhas são originadas dentro de uma célula mãe que ao se romper origina dois organismos. Os taquizoítos induzem forte resposta inflamatória e destruição tecidual, provocando as manifestações clínicas da doença.

Bradizoítos se encontram no interior dos cistos que são formados dentro das células hospedeiras e cada cisto pode conter centenas de organismos (Dubey *et al.*,

*Rosa, R.F.G.*

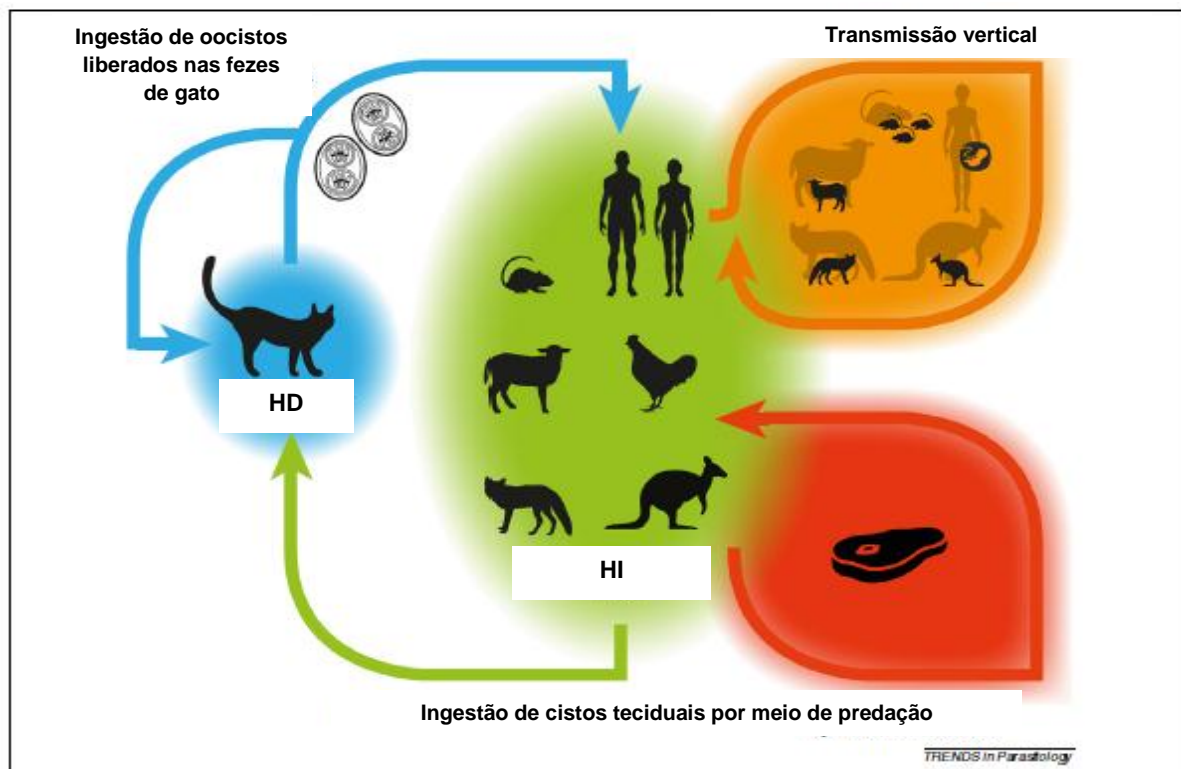
1998). Os taquizoítos multiplicam-se lentamente, expressam moléculas diferentes e são funcionalmente diferentes. A multiplicação também se dá por endodiogenia. Os bradizoítos são muito resistentes e podem persistir por anos nos tecidos, mas podem sair dos cistos teciduais e se transformar em taquizoítos e causar recidiva da infecção particularmente em pacientes imunocomprometidos. Cistos teciduais são capazes de infectar hospedeiros definitivos e intermediários (Montoya e Liesenfeld, 2004).

A multiplicação sexuada de parasitos no intestino do gato forma os oocistos não esporulados, que são eliminados através das fezes do animal. No ambiente, após tornarem-se esporulados, passam a ser infecciosos. Após a ingestão de oocistos, por hospedeiros intermediários, esporozoítos são liberados e passam ao estágio taquizoítos, que são formas de rápida multiplicação do parasito. Os taquizoítos penetram ativamente em todos os tipos de células nucleadas (Montoya e Liesenfeld, 2004), se envolvendo no vacúolo parasitóforo onde decorre sua replicação (Roiko e Carruthers, 2009). Após a multiplicação, *T. gondii* rompe a célula e infecta células adjacentes. Nesta fase inicial, os 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 na medida em que ocorre o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro, levando ao desaparecimento dos parasitos livres e reduzindo a multiplicação intracelular dos mesmos. Nesta fase ocorre a formação dos cistos teciduais contendo bradizoítos que são formas de multiplicação lenta do parasito (Dubey, 1998).

O ciclo de vida de *T. gondii* pode ser dividido em duas fases. A primeira é a fase sexual entero-epitelial, a qual ocorre no intestino delgado de membros da família Felidae, e uma fase assexuada extra-intestinal em animais infectados, incluindo o homem (Montoya e Rosso, 2005).

Todos os três estágios do ciclo de vida de *T. gondii* são infecciosos para os hospedeiros definitivos e intermediários, que podem adquirir a infecção por uma das seguintes rotas: (A) Transmissão horizontal por ingestão oral de oocistos infecciosos do meio ambiente em água ou alimentos contaminados, e até eventualmente por aspirá-los em poeira contaminada; (B) transmissão horizontal por ingestão oral de cistos teciduais contidos em carne crua ou mal cozida ou vísceras do hospedeiro intermediário, ou (C) transmissão vertical pela passagem de taquizoítos através da

placenta (Tenter *et al.*, 2000). O ciclo de vida completo de *T. gondii* pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1:** Ciclo de vida de *T. gondii*. O fluxograma mostra o hospedeiro definitivo (HD), uma variedade de hospedeiros intermediários (HI) e três vias de transmissão: ingestão de oocistos das fezes de gato (indicada pela seta azul), ingestão de cistos teciduais por meio de predação (indicada pelas setas vermelha e verde) e transmissão vertical de mãe para filho (indicada pela seta laranja) (extraído e modificado de Worth, 2013).

## 2.2. Caracterização da Toxoplasmose

O entendimento mais apurado da toxoplasmose teve grande auxílio a partir do desenvolvimento da técnica sorológica denominada teste do corante ou “dye test”, desenvolvido em 1948 por Sabin e Feldman, considerado o teste padrão ouro (*gold standard*) para toxoplasmose (Montoya and Liesenfield, 2004). A elevada proporção de humanos e animais domésticos com anticorpos contra *T. gondii* representou uma grande surpresa para os pesquisadores, que até então consideravam a toxoplasmose como uma infecção relativamente rara (Ferguson, 2009).

Foram muitas as especulações sobre as formas de transmissão da toxoplasmose, Woke e colaboradores (1953) suspeitavam que *T. gondii* era transmitido por artrópodes e investigaram a possibilidade de transmissão por várias espécies de insetos, porém seus resultados não confirmaram suas hipóteses. Todavia, as primeiras evidências relacionadas à transmissão da toxoplasmose surgiram com estudos de casos de recém-nascidos e a transmissão vertical. As mães dessas crianças, apesar de assintomáticas, quando submetidas ao teste

sorológico mostravam-se positivas, o que permitiu deduzir sobre a ocorrência de transmissão congênita (Wolf *et al.*, 1941).

Os primeiros estudos correlacionando a infecção toxoplásmica com hábitos alimentares foram publicados por Weinman e Chandler (1954). Em estudos de sobrevivência de *T. gondii*, Jacobs e colaboradores (1960) mostraram que cistos teciduais de bradizoítos eram capazes de sobreviver após exposição à ácidos e à tripsina, permitindo prever o papel da alimentação como fonte de transmissão da toxoplasmose. Desmonts e colaboradores (1965) confirmaram o papel de alimentos mal cozidos ou crus na transmissão de cistos de *T. gondii*. Além disso, estudos de Bahia-Oliveira e colaboradores (2003) demonstraram pela primeira vez a ocorrência da relação entre a infecção por *T. gondii* e o consumo de água não tratada ou não filtrada de forma contínua para grandes contingentes populacionais o que até então era concebido ocorrer apenas em surtos da infecção (Benenson *et al.*, 1982; Bowie *et al.*, 1997). O potencial da água contaminada presumidamente por oocistos de *T. gondii* como veículo de transmissão da toxoplasmose foi definitivamente demonstrado ocorrer pela primeira vez em um surto no Brasil onde se pode demonstrar e genotipar o parasito implicado no surto (Moura *et al.*, 2006). Posteriormente na França demonstrou-se a presença de DNA do *T. gondii* em água que seria utilizada para consumo humano e animal (Aubert e Villena, 2009). Embora pouco comum, a transmissão por transplante de órgãos, transfusão sanguínea e contaminação com agulhas ou animais infectados tem sido também reportada (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Dados os vários mecanismos de transmissão da toxoplasmose, atualmente ela é considerada uma das mais comuns infecções parasitárias do mundo, tanto na área médica quanto veterinária (Tenter *et al.*, 2000). A alta prevalência da toxoplasmose adquirida e congênita na cidade de Campos dos Goytacazes, é reconhecida como uma das mais elevadas já descrita na literatura. Estudo sorológico conduzido em Campos dos Goytacazes, área endêmica para a toxoplasmose, entre a população de baixo poder aquisitivo, mostrou que a soroprevalência foi de 84,8% (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

Grandes esforços foram alocados com o intuito de se compreender mais detalhadamente a patogenia da toxoplasmose e suas principais manifestações clínicas. Indiscutivelmente que a compreensão do ciclo de vida completo de *T. gondii* facilitou o entendimento dessas questões. Após a ingestão dos oocistos, sua



membrana é rompida pelo suco gástrico liberando quatro esporozoítos que se disseminam nas células do lúmen intestinal e alcançam o sistema linfático e a circulação sanguínea do hospedeiro (Dubey *et al.*, 1970). Durante a fase aguda da doença ocorre expressiva multiplicação dos taquizoítos e invasão de várias células. A fase crônica se caracteriza por um período de latência, no qual bradizoítos multiplicam-se lentamente em cistos teciduais.

*Toxoplasma gondii* infecta células nucleadas, inclusive tem capacidade de sobreviver no interior de células do sistema fagocítico. Em pacientes imunocompetentes a infecção toxoplásmica é em geral assintomática, por outro lado, em pacientes imunossuprimidos ou imunocomprometidos ele pode causar sérias doenças (Miller *et al.*, 2009). Foi descrito que a infecção toxoplásmica causa morte celular e necrose rodeada por uma resposta inflamatória aguda (Bhopale, 2003).

Montoya e Liesenfeld (2004) relatam que a toxoplasmose sintomática é prevalente entre 10 e 20% dos pacientes infectados. Nesses pacientes a infecção pode se caracterizar por linfadenopatia com hiperplasia reticular e hidrocefalia (Jackson e Hutchison, 1989). A doença pode ainda causar, secundariamente, mudanças hematológicas como anemia, leucopenia, linfocitoses, trombocitopenia e pneumonia (Durlach *et al.*, 2003). Associa-se também a ocorrência de doenças oculares, especialmente retinocoroidites (Holland, 2003).

### **2.2.1. Caracterização da Toxoplasmose Ocular**

Nos primeiros estudos clínicos de toxoplasmose já se observava sua possível associação com distúrbios visuais. O primeiro estudo clínico detalhado sobre toxoplasmose ocular foi realizado por Hogan (1951), entretanto, as lesões oculares eram relacionadas apenas com a doença congênita. A ocorrência de lesões oculares em adultos foi reconhecida através de estudos preliminares no final dos anos 1950 (Hogan, 1958), que ainda postulavam que tais lesões seriam reflexo tardio de infecção congênita. Um estudo brasileiro apresentou dados epidemiológicos de filhos de mães com sorologia negativa para toxoplasmose apresentando lesão ocular colocando fim ao entendimento de que lesões oculares seriam decorrentes apenas das infecções congênitas e que portanto lesões oculares poderiam também ser atribuídas à infecção durante qualquer fase da vida (Holland, 2004).

A retina é o sítio usual para localização de *T. gondii* no olho, podendo o parasito ainda atingir a coróide e o nervo óptico (Eckert *et al.*, 2007). A duração e a

intensidade das lesões estão relacionadas ao hospedeiro, ao parasito e a fatores ambientais, sendo que o genótipo do parasito infectante parece ser importante na severidade da doença em pacientes imunocompetentes (Holland, 2004). Em um estudo comparativo realizado por Gilbert e colaboradores (2008), foi sugerido que a aumentada frequência e a severidade da doença ocular no Brasil, comparada com resultados europeus, estaria provavelmente relacionado à maior exposição da população brasileira a cepas mais virulentas de *T. gondii*.

A retinocoroidite toxoplásmica pode causar perda da acuidade visual e cegueira entre adultos jovens nos países desenvolvidos. Ela é caracterizada por retinopatia necrosante, que é desencadeada pela ativação de organismos latentes na retina (Garweg e Candolfi, 2009). A destruição tecidual é provavelmente atribuída ao sinergismo entre a proliferação de *T. gondii* e reações inflamatórias na retina, cada um com maior ou menor importância dependendo de características intrínsecas ao hospedeiro (Holland, 2004).

Em alguns países, mais de 50% dos casos de uveítes posteriores são atribuídos à toxoplasmose (Soheilian *et al.*, 2004), enquanto que no Brasil esse percentual encontra-se em mais de 80% dos casos (Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005). Especificamente sobre a toxoplasmose ocular, estudos realizados no Brasil sugerem pequenas variações no percentual de prevalência. Em Campos dos Goytacazes, a prevalência de doença ocular pode chegar a atingir próximo de 30% da população soropositiva (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012), em Erechim, no Rio Grande do Sul, a prevalência foi de 17% da população com toxoplasmose (Glasner *et al.*, 1982).

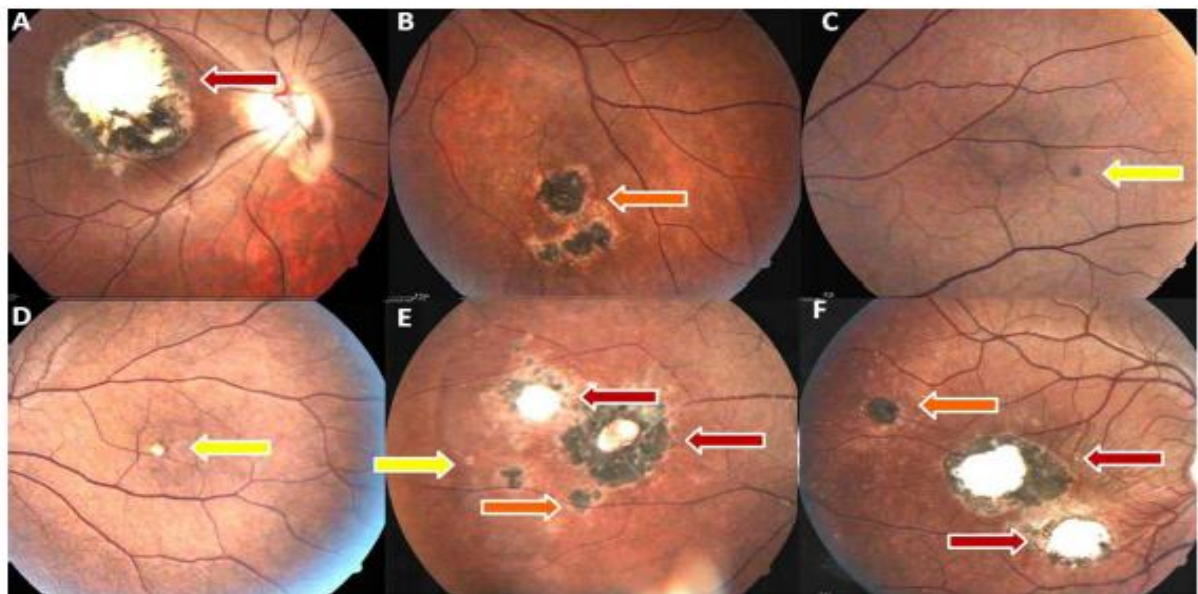
### **2.2.2. Classificação das Lesões**

A toxoplasmose ocular tipicamente afeta o polo posterior dos olhos, podendo ocorrer acometimento mono ou bilateral. As lesões podem ser solitárias, múltiplas ou satélite (Commodaro, 2009).

Porém, como observado em trabalhos prévios, indivíduos portadores de lesões retinianas, com diferentes graus de destruição retino-coroidal, apresentam diferenças significativas quanto a diversos parâmetros imunológicos (Azevedo-Silva, 2001), assim, é importante que seja utilizado um padrão de classificação das lesões. Nesse sentido, o presente estudo considerará o sistema de classificação que reflete o grau de destruição do tecido retiniano. Na Figura 2, lesões cicatrizadas da retina apresentando alto, médio ou baixo grau de severidade, foram classificadas como do

tipo A, B ou C, respectivamente (Bahia-Oliveira *et al.*, 2001, 2009, 2012; Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005; Dutra *et al.*, 2013).

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 retinocoroidal, 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 2A). 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 2B). 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 2C e 2D). Os indivíduos afetados pela toxoplasmose ocular podem apresentar cicatrizes de um único tipo de lesão (Figura 2A-D) ou cicatrizes de lesões com múltiplos graus de severidade (Figura 2E e 2F).



**Figura 2:** Fotografias de lesões cicatriciais não ativas de fundo de olho (retinocoroidianas). Os painéis 2A e 2B representam lesões únicas do tipo A e B, respectivamente. Painéis 2C e 2D representam lesões únicas tipo C, que são hiperpigmentadas ou hipopigmentação (atrófica), respectivamente. As lesões cicatriciais por tipo são indicadas por setas coloridas: vermelha representa tipo A das lesões cicatriciais, laranja representa lesões cicatriciais tipo B e amarela indica lesões cicatriciais tipo C. As duas imagens na parte inferior (painéis 2E e 2F) mostram múltiplas lesões cicatriciais de tipo ABC (com setas vermelhas, laranja e amarela) e uma lesão cicatricial múltipla do tipo AB (com setas vermelhas e laranja) (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012).

### 2.3. Resposta Imune ao *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* induz resposta imune consistente e duradoura que leva ao controle da proliferação dos taquizoítos nos hospedeiros. A infecção primária é caracterizada por elevados níveis de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Figura 3). A ação combinada dessas citocinas é central para a resistência ao *T. gondii*, e provoca uma forte resposta imune adaptativa T-helper-1 (Th1) mediada por células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Montoya e Liesenfeld, 2004).

#### 2.3.1. Participação das células na imunidade ao *Toxoplasma gondii*

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN), conhecidos como os primeiros tipos celulares a alcançarem um sítio de infecção, exercem sua atividade antimicrobiana por meio de fagocitose e inativação de patógenos via mecanismos de citotoxicidade. Foi observado que PMN, *in vitro*, quando estimulados com antígenos de *T. gondii* liberam rapidamente IL-12 e IFN- $\gamma$ , sugerindo que estas células estejam envolvidas nas respostas de citocinas no início da infecção, podendo desenvolver importante papel no desencadeamento da secreção de muitas outras citocinas detectadas na infecção toxoplásmica (Bliss *et al.*, 1999).

A estimulação de macrófagos por *T. gondii* induz a produção de TNF- $\alpha$  e IL-12, os quais agem sinergicamente estimulando células NK a secretarem IFN- $\gamma$ , que por sua vez intensifica a ativação de macrófagos infectados (Denkers e Sher, 1997) e ativam macrófagos não infectados, estimulando o seu metabolismo oxidativo.

Na infecção toxoplásmica, as células NK foram postuladas como mediadoras de mecanismos citotóxicos, podendo agir diretamente contra os parasitos (Hauser e Tsai, 1986). A atividade desta célula está também relacionada com a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, LT- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES (Biron *et al.*, 1999; Moretta *et al.*, 2001). O papel das células NK tem sido explorado *in vivo* em camundongos *SCID*, os quais são portadores de imunodeficiência severa, com ausência de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup>. Neste modelo, a resistência a *T. gondii* está relacionada à produção de IFN- $\gamma$  por células NK (Sher *et al.*, 1993). Esta atividade de NK é dependente de fatores solúveis secretados por macrófagos ativados, tais como IL-12 e TNF- $\alpha$ . As citocinas TGF- $\beta$  e IL-10 antagonizam a resposta desta célula por meio de vias diferentes. A primeira inibe a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK, enquanto a segunda age sobre

macrófagos impedido-os de produzir TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-12, culminando na inibição da resposta pelas células NK (Alexander e Hunter, 1998).

Estudos prévios realizados com indivíduos residentes no município de Campos dos Goytacazes mostraram que as células NK são importantes tanto para controle da manifestação da doença ocular como para transmissão fetal do parasito. Bahia-Oliveira e colaboradores (2009) mostraram que indivíduos soropositivos para toxoplasmose sem presença de lesão ocular apresentavam um percentual significativamente mais elevado destas células do que indivíduos soropositivos com presença de lesão ocular, sugerindo que células NK teriam importante papel no controle dos cistos teciduais. Estes dados corroboram o que foi descrito por Denkers e Gazzinelli (1998), os quais mostraram que células NK, em infecção murina, mantinham cistos teciduais em estado latente de forma que não comprometessem os tecidos oculares.

