

INVESTIGAÇÃO DE FATORES IMUNOGENÉTICOS ASSOCIADOS À
MANIFESTAÇÃO DE RETINOCOROIDITES TOXOPLÁSMICAS EM
ÁREA ALTAMENTE ENDÊMICA PARA TOXOPLASMOSE

ALBA LUCÍNIA PEIXOTO RANGEL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
SETEMBRO DE 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INVESTIGAÇÃO DE FATORES IMUNOGENÉTICOS ASSOCIADOS À
MANIFESTAÇÃO DE RETINOCOROIDITES TOXOPLÁSMICAS EM
ÁREA ALTAMENTE ENDÊMICA PARA TOXOPLASMOSE

ALBA LUCÍNIA PEIXOTO RANGEL

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

Orientadora: Dr^a. Lílian Maria Garcia Bahia Oliveira

Co-Orientadora: Dr^a. Jennefer Mary Blackwell

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
SETEMBRO DE 2008

INVESTIGAÇÃO DE FATORES IMUNOGENÉTICOS ASSOCIADOS À
MANIFESTAÇÃO DE RETINOCOROIDITES TOXOPLÁSMICAS EM
ÁREA ALTAMENTE ENDÊMICA PARA TOXOPLASMOSE

ALBA LUCÍNIA PEIXOTO RANGEL

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

Aprovada em 26 de setembro de 2008.

Comissão Examinadora:

Prof. Adalberto Rezende Santos (Doutor em Biologia Celular e Molecular) –
FIOCRUZ/RJ

Prof. André Lacerda de Abreu Oliveira (Doutor em Medicina – Cirurgia Geral) –
UENF

Prof^a. Elena Lassounskaia (Doutora em Imunologia) – UENF

Prof^a. Lílian M. G. Bahia de Oliveira (Doutora em Bioquímica e Imunologia) - UENF

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto a minha gratidão a todas elas e de forma particular:

À Deus, por ser presença constante em todos os momentos de minha vida;

Aos meus pais, Maria de Jesus e Adnir, por acreditarem e investirem sempre nos meus “empreendimentos”, na busca voraz por maior conhecimento e qualificação;

Aos meus irmãos (Marcus Vinícius, Beatriz Helena, Marta Valéria e Sílvia Cristina) por serem a maior herança que meus pais poderiam me dar na vida.

Aos meus sobrinhos (Daniel, Arthur, Larissa, Vítor, Bruna, Laura, Mariana e Carlos) por serem benção de Deus em nosso Lar;

Aos meus cunhados pela amizade sincera de “irmãos”;

Aos demais familiares pelo incentivo e auxílio em todos os momentos necessários;

Às eternas amigas: JuGuzzo, Michelinha, Rafaela e Rhoninha por serem minhas irmãzinhas adotivas, conselheiras e companheiras de todas as horas. Obrigada pela amizade sincera!

À amiga Elaine Roiffé pela amizade sincera e por ter me recebido sempre com muito carinho em sua casa no Rio no período de prova de proficiência em língua inglesa.

À Ralph pelo incentivo, companheirismo e por ser sempre tão prestativo e carinhoso.

À professora Lílian Bahia gostaria de expressar minha admiração e meu agradecimento sincero pelas oportunidades de aprendizado, pelos exemplos de dedicação e amor à ciência e pela amizade construída ao longo desses 10 anos de orientação. Obrigada mesmo pela formação com transformação, sempre buscando em seus alunos as mais profundas reflexões!

Às amigas Bibi, Flavinha, Lili, Livinha, Lú, Marcelita e Beatriz pelas infinitas ajudas prestadas ao longo deste trabalho, sem as quais seria impossível concluí-lo, pela amizade e pelas risadas contagiantes que tornam nosso ambiente de trabalho um local alegre e motivador. Obrigada mesmo meninas!

Aos amigos do LBR (Franz, Halyka, Gláucia, Daniele, Thiago, Inarei, Marcele, Aline, Juju, Ritinha, Fernando, Núbia, Patrícia, Sr. Jorge, Rosângela) pelas conversas agradáveis e pelo apoio.

Aos professores do LBR pelos valiosos ensinamentos e disponibilidade de ajuda.

Aos motoristas da UENF, especialmente, Nadson, Gaiato, Marquinho, Derval, Vilarinho, Ailton, e Luiz Carlos, pelas conversas agradáveis entre uma visita e outra às casas de pacientes e pelas ajudas e compreensão da necessidade das saídas de campo aos finais de semana.

Aos indivíduos voluntários, meu agradecimento especial, pela compreensão da importância da participação deles para desenvolvimento deste trabalho!

Aos alunos da Escola Técnica Estadual João Barcelos Martins (Unidade FAETEC) que participaram do mutirão.

À Dr^a. Jennefer M. Blackwell por ter me recebido em seu laboratório e pelos ensinamentos valiosos em genética de doenças infecciosas.

À querida Nancy Miller pelas infinitas ajudas e ensinamentos a mim dispensados durante todo o período em Cambridge.

À Lea Castellucci e Sarra Jamieson pelas ajudas durante os dois primeiros meses do meu estágio de doutorado no exterior.

Aos demais colegas do laboratório de doenças infecciosas da Dr^a. Jennefer M. Blackwell obrigada pelas ajudas e pelas conversas agradáveis durante o “Coffee-Break”.

Aos amigos da Link-House, especialmente, Aradhna, Danniell, Dorothy, Gustavo, Iordan, Lea, Letícia, Miguel e Tony pela companhia agradável, pelas saídas e viagens divertidas e por terem suprido um pouco da ausência de minha família enquanto estive em Cambridge!

Aos Professores Olindo e Andréa Teixeira do René-Rachou (FIOCRUZ-BH) por terem me recebido em seu laboratório e, principalmente, por ter me ensinado e ajudado nas análises de CBA lá desenvolvidas.

Aos colegas do LADOC (René-Rachou – FIOCRUZ/BH) muito obrigada pela receptividade e ajuda.

Ao Professor Rodrigo Corrêa (René-Rachou – FIOCRUZ/BH) por permitir que utilizássemos equipamentos de seu laboratório também para realização das análises por CBA.

À família da Professora Lílian por ter me recebido sempre com tanto carinho em seus lares em Belo Horizonte, me fazendo sentir em casa. Muito obrigada!

À Dr^a. Andréa Teixeira e Dr^a. Lea Castellucci por terem aceitado revisar esta tese de doutorado, e pela atenção, dicas e sugestões dispensados na revisão da mesma.

Aos Professores: Adalberto Rezende, André Lacerda e Elena Lassounskaia por terem aceitado fazer parte da banca examinadora desta tese de doutorado.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho!

SUMÁRIO

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xvi
Lista de Abreviaturas	xviii
Apoio Financeiro	xx
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Breve Histórico	1
1.2 Vias de Transmissão do <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.3 Diagnóstico da Infecção Toxoplásmica	4
1.4 A Toxoplasmose	5
1.5 A Toxoplasmose Ocular	6
1.5.1 A Classificação das Lesões Oculares Decorrentes de Infecção pelo <i>Toxoplasma gondii</i>	7
1.6 A Imunidade do Hospedeiro ao Parasita <i>Toxoplasma gondii</i>	9
1.6.1 A Resposta Imune Intraocular	12
1.7 Genética e Susceptibilidade a Infecções Parasitárias	14
II. JUSTIFICATIVA	20
III. OBJETIVO	22
IV. POPULAÇÃO ESTUDADA, MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Indivíduos Sujeitos da Pesquisa.....	23
4.2 Classificação das Lesões Oculares Toxoplásmicas por Tamanho e Localização	23
4.3 Estudo Genético	24
4.3.1 Casuística do Estudo Genético	24
4.3.2 Extração de DNA Genômico de Amostras de Sangue Total	27
4.3.3 Quantificação de DNA por Espectrofotometria	27
4.3.4 Quantificação de DNA por Ensaio de Fluorescência usando Reagente de Picogreen	28
4.3.5 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) “Touchdown”	28
4.3.6 Gel de Agarose	29
4.3.7 Amplificação de DNA Total a partir de Amostras de Sangue Total pelo Método de MDA	29
4.3.8 Ensaio de TaqMan	30
4.3.9 Reação SnaPshot Multiplex	32
4.3.10 Análises Estatísticas	34
4.3.11 Análises de Equilíbrio de Hardy-Weinberg	34
4.3.12 Análises de Associação Genética	35
4.3.12.1 Cálculo do Poder do TDT	35