Na imunidade celular específica é importante a participação de células T tanto direta quanto indiretamente através da secreção de seus produtos. A participação da subpopulação de células TCD4<sup>+</sup> foi demonstrada ser de grande importância, visto que murinos cronicamente infectados, quando tiveram suas células TCD4<sup>+</sup> depletadas, apresentaram danos no SNC que acarretaram a morte (Vollmer *et al.*, 1987). Entretanto, o completo controle da toxoplasmose crônica é dependente tanto de linfócitos TCD4<sup>+</sup> quanto de TCD8<sup>+</sup> e, da síntese de IFN- $\gamma$ , resultante da função sinérgica desenvolvida por estas duas subpopulações celulares, além das células NK (Gazzinelli *et al.*, 1992). Células Th1 CD4<sup>+</sup> produzem, dentre outras, as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2, sendo a IL-2 responsável pela ativação de células NK e células T, as quais são citotóxicas para as células-alvo infectadas por *T. gondii*. Células Th2 CD4<sup>+</sup> produzem, dentre outras, as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que estão associadas à regulação da resposta imune mediada por célula. Estes subgrupos de células T são capazes de regular cruzadamente as atividades uma das outras. Adicionalmente, a transferência adotiva de células T imunes, principalmente a subpopulação de linfócitos TCD8<sup>+</sup>, é capaz de proteger camundongos dos desafios com cepas virulentas do parasito (Gazzinelli *et al.*, 1991). Linfócitos TCD8<sup>+</sup> atuam através da produção de IFN- $\gamma$ , mas também desempenham atividade citotóxica sobre as células infectadas (Alexander e Hunter, 1998).

Outra subpopulação de células que também participa da imunidade celular é a chamada linfócito duplo negativo. Essas células não expressam em sua superfície

nem a molécula CD4 e nem CD8. Esses linfócitos estão presentes em baixas concentrações, variando entre 1 a 5% do total dos linfócitos T circulantes em adultos saudáveis (Roden *et al.*, 2008). Estas células podem expressar o receptor de células T (TCR) do tipo alfa/beta ( $\alpha\beta$ ) ou do tipo gama/delta ( $\gamma\delta$ ). O subconjunto de células T $\gamma\delta$  encontra-se aumentado em várias doenças infecciosas humanas, como por exemplo: leishmaniose cutânea, reações reversas na hanseníase, na área de zonas de necrose em linfadenite tuberculosa circundante, no sangue periférico de pacientes com sarampo, na mononucleose infecciosa, na imunodeficiência humana causada por HIV-1 e na malária (Born *et al.*, 1991).

Linfócitos T $\alpha\beta$  bem como linfócitos T $\gamma\delta$  participam da imunidade celular contra *T. gondii* em humanos durante a fase aguda da infecção (Scalise *et al.*, 1992; De Paoli *et al.*, 1992). Modelos de estudo utilizando camundongos "nude" (atímicos) mostram que estes animais são extremamente susceptíveis a cepas virulentas e não virulentas de *T. gondii* (Lindberg e Frenkel, 1977).

Os mecanismos para ligação e reconhecimento do antígeno pelas células T $\gamma\delta$  ainda não estão completamente compreendidos, porém parece que em alguns casos o antígeno pode se ligar diretamente ao TCR desta célula e em outro, necessitam ser apresentados por uma APC (Morita *et al.*, 2007) podendo ter a participação da molécula CD1 no reconhecimento de alguns antígenos lipídicos (Russano *et al.*, 2006; Spada *et al.*, 2000).

Outros estudos discutem que o reconhecimento de antígenos pelo TCR  $\gamma\delta$  ocorre de forma fundamentalmente diferente do que ocorre nas células T $\alpha\beta$ . As células  $\gamma\delta$  não requerem o processamento do antígeno e o reconhecimento não é restrito as moléculas do complexo MHC. Foi demonstrado que linfócitos T $\gamma\delta$  são expandidos e ativados *in vitro* quando cultivados com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) que internalizaram parasitos mortos. Estes linfócitos desenvolvem ação citotóxica contra as células infectadas por *T. gondii* por meio de via independente de MHC e produzem IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , sugerindo que esta subpopulação possa ser importante no início da resposta imune protetora contra *T. gondii* (Subauste *et al.*, 1995).

Brandes e colaboradores (2005) demonstraram que células T $\gamma\delta$  humanas possuem as características principais de APC. Quando ativadas, essas células processam e apresentam os antígenos via MHC e fornecem sinais co-estimulatórios

suficientes para indução da proliferação e diferenciação celular de linfócitos T $\alpha\beta$  *naive in vitro*.

Dessa forma, atuam dentro da imunidade inata e servem como elo entre a imunidade inata e adaptativa. Alguns estudos mostram que linfócitos T $\gamma\delta$  da corrente sanguínea, após serem expostos a agentes infecciosos podem ativar outros componentes do sistema imune e desencadear rápida secreção de quimiocinas e citocinas do perfil Th1 como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  estimulando assim as células NK, NKT e facilitando o desenvolvimento da resposta imune adaptativa de linfócitos T $\alpha\beta$  específicos (Moser & Eberl, 2007; Wang *et al.*, 2001). Além disso, também secretam quimiocinas que atraem outros leucócitos e fagócitos para o local da infecção (Cipriani *et al.*, 2000).

Rhodes e colaboradores (2001) demonstraram evidências que os linfócitos T $\gamma\delta$  podem regular a função imune de outros leucócitos devido a produção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ . Além disso, as células T $\gamma\delta$  também expressam receptores de células NK como NKG2D (Bauer *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2001; Rincon-Orozco *et al.*, 2005), podendo então exibir atividade citotóxica contra células infectadas por vírus e células tumorais.

Estudos *in vitro* realizados em primatas demonstraram o desenvolvimento de memória pelas células T $\gamma\delta$ , evidenciada por uma resposta maior e mais rápida após a segunda exposição ao antígeno (Shen *et al.*, 2002). Porém, essas células não são capazes de desenvolver memória do tipo antígeno-específica, ou seja, não são capazes de desenvolver uma resposta a apenas um antígeno, como as células T $\alpha\beta$  de memória. Essas células T $\gamma\delta$  após exposição a determinado antígeno se transformam em um estado que os pesquisadores designaram de “preparadas” no qual as células expressam marcadores de ativação e algumas moléculas de memória, sendo capazes então de reagir de forma mais exacerbada em uma segunda exposição, porém, essa resposta não é considerada antígeno-específica uma vez que elas possuem baixa especificidade para os antígenos (Jin *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2002).

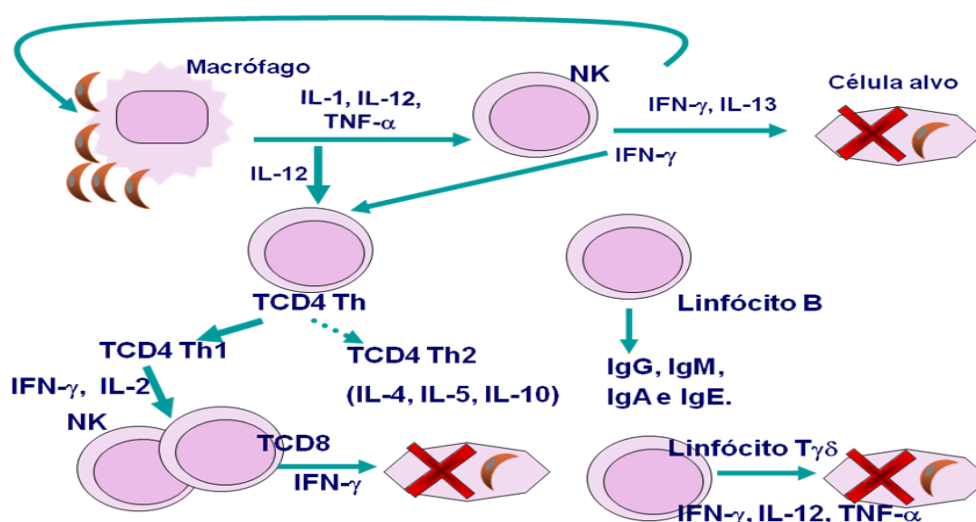
Além disso, estudos recentes demonstraram que células T $\gamma\delta$  humanas ativadas podem auxiliar na resposta imune humoral mediada por linfócitos B. Isto foi evidenciado pela demonstração de moléculas co-estimulatórias importantes para ativação das células B em linfócitos T $\gamma\delta$ , e em co-culturas *in vitro* com células B tonsilar e células  $\gamma\delta$  (Brandes *et al.*, 2005; Caccamo *et al.*, 2006).

Concluindo, os linfócitos T $\gamma\delta$  podem auxiliar na defesa do organismo através da apresentação de antígenos, secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, destruição direta de células infectadas ou transformadas, regulação do processo inflamatório, auxílio na ativação de células B e produção de anticorpos e ainda podem exibir comportamento de células de memória. Dessa forma, células T $\gamma\delta$  possuem características inatas e adaptativas muitas vezes sendo consideradas o elo entre os dois tipos de resposta imune.

Os linfócitos B secretam anticorpos específicos de diferentes isotipos, como IgM, IgG, IgA e IgE contra *T. gondii* e os taquizoítos extracelulares podem ser destruídos por mecanismos dependentes de anticorpos. Ocorre o predomínio de anticorpos IgM durante a fase aguda da infecção, assim como de anticorpos IgG durante a fase crônica (Couto *et al.*, 2006). A produção do isotipo IgA tem sido encontrado precocemente sobre superfícies de mucosa, sugerindo atividade protetora desta imunoglobulina contra reinfecções do hospedeiro (Mineo *et al.*, 1993). 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. Harris e colaboradores (2000) mostraram células B de camundongos produzindo IFN- $\gamma$  em resposta a infecção por *T. gondii*.

Azevedo-Silva (2001), em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, investigou a participação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) na imunidade contra *T. gondii*. Foram observados perfis diferentes da resposta imune de grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose sem lesão ocular e de grupos de indivíduos portadores de lesão ocular toxoplásmica com diferentes apresentações. Indivíduos portadores de lesão do tipo A apresentaram baixos percentuais de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> circulantes, enquanto indivíduos apresentando lesões oculares tipo C, mostraram elevados percentuais de células T $\gamma\delta$  circulantes, bem como de IFN- $\gamma$ , sugerindo que manifestações clínicas da doença ocular toxoplásmica, encontram-se associadas à apresentação de parâmetros imunológicos periféricos diferenciados (Azevedo-Silva, 2001).





**Figura 3:** Representação das células e citocinas do sistema imune envolvidas na toxoplasmose e na destruição do parasito (Azevedo-Silva, 2001 com permissão).

### 2.3.2. O papel das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$ e a imunidade ao *T. gondii*

Vários estudos têm sido realizados para investigar o papel das citocinas no controle da infecção ocular por *T. gondii*, tanto em modelo animal, quanto em humanos.

As citocinas são moléculas protéicas com potente capacidade imunomoduladora, e medeiam a inflamação e a resposta imune através de sua influência sobre a ativação, a proliferação e a diferenciação celular. Há muitos relatos de que genes de citocinas são polimórficos em suas regiões reguladoras, tendo demonstrado que polimorfismos de citocinas podem influenciar nos desfechos clínicos de doenças (Pyo *et al.*, 2003).

Conjuntos diferentes de citocinas que, desempenham funções efetoras distintas, são produzidos por células T *helper* (Th). No final da década de 80 foi demonstrado que as células Th podiam se diferenciar, basicamente, em dois subconjuntos de células: Th1 (resposta pró-inflamatória) ou Th2 (resposta anti-inflamatória). As citocinas foram classificadas em citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-1 e TNF- $\alpha$ ); citocinas de perfil Th1 (por exemplo, IFN- $\gamma$ ) e citocinas de perfil Th2 (por exemplo, IL-4, IL-6 e IL-10) (Mosmann e Coffman, 1989).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina com importante propriedade anti-inflamatória e imunossupressora, produzida por células Th2, que protege o hospedeiro de uma resposta inflamatória exacerbada contra infecções por patógenos (Miller *et al.*, 2009). IL-10 é produzida principalmente por monócitos, linfócitos T, linfócitos B, células NK, macrófagos e células dendríticas (Deniz *et al.*,

2008). IL-10 inibe a expressão de muitas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (De Waal Malefyt *et al.*, 1991). Por outro lado, IL-10 promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células B humanas e aumenta a produção de IgG4 (Akdis e Akdis, 2009).

Para entender o papel da IL-10 na retinocoroidite toxoplásmica, foram comparados camundongos com deficiência funcional do gene desta interleucina e camundongos controles selvagens (sem qualquer deficiência) após injeção intraperitoneal do parasito. Aumento da infiltração celular e necrose foram observados no tecido ocular dos hospedeiros imunodeficientes em relação aos controles (Lu *et al.*, 2003).

O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória, produzida por células Th1, que protege o hospedeiro contra a infecção por *T. gondii* por estimular a atividade microbicida dos macrófagos e induzir a secreção de IFN- $\gamma$  pelas células NK (Filisetti e Candolfi, 2004).

Dados da literatura mostram que camundongos infectados por *T. gondii* desenvolveram inflamação ocular focal e envolvimento do epitélio pigmentar da retina. O tratamento desses animais com anti-IFN- $\gamma$  ou anti-TNF- $\alpha$  resultou em um aumento das lesões oculares, associadas principalmente com os taquizoítas (Gazzinelli *et al.*, 1994). Outro estudo demonstrou, no entanto, que a estimulação de endotélio vascular retiniano de camundongos infectados pelo parasito com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inibiu o crescimento do mesmo dentro destas células (Brunton *et al.*, 2000). Esses resultados sugerem que IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são elementos cruciais no controle do crescimento parasitário, que está diretamente associado ao desenvolvimento das lesões oculares.

Peixoto-Rangel (2008), na região de Campos dos Goytacazes, mostrou que PBMC de indivíduos soropositivos para toxoplasmose (com ou sem lesão ocular) apresentaram aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quando comparados com PBMC de indivíduos soronegativos sob estímulo de antígeno solúvel de *T. gondii*.

O envelhecimento imunológico também é acompanhado por uma mudança de perfil de expressão das citocinas. Dados da literatura mostram que, a inflamação crônica decorrente do envelhecimento (ou *inflammaging*), mostra-se com um aumento de até quatro vezes dos níveis de citocinas inflamatórias circulantes. Vários estudos relataram aumento nos níveis de IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15 e TNF- $\alpha$  com o

aumento da idade (Malaguarnera *et al.*, 2001; Bruunsgaard *et al.*, 2003). O desequilíbrio na produção e na liberação de citocinas e a manutenção de um estado pró-inflamatório contribuem para a maior predisposição a determinadas doenças infecciosas e para o aparecimento e/ou agravamento de doenças crônicas, condições comuns no idoso.

Estudos realizados por Peixoto-Rangel (2008) também demonstraram que células de indivíduos soropositivos para toxoplasmose (com ou sem lesão ocular) apresentaram aumento na produção da citocina IFN- $\gamma$ , após estímulo de antígeno solúvel de *T. gondii*, em comparação aos indivíduos soronegativos e que os níveis desta citocina tendem a aumentar com a idade.

Como descrito, 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 parasitos, quanto a magnitude da resposta imune contra o mesmo. Assim, a resposta imune efetiva contra os parasitos pode se tornar lesiva para o hospedeiro gerando processos de autoagressão caso ela não seja devidamente balanceada (Gazzinelli *et al.*, 1994; Bruton *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2003; Filisetti e Candolfi, 2004).

#### **2.4. Susceptibilidade Genética a Infecções Parasitárias**

O avanço de projetos genomas tanto de humanos como de patógenos tem contribuído para estudos das interações entre patógeno e hospedeiro no sentido de determinar a susceptibilidade à doença infecciosa através de novas abordagens (Blackwell, 2001). O polimorfismo genético tem papel importante na susceptibilidade genética a doenças infecciosas, uma vez que pode alterar sítios de reconhecimento antigênico, a ligação de citocinas a seus ligantes, a produção das mesmas e a expressão de proteínas modificadas (Dutra *et al.*, 2009). Entretanto, muitos outros fatores também estão envolvidos na determinação da susceptibilidade, tais como, estado de saúde prévio e imunidade adquirida (Kwiatkowski, 2000).

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). Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) são resultantes de mutações pontuais e correspondem a posição onde existe uma alternância dos nucleotídeos A, C, G, T em uma frequência alélica mínima de 1% numa dada população. Os SNPs podem estar presentes tanto em regiões codificadoras como

em regiões não codificadoras do genoma (Brookes, 1999). Em regiões codificadoras, quando resultam em uma substituição de aminoácido, são denominados sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Nesses casos, podem ocorrer modificações estruturais e funcionais nas proteínas. As substituições mais freqüentes que ocorrem no DNA são as que envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, troca entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (T/C ou C/T) e são denominadas transições. Caso essas mutações ocorram em células germinativas, sejam transmitidas as gerações seguintes e se fixem na população em uma freqüência mínima de 1% passam a ser consideradas polimorfismos (Brookes, 1999). Vários SNPs não parecem afetar os produtos de genes, mas outros podem ter importância funcional, uma vez que afetam a transcrição gênica, a estabilidade do RNA ou a própria proteína codificada (Shapira, 2005).

As infecções são uma das principais causas da morbidade e mortalidade humana. As doenças infecciosas são uma grande pressão seletiva, e os genes envolvidos na resposta imune são os mais numerosos e diversos do genoma humano, indicando as vantagens evolutivas de uma resposta imunológica variada para uma ampla gama de patógenos (Burgner, 2006). O exemplo mais claro é com o protótipo de região genética de susceptibilidade à infecção, HLA. Pacientes cujos alelos de HLA classe II são heterozigotos e são mais propensos a eliminar a Hepatite B infecciosa.

Vários parasitos, da mesma forma que *T. gondii*, são capazes de provocar infecção crônica assintomática em seus hospedeiros, por muitos anos. Em alguns indivíduos, no entanto, os mesmos parasitos podem causar doença mais agressiva. 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 parasitos. Muita atenção tem sido dada ao ambiente, porque a transmissão do parasito depende fundamentalmente de fatores ambientais, incluindo a densidade e distribuição de vetores e virulência do parasito.

A composição genética pode afetar a susceptibilidade à doença, influenciando a resposta inflamatória, imunidade inata e adaptativa, bem como pode mudar as condições de colonização de microorganismos. Uma vez que a consequência funcional de polimorfismos pode ser o estabelecimento do fenótipo de determinada

doença, muitos estudos têm observado associações entre os polimorfismos de genes específicos com ocorrência de determinadas patologias (Dutra *et al.*, 2009).

As afirmações de que polimorfismos de genes podem influenciar na expressão de moléculas controladoras de respostas imunes têm provocado um profundo impacto no entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das doenças. Nos últimos anos têm-se demonstrado que polimorfismos em genes de citocinas são correlacionados tanto com a susceptibilidade quanto com a proteção ao desenvolvimento de doenças (Dutra *et al.*, 2009).

Um trabalho sobre polimorfismo em genes de citocinas desenvolvido com pacientes colombianos apresentando diferentes manifestações clínicas de tuberculose, mostrou que polimorfismos de nucleotídeo único presentes em genes que codificam IL-10 e IFN- $\gamma$  estavam associados à tuberculose pleural em indivíduos que apresentavam baixo ou alto perfil de produção dessas citocinas, respectivamente (Henaó *et al.*, 2006). Outros trabalhos demonstraram significativa associação entre polimorfismos na região promotora de interferon e ocorrência de leishmaniose (Salih *et al.*, 2007) e malária (Naka *et al.*, 2009).

Recentemente, um estudo em Campos do Goytacazes revelou associação de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *IFNG* com diferentes tipos de lesões cicatriciais da retina provavelmente causadas pela toxoplasmose. Nesse estudo foram observadas associações entre os SNPs rs2069718 e rs3181035 com lesões cicatriciais da retina/retinocoroideanas tipo A e do tipo C, respectivamente (Guerra-Peixe *et al.*, 2014). Os autores também demonstraram que, a associação entre o SNP rs2069718 e as lesões cicatriciais tipo A revelou diferenciais níveis de IFN- $\gamma$  correlacionados com genótipos distintos. Esses dados sugerem fortemente que estudos de imunogenética de indivíduos com infecção congênita ou adquirida após o nascimento são necessários para entender melhor o papel das citocinas e seus polimorfismos na patogênese da toxoplasmose ocular.

Polimorfismo de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$  e citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  têm sido associado a várias doenças (Lu *et al.*, 2005 e Cordeiro *et al.*, 2008). Assim, foram investigados alguns polimorfismos de genes que codificam citocinas relacionados à resposta imune na retinocoroidite toxoplásmica: IL-10 e TNF- $\alpha$ . Ao ser analisado o polimorfismo do gene responsável pela produção da IL-10, rs1800896, observou-se que a presença do alelo A está associado com a ocorrência da retinocoroidite

toxoplásmica (Cordeiro *et al.*, 2008). Este resultado sugere que indivíduos infectados e portadores deste polimorfismo apresentam um maior risco de desenvolverem a doença, em comparação com indivíduos infectados, mas sem o polimorfismo. O polimorfismo do gene que foi mostrado influenciar na produção do TNF- $\alpha$ , rs1800629, está associado ao aumento da produção desta citocina. Com relação à retinocoroidite toxoplásmica, não foram encontradas associações significativas do polimorfismo rs1800629 com a ocorrência da doença, quando comparados indivíduos infectados com e sem a doença, e com a recorrência da doença (Cordeiro *et al.*, 2008).

Uma série de estudos vêm confirmando a relevância de elementos da resposta imune na patogênese da retinocoroidite toxoplásmica. Parece ser necessário um controlado balanço entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na determinação da ocorrência e da gravidade da doença. Além disso, evidências recentes demonstram que predisposição genética pode ser relacionada tanto com a ocorrência, quanto com a recorrência da toxoplasmose ocular (Cordeiro *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2009; Bahia-Oliveira *et al.*, 2012; Guerra-Peixe *et al.*, 2014).

### 3. JUSTIFICATIVA

A endemicidade da toxoplasmose em Campos dos Goytacazes-RJ é alta atingindo 57,2% da população. No contingente populacional de baixo poder aquisitivo o nível de prevalência desta infecção atinge 84,8% (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Além disso, esta mesma população, que vive em comunidades carentes, sob condições sanitárias precárias, também está exposta a infestações helmínticas adquiridas via oral (Bahia-Oliveira *et al.*, 2009).

Infeções parasitárias geram basicamente dois tipos de resposta mediada por linfócitos Th. O padrão de resposta do tipo Th1 (pró-inflamatória) e Th2 (anti-inflamatória) induzem a produção de citocinas que são secretadas durante a infecção. *T. gondii* provoca uma forte resposta Th1 (Montoya e Liesenfeld, 2004) enquanto infecções por helmintos resultam em uma resposta imune potente do tipo Th2.

Alguns estudos apontam a importância dos linfócitos  $\gamma\delta$  em algumas doenças infectocontagiosas como toxoplasmose, leishmanioses, malária, hepatites e algumas infecções causadas por bactérias (De Paoli *et al.*, 1992; Scalise *et al.*, 1992; Carulli *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2003; Dieli *et al.*, 2001; Hossain *et al.*, 2000; Mathiot *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 1996; Ottonnes *et al.*, 2000). Porém, apesar dos esforços, muitos estudos ainda são necessários para se conhecer o papel exato dessas células na imunidade contra infecções por *T. gondii*. Um estudo mais detalhado dos linfócitos  $\gamma\delta$  na toxoplasmose e o padrão de citocinas, produzido por essas células, poderá ser utilizado na padronização de novos parâmetros laboratoriais para avaliação clínica e prognóstica de pacientes infectados.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram a participação de células mononucleares do sangue periférico na imunidade contra *T. gondii* (Azevedo-Silva, 2001). Estudos posteriores realizados por Peixoto-Rangel (2008) na região de Campos mostraram que PBMC de indivíduos soropositivos para toxoplasmose (com ou sem lesão ocular) apresentaram aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , após estímulo de antígeno solúvel de *T. gondii*, em comparação a PBMC de indivíduos soronegativos. Esse estudo também mostrou que os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos tendem a aumentar com a idade, enquanto os níveis de IL-13 permanecem constantes. Isto sugere que IL-13 estaria controlando os níveis de produção das demais citocinas, mas não os de IFN- $\gamma$ , o que poderia

explicar o desenvolvimento de lesões severas em indivíduos mais velhos (Holland, 2009).

O envelhecimento imunológico é acompanhado por mudança de perfil de expressão das citocinas. O *inflammaging* aparenta ter uma propensão progressiva a um estado pró-inflamatório fortemente influenciado pela carga genética do indivíduo (Mishto *et al.*, 2003).

Deste modo, a investigação de parâmetros moleculares a partir de levantamentos epidemiológicos é importante tanto para fornecer sustentação no contexto das doenças infecciosas, como para ampliar sua dimensão de importância enquanto modelo para a pesquisa básica. No Brasil, estudos envolvendo o parasito *T. gondii* tem demonstrado o potencial da importância deste como modelo de estudo em projetos de pesquisa na área de imunogenética e epidemiologia molecular, sugerindo que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) poderiam ser responsáveis por variações tanto em componentes da resposta imune inata como no padrão de resposta de citocinas (Cordeiro *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2009; Bahia-Oliveira *et al.*, 2012; Guerra-Peixe *et al.*, 2014).

Desse modo, a investigação de SNPs nos genes das citocinas *IL-10* e *TNF- $\alpha$*  e o perfil de secreção destas citocinas pelos linfócitos T $\gamma\delta$  no contexto da idade dos pacientes infectados por *T. gondii* e apresentando ou não lesão ocular podem trazer contribuições importantes na elaboração de estratégias de monitoramento da toxoplasmose ocular com repercussões importantes como na conduta do tratamento da doença com o avanço da idade por exemplo.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

A fim de melhor compreender o papel de linfócitos  $T\gamma\delta$  produtores das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  nas manifestações oculares da infecção por *Toxoplasma gondii*, propôs-se investigar polimorfismos de nucleotídeo único nos genes dessas citocinas e seus potenciais efeitos sobre a resposta imune, relacionando com a manifestação e/ou severidade da retinocoroidite toxoplásmica em indivíduos de diferentes faixas etárias.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Recrutar aproximadamente 500 indivíduos distribuídos em coorte de indivíduos infectados afetados por lesão ocular ou não afetados e não infectados pelo *T. gondii*;
- Selecionar SNPs através dos *site* HapMap e *software* Haploview v4.2;
- Genotipar SNPs dos genes candidatos *IL10* e *TNFA* pelo Ensaio de TaqMan;
- Relacionar os polimorfismos com a ocorrência e/ou severidade das lesões por meio de testes de associação genética baseado em população;
- Caracterizar através da citometria de fluxo os percentuais dos linfócitos  $T\gamma\delta$  do sangue periférico de indivíduos infectados afetados por lesão ocular ou não afetados e não infectados pelo *T. gondii*, entre duas diferentes faixas etárias: 1) até 59 anos de idade (< 60 anos) e 2) acima de 60 anos de idade ( $\geq$  60 anos);
- Investigar o percentual de linfócitos  $T\gamma\delta$  produtores de IL-10 e TNF- $\alpha$  no sangue periférico dos indivíduos descritos no item anterior.

## **5. POPULAÇÃO DE ESTUDO, MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Indivíduos sujeitos da pesquisa**

Neste estudo participaram 528 indivíduos residentes no município de Campos dos Goytacazes/RJ. Os 528 indivíduos foram avaliados quanto aos parâmetros genéticos e 72 indivíduos (de um total de 528 indivíduos) também foram avaliados por parâmetros imunológicos. Esses indivíduos eram provenientes de três grupos: indivíduos da população em geral, indivíduos doadores de sangue no Hemocentro do Hospital Ferreira Machado e indivíduos participantes do Projeto Terceira Idade em Ação da UENF. Os mesmos foram selecionados considerando-se como critério: 1) sorologia para toxoplasmose; 2) fundoscopia para verificação de lesões oculares decorrentes da infecção por *T. gondii*, e classificação das mesmas de acordo com suas características morfológicas; 3) sexo; 4) idade; 5) estado imunológico, tendo sido excluído aqueles indivíduos com imunodepressão (por uso de medicamentos, neoplasias, etc) e/ou debilitados no seu estado geral de saúde.

Amostras de sangue foram coletadas e identificadas por códigos alfanuméricos, resguardando os direitos de privacidade dos indivíduos. Todos os indivíduos que participaram do estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e sobre sua forma de participação, além da realização da leitura do termo de consentimento, posteriormente assinado pelo indivíduo (Anexo 1). O termo foi redigido segundo as regras da resolução 194/96, exigida pelo Comitê Regional de Ética em Pesquisa (CEP) e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), para coleta de amostras de sangue periférico e exames fundoscópicos. Esse projeto foi aprovado pelo CEP (FIOCRUZ/RJ – Parecer nº. 347/06) e pelo CONEP (Ministério da Saúde - Parecer nº. 013/2007) (Anexo 2).

### **5.2. Exames oftalmológicos para detecção da lesão ocular e sua classificação**

O exame de oftalmoscopia binocular indireta (Oftalmoscópio Indireto, marca Welch Allyn) foi realizado nos 528 indivíduos participantes do estudo, a fim de identificar lesões oculares decorrentes da infecção por *T. gondii*. Após constatação da presença de lesões oculares toxoplásmicas, todos os pacientes foram submetidos ao registro fotográfico de tais cicatrizes, utilizando-se o retinógrafo marca Zeiss, modelo Visucam. Posteriormente, as imagens foram analisadas, minuciosamente, e classificadas conforme os tipos de lesão (A, B e C) baseados no sistema de classificação proposto por Oréfice e colaboradores (Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005;

Bahia-Oliveira *et al.*, 2009, 2012; Aleixo *et al.*, 2009; Dutra *et al.*, 2013). Os indivíduos distribuídos de acordo com a presença de lesões oculares e sua classificação quanto ao aspecto morfológico (lesão ocular do tipo A, B ou C) encontram-se na Tabela 1. Neste estudo, indivíduos que apresentavam cicatrizes com múltiplos graus de severidade foram alocados no grupo correspondente ao tipo mais grave. A média de idade dos indivíduos participantes na época do exame fundoscópico foi de 36 anos (desvio padrão de 12,8).

**Tabela 1:** Características dos indivíduos participantes dos estudos genético e imunológico, agrupados de acordo com a sorologia para toxoplasmose, sexo e ausência ou presença de lesões cicatriciais retinocoroidianas.

Sorologia para Toxoplasmose	Perfil Clínico	Tipo de Lesão	Sexo (Masculino/Feminino)	Número de indivíduos
Negativo	Sem lesão (SL)		82/40 <sup>1</sup>	122
	Sem lesão (SL)		180/91 <sup>2</sup>	271
Positivo	Com lesão (CL)	A	33/16 <sup>3</sup>	49
		B	20/16 <sup>4</sup>	36
		C	24/26 <sup>5</sup>	50
<b>Total</b>				<b>528</b>

<sup>1</sup>O grupo negativo não foi incluído na análise genética.

<sup>2</sup>O grupo positivo sem lesão foi considerado como grupo controle para a análise genética.

<sup>3</sup>O grupo positivo com lesão do tipo A inclui indivíduos com lesões únicas do tipo A (n= 22) e indivíduos com lesões múltiplas do tipo AB (n= 12), ABC (n= 12) e AC (n= 3), totalizando 49 indivíduos que estão representados na tabela.

<sup>4</sup>O grupo positivo com lesão do tipo B inclui indivíduos com lesões únicas do tipo B (n= 28) e indivíduos com lesões múltiplas do tipo BC (n= 8), totalizando 36 indivíduos que estão representados na tabela.

<sup>5</sup>O grupo positivo com lesão do tipo C inclui apenas os indivíduos com lesões cicatriciais do tipo C.

É importante ressaltar a colaboração: do Projeto de Extensão da UENF Terceira Idade em Ação e da coordenadora desse projeto, Prof<sup>a</sup>. Rosalee Santos Crespo Istoe; do Hemocentro do Hospital Ferreira Machado e dos serviços de oftalmologia e do laboratório de análises clínicas do Hospital Geral de Guarus, pertencentes à rede de atendimento da Prefeitura Municipal de Campos dos Goytacazes, por meio de concessão de uso de espaço físico e equipamentos do setor de atendimento, bem como por meio de disponibilização de profissionais (médicos e técnicos) ligados a esses locais. Os médicos oftalmologistas que participaram do estudo realizando os exames oftalmológicos (oftalmoscopia

binocular indireta e retinografia) foram: Dr. Ricardo G. Peixe e Dr<sup>a</sup>. Elisa Waked Peixoto.

### **5.3. Coleta de amostras de sangue periférico e sorologia**

As amostras de sangue dos indivíduos foram coletadas por profissionais especializados através de venopunção, por meio de tubos a vácuo contendo o anticoagulante citrato de sódio e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso nas análises genéticas.

Amostras de sangue também foram coletadas em tubos sem anticoagulante, os quais permitiram a obtenção de soros utilizados para análises sorológicas. Amostras de soros de todos os pacientes foram analisadas quanto à presença de anticorpos IgG específicos no reconhecimento de *T. gondii*. As análises foram feitas pela técnica de ELISA com a utilização do Kit Toxonostika IgG II (Biomerieux).

As placas do Kit possuem seus poços recobertos com antígeno do *T. gondii* inativado, constituindo a fase sólida. As amostras a serem testadas, bem como amostras controles, foram adicionadas, e complexos imunes foram formados devido à ligação de anticorpos anti-*T. gondii* presentes nas amostras e o antígeno na fase sólida. Seguindo a incubação, os poços foram lavados com tampão fosfato por 4 vezes de aproximadamente 50 segundos.

Anticorpos de carneiro anti-IgG humano conjugado a peroxidase foram incubados e, após este período os poços foram novamente lavados. O substrato TMB (tetrametilbenzidina) foi incubado por 30 minutos, e reagiu com a peroxidase produzindo coloração. A reação foi parada com adição de ácido sulfúrico.

As placas foram lidas no leitor de ELISA (DYNATECH MR5000), após o desenvolvimento da cor. O filtro utilizado foi de 450 nm. A concentração do anticorpo pôde ser estimada usando uma curva de calibração.

### **5.4. Estudo Imunológico**

#### **5.4.1. Preparo do Antígeno Solúvel de *Toxoplasma gondii* (STAg)**

Taquizoítas da cepa RH foram mantidos em monocamadas de fibroblastos humanos provenientes de prepúcio (HFS-F) infectados, assim como em peritônio de camundongos da linhagem CF1 fêmeas de 3 a 4 semanas de idade.

As células HFS-F foram mantidas em meio “Dubelcco`s Modified Essencial Médium” (DMEM) / F-12 (GIBCO-BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino

(SFB; GIBCO-BRL), e em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Quando as culturas se encontraram em monocamadas confluentes, foram infectadas com taquizoítas obtidos de culturas de HFS-F previamente infectadas ou de lavagem peritoneal de camundongos infectados.

Para obtenção do lavado peritoneal contendo parasitas, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e presos à placa de cortiça em decúbito dorsal com auxílio de agulhas. Foram injetados 3 mL de PBS estéril e gelado sob o peritônio previamente exposto (por rebatimento da pele). O peritônio foi massageado e o líquido peritoneal contendo os taquizoítas foi recolhido através de punção com seringa. Foram inoculados intraperitonealmente de 0,3 - 0,5 mL por camundongo, contendo aproximadamente 10<sup>4</sup> parasitos recolhidos do lavado peritoneal. Após este processo, o material coletado foi centrifugado a 500g, por 5 minutos, a temperatura ambiente, para retirada de células peritoneais. Posteriormente, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 913g por 30 minutos a 4°C, para separar parasitos. O sedimento obtido foi ressuspenso e os organismos foram contados em câmara de Neubauer e adicionados à cultura de HFS-F numa proporção de 5-10 parasitos por fibroblasto.

Os parasitos coletados a partir da segunda passagem em culturas de fibroblastos foram centrifugados a 500g, por 15 minutos à temperatura ambiente. Os sedimentos foram estocados a -70°C, e posteriormente, utilizados para produzir o antígeno solúvel de *T. gondii*. Este último processo consistiu na passagem destes sedimentos em cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e, descongelamento em banho-maria a 37°C. A massa contendo os parasitos lisados, após o último ciclo, foi ressuspenso em PBS gelado e ultracentrifugada a 40.000g, durante 70 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dialisado em membranas com limite de exclusão inferior a 10.000 kDa, contra PBS por 48 horas a 4°C. O sobrenadante dialisado foi, então, esterilizado por filtração em membrana de nitrocelulose (Millipore) com poros de 0,22µm. O extrato antigênico estéril foi, posteriormente, alíquotado para dosagem de proteínas pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). As alíquotas do extrato foram armazenadas a -20° até o uso.

#### **5.4.2. Cultura de Células do Sangue Periférico**

Para cultivo de células sanguíneas dois tubos de polipropileno de 15mL foram preparados por indivíduo (tubo controle e tubo STAg). No tubo controle foi adicionado 1mL de RPMI completo contendo L-glu 1,6% e 1 mL de sangue total colhido em heparina. No tubo de antígeno 250µL de STAg (2µg/mL) foi adicionado e acrescido de 750mL de RPMI completo e 1 mL de sangue. Em seguida os tubos foram incubados por 24h em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### **5.4.3. Determinação Fenotípica de Células Tγδ com marcação intracelular das citocinas IL-10 e TNF-α**

As 72 amostras de sangue periférico foram incubadas por 20 horas e após esta primeira incubação foram adicionados 20µL de brefeldina A na concentração final de 10 µg/mL em todos os tubos. As amostras foram novamente incubadas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por um período de 4 horas. A utilização da brefeldina A assegura a retenção da citocina no interior celular, uma vez que essa substância as mantém no interior do complexo de Golgi. Após a segunda incubação, 220µL EDTA 20mM (concentração final de 2mM) foram adicionados diretamente as culturas. Após homogeneização em vórtex, as culturas foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Este procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados. Posteriormente foram lavadas com 6 mL de PBS-W (PBS pH 7,4 contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica). As células foram centrifugadas a 400g, por 7 minutos a 18°C. Posteriormente, foram adicionados 200µL do sangue lavado em tubos de poliestireno 22x75mm de 5mL, contendo anticorpos monoclonais de superfície (Tabela 2) e os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Em seguida, os eritrócitos foram lisados e os leucócitos fixados com 3mL de solução de lise comercial (Facs Lysing Solution – Becton Dickinson) por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram centrifugadas a 400g, por 7 minutos a 18°C. Posteriormente, as células foram lavadas com 500µL de PBS-W e permeabilizadas com 3mL de PBS-P (PBS pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina). Os tubos foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. A suspensão celular foi centrifugada a 400g, por 7 minutos a 18°C, e novamente lavada com PBS-W. Posteriormente, 30µL das células permeabilizadas foram adicionadas em poços de fundo U e incubadas por 30

minutos a temperatura ambiente, ao abrigo de luz. O plaqueamento celular foi feito em placa de 96 poços de fundo U onde previamente anticorpos anti-IL-10 e anti-TNF- $\alpha$  foram diluídos conforme normas do fabricante em um volume final de 20 $\mu$ L/poço (Tabela 2). Após período de incubação as células foram primeiramente lavadas com 100 $\mu$ L de PBS-P e centrifugadas a 400g, por 7 minutos a 18°C e, em seguida com 200 $\mu$ L de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 7 minutos a 18°C. Por fim, foram adicionados 200 $\mu$ L de solução fixadora (10g/L de paraformaldeído, 10,2g/L de cacodilato de sódio e 6,65g/L de cloreto de sódio pH 7,2). As amostras foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da leitura, que não foi superior a 24 horas. No momento da leitura, todos os poços e conteúdos foram transferidos para microtubos de leitura de 500 $\mu$ L. A análise dos parâmetros fenotípicos das células presentes em cada tubo foi determinada com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson), utilizando o programa CELLQuest™ para aquisição e análise dos dados.

**Tabela 2:** Anticorpos anti-marcadores fenotípicos e anti-citocinas intracelulares.

<b>Marcadores Fenotípicos</b>	<b>Anticorpos / Fluorocromo</b>
Células T $\gamma\delta$	Anti-CD3 / PerCP
	Anti- $\gamma\delta$ / FITC
Marcadores de citocinas intracelulares	Anti-IL10 / PE
	Anti-TNF- $\alpha$ / APC

#### 5.4.4. Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Prisma (GraphPad Prism 4.0). Inicialmente, a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados foi avaliada considerando-se o seu grau de independência, normalidade e variância. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunn's para comparação entre três grupos ou mais e o Teste Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

### 5.5. Seleção dos SNPs

Amostras de DNA dos 528 indivíduos, incluindo indivíduos infectados (afetados por lesão ocular ou não) e não infectados por *T. gondii* foram genotipadas para 12 SNPs em genes candidatos *IL10* e *TNFA* (Tabela 3). Posteriormente, os dados foram utilizados para análise da proporção de alelos envolvidos na composição de genótipos em indivíduos apresentando diferentes fenótipos clínicos de lesão ocular (lesão tipo A, lesão tipo B e lesão tipo C).

A seleção dos SNPs de *IL10* e *TNFA* de interesse para este estudo foi realizada a partir de artigos da literatura científica e através da base de dados do sítio *HapMap* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). No sítio *HapMap*, foi selecionada a opção “*HapMap Genome Browser release #28*” para fases 1, 2 e 3 que mesclam genótipos e frequências. Para a análise, foi selecionado “*Download SNP genotype data*” e feita sua configuração por meio da seleção da população de interesse, indicada como CEU (moradores de Utah, com ascendência europeia ocidental ou nórdica). Utilizou-se o programa *Haploview* versão 4.2 para checar desequilíbrio de ligação (*Linkage Disequilibrium* - LD), onde os SNPs com muito baixa MAF (*Minor Allele Frequency*), como menores que 0,05, foram destacados em vermelho e não foram incluídos no mapa de LD. O mesmo procedimento foi feito para a população africana YRI (moradores de Yoruba em Ibadan, Nigéria).