4.3.12.2 Análises TDT	35
4.3.12.3 Análises Caso-Pseudocontrole	36
4.3.12.4 Teste de Associação Baseado em família	36
4.4 Estudo Imunológico	37
4.4.1 Casuística do Estudo Imunológico	37
4.4.2 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico	37
4.4.3 Manutenção de <i>Toxoplasma gondii</i> (cepa RH) e Preparação de Lisado Protéico	38
4.4.4 Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico	39
4.4.5 Obtenção de Sobrenadantes de Cultura Celular para Avaliação de Citocinas Secretadas	40
4.4.6 Análise de Citocinas em Sobrenadantes de Cultura de PBMCs por “Cytometric Bead Array”	40
4.4.7 Análises Estatísticas	41
4.5 Detecção de Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em Amostras de Soro de Indivíduos através de ELISA	42
V. RESULTADOS	43
5.1 Tamanho e Localização das Lesões Retinianas Abordadas nesse Estudo	43
5.1.1 Relação entre o Tipo de Lesão Retiniana e o seu Tamanho	44
5.1.2 Relação entre o Tipo de Lesão Ocular e a Localização da Lesão na Retina	45
5.2 Estudo Genético	47
5.2.1 Frequências Alélicas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)	47
5.2.2 Análises de Associação	50
5.2.2.1 Cálculos de Poder para as Análises “Transmission Disequilibrium Test” (TDT) como uma Ferramenta para Estimar o Tamanho da Amostragem Adequada	50
5.2.2.2 Teste Estatístico “Transmission Disequilibrium Test” (TDT) para Investigar a Associação entre Marcadores e a Manifestação de Doença Ocular	51
5.2.2.3 Análises “Caso-Pseudocontrole” Usadas em Estudos de Associação entre Marcadores Genéticos e o Fenótipo da Doença Ocular Toxoplásmica..	54
5.2.2.4 Teste de Associação Baseado em Família (FBAT) usado para Detectar Associação entre os SNPs e a Toxoplasmose Ocular	56
5.2.3 Relação entre Genótipo e Tipo de Lesão Ocular Toxoplásmica	58
5.3 Estudo Imunológico	67
5.3.1 Perfil de Produção de Citocinas <i>in vitro</i> por PBMCs de Diferentes Grupos de Indivíduos	67
5.3.1.2 Dosagem das Citocinas TNF- α e IL-10 em Sobrenadantes de Cultura de PBMCs Coletados no Primeiro Dia após o Início da Cultura	68
5.3.1.3 Dosagem de IL-2 em Sobrenadantes de Cultura de PBMCs Coletados no Sexto Dia após o Início da Cultura	72
5.3.1.4 Dosagem de TNF- α em Sobrenadantes de Cultura de PBMCs	

Coletados no Sexto Dia após o Início da Cultura	74
5.3.1.5 Dosagem de IFN- γ em Sobrenadantes de Cultura de PBMCs Coletados no Sexto Dia após o Início da Cultura	76
5.3.1.6 Dosagem de IL-5 em Sobrenadantes de Cultura de PBMCs Coletados no Sexto Dia após o Início da Cultura	78
5.3.1.7 Dosagem de IL-4 em Sobrenadantes de Cultura de PBMCs Coletados no Sexto Dia após o Início da Cultura	80
5.3.1.8 Dosagem de IL-10 em Sobrenadantes de Cultura de PBMCs Coletados no Sexto Dia após o Início da Cultura	82
5.3.1.9 Dosagem de IL-13 em Sobrenadantes de Cultura de PBMCs Coletados no Sexto Dia após o Início da Cultura	84
5.3.2 Análise da Produção de Citocinas em Grupos de Altos (“high”) e Baixos (“low”) Produtores de Citocinas	86
5.3.2.1 Investigação do Perfil de Secreção de Citocinas em Grupo de Altos (“high”) Produtores de Citocinas Portadores ou Não de Doença Ocular	90
5.3.2.2 Relação entre Genótipo e Produção de Citocinas em Grupo de Altos (“high”) Produtores de Citocinas	92
5.3.3 Razão IFN- γ /IL-13 em Indivíduos Avaliados em 2001 e 2006	95
VI. DISCUSSÃO	96
VII. CONCLUSÃO	112
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
IX. ANEXOS	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Título	
1.	Classificação de lesões oculares decorrentes de infecção pelo <i>T. gondii</i> , segundo Oréfice e colaboradores	8
2.	Esquema representativo do ensaio de TaqMan utilizado para genotipar SNPs potencialmente associados com a toxoplasmose ocular	31
3.	Gráfico gerado de uma tabela de resultados obtida durante as análises de dados do ensaio de TaqMan	32
4.	Resumo esquemático do procedimento de SNaPshot obtido do website do ABI	33
5.	Fotografia fundoscópica da retina indicando as regiões: Equatorial (1), Macular (2), Pólo Posterior/Mácula (3) e Pólo Posterior (4)	43
6.	Índice de tamanho obtido a partir de valores atribuídos em diâmetro de disco (dd) e relacionados aos diferentes tipos de lesão ocular decorrente da infecção pelo <i>T. gondii</i>	45
7.	Índice de localização de regiões da retina, relacionado aos diferentes tipos de lesão ocular decorrente da infecção pelo <i>T. gondii</i>	47
8.	Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo GG, GC e CC para o marcador ABCR_rs1801574.....	59
9.	Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo CC, CT e TT para o marcador CFH_rs1061170	60
10.	Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo TT, TC e CC para o marcador COL2A1_rs1635544	61
11.	Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo AA, AG e GG para o marcador COL2A1_rs2276455	62
12.	Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos	

	da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo TT, TC e CC para o marcador COL2A1_rs2070739	63
13.	Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo AA, AG e GG para o marcador P2X7_rs1718119	64
14.	Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo AA, AG e GG para o marcador P2X7_rs1621388	65
15.	Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo CC, CT e TT para o marcador TLR9_rs352140	66
16.	Avaliação da produção de TNF- α em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no primeiro dia após o início da cultura	69
17.	Avaliação da produção de IL-10 em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no primeiro dia após o início da cultura	71
18.	Avaliação da produção de IL-2 em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no sexto dia após o início da cultura	73
19.	Avaliação da produção de TNF- α em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no sexto dia após o início da cultura	75
20.	Avaliação da produção de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no sexto dia após o início da cultura	77
21.	Avaliação da produção de IL-5 em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no sexto dia após o início da cultura	79
22.	Avaliação da produção de IL-4 em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no sexto dia após o início da cultura	81
23.	Avaliação da produção de IL-10 em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no sexto dia após o início da cultura	83
24.	Avaliação da produção de IL-13 em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no sexto dia após o início da cultura	85
25.	Avaliação do padrão de distribuição dos indivíduos em relação a produção de citocinas em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no sexto dia	

	após o início da cultura: IL-2, TNF- α , IL-5, IL-4 e IL-10.....	88
26.	Avaliação do padrão de distribuição dos indivíduos em relação a produção de citocinas em sobrenadantes de cultura de PBMCs coletados no sexto dia após o início da cultura: IL-13 e IFN- γ	89
27.	Perfil de produção de citocinas por PBMCs, estimuladas com STAg, de altos produtores de citocinas nos diferentes grupos de indivíduos: IFN- γ	91
28.	Perfil de produção de citocinas por PBMCs, estimuladas com STAg, de altos produtores de citocinas nos diferentes grupos de indivíduos: IL-13.....	92
29.	Determinação da média de razão IFN- γ /IL-13 produzida por PBMCs, estimuladas com STAg, de indivíduos portadores soropositivos e soronegativos para toxoplasmose, portadores de lesão ocular ou não, acompanhados por um período equivalente a cinco anos.....	95

ÍNDICE DE TABELAS

Nº	Título	
1.	População estudada no projeto toxoplasmose, compreendendo 255 indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes	24
2.	Casuística de indivíduos portadores de toxoplasmose ocular, analisados por meio de estudo genético, baseado em família, quanto ao polimorfismo em genes candidatos relacionados à susceptibilidade a manifestação ocular da toxoplasmose	25
3.	Informações sobre os SNPs genotipados na população de Campos dos Goytacazes	26
4.	Indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes participantes do	

	estudo imunológico para toxoplasmose	38
5.	Avaliação da frequência de tamanho em diâmetros discais de retinocoroidites toxoplásmicas tipo A, tipo B e tipo C	44
6.	Avaliação da frequência de localização topográfica de retinocoroidites toxoplásmicas tipo A, tipo B e tipo C na retina	46
7.	Frequências alélicas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e frequências dos alelos de menor frequência para cada marcador	49
8.	Simulação do cálculo do poder do TDT para um estudo de associação baseado em família, consistindo de famílias com um único indivíduo afetado e seus genitores, baseado sobre o método Knapp (1999)	51
9.	Análises TDT baseada em família de marcadores presentes em genes candidatos potencialmente envolvidos com a manifestação ocular da toxoplasmose na população brasileira	53
10.	Análise genética baseada em família usando o teste Caso-Pseudocontrole para detectar associação entre marcadores e manifestação ocular da toxoplasmose	55
11.	Teste de associação baseado em família (FBAT) para correlacionar polimorfismos em nucleotídeo único (SNP) nos genes candidatos com a toxoplasmose ocular	57
12.	Genótipos dos altos produtores de citocinas para os marcadores dos genes <i>ABCR</i> , <i>CFH</i> , <i>COL2A1</i> , <i>P2X7</i> e <i>TLR9</i>	94

RESUMO

Este estudo avaliou parâmetros da resposta imune específica (produção de citocinas) e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes candidatos, intimamente relacionados à doença ocular em amostras de sangue periférico de 303 indivíduos soronegativos e soropositivos para o *Toxoplasma gondii*, portadores ou não de toxoplasmose ocular. Os indivíduos portadores de toxoplasmose ocular tiveram suas cicatrizes classificadas como tipo A, tipo B e tipo C de acordo com o grau de destruição tecidual. A severidade da lesão ocular foi mostrada estar diretamente associada ao tamanho e localização da mesma. PBMC de indivíduos soropositivos para toxoplasmose, quando estimuladas *in vitro* com STAg, apresentaram aumento estatisticamente significativo para a produção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-10 e IL-13, em comparação com PBMC de indivíduos soronegativos. A análise do perfil da produção de IL-13 e IFN- γ evidenciou a existência de indivíduos que podem ser categorizados como baixos (“low”), altos (“high”) e muito altos (“very high”) produtores dessas citocinas. No que tange ao estudo genético foram avaliados ao todo 36 SNPs presentes em 11 genes candidatos (*ABCA4*, *CFH*, *TLR5*, *TLR9*, *TLR2*, *IL-13*,

IL-4, *FOXQ1*, *TLR4*, *COL2A1* e *P2X7*). Polimorfismos de nucleotídeo único presentes em 8 marcadores dos genes *P2X7* (rs1718119 e rs1621388), *TLR9* (rs352140), *ABCA4* (rs1801574), *COL2A1* (rs2070739, rs2276455 e rs1635544) e *CFH* (rs1061170) estavam associados à ocorrência de lesão retiniana toxoplásmica. Observamos ainda que indivíduos mais velhos tendem produzir níveis mais elevados de IFN- γ em comparação com indivíduos mais jovens. Esses dados corroboram com a análise da razão IFN- γ /IL-13 em grupo de indivíduos num intervalo de 5 anos, onde mostrou-se que em 2006, os indivíduos apresentaram níveis significativamente mais elevados da razão IFN- γ /IL-13 em comparação a 2001. Portanto, a continuidade do estudo de parâmetros imunogenéticos certamente elucidará aspectos relevantes referentes à susceptibilidade diferencial ao desenvolvimento de lesões oculares toxoplásmicas.

Palavras-chave: Citocinas; Resposta Imune; SNPs; *Toxoplasma gondii*; Retinocoroidite toxoplásmica;

ABSTRACT

In this study, we evaluated parameters of specific immune response (cytokines production) and polymorphisms in single nucleotide (SNPs), using a candidate gene approach, closely related to the toxoplasmic retinochoroiditis development in individuals residents in a highly endemic area for toxoplasmosis. In total, 303 seronegative or seropositive individuals to *T. gondii*, presenting with ocular disease or not, nucleated in families or not, were analyzed. Patients with ocular disease had their scars classified as type A, type B and type C according to the severity of retinal damages. The severity of the lesions were detected to be directly associated with the lesions size and localization. PBMC from seropositive individuals to *T. gondii*, when stimulated *in vitro* with STAg, presented significantly higher levels of all analyzed cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-10 and IL-13), except IL-2, compared with the cytokine production levels by seronegative PBMC. The profiles of IFN- γ and IL-13 production revealed groups of individuals categorized as being low, high and very high producers of these cytokines. Regarding the genetic study, 36 SNPs located in 11 candidate genes (*ABCA4*, *CFH*, *TLR5*, *TLR9*, *TLR2*, *IL-13*, *IL-4*, *FOXQ1*, *TLR4*, *COL2A1* e *P2X7*) were evaluated. The

family-based study detected the association between polymorphisms in single nucleotide and the toxoplasmic retinochoroidite manifestation in 8 markers located in the genes *P2X7* (rs1718119 e rs1621388), *TLR9* (rs352140), *ABCA4* (rs1801574), *COL2A1* (rs2070739, rs2276455 e rs1635544) e *CFH* (rs1061170). We observed that the oldest individuals have a tendency to produce increased levels of IFN- γ when compared with youngest individuals. This fact is corroborated by the IFN- γ /IL-13 ratio analyses in group of individuals assessed in 2001 and 2006. In 2006 the ratio IFN- γ /IL-13 was significantly higher than the same ratio in 2001. Thus, the continuity of this immunogenetic study will certainly contribute for a better understanding of the differential susceptibility observed in ocular toxoplasmosis.

Key-words: Cytokines; Immune Response; SNPs; *Toxoplasma gondii*; Toxoplasmic Retinochoroiditis;

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação de Polimerase em cadeia)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio de Imuno-adsorção ligado a enzima)
MAT	Modified Agglutination Test (Teste de Aglutinação Modificado)
TLR	Toll Like Receptors (Receptores Tipo-Toll)
NK	Natural Killer
LPS	Lipopolissacarídeo
RPE	Retinal Pigment Epithelium (Epitélio do Pigmento Retinal)
HLA	Human Leucocyte Antigen (Antígeno de Leucócito Humano)
ANFH	Avascular Necrosis Femoral Head (Necrose avascular na cabeça do fêmur)
STGD	Stargardt
AMD	Age-Related Macular Degeneration (Degeneração Macular Relacionada com a Idade)
CRD3	Cone-rod dystrophy 3 (distrofia "cone-rod" 3)
ATP	Adenosine Triphosphate (Adenosina Tri-fosfato)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa

CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
MDA	Multiple Displacement Amplification
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
TDT	Transmission Disequilibrium Test (Teste de Desequilíbrio de Ligação)
FBAT	Family-Based Association Test (Teste de Associação Baseado em Família)
DMEM	Dubelcco`s Modified Essencial Medium (Meio essencial modificado Dubelcco`s)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Meio de Cultura desenvolvido neste instituto)
CMBlast	Culture Medium for Blastogenesis (Meio de Cultura para Blastogênese)
STAg	Soluble <i>Toxoplasma</i> Antigen (Antígeno Solúvel de <i>Toxoplasma</i>)
SEB	Stafilococcal Enterotoxin B (Enterotoxina B de Stafilococcus)
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
CBA	Cytometric Beads Array
SN	Indivíduos soronegativos para toxoplasmose
SP	Indivíduos soropositivos para toxoplasmose
SL	Indivíduos soropositivos para toxoplasmose sem lesão ocular
CL	Indivíduos soropositivos para toxoplasmose portadores de lesão ocular
SNP	Single Nucleotide Polimorphism (Polimorfismo em Nucleotídeo Único)
LD	Linkage Disequilibrium (Desequilíbrio de Ligação)
NO	Nitric oxide (Óxido nítrico)