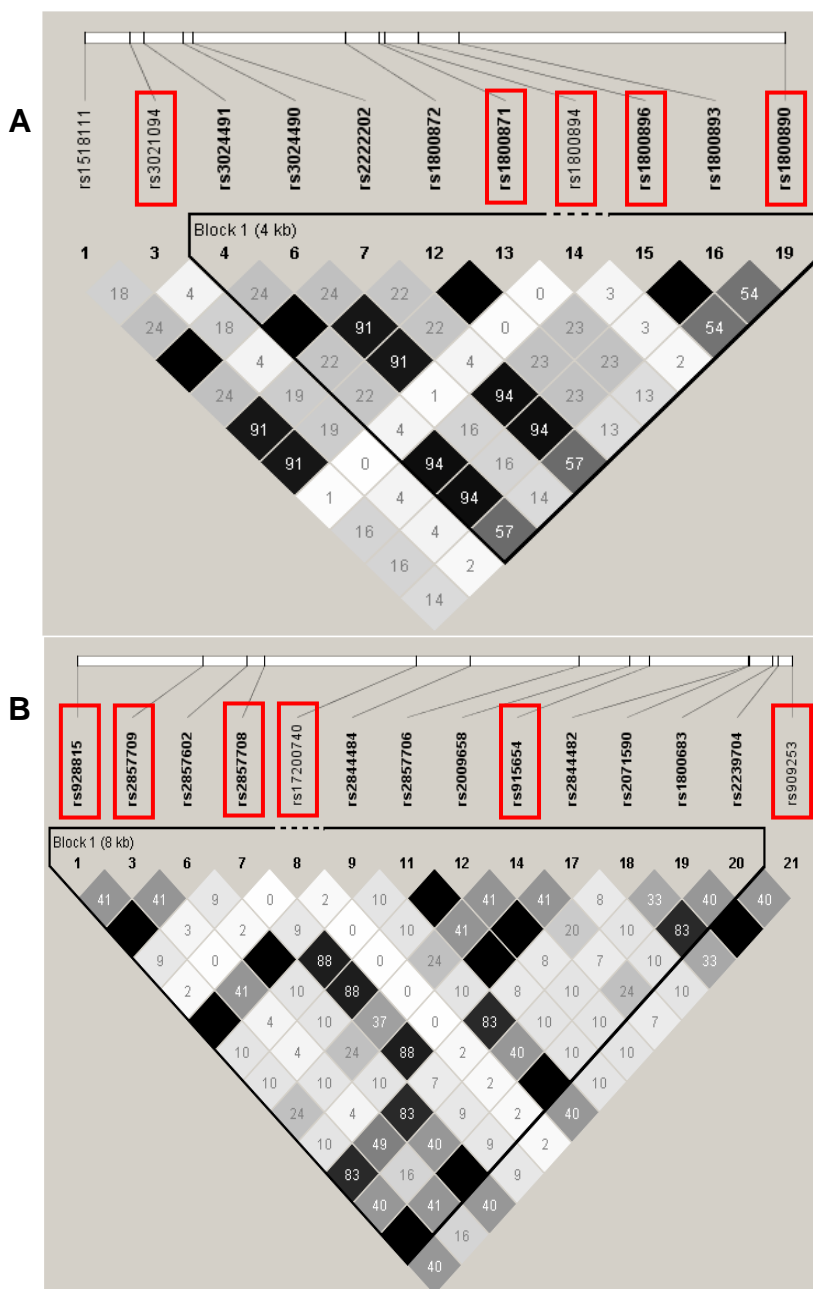
Após seleção dos SNPs a partir de artigos da literatura científica e do sítio *HapMap* foi montado o mapa de desequilíbrio de ligação por meio do *Haploview* no intuito de observar o desequilíbrio de ligação entre os SNPs selecionados para este estudo na população europeia (CEU). Na Figura 4A e 4B temos os mapas de *IL10* e *TNFA*, respectivamente.



**Tabela 3:** Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) selecionados para *IL10* e *TNFA*.

SNP	Localização no cromossomo	Sequência de referência	Alelo 1	Alelo 2
<b><i>IL10 (forward strand Chr 1q31-32)</i></b>				
<i>IL10_rs1800896</i>	206946897	NC_000001.10	T	C
<i>IL10_rs1800871</i>	206946634	NC_000001.10	G	A
<i>IL10_rs3021094</i>	206944952	NC_000001.10	T	G
<i>IL10_rs1800894</i>	206946666	NC_000001.10	T	C
<i>IL10_rs1800890</i>	206949365	NC_000001.10	A	T
<b><i>TNFA (forward strand Chr 6p21.3)</i></b>				
<i>TNFA_rs928815</i>	31531215	NC_000006.11	T	G
<i>TNFA_rs2857709</i>	31532814	NC_000006.11	G	A
<i>TNFA_rs2857708</i>	31533606	NC_000006.11	T	C
<i>TNFA_rs17200740</i>	31535539	NC_000006.11	A	C
<i>TNFA_rs915654</i>	31538497	NC_000006.11	A	T
<i>TNFA_rs909253</i>	31540313	NC_000006.11	G	A
<i>TNFA_rs1800629*</i>	31543031	NC_000006.11	A	G

\* O SNP **rs1800629** foi selecionado, a partir de dados da literatura descritos por Cordeiro e colaboradores (2008), apesar de não constar no mapa da Figura 4.



**Figura 4:** Mapa de desequilíbrio de ligação da população CEU para *IL10* (A) e *TNFA* (B) gerado no *Haploview* (<http://www.hapmap.org>). Os valores de desequilíbrio de ligação entre dois SNPs estão indicados nos quadrados da matriz. Onde não existe valor,  $D' = 1$  (isto é, 100). As cores preta (alto) passando pelo cinza (médio) até o branco (baixo) indicam o grau de confiança na estimativa de desequilíbrio de ligação entre os SNPs.

## 5.6. Extração de DNA a partir de amostras de sangue total

Utilizando o kit comercial *DNeasy Blood Tissue* (Qiagen) foram extraídos DNA genômico das 528 amostras de acordo com o protocolo do fabricante, onde primeiramente foram pipetados 20 $\mu$ L de proteínase K em um tubo cônico de 1,5ml. Em seguida foram adicionadas 100 $\mu$ L de amostra de sangue com anticoagulante citrato de sódio. O volume total foi ajustado com PBS até atingir 220 $\mu$ L. Foram adicionados ao mesmo tubo 200 $\mu$ L de tampão AL (fornecido pelo fabricante) e misturados com auxílio de vórtex (Phoenix AP56) e incubados (*Thermomixer compact* - Eppendorf) a 56°C por 10 minutos.

Após a incubação, foram adicionados 200 $\mu$ L de etanol 100%, misturado à amostra vigorosamente com auxílio do vórtex.

A mistura foi então pipetada em tubos de 2mL contendo as mini colunas fornecidas pelo fabricante e logo, centrifugadas (Microcentrífuga 5415R - Eppendorf) a 6000g por 1 minuto. Os tubos foram descartados, permanecendo apenas a mini coluna, a qual foi reposicionada em um novo tubo de 2mL fornecido pelo fabricante. Então, foram adicionados 500 $\mu$ L de tampão AW1 com etanol e essa mistura foi centrifugada a 6000g por 1 minuto. O tubo foi descartado novamente, permanecendo apenas o DNA aderido à membrana presente na mini coluna.

A mini coluna foi posicionada em um novo tubo fornecido pelo fabricante e então, adicionados 500 $\mu$ L de tampão AW2. Procedeu-se uma centrifugação por 5 minutos a 20.000g para secar a membrana. Novamente o tubo foi descartado após esse procedimento.

A mini coluna contendo a membrana foi posicionada em um novo tubo cônico de 1,5mL e, pipetados 100 $\mu$ L de tampão AE diretamente sobre a membrana. Após a incubação de 1 minuto a temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado a 6000g por 1,5 minutos. O procedimento foi repetido para melhor eluição do DNA. O DNA extraído foi quantificado e posteriormente armazenado à -20°C.

## 5.7. Quantificação de DNA por *Nanodrop*

Por meio do *NanoDrop Spectrophotometer* ND-1000 e o programa *NanoDrop* ND-1000, as amostras de DNA extraídas foram quantificadas a fim de certificar as concentrações (ng/ $\mu$ L) adequadas e necessárias para a continuidade do estudo. Esta concentração foi determinada pela medida da absorbância das amostras a 260nm, 280nm e 230nm. A concentração e pureza das amostras de DNA foram

estimadas pelas seguintes razões:  $A[260]/A[280]$  e  $A[260]/A[230]$ , no qual o mais puro DNA encontra-se próximo a 1.8 e 1.2, respectivamente.

As amostras que apresentaram concentrações inferiores a  $8\text{ng}/\mu\text{L}$  foram submetidas à nova extração de DNA no intuito de alcançar a concentração ideal para a condução das análises de genotipagem do estudo genético.

As amostras foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso posterior na genotipagem pela metodologia *TaqMan* e portanto, avaliação dos SNPs.

### 5.8. Reação em cadeia da polimerase (PCR) *Touchdown*

Com o intuito de checar o sucesso da extração do DNA de todas as amostras antes dos ensaios genéticos, além da quantificação, todas as amostras passaram pelo procedimento da PCR *Touchdown*, cuja temperatura de anelamento é diminuída em  $0,5^{\circ}\text{C}$  a cada ciclo, até temperatura final seja alcançada. O par de *primers* utilizado nesta etapa não foi específico do estudo, mas sim, da região do genoma humano (gene da beta-globina, 365pb), haja vista que se trata apenas da observação do sucesso da extração de DNA e da pureza das amostras de DNA extraído em relação a capacidade de amplificação por PCR.

Utilizando uma placa de 96 poços, para cada poço de reação foi adicionado 25ng de amostra de DNA genômico. Subsequentemente, foram adicionados  $1\mu\text{L}$  de cada par de *primers* (*forward* e *reverse*) (na concentração de 10mM) capazes de gerar fragmentos com 365 pares de bases,  $12,05\mu\text{L}$  de água ultra pura,  $0,75\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen),  $2,5\mu\text{L}$  de tampão de PCR 10X (nas concentrações de 200mM de Tris-HCl pH 8,0 e 500mM de KCl),  $0,2\mu\text{L}$  de Taq DNA Polimerase Recombinante a  $5\text{U}/\mu\text{L}$  (Invitrogen) e  $2,5\mu\text{L}$  de dNTPs (na concentração de 2mM) por reação, até atingir um volume total de  $20\mu\text{L}$ .

A amplificação foi realizada em um termociclador de placa (*Applied Biosystems GeneAmp PCR Systems 9700*) sob as seguintes condições:

- |  |   |                  |
|--|---|------------------|
| 1. Desnaturação inicial: $94^{\circ}\text{C}$ por 10 min   |   |                  |
| 2. Desnaturação: $94^{\circ}\text{C}$ por 20 seg   | } | <b>14 ciclos</b> |
| 3. Anelamento: $63-56^{\circ}\text{C}$ por 60 seg com decréscimo de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{ciclo}$ |   |                  |
| 4. Extensão: $72^{\circ}\text{C}$ por 60 seg   |   |                  |
| 5. Desnaturação: $94^{\circ}\text{C}$ por 20 seg   |   |                  |
| 6. Anelamento: $56^{\circ}\text{C}$ por 60 seg   | } | <b>20 ciclos</b> |
| 7. Extensão: $72^{\circ}\text{C}$ por 60 seg   |   |                  |
| 8. Extensão final: $72^{\circ}\text{C}$ por 5 min  |   |                  |

### 5.9. Gel de agarose

Para confirmação do DNA extraído, a visualização dos produtos da PCR *Touchdown* foi realizada através de géis de agarose a 2%. Para a preparação deste, a agarose foi dissolvida em tampão TBE 1X (0,44M Tris-HCL; 0,44M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 10mM EDTA) e aquecida até a completa dissolução. Logo, adicionado brometo de etídio (Sigma, na concentração de 10µg/ml) na proporção de 2µL para cada 100mL do volume do gel de agarose.

Para 2µL de amostras foram adicionadas 6µL de tampão de amostra *o*-Cresolsulfonftaleína (*Cresol Red* - Sigma-Aldrich, na concentração de 1mM). Ainda, foi agregado um marcador padrão de 100 a 1000 pares de bases (Invitrogen) para comprovar o peso das bandas obtidas.

Desse modo, foram corridas à 120V durante 0,7 horas e visualizados no *Luminescent Image Analyzer* (GE) pelo programa *Image Quant LAS 4000*, em exposição do brometo de etídio à luz ultravioleta por 1/8 segundos.

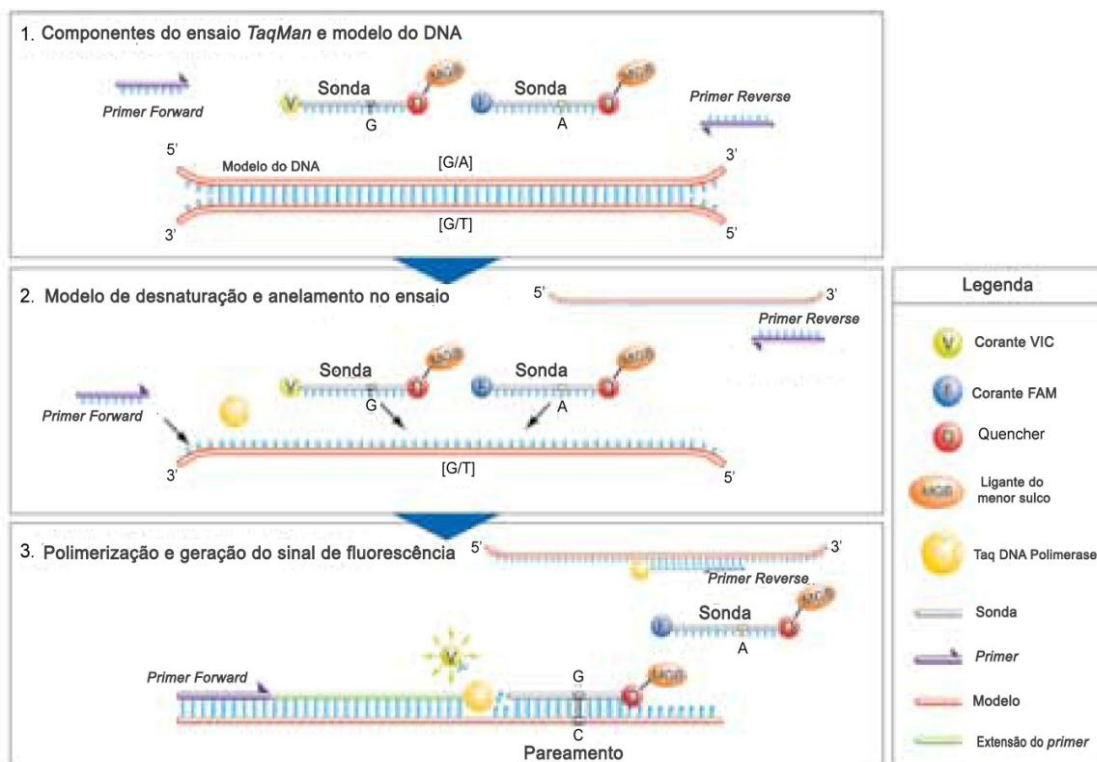
### 5.10. Ensaio *TaqMan*

No estudo 12 SNPs dos genes de *IL10* e *TNFA* foram genotipados pela empresa *Kbioscience*, utilizando metodologia *TaqMan Assay*. Este ensaio consiste em uma sonda fluorogênica, complementar à sequência alvo, no caso, dos SNPs selecionados para o estudo, a qual é adicionada à mistura de reação de PCR. Esta sonda é um oligonucleotídeo com um corante repórter ligado à extremidade 5' e um corante *quencher* ligado à extremidade 3' da fita de DNA.

A molécula *quencher* extingue a fluorescência emitida pelo fluoróforo quando estimulado pela fonte de luz do termociclador da via FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (Robinson *et al.*, 2004)

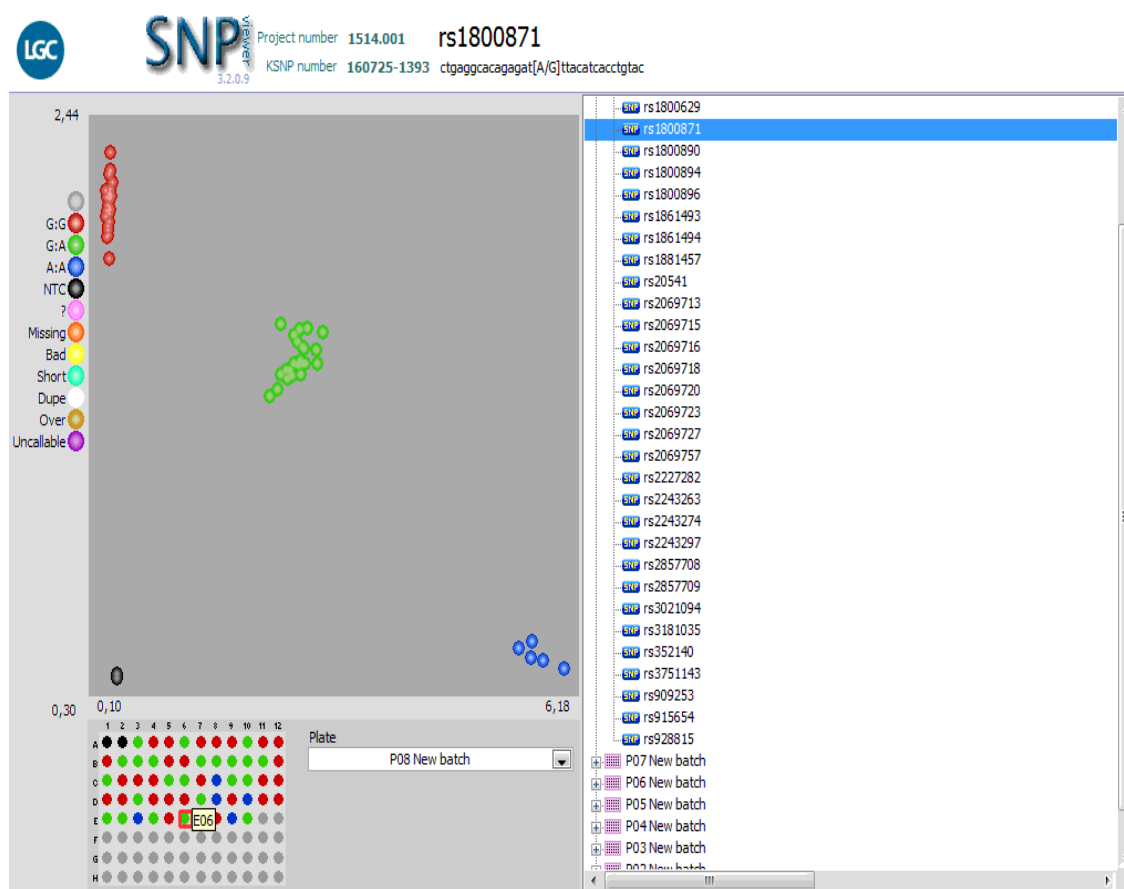
Assim, as sondas fluorogênicas anelam-se dentro de uma região do DNA amplificado por um conjunto específico de primers. Como a Taq Polimerase, enzima polimerase da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* (Taq), realiza a extensão do *primer* no sentido 3'-5' e concomitantemente, tem atividade inerente de exonuclease 5'-3' para clivar nucleotídeos de dupla fita no local das ligações fosfodiéster, liberando mono e oligonucleotídeos ou seja, degradando a sonda fluorogênica. Logo, o fluoróforo é liberado e afasta-se do *quencher*, permitindo então a fluorescência (Figura 5). Desse modo, a fluorescência detectada no termociclador é diretamente proporcional ao fluoróforo liberado e da quantidade de DNA presente na

PCR, que se repete em cada ciclo e não interfere com o acúmulo de produto da PCR (Robinson *et al.*, 2004).



**Figura 5:** Esquema representativo, retirado e modificado do site da *Applied Biosystems* (<http://www.cop.ufl.edu/wpcontent/uploads/dept/ptr/centers/pharmacogenomics/TaqManSNPGenotypingAssays.pdf>), do ensaio de *TaqMan* utilizado neste estudo para genotipar SNPs potencialmente associados com a toxoplasmose ocular.

Os genótipos foram determinados, visualmente, baseado na emissão dos corantes fluorescentes plotados num gráfico de coordenadas X-Y do programa *SNPviewer*, específico da *Kbioscience* (Figura 6).



**Figura 6:** Gráfico gerado de uma tabela de resultados obtida a partir do programa *SNPviewer* durante as análises de dados do ensaio de *TaqMan*. Grupos de genótipos homocigotos e heterocigotos estão destacados em diferentes cores. Grupos não especificados foram considerados como dados de genotipagem que falharam.

### 5.11. Análises de associação genética baseado em estudo de população

O estudo realizado buscou comparar polimorfismos de único nucleotídeo em genes candidatos de *IL10* e *TNFA* em grupos de indivíduos afetados e não afetados.