APOIO FINANCEIRO:

- CAPES (concessão de bolsa PDEE – Programa de Doutorado com Estágio no Exterior)
- CNPq
- FAPERJ

I. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário, intracelular obrigatório, cosmopolita, que infecta várias espécies de animais homeotérmicos, inclusive o homem. A infecção por esse importante patógeno oportunista é, geralmente, assintomática em hospedeiros imunocompetentes (Luder and Gross, 1998). Entretanto, é capaz de causar também infecção congênita disseminada no desenvolvimento de fetos (Desmont and Couvreur, 1974), severas complicações neurológicas em indivíduos imunocomprometidos (Luft *et al.*, 1993), e afecções oculares em indivíduos saudáveis (Roberts and McLeod, 1999). Estudos têm sido realizados no intuito de identificar fatores determinantes para o desenvolvimento da doença ocular. O melhor entendimento da epidemiologia da infecção pelo *T. gondii*, bem como o conhecimento de fatores do hospedeiro e do parasita que possam influenciar a forma de apresentação da doença, é importante para a elaboração de estratégias para a prevenção e gerenciamento da toxoplasmose ocular.

1.1 Breve Histórico

A história do *Toxoplasma gondii* começou em 1908, quando Nicolle e Manceaux observaram um parasita em células mononucleares do baço e fígado de um roedor do Norte da África, o gondi (*Ctenodactylus gondi*). Este organismo foi na ocasião intimamente relacionado à *Leishmania* e chamado de *Leishmania gondi* (Nicolle and Manceaux, 1908). No ano seguinte a esta descoberta, baseado em critérios morfológicos, eles concluíram que este parasita não pertencia ao gênero *Leishmania* e propuseram um novo nome, *Toxoplasma gondii* (do grego “toxon” significa arco) (Nicolle and Manceaux, 1909). Este organismo também foi chamado *Toxoplasma cuniculi*, porque ao mesmo tempo e independentemente, Splendore (1908) o encontrou em um coelho que havia morrido por paralisia no

Brasil. O organismo logo atraiu atenção como causador de doenças em animais. Em 1923, Janku, um oftalmologista de Praga, descreveu o primeiro caso reconhecido em humanos (revisado por Remington *et al.*, 2001). Ele encontrou cistos do parasita na retina de uma criança de 11 meses de idade que havia nascido com toxoplasmose congênita.

Em 1937, Wolf e Cowen, nos Estados Unidos, relataram um caso fatal de encefalite granulomatosa infantil que acreditaram ser causada por um encefalitozoa (Wolf and Cowen, 1937). Foi a partir destes dados que a toxoplasmose passou a ter impacto na medicina. Wolf, Cowen e colaboradores, então, apresentaram numerosos estudos e estabeleceram o *T. gondii* como um causador de doença humana transmitida congenitamente (revisado por Remington *et al.*, 2001).

A descoberta do *T. gondii* como causa de doença adquirida após o nascimento foi descrita posteriormente por Pinkerton e Weinman. Em 1940, eles descreveram uma doença fatal generalizada em um homem jovem que teve como causa a infecção por *T. gondii*. Em 1941, Pinkerton e Henderson forneceram uma descrição clínica de dois casos fatais de doença exantematosa febril aguda em adultos (Pinkerton and Henderson, 1941) e, no mesmo ano, Sabin descreveu casos de encefalite toxoplásmica em crianças (Sabin, 1941).

Em 1948, Sabin e Feldman desenvolveram um teste sorológico, o “dye test”, que permitiu numerosos investigadores estudarem os aspectos epidemiológicos e clínicos da toxoplasmose, para demonstrar que o *T. gondii* é a causa de uma infecção com alta prevalência e amplamente disseminada (maioria freqüentemente assintomática) em humanos (Sabin and Feldman, 1948). Muitos anos após a descoberta do parasita, o *T. gondii* foi colocado no grupo dos coccídios e seus hospedeiros definitivos foram descobertos como sendo os indivíduos pertencentes à família dos felídeos (Frenkel and Dubey, 1970; Ferguson *et al.*, 1974).

Na década de 90, o *T. gondii* emergiu como um parasita oportunista em humanos (Remington and Viloté, 1991), principalmente em pacientes imunocomprometidos, como aqueles com Aids (Acquired Immunodeficiency

Syndrome – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), por exemplo, nos quais a toxoplasmose se desenvolve severamente, podendo causar a morte (Brown and McLeod, 1994).

1.2 Vias de Transmissão do *Toxoplasma gondii*

A infecção pelo *T. gondii* pode ser adquirida por várias vias. A ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida, especialmente de porco e de carneiro, mas também de galinha, boi e outros animais infectados, constitui uma das vias de infecção. Os cistos permanecem viáveis durante semanas na geladeira, porém o congelamento abaixo de -15°C destrói o cisto em três dias (Jacobs *et al.*, 1960). Temperaturas acima de 66°C , para cozimento da carne, são também capazes de destruir os cistos (Garnhan and Laison, 1960), e acima de 170°C a destruição ocorre em cinco minutos (Jacobs *et al.*, 1960). A manipulação da carne crua também representa risco de infecção (Dubey, 1991).

T. gondii pode ser transmitido também através da ingestão de oocistos presentes no solo, caixas de areia, verduras mal lavadas, disseminadas mecanicamente por moscas, baratas, minhocas e outros animais (Revisado por Tenter *et al.*, 2000). No entanto, a principal fonte de contaminação ambiental pelo *T. gondii* tem sido por oocistos liberados juntamente com fezes de gatos ou de outros felídeos selvagens, que constituem hospedeiros definitivos para o *T. gondii* (Hutchison and Jackson, 1989). A infecção de humanos e outros animais suscetíveis ao *T. gondii* pode ainda se efetuar através do contato com solos contaminados, por exemplo, no exercício da jardinagem, ou mesmo pela pastagem do gado nestes ambientes, pois oocistos esporulados de *T. gondii* são muito resistentes às condições ambientais adversas (Boch, 1984). Os oocistos não esporulados perdem sua capacidade de esporular após o congelamento por um dia a -21°C , ou sete dias a -6°C , ou ainda sob aquecimento a 50°C por 10 min. O congelamento pode não ser suficiente para matar oocistos esporulados, e estes podem sobreviver por 28 dias após congelamento constante a -21°C (Frenkel and Dubey, 1973). Após a infecção primária com cistos teciduais ou oocistos de *T. gondii*, um único gato pode liberar mais do que 100 milhões de oocistos no ambiente (Dubey, 1996). Sobre condições ambientais favoráveis, no

que diz respeito à aeração, umidade e temperatura, os oocistos esporulam e se tornam infectivos dentro de 1 a 5 dias (Dubey, 1986). Dependendo da cepa de *T. gondii*, a ingestão de apenas 10 oocistos esporulados pode causar infecção em um hospedeiro intermediário, tal como o porco (Dubey *et al.*, 1996), mas é necessária a ingestão de 100 ou mais oocistos esporulados para resultar em infecção de felinos (Dubey, 1996).

A água contaminada também constitui uma importante fonte de infecção humana, tanto por seu consumo direto como pela sua utilização indireta no preparo de alimentos. Até recentemente, a contaminação de águas com oocistos eliminados nas fezes de gatos depositadas nas margens de rios e lagos, não era considerado um mecanismo de disseminação de grande relevância. Porém, inquéritos epidemiológicos realizados na cidade de Campos dos Goytacazes mostraram que 65,9%, de um total de 276 indivíduos, que relataram ingerir água de rio ou lagoa da região, apresentam sorologia positiva para toxoplasmose (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

Relato anterior indica que oocistos de *T. gondii* podem não somente sobreviver em água doce, mas também esporular e permanecer viáveis em água salgada por vários meses (Lindsay *et al.*, 2003).

Outra importante via de infecção por *T. gondii* é através de transmissão transplacentária, particularmente no caso da gestante adquirir a infecção durante a gravidez. Além disso, a inalação de oocistos suspensos no ar ou em perdigotos, como também a ingestão de ovos, leite e colostro contaminados por taquizoítas também constituem um risco de contaminação, porque apesar desses serem destruídos pelo suco gástrico, o risco de infecção é devido à possibilidade de penetração dos parasitas na mucosa oral e faríngea (McLeod and Remington, 1994; Kawazoe, 1995).