Previamente às análises de associação genética baseada em população, análises de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) foram realizadas utilizando planilha customizada no programa *Microsoft Excel*, a fim de certificar que não havia desvio, uma vez que seria considerado erro de genotipagem. Nesta planilha, as frequências alélicas foram consideradas na proporção de *Hardy-Weinberg* quando valores de  $p$  foram maiores ou equivalentes a 0,05 ( $p \geq 0,05$ ) para cada SNP.

As distribuições alélicas e genóticas em grupos de afetados e não afetados foram comparadas usando o teste estatístico  $\chi^2$  - com 1 (1gl) e 2 (2gl) graus de liberdade respectivamente - realizado tanto em planilha customizada no programa *Microsoft Excel* quanto no programa *GraphPad Prism 4*. Posteriormente, a partir do programa *GraphPad Prism 4*, foram calculados para os alelos usando o teste estatístico de Fisher, os valores de razão de chance (*odds ratio* - OR) dentro de um intervalo de confiança de 95% (95% CI) entre grupos de indivíduos apresentando diferentes sorologias e fenótipos clínicos de lesão ocular.

Foi aplicado o método de Bonferroni para correção da significância do valor de p, por termos realizado nesse estudo múltiplos testes (5 SNPs para *IL10* e 7 SNPs para *TNFA*) para o mesmo grupo de amostras. Com a correção o valor passa a ser  $p_{\text{corrigido}} \leq 0,01$  para SNPs de *IL 10* e  $p_{\text{corrigido}} \leq 0,007$  para SNPs de *TNFA*.



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Estudo imunológico

#### 6.1.1. População do estudo imunológico

A população estudada foi constituída com um total de 72 indivíduos infectados afetados com lesão ocular (CL) ou não afetados (SL) e não infectados (Neg) por *T. gondii* (Tabela 4). Os indivíduos foram divididos em dois grupos etários: menores de 60 anos de idade (< 60 anos; com média da idade igual a 33,0 anos) e com 60 anos de idade ou mais (≥ 60 anos; com média da idade igual a 67,4 anos). Os indivíduos < 60 anos foram oriundos da população em geral e os ≥ 60 anos foram oriundos da população em geral e do Projeto Terceira Idade em Ação da UENF. Os indivíduos incluídos neste estudo foram agrupados de acordo com a Tabela 4.

**Tabela 4:** Características dos indivíduos participantes do estudo imunológico, agrupados de acordo com a sorologia para toxoplasmose, ausência ou presença de lesões cicatriciais retinocoroidianas, idade e sexo.

Sorologia para Toxoplasmose	Perfil Clínico	Tipo de Lesão	Sexo (Masculino/Feminino)	Número de indivíduos (<60anos/≥60anos)
Negativo (Neg)	Sem lesão (SL)		2 <sup>1a</sup> /2 <sup>2a</sup> e 9 <sup>2b</sup>	4/9
	Sem lesão (SL)		2 <sup>1a</sup> e 4 <sup>1b</sup> /3 <sup>2a</sup> e 28 <sup>2b</sup>	5/32
Positivo	Com lesão (CL)	A <sup>3</sup>	1 <sup>1a</sup> e 2 <sup>1b</sup> /3 <sup>2a</sup> e 4 <sup>2b</sup>	4/6
		B <sup>4</sup>	1 <sup>1a</sup> e 1 <sup>1b</sup> /2 <sup>2a</sup> e 1 <sup>2b</sup>	3/2
		C <sup>5</sup>	1 <sup>1a</sup> e 2 <sup>1b</sup> /1 <sup>2a</sup> e 3 <sup>2b</sup>	2/5
<b>Total</b>				<b>18/54 (72)</b>

<sup>1a</sup> Indivíduos do sexo masculino e com menos de 60 anos; <sup>1b</sup> Indivíduos do sexo masculino e com 60 anos ou mais.

<sup>2a</sup> Indivíduos do sexo feminino e com menos de 60 anos; <sup>2b</sup> Indivíduos do sexo feminino e com 60 anos ou mais.

<sup>3</sup> O grupo positivo com lesão do tipo A inclui indivíduos com lesões únicas do tipo A (n=7) e indivíduos com lesões múltiplas do tipo ABC (n= 3), totalizando 10 indivíduos que estão representados na tabela.

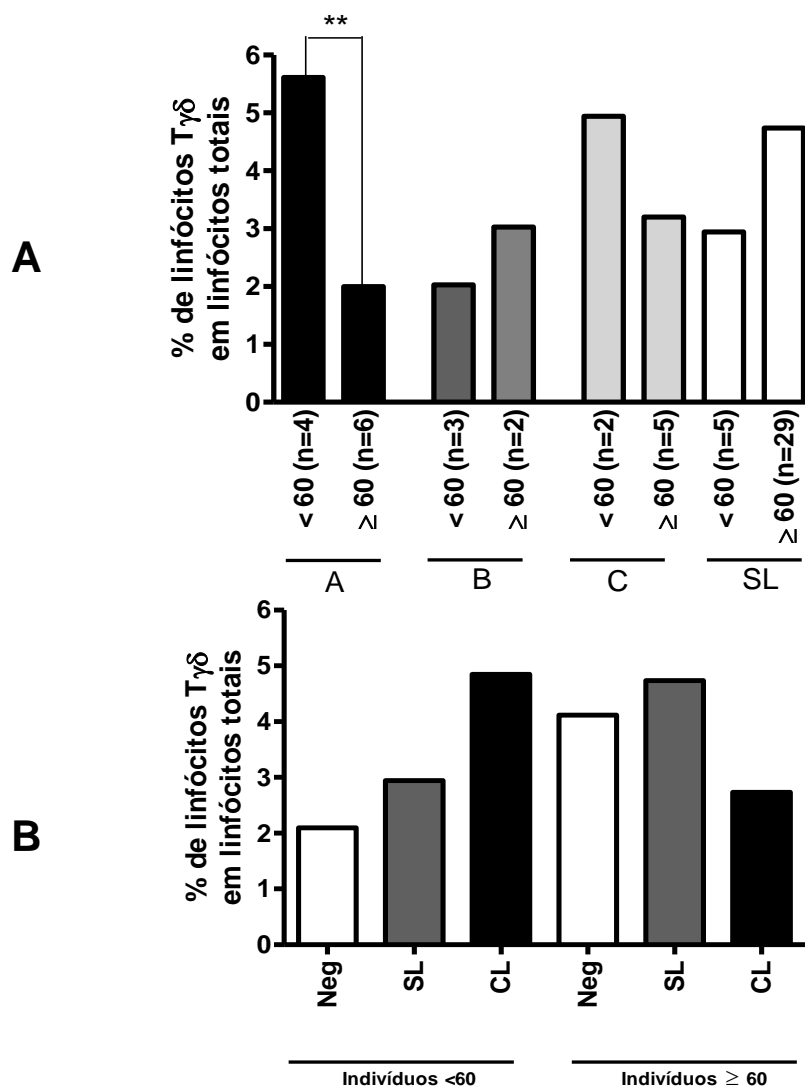
<sup>4</sup> O grupo positivo com lesão do tipo B inclui apenas os indivíduos com lesões cicatriciais do tipo B.

<sup>5</sup> O grupo positivo com lesão do tipo C inclui apenas os indivíduos com lesões cicatriciais do tipo C.

#### 6.1.2. Análise *in vitro* dos linfócitos Tγδ do sangue periférico

Neste estudo, foram avaliados o percentual de linfócitos Tγδ do sangue periférico de indivíduos afetados por lesão ocular (CL) ou não afetados (SL) e não infectados pelo *T. gondii* (Neg), entre dois grupos de diferentes faixas etárias: < 60 anos e ≥ 60 anos, após estímulo com STAg (imediatamente após a coleta do sangue periférico). Na Figura 7, a análise dos resultados mostra que os indivíduos < 60 anos com lesão do tipo A expressam um percentual significativamente maior (p=0,009) destas células na corrente sanguínea que indivíduos ≥ 60 anos do mesmo grupo (CL

do tipo A) (Figura 7A). As análises entre os dois grupos de diferentes faixas etárias (indivíduos Neg, SL e CL) não mostraram diferença significativa entre os grupos ( $p=0,16$ ), demonstrado na Figura 7B. A análise dos grupos controle e STAg não mostraram diferença significativa entre os grupos ( $p= 0,67$ ).



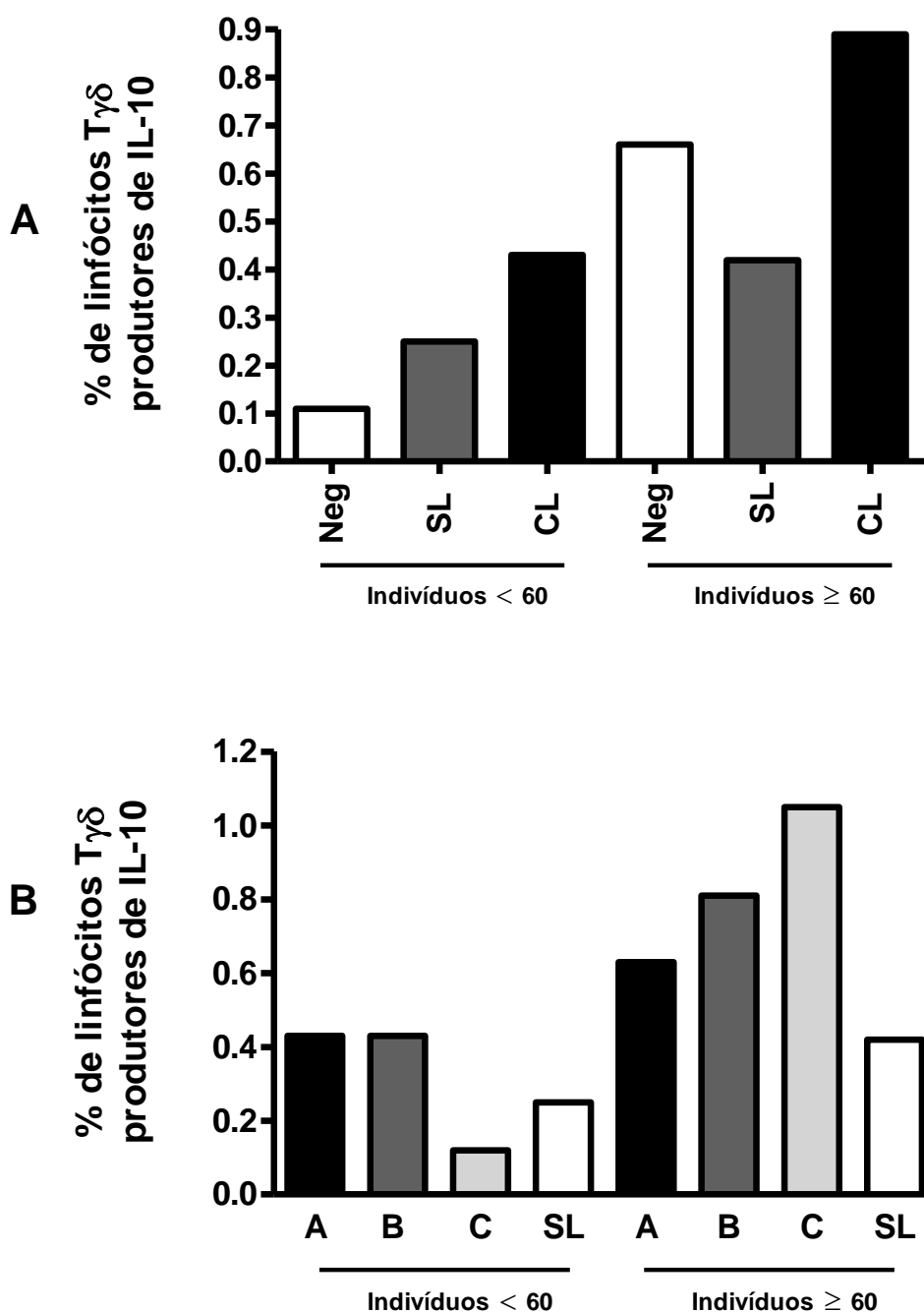
**Figura 7:** Percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  circulantes no sangue periférico de indivíduos infectados com lesão (CL), sem lesão (SL) ou não infectados (Neg) por *T. gondii*, sob estímulo do STAg (imediatamente após a coleta do sangue periférico). Na **Figura 7A:** Os indivíduos foram separados em quatro grupos: com lesão tipo A, tipo B, tipo C e sem lesão; também estão separados em dois grupos etários (< 60 anos de idade e ≥ 60 anos de idade). Na **Figura 7B:** Os indivíduos foram separados em 3 grupos: Neg, SL e CL e, também, nos dois grupos etários. As barras representam a mediana em cada grupo. A diferença significativa ( $p=0,009$ ) está identificada com o símbolo \*\*. Os dados foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunn's para comparação entre três grupos ou mais e o Teste Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

### **6.1.3. Avaliação do padrão de citocinas intracelulares em linfócitos T $\gamma\delta$ do sangue periférico após cultura *in vitro***

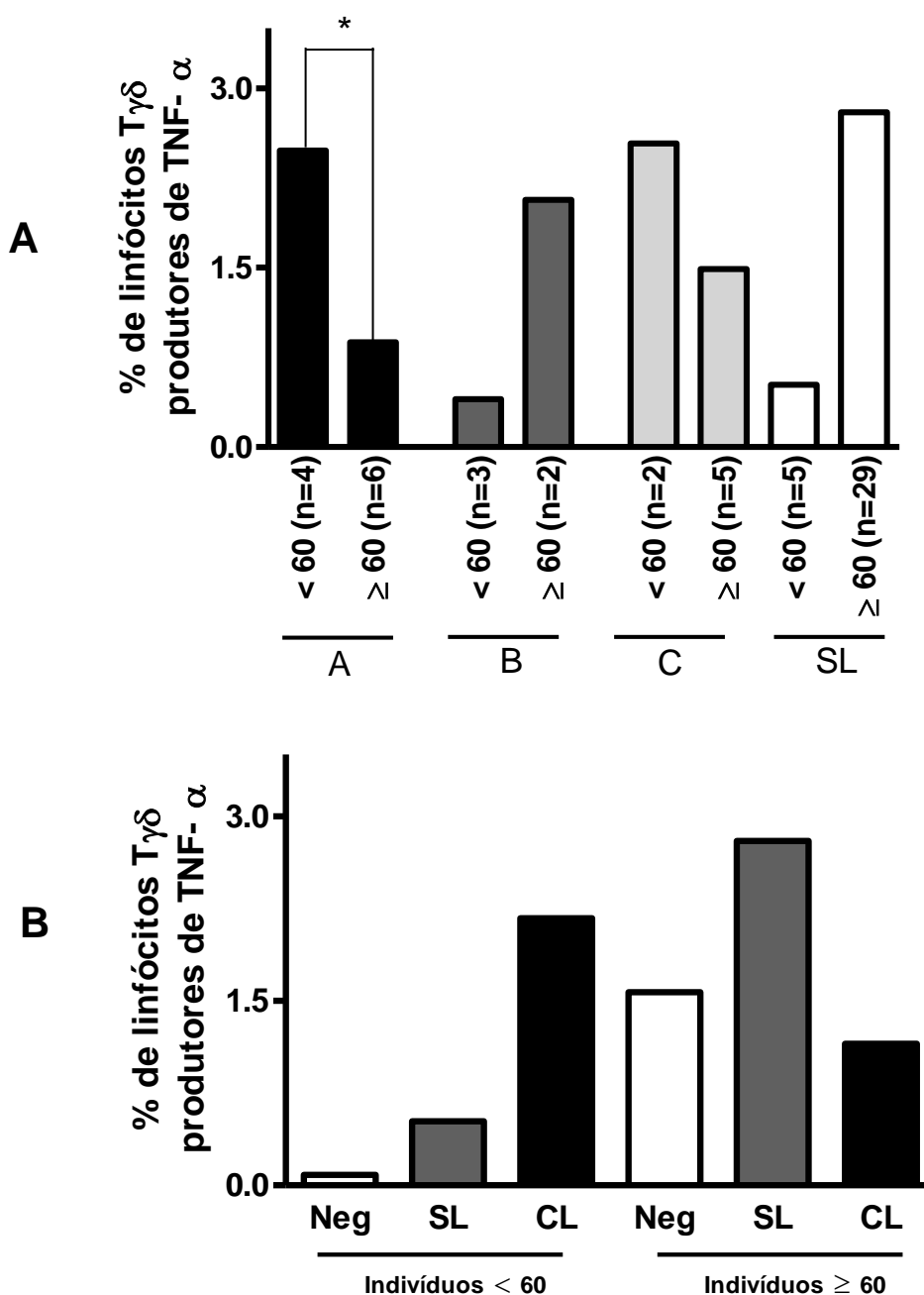
Para este estudo foi analisado o percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produtores de IL-10 (Figura 8A) o qual revelou que não houve diferença significativa nos grupos analisados (Neg, SL e CL, sendo  $p=0,10$ ). Contudo, observamos que o percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produtores de IL-10, nos dois grupos etários, mostrou-se aumentado nos indivíduos CL quando comparado aos controles SL (Figura 8A). Na Figura 8B, os indivíduos infectados foram separados em quatro grupos: com lesão do tipo A, tipo B, tipo C ou SL e foram comparados o percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produtores de IL-10 nos dois grupos etários ( $<60$  anos e  $\geq 60$  anos) e não foi observada diferença significativa entre os 8 grupos avaliados ( $p=0,40$ ). Entretanto, nos indivíduos acima de 60 anos apresentando cicatrizes de lesão do tipo C o percentual de células T $\gamma\delta$  produzindo IL-10 foi mais elevado quando comparado com os demais grupos estudados, tanto mais jovens quanto também na mesma faixa etária com outros tipos de lesão A e B (Figura 8B).

Já o percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produtores de TNF- $\alpha$  (Figura 9A) foi diferente significativamente ( $p=0,04$ ) quando indivíduos infectados  $< 60$  anos com lesão do Tipo A foram comparados com indivíduos infectados  $\geq 60$  anos do mesmo grupo (CL do tipo A). Na Figura 9B, as análises entre os dois grupos de diferentes faixas etárias (indivíduos Neg, SL e CL) também mostraram diferença significativa entre os grupos ( $p=0,02$ ) no teste estatístico Kruskal-Wallis (quando 6 grupos foram avaliados), contudo, essa diferença (Figura 9B) não foi observada no Teste de Dunn's para comparação entre duplas de grupos.

O percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produtores de TNF- $\alpha$  mostrou-se aumentado nos indivíduos  $< 60$  anos CL quando comparado ao controle SL (Figura 9B). De forma contrária, o percentual de células produzindo TNF- $\alpha$  mostrou-se diminuído nos indivíduos  $\geq 60$  anos CL quando comparados ao controle SL (Figura 9B).



**Figura 8:** Percentual de linfócitos  $T\gamma\delta$  circulantes no sangue periférico, produtores de IL-10, de indivíduos infectados com lesão (CL), sem lesão (SL) ou não infectados (Neg) por *T. gondii*, sob estímulo do STAg (imediatamente após a coleta do sangue periférico). Na **Figura 8A**: Os indivíduos foram separados em 3 grupos: Neg, SL e CL e, também, nos dois grupos etários. Na **Figura 8B**: Os indivíduos foram separados em quatro grupos: com lesão tipo A, tipo B, tipo C e SL por grupos etários. As barras horizontais representam a mediana em cada grupo. Os dados foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunn's para comparação entre três grupos ou mais e o Teste Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.



**Figura 9:** Percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  circulantes no sangue periférico, produtores de TNF- $\alpha$ , de indivíduos infectados com lesão (CL), sem lesão (SL) ou não infectados (Neg) por *T. gondii*, sob estímulo do STAg (imediatamente após a coleta do sangue periférico). Na **Figura 9A**: Os indivíduos foram separados em quatro grupos: com lesão tipo A, tipo B, tipo C e sem lesão; também estão separados em dois grupos etários (< 60 anos de idade e  $\geq$  60 anos de idade). Na **Figura 9B**: Os indivíduos foram separados em 3 grupos: Neg, SL e CL e, também, nos dois grupos etários. As barras horizontais representam a mediana em cada grupo. A diferença significativa ( $p=0,04$ ) está identificada com o símbolo \*. Os dados foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunn's para comparação entre três grupos ou mais e o Teste Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

## 6.2. Estudo genético

Foram genotipadas amostras de DNA de 406 indivíduos soropositivos para *T. gondii* (135 afetados e 271 não afetados com doença ocular) e 122 com sorologia negativa para o parasito. Após genotipagem, as amostras foram investigadas quanto à influência de polimorfismos de nucleotídeo único em genes candidatos sobre a propensão ao desenvolvimento da forma ocular e sua correlação com os diferentes tipos de lesões de retinocoroidites causadas pela toxoplasmose.

### 6.2.1. Frequências alélicas no Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW)

O Princípio ou Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) considera que, em condições de acasalamento ao acaso na ausência de fatores como migração, mutação e seleção natural, em uma população relevante as frequências alélicas e genotípicas são constantes. Logo, as frequências alélicas de uma população estão em EHW quando são próximas daquelas esperadas para a proporção de *Hardy-Weinberg*. Desvios do EHW em populações controles podem indicar erros sistemáticos de genotipagem e outros vícios que podem comprometer a replicação dos resultados encontrados. Portanto, a análise do EHW da frequência genotípica de marcadores tem sido amplamente recomendada, como uma etapa crucial em estudos de associação genética baseado em população (Moonesinghe, 2010).