Há ainda outras formas de infecção por este parasita, tais como através de transfusão de sangue e células, transplante de órgãos, e acidentes em laboratórios devido à manipulação de animais infectados ou material contaminado (Oréfice and Bahia-Oliveira, 2005).

1.3 Diagnóstico da Infecção Toxoplásmica

A infecção pelo *T. gondii* pode ser diagnosticada indiretamente por meio de métodos sorológicos e diretamente pelo PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação de Polimerase em Cadeia), hibridização, isolamento, histologia e outros (Montoya and Liesenfield, 2004).

O diagnóstico sorológico é feito através da detecção de imunoglobulinas (IgG e IgM, predominantemente) produzidas contra o parasita, podendo tal análise ser realizada através de diferentes métodos, tais como “dye test” desenvolvido em 1948 por Sabin e Feldman, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio Enzimático de Imunoadsorção), MAT (Modified Agglutination Test - Teste de Aglutinação Modificado) e outros. Entretanto, a técnica de ELISA é a mais comumente utilizada, sendo, contudo, o “dye test” considerado o teste padrão ouro (gold standard) para toxoplasmose (Montoya and Liesenfield, 2004).

O diagnóstico direto se baseia na identificação de parasitas no sangue periférico, fluidos corporais (cérebro-espinhal, humor aquoso, humor vítreo) e urina. A utilização do PCR para fins diagnósticos tem revolucionado o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita por possibilitar o diagnóstico precoce da infecção (Hohfeld *et al.*, 1994; Montoya, 2002). Este método também auxilia no estabelecimento de diagnóstico em pacientes que apresentam lesões atípicas na retina e, no entanto, respondem ao tratamento específico para o *T.gondii*, ou ainda, no caso de pacientes imunocomprometidos (Montoya *et al.*, 1999; Fardeau, *et al.*, 2002).

1.4 A Toxoplasmose

O estudo da infecção de seres humanos pelo *T. gondii* tem suscitado grande interesse em pesquisadores do mundo inteiro ao longo do último século devido à alta prevalência sorológica em vários países, podendo atingir mais de 70% da população em determinadas áreas. Todavia a incidência da doença é bem menor (Oréfice and Bahia-Oliveira, 2005), sendo sintomática somente em 10-20% dos adultos infectados pelo *T. gondii* (Remington, 1974). Frequentemente, a infecção pelo *T.gondii* causa linfadenopatia cervical assintomática com nódulos

geralmente discretos, raramente medindo mais de 3 cm de diâmetro (McCabe *et al.*, 1987), acompanhada de febre e outros sintomas que se confundem com os sintomas de um resfriado comum. No entanto, manifestações clínicas da toxoplasmose podem decorrer de: (1) reativação da toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos; (2) toxoplasmose ocular; e (3) infecção primária durante a gravidez que eventualmente resulta em infecção congênita do feto (Luder and Gross, 1998).

A reativação da infecção pelo *T. gondii* é comum em indivíduos infectados congenitamente, em indivíduos que receberam terapia imunossupressora, tais como indivíduos transplantados, e pacientes portadores de HIV (Jackson and Hutchison, 1989). Fatores como predisposição genética, variação na virulência entre diferentes cepas do parasita, bem como estado imunológico do indivíduo podem exercer papel crucial na reativação da toxoplasmose (Bhopale, 2003).

A infecção pelo *T. gondii* pode causar quadros graves como a encefalite toxoplásmica, especialmente em hospedeiros imunossuprimidos, além de poder causar abortos espontâneos e infecção congênita se a contaminação da mãe ocorrer durante a gestação. Pode acontecer também da infecção congênita ser inicialmente subclínica, e se manifestar no indivíduo quando mais velho através de outras formas, como as manifestações oculares da toxoplasmose (Hughes, *et al.*, 1985).

Embora a toxoplasmose ocular tenha sido considerada por muito tempo como a reativação da infecção congênita, existe agora clara evidência de que a toxoplasmose adquirida também pode induzir lesões oculares (Montoya and Remington, 1996; Holland, 1999; Silveira *et al.*, 2001). A gravidade das conseqüências da transmissão do *T. gondii* para humanos e animais é o principal fator que responde pelo enorme interesse em se estudar a doença atualmente, visto que constitui um problema de saúde pública e uma ameaça a vários animais de importância econômica e veterinária (Alexander and Hunter, 1998).

1.5 A Toxoplasmose Ocular

A manifestação ocular da toxoplasmose ocorre, predominantemente, entre a segunda e a quarta década de vida, tanto na forma de toxoplasmose ocular primária como de toxoplasmose ocular recorrente (Ongkosuwito *et al.*, 1999). A manifestação primária da doença ocular se caracteriza pela apresentação de lesões isoladas na retina não sendo as mesmas provenientes de cicatriz, enquanto na toxoplasmose ocular recorrente, as lesões ativas na retina estão associadas com cicatrizes antigas inativas (Ongkosuwito *et al.*, 1999). Algumas evidências relacionadas à origem da reativação da lesão ocular toxoplásmica sugerem que a recorrência seja proveniente da presença de parasitas que permaneceram na cicatriz após um episódio prévio da doença (Holland, 1999), ou ainda que seja consequência da reativação de cistos teciduais viáveis localizados nas bordas das cicatrizes (Culbertson *et al.*, 1982; Newman *et al.*, 1982; Webb *et al.*, 1984). Entretanto, fatores específicos responsáveis pela recorrência da retinocoroidite toxoplásmica permanecem desconhecidos (O'Connor, 1983; Holland *et al.*, 1996;). Vários relatos têm proposto um número de fatores que podem contribuir para a reativação de cistos teciduais, dentre os quais podemos citar: mudanças durante o processo de senescência dos cistos teciduais, acarretando na liberação de parasitas ou antígenos (Rao and Font, 1977), trauma, alterações hormonais, e respostas imunes transitórias, celular e humoral (Holland, 2003).

A toxoplasmose ocular ativa consiste de focos bem definidos de necrose coagulativa na retina, podendo haver inflamação difusa na retina e coróide (Revisado em Roberts e McLeod, 1999). A retinocoroidite toxoplásmica foi considerada ser a causa reconhecível mais comum de uveítes posteriores em hospedeiros imunocompetentes, representando cerca de 55% de todos os casos do mundo (Newman *et al.*, 1982; Henderly *et al.*, 1987), enquanto no Brasil esse percentual encontra-se em mais de 80% dos casos (Oréfice e Bahia-Oliveira, 2005).

Dados recentes mostram alta prevalência da toxoplasmose adquirida e congênita na cidade de Campos dos Goytacazes, sendo reconhecida como uma

das mais elevadas já descrita. A prevalência de doença ocular está situada na faixa de 6 a 14% para a população soropositiva (Bahia-Oliveira *et al.*, 2001).

1.5.1 A Classificação das Lesões Oculares Decorrentes de Infecção pelo *Toxoplasma gondii*

As cicatrizes decorrentes de retinocoroidites toxoplásmicas carecem de classificações universais que contemplem a diversidade das apresentações clínicas descritas na literatura médica. Observa-se, no entanto, que esforços vêm sendo feitos por parte de grupos de pesquisas para classificar tais cicatrizes (Glasner *et al.*, 1992; Oréfice and Bahia-Oliveira, 2005). Contudo, estudos epidemiológicos, em geral, têm adotado critérios subjetivos para classificação de lesões retinianas, categorizando-as, freqüentemente, em termos da probabilidade de serem causadas pela manifestação ocular da toxoplasmose (Glasner *et al.*, 1992).

Nesse estudo, consideraremos o sistema de classificação proposto por Oréfice e colaboradores (Oréfice and Bahia-Oliveira, 2005) que reflete o grau de destruição do tecido retiniano. A importância dessa classificação está no fato de indivíduos portadores de lesões retinianas, com diferente grau de destruição retino-coroidal, terem apresentado diferenças significativas quanto a diversos parâmetros imunológicos (Azevedo-Silva, 2001).

Portanto, cicatrizes consideradas como de maior, mediano e menor grau de destruição do tecido retiniano, serão classificadas como tipo A, tipo B e tipo C, respectivamente, correspondendo, respectivamente, às lesões tipo I, II e III conforme proposto por Oréfice and Bahia Oliveira 2005.

As cicatrizes do tipo A apresentam como característica uma área central clara e um halo hiperpigmentado (**Figura 1**). A parte clara representa a esclera, parte esta constituída praticamente de colágeno, a qual é a camada mais externa do globo ocular. Então, nesse tipo de lesão, observamos que o processo inflamatório acarretou na destruição de mais de uma camada do tecido retiniano, tendo sido destruída também a coróide, o que permite a visualização da esclera. O

halo pigmentado pode ser explicado devido ao fato da última camada da retina, antes de chegar à coróide, ser constituída pelo epitélio pigmentar da retina, e este, uma vez o tecido retiniano tenha sofrido algum tipo de agressão, se prolifera rapidamente, mobilizando-se para recompor o tecido danificado, o que pode causar hiperpigmentação.

As cicatrizes do tipo B são classificadas como cicatrizes derivadas de processos inflamatórios que acarretaram em destruição mais moderada do tecido em relação à lesão do tipo A (**Figura 1**). Essas cicatrizes possuem como característica um centro hiperpigmentado e uma borda clara, diferente da lesão do tipo A. Nesse caso, a reação inflamatória é provavelmente de menor intensidade e o reparo tecidual parece ser mais eficaz que na lesão tipo A.

Por outro lado, as cicatrizes do tipo C, cuja etiologia deixa margens de dúvida de ser ou não causada pela infecção toxoplásmica, apresentam-se hiperpigmentadas e/ou apigmentadas (**Figura 1**), sendo os danos causados ao tecido menos severos que os causados pelas lesões A e B.

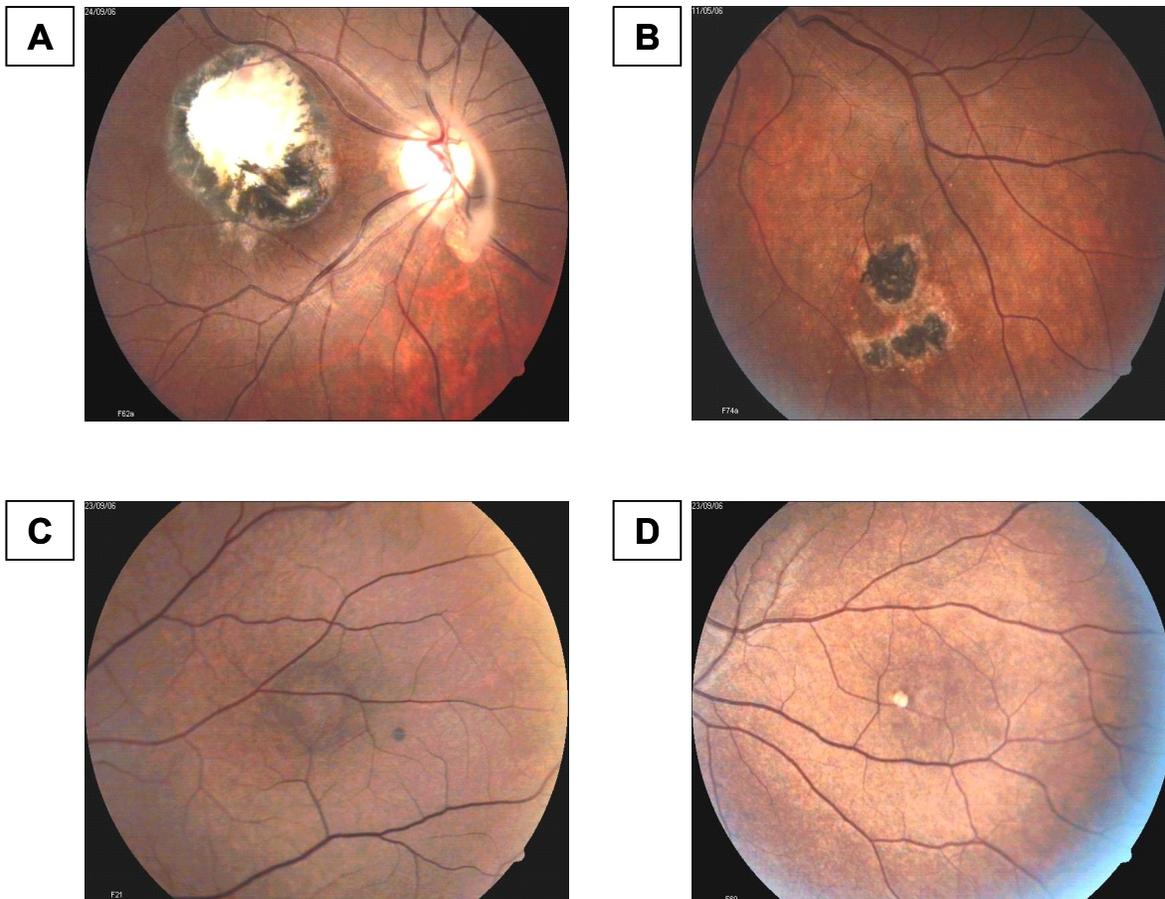


Figura 1: Classificação de lesões oculares decorrentes de infecção pelo *T. gondii*, segundo Oréfice e colaboradores (Oréfice and Bahia-Oliveira, 2005). **A** - Cicatrizes tipo A, caracterizadas como atróficas com halo pigmentado; **B** - cicatrizes tipo B, caracterizadas como pigmentadas com halo atrófico; **C e D** - cicatrizes do tipo C caracterizadas por cicatrizes pigmentadas e/ou atróficas.

1.6 A Imunidade do Hospedeiro ao Parasita *Toxoplasma gondii*

O hospedeiro infectado pelo *T. gondii* desenvolve forte e persistente resposta imune sistêmica T helper(Th) -1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo, dentre outras, interleucina (IL) -12, interferon (IFN) γ , e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). A ação combinada dessas citocinas e outros mecanismos imunológicos protege o hospedeiro contra a rápida proliferação de taquizoítas e, subseqüente alterações patológicas (Montoya and Liesenfeld, 2004).

Os receptores do tipo Toll (Toll-Like Receptors - TLRs) exercem papel crítico na imunidade inata de mamíferos (Medzhitov, 2001), pois ativam uma cascata de transdução de sinais que induzem a expressão de genes da resposta imune seguindo o reconhecimento de seus respectivos ligantes. Os membros da família TLR, bem como IL-1R, possuem como principal ligante, a proteína adaptadora citoplasmática MyD88, a qual foi observada estar intimamente associada à alta susceptibilidade à infecção pelo *T. gondii* em camundongos apresentando deficiência nessa proteína (Scanga *et al.*, 2002).

O reconhecimento de *T. gondii* por membros da família TLR é crucial para evitar a invasão do parasita. Dados da literatura mostraram que camundongos deficientes para TLR-2 apresentaram elevada mortalidade e carga parasitária, bem como deficiência na liberação de óxido nítrico e óxido nítrico sintetase comprovando a função vital desse membro da família TLR na resistência ao *T. gondii* (Mun *et al.*, 2003).

Estudos experimentais em murinos mostraram que TLR11 apresenta importante função na resposta imune desses animais contra o *T. gondii*, no entanto, em humanos esse membro TLR parece não ser funcional devido à presença de um "stop codon" no gene (Zhang *et al.*, 2004). Portanto, não está

claro se TLR11 é de importância fundamental para outras espécies de mamíferos, visto que humanos apresentam um padrão alternativo de receptores da resposta imune inata ao *T. gondii* (Yarovinsky *et al.*, 2005).

A resposta imune inata ao *T. gondii* é capaz de disparar a ativação de macrófagos e células “natural killer” (NK) (Hauser *et al.*, 1983), e esta ativação é pretendida para limitar a proliferação do parasita por meio desta ação citotóxica direta e indireta, e direcionar resposta imune específica para antígenos de *T. gondii*.