Baseado nesse conceito, frequências alélicas no EHW foram calculadas para cada genótipo marcador do estudo. O resultado das análises realizadas para todos SNPs do gene *IL10* e do gene *TNFA* investigados neste trabalho não demonstrou diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre as frequências alélicas e genotípicas observadas e as esperadas pelo EHW para todos os marcadores no grupo controle. Esses dados confirmam que a amostragem de 528 indivíduos estava de acordo com o princípio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). A tabela mostra também o alelo de menor frequência e sua respectiva frequência (MAF), e as frequências em populações CEU e YRI.

**Tabela 5:** Frequências alélicas no Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) e frequências dos Alelos de Menor Frequência (MAF) para cada SNP.

SNP	Teste $\chi^2$ EHW (CONTROLE)	Alelo de menor frequência	Frequência do alelo de menor frequência MAF (%)	MAF CEU* (%)	MAF YRI** (%)	Ref SNP
<i>IL10_rs1800896</i>	1,24	C	36,3	0,53	0,27	T/C
<i>IL10_rs1800871</i>	0,13	A	31,4	0,17	0,46	G/A
<i>IL10_rs3021094</i>	0,11	G	5,9	0,06	0	T/G
<i>IL10_rs1800894</i>	0,10	T	1,9	0,04	0	T/C
<i>IL10_rs1800890</i>	0,00	T	27,6	0,38	0,20	A/T
<i>TNFA_rs928815</i>	0,49	T	33,1	0,41	0,28	T/G
<i>TNFA_rs2857709</i>	7,55	A	7,5	0,16	0,05	G/A
<i>TNFA_rs2857708</i>	1,64	T	12,0	0,14	0,05	T/C
<i>TNFA_rs17200740</i>	0	C	0,5	0,02	0	A/C
<i>TNFA_rs915654</i>	2,96	A	46,2	0,32	0,63	A/T
<i>TNFA_rs909253</i>	4,04	G	36,7	0,36	0,48	G/A
<i>TNFA_rs1800629</i>	***	A	0	0,17	0,09	A/G

Notas: \* - CEU, moradores de Utah; \*\* - YRI, moradores de Yoruba, Ibadan; \*\*\* - Não foi possível o cálculo do  $\chi^2$ .

### 6.2.2. Estudo de associação genética com SNPs de *IL10* e *TNFA*

Neste estudo, indivíduos portadores de doença ocular foram classificados em três grupos (A, B e C), de acordo com o grau de severidade da lesão ocular causada pela toxoplasmose, considerando que lesões classificadas como tipo C são de menor severidade e que as lesões A e B representam lesões de retinocoroidite de alto grau e médio grau de severidade, respectivamente. Dessa forma os indivíduos do grupo A apresentavam lesões oculares do tipo A isoladas ou associadas a outros tipos de lesão (B, C e BC). O grupo B foi formado por portadores de lesões tipo B isoladas ou associadas à lesão C (BC). O grupo C foi o único composto apenas por portadores de um único tipo de lesão ocular (tipo C).

Com o objetivo de investigar se havia relação entre o genótipo para os diferentes marcadores e o grau de severidade da lesão ocular apresentada pelos indivíduos participantes, comparamos as frequências alélicas e genotípicas de grupos de pacientes portadores de diferentes tipos de lesões oculares (grupos A, B e C) com o grupo controle, formado por indivíduos soropositivos sem lesões oculares.

**Tabela 6:** Grupos de indivíduos formados a partir do perfil clínico obtido por exames de oftalmoscopia a fim de utilizá-los nas análises de associação genética a serem feitas neste estudo.

<b>Código da análise</b>	<b>Combinação dos grupos de indivíduos (não afetados <i>versus</i> afetados)</b>
C1	SL <i>versus</i> CL tipo A
C2	SL <i>versus</i> CL tipo B
C3	SL <i>versus</i> CL tipo C

**SL:** código atribuído aos indivíduos soropositivos para toxoplasmose, mas não afetados pela toxoplasmose ocular.

**CL:** código atribuído aos indivíduos acometidos pela toxoplasmose ocular, podendo ser com lesão tipo A, B ou C.

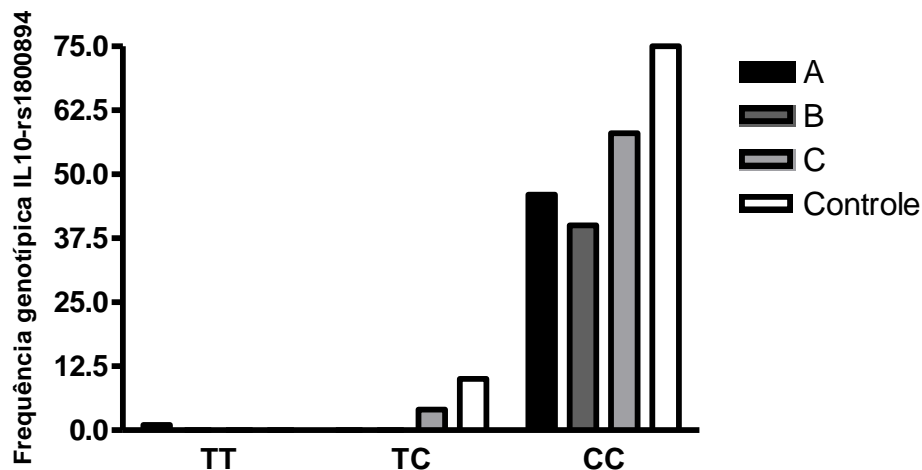
Para este estudo foram avaliados 12 polimorfismos de nucleotídeo único nos genes de *IL10* (5 SNPS) e *TNFA* (7 SNPS) em amostras de DNA de 406 indivíduos (Tabela 3). Houve uma pequena diferença entre o número total de indivíduos genotipados (406 indivíduos) e o número total de genotipagens para cada SNP analisado, o que é explicado por falhas na genotipagem de algumas amostras do DNA. As frequências alélicas e genotípicas para cada um dos SNPs foram obtidas a partir das análises em planilhas customizadas do programa *Microsoft Excel* para as diferentes apresentações fenotípicas (perfil clínico) dos indivíduos (Tabela 6). Estas frequências alélicas e genotípicas serviram de suporte para a análise estatística, através do teste  $\chi^2$ , realizado no programa *GraphPad Prism 4*. É importante relatar que as distribuições alélicas e genotípicas para cada um dos 12 SNPs foram obtidas para todas as análises descritas na Tabela 6. Entretanto, observou-se significância ao nível de 5% no teste estatístico de  $\chi^2$  aplicado apenas para dois marcadores: um SNP de *IL10* (rs1800894) e um SNP de *TNFA* (rs928815). Com a correção de Bonferroni (valor de  $p_{\text{corrigido}} \leq 0,01$  para SNPs de *IL10* e  $p_{\text{corrigido}} \leq 0,007$  para SNPs de *TNFA*), apenas os resultados para o marcador de *TNFA* rs928815 permaneceram com significância estatística. Para os demais SNPs avaliados nesse estudo para os genes de *IL10* (rs1800896, rs1800871, rs3021094 e rs1800890) e *TNFA* (rs2857709, rs2857708, rs17200740, rs915654, rs909253 e rs1800629) não foi observada significância estatística para nenhuma das análises realizadas (ANEXO 3).



### 6.2.2.1. Estudo de associação genética com SNPs do gene *IL10*

Foram analisadas as frequências alélicas e genotípicas em todos os grupos de análise descritos na tabela 6, para todos os marcadores genotipados para o gene *IL10*. Dos cinco SNPs avaliados nesse gene, observou-se para o marcador rs1800894 do gene *IL10* diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na frequência genotípica entre não afetados e afetados no grupo de análise C1 (SL **versus** CL tipo A). Os valores de  $\chi^2$  para C1 foram de 7,47 ( $p = 0,02$ ) para as frequências genotípicas e de 0,03 ( $p = 0,86$ ) para as frequências alélicas (Tabela 7). Para os demais marcadores do gene *IL10* não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

Observou-se, na análise C1, analisando as frequências genotípicas (Tabela 7 e Figura 10) que o genótipo CC ( $f = 0,98$ ) foi o mais encontrado nos portadores de lesão ocular tipo A. Além disso, observou-se que o alelo C parece atuar de acordo com o modelo dominante de herança genética ( $p = 0,02$ ; OD = 0,06; IC = 0.002-1.440; Tabela 7 e Figura 11) e não com o modelo recessivo ( $p = 0,58$ ). Entretanto, após a correção de Bonferroni, utilizada para correção do nível de significância de estudos com múltiplas análises, estes dados perdem sua significância estatística ( $p_{\text{corrigido}} \leq 0,01$ ).

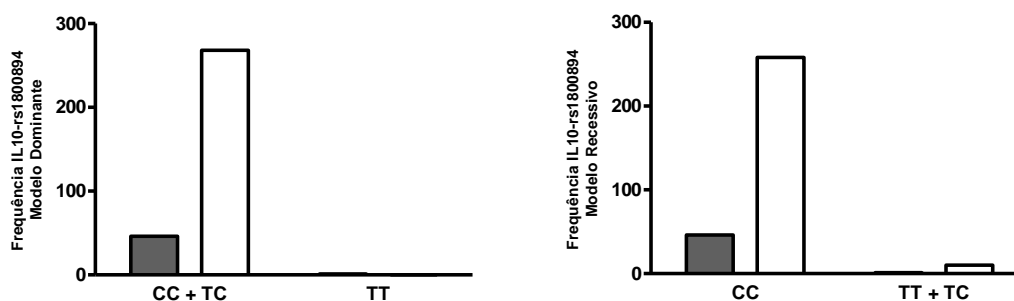


**Figura 10:** Frequência dos genótipos homocigoto para o alelo 1 (TT), heterocigoto para os alelos 1 e 2 (TC) ou homocigoto para o alelo 2 (CC) do SNP *IL10\_rs1800894* em grupos de indivíduos positivos para toxoplasmose, portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B, C e Controle SL).

**Tabela 7:** Distribuição alélica e fenotípica na análise C1 (CL tipo A *versus* SL) para SNP *IL10\_rs1800894*.

SNP <i>IL10_rs1800894</i>								
	CL tipo A		SL		$\chi^2$	P	ODDS RATIO	CI
	N	%	n	%				
TT	1	2,1	0	0	7,47	0,02		
TC	0	0	10	3,7				
CC	46	97,9	258	96,3				
T	2	2,1	10	1,9	0,03	0,86	1,14	0,246 – 5,305
C	92	97,9	526	98,1				
Modelo Dominante								
CC+TC	46	97,9	268	100,0	5,72	0,02	0,06	0,002 – 1,440
TT	1	2,1	0	0				
Modelo Recessivo								
CC	46	97,9	258	96,3	0,30	0,58	1,78	0,223 -14,270
TT+TC	1	2,1	10	3,7				

Nota:  $p_{\text{corrigido}} \leq 0,01$ .



**Figura 11:** Modelos de herança genética dominante e recessivo para o SNP *IL10\_rs1800894* em grupos de indivíduos positivos para toxoplasmose com lesão ocular tipo A (afetados – barra cinza) e no grupo de indivíduos positivos sem lesão ocular (não afetados - barra branca).

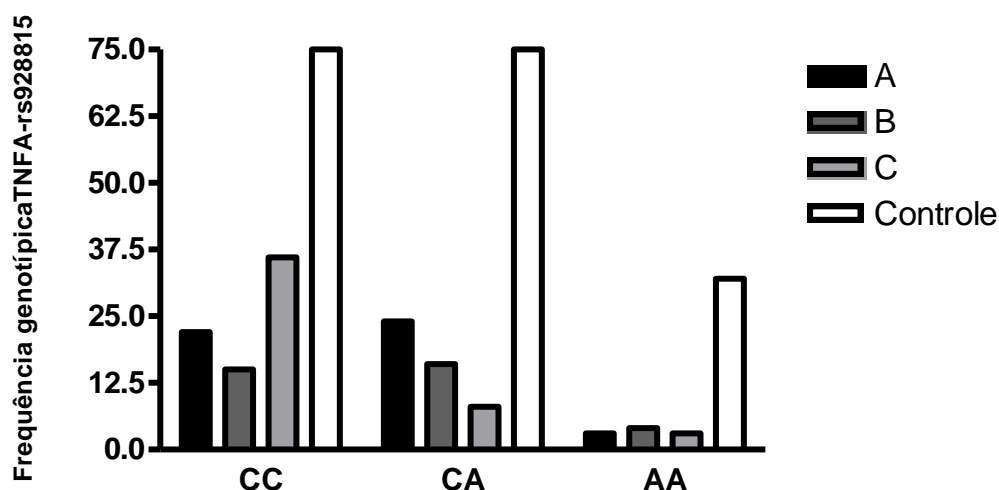
### 6.2.2.2. Estudo de associação genética com SNPs do gene *TNFA*

A análise da distribuição alélica e genotípica realizada em SNPs do gene *TNFA* revelou significância estatística nas comparações entre afetados e não afetados em apenas um marcador (rs928815). Observou-se para o marcador *rs1800894* do gene *TNFA* diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas frequências genotípica e alélica entre não afetados e afetados no grupo de análise C3 (SL *versus* CL tipo C). Os valores de  $\chi^2$

Rosa, R.F.G.

para C3 foram de 15,34 ( $p=0,0005$ ) para as frequências genóticas e de 12,52 ( $p=0,0002$ ) para as frequências alélicas (Tabela 8). Para os demais marcadores do gene *TNFA* não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

Observou-se, na análise C3, que o alelo A foi mais frequente no grupo SL em relação ao grupo com lesão tipo C (0,33 versus 0,15), sugerindo um papel protetor para este alelo contra a apresentação ocular do tipo C. Já o alelo C foi mais frequente nos indivíduos com lesão tipo C do que no grupo SL (0,85 versus 0,67). Analisando as frequências genóticas (Figura 12) observamos que o genótipo CC foi o mais encontrado nos portadores de lesão ocular tipo C (0,77). Além disso, observou-se que o alelo de risco C parece atuar de acordo com o modelo recessivo de herança genética ( $p<0,0001$ ;  $OD=3,88$ ;  $IC=1,897-7,955$ ; Tabela 8 e Figura 13) e não com o modelo dominante ( $p=0,27$ ). A presença do genótipo CC parece predispor à ocorrência da forma de lesão ocular do tipo C. A diferença entre as frequências do genótipo CC entre os grupos estudados no modelo recessivo é estatisticamente significativa mesmo após a correção de Bonferroni para o valor de  $p$  ( $p_{\text{corrigido}} \leq 0,007$ ).

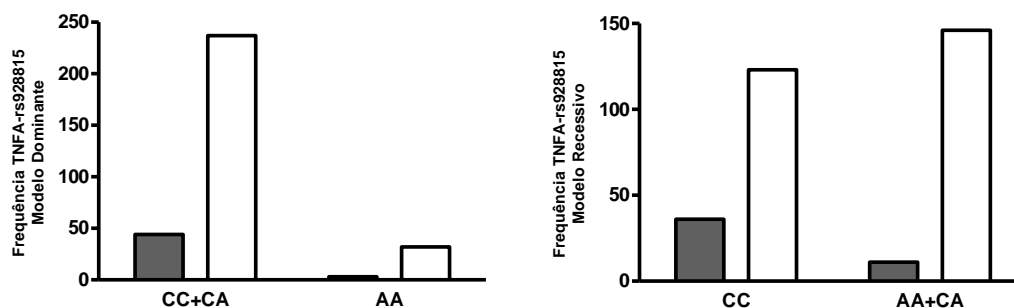


**Figura 12:** Frequência dos genótipos homocigoto para o alelo 1 (CC), heterocigoto para os alelos 1 e 2 (CA) ou homocigoto para o alelo 2 (AA) do SNP *TNFA\_rs928815* em grupos de indivíduos positivos para toxoplasmose, portadores de diferentes tipos de cicatrizes da lesão ocular toxoplásmica (A, B, C) e Controle SL.

**Tabela 8:** Distribuição alélica e fenotípica na análise C3 (CL tipo C *versus* SL) para SNP *TNFA\_rs928815*.

<i>TNFA_rs928815</i>								
	CL tipo C		SL		$\chi^2$	P	ODDS RATIO	CI
	n	%	n	%				
<b>CC</b>	36	76,6	123	45,7	15,34	<b>0,0005</b>		
<b>CA</b>	8	17,0	114	42,4				
<b>AA</b>	3	6,4	32	11,9				
<b>C</b>	80	85,1	360	66,9	12,52	<b>0,0002</b>	2,82	1,557 – 5,126
<b>A</b>	14	14,9	178	33,1				
<b>Modelo Dominante</b>								
<b>CC+CA</b>	44	93,6	237	88,1	1,23	0,27	1,98	0,581 – 6,753
<b>AA</b>	3	6,4	32	11,9				
<b>Modelo Recessivo</b>								
<b>CC</b>	36	76,6	123	45,7	15,25	<b>&lt;0,0001</b>	<b>3,88</b>	1,897 -7,955
<b>AA+CA</b>	11	23,4	146	54,3				

Nota:  $p_{\text{corrigido}} \leq 0,007$ .

**Figura 13:** Modelos de herança genética dominante e recessivo para o SNP *TNFA\_rs928815* em grupos de indivíduos positivos para toxoplasmose com lesão ocular tipo C (afetados – barra cinza) e no grupo de indivíduos sem lesão ocular (não afetados - barra branca).

## 7. DISCUSSÃO

O protozoário *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório com ampla distribuição geográfica (Dubey, 2010). A toxoplasmose é considerada uma doença infecciosa altamente prevalente e estima-se que cerca de 30% da população mundial esteja infectada (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). No Brasil, a doença é altamente prevalente e essa prevalência está entre uma das mais altas do mundo. Em Campos dos Goytacazes, a endemicidade da toxoplasmose também é alta, peculiaridades ambientais e sociais influenciam os fatores de risco e impacto sobre a soroprevalência quando análises são realizadas em populações locais estratificadas por nível sócio-econômico (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). A toxoplasmose atinge 57,2% da população quando se considera conjuntamente as classes alta, média e baixa (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Para o contingente populacional de baixo poder aquisitivo o nível de prevalência desta infecção atinge 84,8% (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

A retinocoroidite toxoplásmica é a infecção mais comum da retina e a manifestação clínica mais frequente da toxoplasmose (Holland *et al.*, 2009). Uma combinação de fatores do parasito e do hospedeiro é considerada causa para esta apresentação clínica particular de toxoplasmose que é caracterizada por lesões multifocais, que se localizam no epitélio pigmentar da retina bem como podem atingir as camadas profundas da mesma (Maenz *et al.*, 2014). A infecção toxoplásmica se apresenta, na presença ou ausência de cicatrizes retinocoroidais adjacentes, geralmente acompanhadas de graus variados de inflamação intraocular envolvendo vítreo, vasos retinianos e nervo óptico, nesse caso, com perda visual significativa (Vasconcelos-Santos, 2012). A prevalência de toxoplasmose ocular pode variar de uma região para outra, dentro do país, mesmo em face de soroprevalência da mesma magnitude (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). Em Campos dos Goytacazes, Bahia-Oliveira e colaboradores (2012) mostraram que a prevalência da manifestação ocular da toxoplasmose pode atingir 30% da população soropositiva.

O estudo da toxoplasmose ocular continua sendo um desafio com muitas questões em aberto. Com o objetivo de melhor entender a dinâmica dessa patologia, vários estudos tem sido conduzidos abordando fatores imunológicos e genéticos do hospedeiro (Maenz *et al.*, 2014).

Estudos prévios do nosso grupo (Azevedo-Silva, 2001; Peixoto-Rangel, 2008; Bahia-Oliveira *et al.*, 2009, 2012; Guerra-Peixe *et al.*, 2014) mostraram que

manifestações da toxoplasmose ocular encontram-se associadas a parâmetros imunológicos diferenciados, a parâmetros genéticos bem como a doença parece estar sob a influência da idade do paciente. Buscando reforçar estas hipóteses, o presente estudo, investigou a presença de polimorfismos em genes das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  e o percentual de linfócitos T $\gamma\delta$ , produtores dessas citocinas, na apresentação clínica dos diferentes tipos de cicatrizes retinianas as quais são presumivelmente causadas pela infecção toxoplásmica. Para este fim, indivíduos infectados afetados por lesão ocular foram distribuídos em três grupos de indivíduos com: cicatrizes retinianas do tipo A, cicatrizes retinianas do tipo B e com cicatrizes retinianas do tipo C. Nos indivíduos que apresentaram mais de um tipo de cicatriz, considerou-se a mais severa como critério e inclusão nos grupos. Para o estudo imunológico, os indivíduos afetados por lesão ocular (CL) ou não afetados (SL) e não infectados (Neg) por *T. gondii*, foram distribuídos em outros dois grupos de duas diferentes faixas etárias: 1) até 59 anos de idade (< 60 anos) e 2) acima de 60 anos de idade ( $\geq$  60 anos).

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 retinocoroidal, 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. 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. 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 (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012).

Lesões tipo C teriam uma baixa probabilidade de serem consideradas como lesões cicatriciais de toxoplasmose, entretanto algumas observações sobre as lesões tipo C nos faz acreditar que elas realmente representem lesões cicatrizadas de toxoplasmose ocular de menor severidade. Uma delas é o fato da sua alta prevalência em pacientes soropositivos para o parasito (50 pacientes com lesão C em um total de 406 pacientes positivos para toxoplasmose, representando uma

ocorrência de cerca de 12%), diferente da sua completa ausência em indivíduos soronegativos, como pode ser visto neste estudo. Outra observação é a associação frequente destas lesões com outras lesões de retinocoroidites mais severas como as do tipo A e B, o que nesse estudo ocorreu em cerca de 23% dos casos. Além disso, pacientes com lesão do tipo C apresentam um perfil diferenciado de resposta imune celular específica *in vitro* quando comparados com o perfil de pacientes soropositivos sem acometimento ocular (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). Estes dados são reforçados pelo presente estudo quando demonstramos aumentado percentual dos linfócitos T $\gamma\delta$ , produtores de IL-10, dos indivíduos mais velhos portadores de lesão ocular tipo C quando comparados aos percentuais das células T $\gamma\delta$  dos indivíduos soropositivos sem lesão, apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa (Figura 8B).

A resposta imune protetora na toxoplasmose está relacionada com uma forte resposta Th1 que impede a lise da célula hospedeira mediada pelo parasito através da proteção desta célula contra a replicação do protozoário. No entanto, a forte resposta Th1 pode também causar danos no tecido imune por contribuir para a severidade da toxoplasmose ocular (Maenz *et al.*, 2014). Ambas as citocinas, IL-10 e TNF- $\alpha$ , que foram avaliadas neste trabalho apresentam grande relevância na resposta imune a *T. gondii*. As citocinas, em particular, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , desempenham um papel essencial na resistência a infecções por *T. gondii*. Estas citocinas ativam os macrófagos que são elementos celulares importantes componentes da primeira linha de defesa do hospedeiro (Gazzinelli *et al.*, 1994). Muitos estudos têm documentado que o TNF- $\alpha$  é uma citocina importante para controlar a resistência à infecção aguda (Deckert-Schluter *et al.*, 1998; Johnson, 1992) e crônica por *T. gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1993; Yap *et al.*, 1998). Além disso, dados experimentais têm demonstrado papel relevante para a citocina anti-inflamatória IL-10 na modulação da infecção aguda (Maenz *et al.*, 2014).

O estudo da participação de diferentes populações celulares nos eventos protetores e/ou patológicos da doença chama a atenção para o envolvimento principalmente da resposta imune celular. Nesse contexto, a detecção de moléculas expressas na superfície de células tem permitido um grande avanço na pesquisa científica aplicada ao estudo de doenças infecciosas humanas possibilitando a identificação e/ou caracterização de novas subpopulações, oferecendo assim,

informações adicionais que podem enriquecer os conhecimentos acerca da imunidade contra a toxoplasmose.

De Paoli e colaboradores (1992) mostraram que os linfócitos T $\gamma\delta$  participam da imunidade celular contra *T. gondii* e que essas células estão aumentadas durante a infecção aguda por *T. gondii*. Neste estudo, analisamos a caracterização dos linfócitos T $\gamma\delta$  quanto ao seu perfil de produção das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  após estímulo antigênico *in vitro*.

Com relação aos linfócitos T $\gamma\delta$  não se encontrou diferença nos percentuais dessas células analisadas quando comparamos indivíduos afetados por lesão ocular (CL), não afetados (SL) e não infectados por *T. gondii* (Neg) nos dois grupos de diferentes faixas etárias: < 60 anos e  $\geq$  60 anos (Figura 7B). Contudo, Azevedo-Silva (2001) demonstrou que indivíduos apresentando lesões oculares tipo C, mostraram elevados níveis circulantes de células T $\gamma\delta$  em comparação com indivíduos SL. Por outro lado, quando classificamos os pacientes por tipos de lesão ocular (dos tipos A, B e C), percebemos que os indivíduos mais jovens (< 60 anos) com lesão do tipo A expressam percentual significativamente maior ( $p=0,009$ ) destas células na corrente sanguínea que indivíduos mais velhos ( $\geq$  60 anos) do mesmo grupo (CL do tipo A) (Figura 7A).

A idade avançada está associada a um declínio funcional do sistema imunitário. Um estudo japonês, que examinou o repertório de células T $\gamma\delta$ , mostrou que os números absolutos e relativos de células T $\gamma\delta$  diminuíram com o envelhecimento (Michishita *et al.*, 2011). Neste estudo, mostramos que os números relativos de células T $\gamma\delta$  diminuíram com o envelhecimento quando comparamos indivíduos, afetados com lesão, mais jovens com indivíduos idosos. Roux e colaboradores (2013) mostraram a diminuição das células T $\gamma\delta$  com o avanço da idade na infecção por citomegalovírus. Os autores sugerem que a diminuição das células T $\gamma\delta$  nos idosos parece ser independente da atividade do timo, argumentando a favor de um sítio extratímico para a produção de células T $\gamma\delta$  em seres humanos.

Segundo Carding e Paul (2002) as células T $\gamma\delta$  participam tanto dos estágios iniciais quanto dos tardios durante a infecção de diferentes patógenos. Segundo os autores, nos estágios iniciais, essas células podem, através da produção de citocinas pró-inflamatórias modular a resposta imune inata das células NK e macrófagos e a resposta imune adaptativa de células T CD4+. Já na fase tardia da infecção, essas células podem liberar citocinas anti-inflamatórias ou



imunorregulatórias, exibir atividade citotóxica contra macrófagos ativados, além de regeneração tecidual. Neste trabalho observamos que o percentual dos linfócitos  $T\gamma\delta$  produtores de IL-10, nos dois grupos etários, apresenta-se aumentado, quando indivíduos CL são comparados com os controles SL (Figura 8A). No entanto, nas análises considerando separadamente cada tipo de lesão, indivíduos idosos com cicatrizes de lesão do tipo C, apresentam maior percentual de células  $T\gamma\delta$  produzindo IL-10 quando comparado com os demais grupos estudados, tanto mais jovens quanto também na mesma faixa etária com outros tipos de lesão A e B (Figura 8B), sugerindo que o aumentado percentual de células  $T\gamma\delta$  produzindo IL-10 está modulando a inflamação na retina desses indivíduos idosos.

Na subpopulação de linfócitos  $T\gamma\delta$  produzindo TNF- $\alpha$ , observamos menor percentual de células em indivíduos mais velhos quando comparados com indivíduos jovens do mesmo grupo (CL do tipo A; Figura 9A). Observamos também, diferença estatística ( $p=0,02$ ), quando comparamos indivíduos Neg, SL e CL nos dois grupos de diferentes faixas etárias (quando 6 grupos foram avaliados, no teste estatístico Kruskal-Wallis; Figura 9B). O percentual de linfócitos  $T\gamma\delta$  produtores de TNF- $\alpha$  mostrou-se aumentado nos indivíduos jovens CL quando comparado ao controle SL (Figura 9B). De forma contrária, o percentual de linfócitos  $T\gamma\delta$  produtores de TNF- $\alpha$  mostrou-se diminuído nos indivíduos idosos CL quando comparado ao controle SL (Figura 9B). Esses resultados sugerem que o aumentado percentual dos linfócitos  $T\gamma\delta$  produtores de TNF- $\alpha$ , nos indivíduos mais jovens, parece estar modulando a resposta imune através de um mecanismo de auto-agressão. Enquanto, nos indivíduos idosos, percentuais menores dos linfócitos  $T\gamma\delta$  parecem modular a resposta imune, favorecendo o mecanismo de replicação parasitária.

Peixoto-Rangel (2008), na região de Campos dos Goytacazes, demonstrou que células de indivíduos soropositivos para toxoplasmose (com ou sem lesão ocular) apresentaram aumento na produção de IL-10, TNF- $\alpha$  e outras citocinas, após estímulo de antígeno solúvel de *T. gondii*, em comparação aos indivíduos soronegativos e que os níveis da citocina IFN- $\gamma$  tendem a aumentar com a idade. Em nossos resultados também observamos o aumento percentual dos linfócitos  $T\gamma\delta$  produtores de IL-10 e TNF- $\alpha$  quando comparamos indivíduos SL e CL com indivíduos Neg.

O impacto da idade do paciente, sob vários aspectos da toxoplasmose ocular, tem sido debatido há décadas no entanto é consenso que fatores específicos de idade mostram-se importantes na apresentação da toxoplasmose ocular em idosos (Maenz *et al.*, 2014). No Brasil, estudos mostraram que a idade mais avançada foi um importante fator de risco para doença ocular (Dubey *et al.*, 2012; Portela *et al.*, 2004). Dados recentes a partir de modelos experimentais da doença ocular indicam que existe um desbalanço entre as respostas pró-inflamatórias de células Th17 e de células T reguladoras (mediada por IL-10, IL-27 ou TGF- $\beta$ ) relacionado à severidade da toxoplasmose ocular. Um estudo de seguimento revelou que a resposta imune Th17 era forte durante a infecção primária intravítrea e acentuadamente reduzida após a reinfecção de camundongos infectados no período neonatal (Sauer *et al.*, 2013).

Estudos mostraram que as células T $\gamma\delta$  desempenham um papel importante na tolerância ocular (Xu & Kapp, 2001) mesmo não sendo normalmente encontradas no olho. Fatores envolvidos na regulação diferencial de células T $\gamma\delta$  com o envelhecimento também não estão completamente esclarecidos (Roux, 2013). Portanto, estudos adicionais se fazem necessários para expandir a compreensão da associação entre envelhecimento, células T $\gamma\delta$  e toxoplasmose ocular. Sugerimos que outros estudos sejam realizados e com amostragem maior de pacientes para que os resultados obtidos neste trabalho se confirmem, bem como para aumentar o conhecimento sobre a imunopatologia da toxoplasmose ocular. Tais conhecimentos podem resultar em novas estratégias de tratamento com maior chance de sucesso.

Como foi proposto recentemente, parâmetros imunológicos e genéticos têm importante contribuição na diversidade das lesões oculares toxoplásmicas (Bahia-Oliveira *et al.*, 2012). Em modelos murinos, fatores genéticos do hospedeiro são críticos na determinação de suscetibilidade assim como na severidade da toxoplasmose ocular experimental (Cordeiro *et al.*, 2010). Além disso, polimorfismos em genes importantes na resposta imune inata ao parasito têm sido associados à suscetibilidade a manifestações da toxoplasmose ocular, envolvendo os genes de *IFNG*, *IL1*, *P2X7*, *TLR9* e *NOD2* (Albuquerque *et al.*, 2009; Cordeiro *et al.*, 2008; Peixoto-Rangel, 2008; Peixoto-Rangel *et al.*, 2009; Dutra *et al.*, 2013; Bahia-Oliveira *et al.*, 2012; Guerra-Peixe *et al.*, 2014). Estudos genéticos de associação com genes candidatos com potencial relevância para influenciar o perfil da resposta inflamatória contra o parasito em pacientes com toxoplasmose ocular têm sido realizados por

nosso grupo e indicam associação da toxoplasmose ocular com polimorfismos genéticos para os marcadores de TLR9 (rs352140) e NOD2 (rs3135499), enquanto que a ausência do SNP rs1718119 no *P2XR7* está associada com a proteção da manifestação ocular da doença ocular (Peixoto-Rangel *et al.*, 2009; Bahia-Oliveira *et al.*, 2012; Dutra *et al.*, 2013). Assim, o presente estudo vem complementar informações da mesma natureza. Além disso, Smith e Humphries (2009) mostraram que 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. Portanto, torna-se pertinente avaliar polimorfismos em genes de citocinas relacionadas a resposta imune a *T. gondii* tais como o que aqui apresentamos.

No que diz respeito à investigação de polimorfismos de nucleotídeo único presentes nos genes *IL10* e *TNFA* na manifestação clínica da retinocoroidite toxoplásmica, as frequências alélicas e genótípicas 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 com as frequências do grupo SL, formado por indivíduos soropositivo sem lesão ocular (n=271). Entre os 12 SNPs avaliados neste estudo, foi observado que apenas um marcador estava associado à manifestação da doença ocular causada pela toxoplasmose: o marcador do gene *TNFA* (*TNFA\_rs928815*).

O marcador rs1800894 (IL-10) mostrou que a frequência genotípica (genótipo CC) parece estar associada com a lesão tipo A ( $p=0,02$ ; Tabela 6). Contudo, estes resultados não atingiram o limiar mínimo de significância estatística pela correção de Bonferroni ( $p_{\text{corrigido}} \leq 0,01$ ), o que pode ter sido causado pelo baixo número de indivíduos avaliados (36 pacientes com lesão B e 50 com lesão C) ou pelo número de SNPs testados (5 SNPs), o que provoca um aumento de complexidade na análise estatística. Cordeiro e colaboradores (2008) analisaram o SNP rs1800896 o qual está localizado na região promotora do gene *IL10* e tem sido associado com baixos níveis de produção de IL-10 (Turner *et al.*, 1997) e observaram que a presença do alelo A está associado com a ocorrência da retinocoroidite toxoplásmica. Os autores sugeriram que indivíduos infectados e portadores deste polimorfismo apresentam maior risco de desenvolverem a doença, em comparação com indivíduos infectados, mas sem o polimorfismo. Nossos resultados para o mesmo SNP rs1800896, de maneira contrária, não apresentaram diferença estatística para as análises

realizadas (Anexo 3). Para os demais marcadores do gene *IL10* avaliados não houve diferença significativa entre os grupos analisados. No entanto, este foi o primeiro trabalho em que se propôs correlacionar a presença do SNP rs1800894 com a retinocoroidite toxoplásmica.

Para o marcador rs928815 do gene *TNFA*, observamos significância estatística na distribuição alélica e genotípica entre os grupos estudados, sendo o genótipo recessivo CC mais frequente nos pacientes com lesão do tipo C do que nos indivíduos controle, sugerindo que a homozigose do alelo C está associada à predisposição para o desenvolvimento deste tipo de cicatriz retiniana. Ou seja, indivíduos homozigotos CC possuem risco 3,9 vezes maior de desenvolver cicatriz de toxoplasmose ocular do tipo C, do que os outros genótipos (CA e AA). A diferença entre as frequências do genótipo CC entre os grupos estudados no modelo recessivo é estatisticamente significativa mesmo após a correção de Bonferroni para o valor de  $p$  ( $p_{\text{corrigido}} \leq 0,007$ ). Para o mesmo SNP, rs928815, verificou-se que o alelo A foi mais frequente no grupo controle em relação ao grupo com lesão C, sugerindo um papel protetor para este alelo contra a apresentação ocular do tipo C.

Um estudo desenvolvido por Cordeiro e colaboradores (2008) sobre o polimorfismo do gene *TNFA*, rs1800629, mostrou que o polimorfismo está associado a um aumento da produção desta citocina inflamatória. Porém, com relação à retinocoroidite toxoplásmica, não foram encontradas associações significativas do polimorfismo rs1800629 com a ocorrência da doença, quando comparados indivíduos infectados com e sem a doença, e com a recorrência da doença segundo aqueles autores. Nossos resultados, para o marcador rs1800629, também não apresentaram significância estatística (Anexo 3). Para os demais marcadores do gene *TNFA* avaliados não houve diferença significativa entre os grupos analisados. De acordo com a revisão da literatura científica, este foi o primeiro trabalho em que se propôs correlacionar a presença do SNP rs928815 com a toxoplasmose ocular.

De acordo com os resultados observados, foram obtidos dados que corroboram a ideia de que as associações entre o genótipo e o desenvolvimento da toxoplasmose ocular não se baseiam somente em fatores casuais. Os dados obtidos sugerem que existem associações entre o genótipo encontrado para o SNP *TNFA\_rs928815* e a lesão ocular do tipo C.

Esses resultados apontam para a necessidade de continuidade desse estudo pela ampliação do número de indivíduos estudados para se ter validação dos dados

de significância estatística encontrados e, conseqüentemente, para o melhor entendimento da manifestação ocular da doença.

De um modo geral, podemos concluir com este estudo que a ocorrência de polimorfismos em genes importantes da resposta imune a *T. gondii* como os genes que codificam citocinas podem influenciar o aparecimento de lesão ocular e o tipo de lesão que o indivíduo venha a sofrer. Assim, o melhor entendimento acerca do controle exercido por estas moléculas cria a perspectiva de poder regular os processos inflamatórios no tecido ocular provenientes da toxoplasmose e/ou oferecer tratamento quimioterápico de maneira mais racional e menos empírica como ocorre atualmente.

## 8. CONCLUSÕES

I. Indivíduos mais jovens com cicatrizes do tipo A apresentaram percentuais mais altos de linfócitos T $\gamma\delta$  no sangue periférico que indivíduos idosos, sob estímulo do STAg imediatamente após a coleta da amostra de sangue periférico.

II. Indivíduos, dos dois grupos etários analisados (menores e maiores que 60 anos), apresentam aumentado percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produtores de IL-10, quando foram comparados indivíduos CL com controles SL.

III. Indivíduos idosos afetados com cicatrizes de lesão do tipo C, apresentam o percentual de células T $\gamma\delta$  produzindo IL-10 mais elevado quando comparado com os demais grupos estudados, tanto mais jovens quanto também na mesma faixa etária com outros tipos de lesão A e B, sugerindo que o aumentado percentual de células T $\gamma\delta$  produzindo IL-10 parece estar modulando a inflamação na retina desses indivíduos.

IV. Indivíduos idosos apresentaram menor percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produtores de TNF- $\alpha$  quando comparados com indivíduos jovens do mesmo grupo (CL do tipo A).

V. O percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produtores de TNF- $\alpha$  mostra-se aumentado nos indivíduos jovens CL quando comparado ao controle SL. De forma contrária, o percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produtores de TNF- $\alpha$  mostra-se diminuído nos indivíduos idosos CL quando comparado ao controle SL.

VI. A idade parece ser um importante fator de risco para doença ocular, uma vez que foi observado aumento do percentual de linfócitos T $\gamma\delta$  produtores das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  quando comparamos indivíduos infectados (com ou sem lesão) com indivíduos não infectados com o avanço da idade. Associações entre idade, resposta imune e susceptibilidade a toxoplasmose ocular indicam que tais fatores tem implicações importantes para o tratamento da doença ocular toxoplásmica em idosos.

VII. Para o SNP rs1800894 do gene *IL10* a presença do genótipo CC parece estar associada à presença da manifestação da lesão ocular característica da infecção por *Toxoplasma gondii*, favorecendo o desenvolvimento de lesões do tipo

A, embora biologicamente essa associação faça sentido esse dado não apresentou valor estatístico significativo após a correção de Bonferroni.

VIII. Para o SNP rs928815 do gene *TNFA* observou-se que a presença do alelo A está associado com a proteção contra lesões de toxoplasmose ocular do tipo C, entretanto, o genótipo recessivo CC está associado com a predisposição para o desenvolvimento deste tipo de cicatriz retiniana;

IX. Para os SNPs rs1800896, rs1800871, rs3021094, rs1800890, rs2857709, rs2857708, rs17200740, rs915654, rs909253 e rs1800629 não foi observada significância estatística para nenhuma das análises realizadas (Anexo III).

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M.C., ALEIXO, A.L., BENCHIMOL, E.I., LEANDRO, A.C., DAS NEVES, L.B., VICENTE, R.T., *et al.* The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(3):451-5, 2009.

ALEXANDER, J., HUNTER, C.A. Immunoregulation during toxoplasmosis. *Chem Immunol* 70: 81-102, 1998.

AKDIS, C.A., AKDIS, M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 123:735-46, quiz 47-8, 2009.

AUBERT, D., VILLENA, I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne Region, France. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(2): 290-295, 2009.

AZEVEDO-SILVA J. Avaliação da resposta imunológica contra antígenos de *Toxoplasma gondii* e *Ascaris lumbricoides* em pacientes residentes em áreas coendêmicas para ambos os parasitos em Campos dos Goytacazes/RJ. Tese de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Biologia do Reconhecer. pp109, Agosto de 2001.

BAHIA-OLIVEIRA, L., RANGEL, A.L.P., BOECHAT, M.S.B., MANGIAVACCHI, B.M., MARTINS, L.M., FERRAZ, F.B., ALMEIDA, M.B., PEIXOTO, E.M.W., VIEIRA, F.P., 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 O. Djurković Djaković, *Toxoplasmosis – Recent Advance*, In Tech, Rijeka, Croatia, p. 145–172, 2012.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G., AZEVEDO-SILVA, J., PEIXOTO-RANGEL, A.L., BOECHAT, M.S.B., WILKEN-ABREU, A.M.O., MASSARA, C.L., GUERRA-PEIXE, R. 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, L.M.G. *et al.* Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 9(1): 55-62, 2003.



- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., WILKEN DE ABREU A. M., AZEVEDO-SILVA J. e ORÉFICE, F. Toxoplasmosis in southeastern Brazil an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. In: Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. E. Petersen, A. Pollak, and I. Reiter-Owona (Invited Review). *Intl. J. Parasitol.* 31: 115 - 144, 2001.
- BAUER, S., GROH, V., WU, J., STEINLE, A., PHILLIPS, J. H., LANIER, L. L., SPIES, T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*.30;285(5428): 727-729, 1999.
- BIRON, C.A., NGUYEN, K.B., PIEN, G.C., COUSENS, L.P., SALAZAR-MATHER, T.P. Natural Killer Cells In Antiviral Defense: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17:189–220, 1999.
- BHOPALE, G.M. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 26: 213-222, 2003.
- BLISS, S.K., MARSHALL, A.J., ZHANG, Y., DENKERS, E.Y. 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.
- BORN, W.K., HARSHAN, K., MODLIN, R.L., O'BRIEN, R.L. The role of  $\gamma\delta$  T lymphocytes in infection. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 455, 1991.
- BRANDES, M., WILLIMANN, K., MOSER, B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science.* 8: 309(5732): 264-268, 2005.
- BROOKES, A.J. The essence of SNPs. *Gene.* 234(2):177-186, 1999.
- BRUNTON, C.L., WALLACE, G.R., GRAHAM, E., STANFORD, M.R. The effect of cytokines on the replication of *T. gondii* within rat retinal vascular endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 102(2):182-8, 2000.
- BRUUNSGAARD, H., ANDERSEN-RANBERG, K., HJELMBORG, J.B., PEDERSEN, B.K., JEUNE, B. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am J Med.* 115:278-83, 2003.

CACCAMO, N. *et al.* A Subset of Vgamma9V-delta2 T cells help B cells for antibody production. *Haematologica Rep.* 2: 10-13, 2006.

CARDING, S.R., PAUL, J.E.  $\gamma\delta$  T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2(5): 336-45, 2002.

CIPRIANI, B., BORSELLINO, G., POCCIA, F., PLACIDO, R., TRAMONTI, D., BACH, S., BATTISTINI, L., BROSANAN, C.F. Activation of C-C -chemokines in human peripheral blood T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. *Blood.* 95: 39-47, 2000.

COMMODARO, A.G. Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(2): 345-350, 2009.

CORDEIRO, C. A., MOREIRA, P. R., DUTRA, W. O., YOUNG, L., CAMPOS, W. R., ORÉFICE, F., TEIXEIRA JÚNIOR, A. L. Imunologia da retinocoroidite toxoplásmica. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia.* 73(6): 548-55, 2010.

CORDEIRO, C.A., MOREIRA, P.R., DUTRA, W.O., CAMPOS, W.R., TEIXEIRA, A.L., ORÉFICE, F. Immunogenetics in the uveitis. *Arq Bras Oftalmol.* 71(2):295-9, 2008.

CORDEIRO, C.A., MOREIRA, P.R., ANDRADE, M.S., DUTRA, W.O., CAMPOS, W.R., ORÉFICE, F., *et al.* Interleukin-10 gene polymorphism (-1082A/G) is associated with Toxoplasmic Retinochoroiditis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49(5):1979-82, 2008.

CORDEIRO, C.A., MOREIRA, P.R., COSTA, G.C., DUTRA, W.O., CAMPOS, W.R., ORÉFICE, F., *et al.* TNF-alpha gene polymorphism (-308G/A) and toxoplasmic retinochoroiditis. *Br J Ophthalmol.* 92(7):86-8, 2008

COUTO., J.C.F., AVELINO, M.M.FERREIRA, Q.T.M. In Couto, J.C.F, Andrade, G.M.Q., Tonelli, E., *Infecções Perinatais.* Guanabara/Koogan, 2006.

DAS, H., GROH, V., KUIJL, C., SUGITA, M., MORITA, C.T., SPIES, T., BUKOWSKI, J.F. MICA engagement by human Vgamma2 Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity.* 15(1): 83-93, 2001.

DECKERT-SCHLUTER, M., BLUETHMANN, H., RANG, A. *et al.* Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *J Immunol.* 160:3427–33, 1998.

DE PAOLI, P., BASAGLIA, G., GENNARI, D., CROVATTO, M., MODOLO, M. L., SANTINI, G. Phenotypic profile and functional characteristics of human gamma and delta T cells during acute toxoplasmosis. *J. of. Clinical Microbiol.* 30: 729 – 731, 1992.

DENKERS, E. Y., GAZZINELLI, R. T.: Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 11: 569-588, 1998.

DENKERS, E. Y., 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.

DENIZ, G., ERTEN, G., KUCUKSEZER, U.C., KOCACIK, D., KARAGIANNIDIS, C., AKTAS, E., *et al.* Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 180:850-7, 2008.

DESMONTS G, *et al.* Etude epidemiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. *Rev Fr Etudes Clin Biol* 10: 952-958, 1965.

DE WAAL MALEFYT, R., ABRAMS, J., BENNETT, B., FIGDOR, C.G., DE VRIES, J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-20, 1991.

DUBEY, J.P., LAGO, E.G., GENNARI, S.M., SU, C., JONES, J.L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* . 139: 1375-1424, 2012.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis of animals and humans. *Boca Raton: CRC Press.* Second edition, 313 p., 2010.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J. Parasitol.* 82: 957-961, 1998.

DUBEY, J.P. *et al.* The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 132: 636-662, 1970.

DURLACH, R.A.; KAUFER, F.; CARRAL, L.; HIRT, J. Toxoplasmic lymphadenitis - clinical and serologic profile. *Clin Microbiol Infect* 9: 625-631, 2003.

DUTRA, M.S., BÉLA, S.R., PEIXOTO-RANGEL, A.L., FAKIOLA, M., CRUZ, A.G., 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, W.O., *et al.* Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: Lessons learned from oral diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20: 223-232, 2009.

ECKERT, G.U.; MELAMED, J.; MENEGAZ, B. Optic nerve changes in ocular toxoplasmosis. *Eye* 21: 746-751, 2007.

ELMORE, S.A., JONES, J.L., CONRAD, P.A., PATTON, S., LINDSAY, D.S. *et al.* *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology* 26: 190–196, 2010.

FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends Parasitol* 18: 355-359, 2002.

FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(2): 133-48, 2009.

GARWEG, J.G., CANDOLFI, E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(2): 211-220, 2009.

GAZZINELLI, R.T., BRÉZIN, A., LI, Q., NUSSENBLATT, R.B., CHAN, C.C. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Exp Parasitol.* 78(2):217-29, 1994.

GAZZINELLI, R.T., ELTOUM, I., WYNN, T.A. *et al.* Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF- $\alpha$  and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase *in vivo*. *J Immunol.* 151:3672–81, 1993.

GAZZINELLI, R.T., DENKERS, E.Y., 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, R.T., 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, R.T., HAKIM, F.T., HIENY, S. SHEARER, G.M, SHER, A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *The Journal of immunology*. 146: 286-292, 1991.

GILBERT, R.E. *et al.* Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2(8): e277, 2008.

GUERRA-PEIXE, R., BOECHAT, M.S.B., PEIXOTO-RANGEL, A.L., ROSA, R.F.G., PETZL-ERLER, M.L., BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. Single nucleotide polymorphisms in the interferon gamma gene are associated with distinct types of retinochoroidal scar lesions presumably caused by *Toxoplasma gondii* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 109(1): 99-107, 2014.

HARRIS, D.P., HAYNES, L., SAYLES, P.C., DUSO, D.K., EATON, S.M., LEPAK, N.M., JOHNSON, L.L., SWAIN, S.L., LUND, F.E. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* 1: 475–482, 2000.

HAUSER, W.E.Jr., TSAI, V. Acute toxoplasma infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* in vitro. *J Immunol.* 136: 313-319, 1986.

HENAO, M. I., MONTES, C., PARIS, S. C., GARCIA, L.F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 86(1): 11-19, 2006.

HOGAN, M.J. Ocular Toxoplasmosis. New York: Columbia University Press, 1951.

HOGAN, M.J. Ocular toxoplasmosis: XIV Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 46:467-494, 1958.

HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis and patient age. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 136 (6): 351-357, 2009.

HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. *Am J Ophthalmol.*137: 1-17, 2004.

HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am. J. Ophthalmol.* 136, 973–988, 2003.

JACKSON, M.H., HUTCHISON, W.M. The prevalence and source of toxoplasma infection in the environment. In: BAKER, J.R. e MULLER, R. editors. *Advanced Parasitology*, vol. 28. London: Academic Press, p. 55–105, 1989.

JACOBS, L., REMINGTON, J.S., MELTON, M.L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 46: 11-21, 1960.

JIN, N., TAUBE, C., SHARP, L., HAHN, Y., YIN, X., WANDS, J.M., ROARK, C.L., O'BRIEN, R.L., GELFAND, E.W., BORN, W.K. Mismatched Antigen Prepares  $\gamma\delta$ T Cells for Suppression of Airway Hyperresponsiveness. *J. Immunol.* 174: 2671-79, 2005.

JOHNSON, L.L. A protective role for endogenous tumor necrosis factor in *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun.* 60:1979–83, 1992.

JONES, J.L., MUCCIOLI, C., BELFORT, R. Jr, HOLLAND, G.N., ROBERTS, J.M., SILVEIRA, C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 582-587, 2006.

LINDBERG, R. E., FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis in nude mice. *J Parasitol* 63: 219-21, 1977.

LOWRY O. H., ROSEMBROUGH J. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. Protein measurement with the fenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.

LU, F., HUANG, S., KASPER, L.H. Interleukin-10 and pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. *Infect Immun.* 71(12):7159-63, 2003.

LU, F., HUANG, S., HU, M.S., KASPER, L.H. Experimental ocular toxoplasmosis in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun.* 73(8):5160-5, 2005.

MAENZ, M., *et al.* Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2014. <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.12.005>>

MALAGUARNERA, L., FERLITO, L., IMBESI, R.M., GULIZIA, G.S., DI MAURO, S., MAUGERI, D. *et al.* Immunosenescence: a review. *Arch Gerontol Geriatr.* 32:1-14, 2001.

MICHISHITA, Y., HIROKAWA, M., GUO, Y.M., ABE, Y., LIU, J., UBUKAWA, K., FUJISHIMA, N., FUJISHIMA, M., YOSHIOKA, T., KAMEOKA, Y., SAITO, H., TAGAWA, H., TAKAHASHI, N., SAWADA, K. Age-associated alteration of  $\gamma\delta$  T-cell repertoire and different profiles of activation-induced death of V $\delta$ 1 and V $\delta$ 2 T cells. *Int J Hemato.* 94(3): 230-40, 2011.

MILLER, C.M. *et al.* The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 39: 23-39, 2009.

MINEO, J.R., McLEOD, R., MACK, D., SMITH, J., KHAN, I.A., ELY, K.H., KASPER, L.H. 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.

MISHTO, M., SANTORO, A., BELLAVISTA, E., BONAFE, M., MONTI, D., FRANCESCHI, C., Immunoproteasomes and immunosenescence. *Ageing Res Rev.* 2(4): 419-32, 2003.

MONTOYA J.G., ROSSO, F. Diagnosis and Management of Toxoplasmosis. *Clin. Perinatol.* 32: 705-26, 2005.

MONTOYA, J. G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet* 363: 1965-76, 2004.

MOONESINGHE, R; YESUPRIYA, A; CHANG, M; DOWLING, N. F.; KHOURY, M; SCOTT, A. J. FOR CDC/NCI NHANES III GENOMICS WORKING GROUP. A Hardy-Weinberg equilibrium test for analysing population genetic surveys with complex sample designs. *American Journal of Epidemiology* 171 (8), 2010.

MORETTA, A., BOTTINO, C., VITALE, M., PENDE, D., CANTONI, C., MINGARI, M., BIASSONI, R., MORETTA, L. Activating receptors and coreceptors involved in

human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 197–223, 2001.

MORITA, C.T., JIN, C., SARIKONDA, G., WANG, H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev.* 215: 59-76, 2007.

MOSER, B., EBERL, M. Gammadelta T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 215: 89-102, 2007.

MOSMANN, T.R., COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173, 1989.

MOURA, L., BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G., WADA, M.Y., JONES, J.L., TUBOI, S.H., CARMO, E.H., RAMALHO, W.M., CAMARGO, N.J., TREVISAN, R. GRAÇA, R.M.T., SILVA, A.J., MOURA, I., DUBEY, J.P., GARRET, D.O. Waterborne Toxoplasmosis, Brazil, from Field to Gene. *Emerging Infectious Diseases.* 12(2): 326-329, 2006.

NAKA, I. *et al.* IFNGR1 polymorphisms in Thai malaria patients. *Infection, Genetics and Evolution.* 9: 1406-1409, 2009.

NELSON, D. SNPs, linkage disequilibrium, human genetic variation and Native American culture. *Trends Genet.* 17(1):15–6, 2001.

NIELSEN, R. Population genetic analysis of ascertained SNP data. *Hum. Genom.* 1(3):218-24, 2004.

ORÉFICE, F. e BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. Toxoplasmose. In: ORÉFICE F. editor. *Uveíte Clínica e Cirúrgica – Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica p. 619-680, 2005.*

PEIXOTO-RANGEL, A. L., MILLER, E. N., CASTELUCCI, L., JAMIESON, S. E., PEIXE, R. G., DE SOUZA ELIAS, L., CORREA-OLIVEIRA, R., BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., BLACKWELL, J. M. Candidate gene analysis of acquired ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 104: 1187-1190, 2009.



PEIXOTO-RANGEL, A.L. Investigação de fatores imunogenéticos associados à manifestação de retinocoroidites toxoplásmicas em áreas altamente endêmicas para toxoplasmose. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Biologia do Reconhecer. pp142, Setembro de 2008.

PORTELA, R.W., BETHONY, J., COSTA, M.I., GAZZINELLI, A., VITOR, R.W., HERMETO, F.M., CORREA-OLIVEIRA, R., GAZZINELLI, R.T. 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.

PYO, CHUL-WOO *et al.* Polymorphisms of IL-1B, IL-1RN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IFN- $\gamma$  Genes in the Korean Population. *Human Immunology.* 64: 979–989, 2003.

RHODES, S.G., HEWINSON, R.G., VORDERMEIER, H.M. Antigen recognition and immunomodulation by gamma delta T cells in bovine tuberculosis. *J Immunol.* 166(9): 5604-10, 2001.

RINCON-OROZCO, B., KUNZMANN, V., WROBEL, P., KABELITZ, D., STEINLE, A., HERRMANN, T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol.* 15;175(4): 2144-51, 2005.

ROBERT-GANGNEUX, F., DARDÉ, M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25: 264–296, 2012.

RODEN, A.C., MORICE, W.G., HANSON, C.A. Immunophenotypic attributes of benign peripheral blood gammadelta T cells and conditions associated with their increase. *Arch Pathol Lab Med.* 132(11): 1774-1780, 2008.

ROIKO, M.S., CARRUTHERS, V.B. New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. *Cellular Microbiology.* 11(10):1444-52, 2009.

ROUX, A., MOURIN, G., LARSEN, M., FASTENACKELS, S., URRUTIA, A., GOROCHOV, G., AUTRAN, B., DONNER, C., SIDI, D., SIBONY-PRAT, J., MARCHANT, A., STERN, M., SAUCE, D., APPAY, V. Differential Impact of Age and Cytomegalovirus Infection on the  $\gamma\delta$  T Cell Compartment. *J Immunol.* 191:1300-1306, 2013.

RUSSANO, A.M., AGEA, E., CORAZZI, L., POSTLE, A.D., DE LIBERO, G., PORCELLI, S., DE BENEDICTIS, F.M., SPINOZZI, F. Recognition of pollen-derived phosphatidyl-ethanolamine by human CD1d-restricted gamma delta T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 117(5): 1178-1184, 2006.

SABIN A. B. AND FELDMAN H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108: 660-663., 1948.

SCALISE, F., GERLI, R., CASTELLUCCI, G., SPINOZZI, F., FABIETTI, G.M., CRUPI, S., SENSI, L., BRITTA, R., VACCARO, R., A. BERTOTTO, A. Lymphocytes bearing the  $\gamma\delta$  T-cell receptor in acute toxoplasmosis. *Immunology.* 76: 668-70, 1992.

SALIH, M.A. *et al.* IFNG and IFNGR1 gene polymorphisms and susceptibility to post-kala-azar dermal leishmaniasis in Sudan. *Genes Immun.* 8 (1): 75-78, 2007.

SAUER, A., ROCHET, E., LAHMAR, I., BRUNET, J., SABOU, M., BOURCIER, T., CANDOLFI, E., PFAFF, A.W. The local immune response to intraocular *Toxoplasma* rechallenge: less pathology and better parasite control through Treg/Th1/Th2 induction. *Int. J. Parasitol.* 43: 721-28, 2013.

SPADA, F.M., GRANT, E.P., PETERS, P.J., SUGITA, M., MELIAN, A., LESLIE, D.S., LEE, H.K., VAN DONSELAAR, E., HANSON, D.A., KRENSKY, A.M., MAJDIC, O., PORCELLI, S.A., MORITA, C.T., BRENNER, M.B. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med.* 20;191(6): 937-948, 2000.

SHAPIRA, L.; WILENSKY, A.; KINANE, D.F. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J. Clin. Periodontol* 32(Suppl.6): 72–86, 2005.

SHEN, Y., ZHOU, D., QIU, L., LAI, X., SIMON, M., SHEN, L., KOU, Z., WANG, Q., JIANG, L., ESTEP, J., HUNT, R., CLAGETT, M., SEHGAL, P.K., LI, Y., ZENG, X., MORITA, C.T., BRENNER, M.B., LETVIN, N.L., CHEN, Z.W. Adaptive immune response of Vgamma2 Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science.* 22;295(5563): 2255-58, 2002.

- SHER A., OSWALD I.P., HIENY S. AND GAZZINELLI R.T. *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.
- SOHEILIAN, M., HEIDARI, K., YAZDANI, S., SHAHSAVARI, M., AHMADIEH, H., DEHGHAN, M. Patterns of uveitis in a tertiary eye care center in Iran. *Ocul Immunol Inflamm* 12: 297-310, 2004.
- SUBAUSTE, C.S., CHUNG, J.Y., DO, D., KONIARIS, A.H., HUNTER, C.A., MONTOYA, J.G., PORCELLI, S., REMINGTON, J.S. 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.
- SMITH, A.J.P., HUMPHRIES, S.E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20: 43–59, 2009.
- TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30: 1217-1258, 2000.
- TURNER, D.M., WILLIAMS, D.M., SANKARAN, D., LAZARUS, M., SINNOTT, P.J., HUTCHINSON, I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 24:1-8, 1997.
- VASCONCELOS-SANTOS, D.V. Ocular manifestations of systemic disease: toxoplasmosis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 23: 543-50, 2012.
- VOLLMER, T.L., WALDOR, M.K., STEINMANN, L., CONLEY, F.K. 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, L., DAS, H., KAMATH, A., BUKOWSKI, J.F. Human V gamma 2V delta 2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products. *J Immunol.* 167(11): 6195-6201, 2001.

WEINMAN D., CHANDLER, A.H. Toxoplasmosis in swine and rodents. Reciprocal oral infection and potential human hazard. *Proc Soc Exp Biol Med* 87: 211-216, 1954.

WOKE, P.A., JACOBS, L., JONES, F.E., MELTON, M.L. Experimental results on possible arthropod transmission of toxoplasmosis. *J. Parasitol.* 39: 523-32, 1953.

WOLF, A., COWEN, D., PAIGE, B.H. Fetal encephalomyelitis: prenatal inception of infantile toxoplasmosis. *Science* 93: 548-549, 1941.

WORTH, A.R., LYMBERY, A.J., THOMPSON, R.C.A. Adaptive host manipulation by *Toxoplasma gondii*: fact or fiction? *Trends in Parasitology* 29(4): 150-155, 2013.

YAP, G.S., SCHARTON-KERSTEN, T., CHAREST, H. *et al.* Decreased resistance of TNF receptor p55 and p75 deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *J Immunol.* 160:1340–5, 1998.

## 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**

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. Lillian 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

### ANEXO 3

**Tabela:** Valores de  $\chi^2$  (qui-quadrado) para todos os SNPs avaliados, em todas as análises realizadas.

SNP	SL <i>versus</i> CL A		SL <i>versus</i> CL B		SL <i>versus</i> CL C	
	Freq. alélica	Freq. genotípica	Freq. alélica	Freq. genotípica	Freq. alélica	Freq. genotípica
<i>IL10_rs1800896</i>	0,07	0,91	0,00	0,15	0,49	2,28
<i>IL10_rs1800871</i>	1,21	2,23	0,00	0,02	1,11	1,73
<i>IL10_rs3021094</i>	0,64	2,07	0,55	1,01	0,00	0,19
<i>IL10_rs1800894</i>	0,03	<b>7,47</b>	1,52	*nd	0,90	*nd
<i>IL10_rs1800890</i>						
<i>TNFA_rs928815</i>	0,23	1,68	0,04	0,14	<b>12,52</b>	<b>15,34</b>
<i>TNFA_rs2857709</i>	0,43	1,25	0,51	2,02	0,24	0,65
<i>TNFA_rs2857708</i>	0,11	1,21	0,86	0,97	0,75	3,69
<i>TNFA_rs17200740</i>	0,35	*nd	0,28	*nd	0,32	*nd
<i>TNFA_rs915654</i>	0,92	0,88	1,77	2,32	0,32	0,94
<i>TNFA_rs909253</i>	0,02	1,41	0,35	0,37	0,34	0,92
<i>TNFA_rs1800629</i>	*nd	*nd	*nd	*nd	*nd	*nd

Notas: \* nd: teste  $\chi^2$  não foi possível.