Os mecanismos citotóxicos apresentados pelas células NK são similares aos mecanismos citotóxicos apresentados por linfócitos T. A citotoxicidade pode ser resultado da secreção de grânulos de perforina e granzimas, que são moléculas designadas para auxiliar na eliminação de células-alvo por meio de apoptose. A granzima B, por exemplo, é uma serino-protease que, como caspases (cisteíno-proteases que clivam proteínas imediatamente após resíduos de ácido aspártico), cliva proteínas após estes resíduos aspartil e pode, portanto, diretamente ativar a cascata de caspases. Em geral, a indução de morte por apoptose depende da ativação de caspases. No entanto, as células NK podem ainda se ligar diretamente a receptores na superfície das células alvo e induzir apoptose (Lieberman, 2003). Outra função efetora das células NK é a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como por exemplo, IFN- γ , TNF- α , XCL1/LT- α (Linfotoxina- α), GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor – Fator Estimulador de Colônia-Granulócitos e Macrófagos) e CCL3/MIP-1- α (Trinchieri, 1989; Robertson, 2002). IFN- γ secretado por células NK, por sua vez, pode ativar macrófagos para destruir microorganismos fagocitados.

Em camundongos, a ativação de macrófagos por IFN- γ na presença de sinais co-estimuladores, tais como LPS ou TNF- α , estimulam a atividade citotóxica dos macrófagos contra o parasita (Sibley *et al.*, 1993). A estimulação de macrófagos pelo *T. gondii* induz a produção de TNF- α e IL-12, os quais agem sinergisticamente estimulando células NK a secretarem IFN- γ , que por sua vez intensifica a ativação de macrófagos infectados (Denkers and Sher, 1997) e ativam macrófagos não-infectados, estimulando o seu metabolismo oxidativo. O

papel de células NK tem sido explorado *in vivo* em camundongos SCID, os quais são portadores de imunodeficiência severa. Neste modelo, a resistência ao *T. gondii* está relacionada à produção de IFN- γ , o qual na ausência de células T CD4⁺ e células T CD8⁺ originam-se de células NK (Sher *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1994). Esta atividade de NK é dependente de fatores solúveis secretados por macrófagos ativadas, tais como IL-2 e TNF- α . A ativação de células NK que ocorre no início da infecção não é duradoura, e apresenta uma queda logo após o pico de ativação, indicando deste modo, que algum mecanismo que antagoniza a resposta destas células já se estabelece nesta fase. Este antagonismo é mediado, *in vitro*, pela participação de citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β (Denkers and Sher, 1997). As citocinas TGF- β e IL-10 agem sobre células NK por meio de vias diferentes. A primeira inibe a produção de IFN- γ pelas células NK; enquanto a segunda age sobre macrófagos impedindo-os de produzir TNF- α , IL-1 e IL-12, culminando na inibição da resposta pelas células NK (Alexander and Hunter, 1998).

Embora células NK tenham sido, por muito tempo, relacionadas somente ao padrão Th1 de resposta imune, devido sua capacidade de secretar IFN- γ , nos últimos anos células NK de murinos e humanos mostraram-se também capazes de secretar IL-13, uma citocina intimamente relacionada à resposta Th2 (Hoshino *et al.*, 1999; Chakir *et al.*, 2001).

A avaliação da expressão de mRNA de IFN- γ e IL-13 por células NK murinas (Gao *et al.*, 2006), confirmou achados prévios que mostraram que o uso combinado das citocinas IL-12 e IL-18 estimula a expressão simultânea de níveis significativos de mRNA de ambas citocinas (Chakir *et al.*, 2001).

Uma função efetora de IL-13, diferente de citocinas Th1, as quais estimulam a produção de óxido nítrico, ocorre por meio do estímulo da atividade de arginase em macrófagos, por uma via de ativação denominada alternativa. A enzima Arginase usa L-arginina como um substrato para fazer L-ornitina, que por sua vez é convertida à prolina e poliaminas. A prolina é um aminoácido essencial envolvido na produção de colágeno e, portanto, é necessário para o desenvolvimento de fibrose (Wynn, 2003).

As citocinas IL-13 e IL-10 induzem a secreção e ativação de TGF- β , o qual pode evitar a indução da indolamina, enzima degradante de triptofano, que tem sido mostrada prevenir a multiplicação do *T. gondii*. A produção dessa enzima é estimulada por IFN- γ (Mackenzie *et al.*, 1999).

IL-13 compartilha muitas propriedades com IL-4, mas também têm muitas funções distintas (Gao *et al.*, 2006), podendo a combinação de ambos ligantes e seus receptores específicos, ditar a relevância de IL-13 e/ou IL-4 no contexto de resposta imune protetora contra determinados agentes patogênicos (Wynn, 2003).

Entre a população de células T, células T CD8⁺ são consideradas as maiores células efetoras responsáveis pela proteção contra o *T. gondii* atuando em parceria com células T CD4⁺ (Parker *et al.*, 1991). Células T CD8⁺ tanto de camundongos como de humanos secretam IFN- γ e exibem *in vitro* citotoxicidade dirigida às células infectadas (Denkers *et al.*, 1996). Células Th1 CD4⁺ produzem IFN- γ e IL-2, sendo IL-2 responsável pela ativação de células NK e células T, as quais são citotóxicas para as células-alvo infectadas com o *T. gondii*. Células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 que estão associadas à baixa regulação da resposta imune mediada por célula. Posteriormente, estes subgrupos de células T são capazes de regular cruzadamente as atividades uma das outras. Por exemplo, IL-10 inibe a produção de IFN- γ , e este inibe a proliferação de células Th2.

Os linfócitos T $\gamma\delta$ também participam da imunidade específica contra o *T. gondii* (De Paoli *et al.*, 1992). Essas células desenvolvem ação citotóxica contra as células infectadas com o parasita, através de uma via independente de MHC, e produzem IFN- γ , IL-12 e TNF- α , sugerindo que esta sub-população possa ser importante desde o início da resposta imune protetora contra o *T. gondii* (Subauste *et al.*, 1995).

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

1.6.1 A Resposta Imune Intraocular

Embora a retina seja considerada o sítio primário de infecção pelo *T. gondii*, o olho é um ambiente imunologicamente privilegiado, onde inúmeros fatores contribuem para esse privilégio, incluindo barreiras anatômicas (Barragan and Sibley, 2003). A resposta imune intraocular é suprimida o que diminui chance de destruição tecidual e, nesse sentido, tal resposta tende ser diferenciada da observada sistemicamente (Vincent *et al.*, 2001). Em circunstâncias normais, células presentes em várias estruturas do olho como por exemplo, córnea, íris, corpos ciliares, retina, bem como células T e macrófagos expressam constitutivamente ligante de Fas (Fas-L), o qual pode promover a deleção de células T e células NK no olho, por as mesmas expressarem Fas quando ativadas, induzindo morte por apoptose. Além disso, foi mostrado que o fluido intraocular contém citocinas como TGF- β e outros mediadores que têm propriedades imunossupressoras (Vincent *et al.*, 2001).

TGF- β induz a baixa regulação de moléculas de MHC classe I e, portanto, respostas imunes citotóxicas intraoculares são mediadas, preferencialmente, por células NK em detrimento de células T CD8⁺ citotóxicas. Expressão elevada de TGF- β por células da retina, vítreo e epitélio do pigmento retinal (RPE) foi intimamente relacionada à fibrose retinal e neovascularização coroidal (O'Connor *et al.*, 1983). Por outro lado, níveis menores de TGF- β foram encontrados em fluidos oculares de indivíduos portadores de uveítes (de Boar *et al.*, 1994).

Nagineeni e colaboradores (Nagineeni *et al.*, 2002), através de cultura de células RPE humanas, mostraram que o *T. gondii* é capaz de estimular e alterar a forma ativa do TGF- β , enquanto a administração de TGF- β favorece a replicação do parasita.

O *T. gondii* pode promover a produção de fatores que anulam o privilégio imune, como o IFN- γ , que desenvolve papel crucial na resistência contra a infecção, é um antagonista potente de TGF- β , e pode hiper-regular a expressão de moléculas de MHC de classe II em células específicas do sítio (Revisado em

Roberts e McLeod, 1999). Um estudo, realizado com camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa de *T. gondii* ME49, mostrou que o tratamento com anticorpos neutralizantes para IFN- γ e TNF- α , está associado ao aumento da intensidade das lesões oculares, caracterizado pela necrose da retina e inflamação acentuada na retina, humor vítreo e na coróide. A piora das lesões oculares foi associada ao aumento de macrófagos e linfócitos T nos sítios de infecção e a presença de grandes quantidades de taquizoítas (Gazzinelli *et al.*, 1994).

Células T CD4⁺ parecem ser requeridas para o desenvolvimento da patogênese ocular no contexto da toxoplasmose, devido ao fato de que os olhos de camundongos deficientes nessas células não terem apresentado sinal de necrose ou inflamação aguda, após infecção primária ou desafio com formas taquizoítas do *T. gondii* (Lu *et al.*, 2004).

A injeção intraocular de IL-13 em ratos pode inibir a inflamação ocular decorrente de uveíte induzida por endotoxina (Lemaitre *et al.*, 2001). A indução de mRNA de IL-13 em células NK, por estímulo de células B, pode adir aos estudos sobre o efeito de células NK na geração de resposta tipo Th2.

Estudos, previamente realizados por nosso grupo, mostraram que manifestações clínicas da doença ocular toxoplásmica, encontram-se associadas à apresentação de parâmetros imunológicos periféricos diferenciados. Esses parâmetros definem perfis diferentes de resposta imune de grupos de indivíduos soropositivos para toxoplasmose sem acometimento visual ou, grupos de indivíduos portadores de lesão ocular toxoplásmica com diferentes apresentações. Por exemplo, indivíduos portadores de lesão tipo I apresentaram baixos níveis de células T CD4⁺ e T CD8⁺ circulantes, enquanto indivíduos apresentando lesões oculares tipo III, consideradas menos severa em relação ao tipo I, mostraram elevados níveis circulantes de células T $\gamma\delta$, bem como de IFN- γ e IL-13. Indivíduos, sem acometimento visual, apresentaram elevados percentuais de células NK, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ no sangue periférico (Azevedo-Silva, 2001).

Portanto, a resposta imunológica desenvolvida contra o *T. gondii* no olho e na periferia, é bastante complexa, devido aos vários mecanismos requeridos para a contenção do número de parasitas poderem também, contrariamente, influenciar no privilégio imune e causar danos teciduais (Lyons *et al.*, 2001).

1.7 Genética e Susceptibilidade a Infecções Parasitárias

Estudos em genética humana e susceptibilidade a infecções parasitárias começaram com observações de alta prevalência de alelos mutados para o gene β da globina em áreas de alta endemicidade para malária (Allison, 1969), levando à hipótese de que estes alelos eram protetores contra a malária severa. Estratégias semelhantes foram usadas para demonstrar que determinados haplotipos de HLA (*Human Leukocyte Antigen*) e alguns alelos de TNF- α também modificam a susceptibilidade à malária (revisado em Dessein, *et al.*, 2001).

Estudos genéticos têm fornecido esclarecimentos importantes sobre susceptibilidade a doenças infecciosas, visto que, uma variedade de fenótipos clínicos associados a doenças infecciosas pode estar intimamente relacionada ao genótipo do hospedeiro e, dessa forma, contribuir para a severidade de doenças. Pesquisas populacionais também contribuem para a visão de que doenças infecciosas podem influenciar seletivamente no processo evolutivo e, por conseguinte, na estrutura genética populacional (Blackwell, 2001).

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 genéticas (Blackwell, 2001). Entretanto, muitos outros fatores também estão envolvidos na determinação da susceptibilidade, tais como, estado de saúde prévio e imunidade adquirida (Kwiatkowski, 2000).

Uma variedade de parasitas causa infecções crônicas que permanecem por muito tempo em seus hospedeiros humanos sem sintomas clínicos. Em alguns indivíduos, no entanto, os mesmos parasitas podem causar doença severa. Por isso, muitos estudos têm tentado identificar os fatores que causam o desenvolvimento da doença em apenas uma fração da população exposta aos parasitas. Muita atenção tem sido dada ao ambiente, porque a transmissão do parasita depende

fundamentalmente de fatores ambientais, incluindo a densidade e distribuição de vetores e virulência do parasita.

A dificuldade em determinar o componente genético envolvido em doenças complexas encontra-se no fato dessas doenças serem influenciadas por inúmeros fatores não somente de caráter ambiental, mas também social, nutricional, ou ainda, por interação de vários genes, os quais diferem em magnitude em relação à contribuição deles na determinação do fenótipo (Hanchard, 2005).

Os protozoários parasitas, devido ao seu grande genoma, têm desenvolvido mecanismos sofisticados, como a variação antigênica, para evadir do combate do sistema imune do hospedeiro. A plasticidade do genoma do parasita é tão grande que em alguns casos pode estar relacionado à apresentação de diferentes formas clínicas e subclínicas da infecção devido à existência de clones de virulência/patogenicidade diferentes na população parasitária.

Pesquisas desenvolvidas no campo da genética médica tem apresentado evidências de associação entre a manifestação de doenças como fibrose cística e hemofilia e a ocorrência de polimorfismo em um único nucleotídeo (SNP – single nucleotide polymorphism), sendo tal polimorfismo suficiente para conduzir a apresentação da doença (Hanchard, 2005).

A descoberta dos genes responsáveis por esse tipo de desordem é geralmente alcançada quando se estudam famílias de indivíduos afetados e se observa como determinados marcadores presentes no genoma são transmitidos dentro de núcleos familiares. Este tipo de estudo se baseia na premissa que marcadores associados a mutações intimamente relacionadas com a manifestação de doenças serão transmitidos a membros da família de indivíduos afetados mais freqüentemente que por ocorrência de novas mutações (Hanchard, 2005).

Nos últimos anos, vários relatos têm sido feitos sobre polimorfismos em genes de citocinas que parecem estar associados com níveis alterados de expressão desses fatores solúveis (Vandenbroeck and Goris, 2003). As citocinas podem positivamente ou negativamente modular a divisão, crescimento, diferenciação, migração e morte celular, bem como a produção de outras citocinas e diversos produtos celulares. Uma rede de citocinas funcional é um elemento central

na homeostase da resposta imune e sua alteração pode conduzir ao desenvolvimento de uma resposta imune anormal (Henaó *et al.*, 2006).

Recentemente, um trabalho sobre polimorfismo em genes de citocinas desenvolvido com pacientes colombianos apresentando diferentes manifestações clínicas da tuberculose, mostrou que polimorfismos em nucleotídeos únicos presentes em genes que codificam IL-10 e IFN- γ , estavam associados à tuberculose pleural em indivíduos que apresentavam baixo perfil e alto perfil de produção dessas citocinas, respectivamente (Henaó *et al.*, 2006).

Outro relato de estudo comparando o polimorfismo de genes de citocinas com susceptibilidade à perda recorrente de gravidez realizado com mulheres iranianas, mostrou que polimorfismo no gene que codifica IL-10 pode atuar como um fator de predisposição a perda recorrente de gravidez (Kamali-Sarvestani *et al.*, 2005).

Estudos genéticos de doenças infecciosas são difíceis de serem realizados, devido sua natureza multifatorial. Entretanto, uma das indicações para tais estudos é a definição do papel de genes específicos no aparecimento de diferentes formas clínicas da doença (Revisado por Hill, 1998). A análise de citocinas, produzidas *in vitro* por PBMC de pacientes apresentando diferentes formas clínicas de doenças multifatoriais, tem-se mostrado vinculada à apresentação de polimorfismos nos genes que codificam para tais citocinas (Pravica, 1999; Hoffmann *et al.*, 2001). Portanto, o estudo de polimorfismos em genes de citocinas pode ser crucial para o melhor entendimento da patogênese e expressão clínica de várias doenças multifatoriais.

Alguns genes também têm sido estudados no contexto da toxoplasmose ao longo dos últimos anos. Análise por genes candidatos de bebês que desenvolveram sinais clínicos quando infectados pelo *T. gondii* no útero materno mostrou que os genes *ABCR*, *COL2A1*, *FOXQ1* e *P2X7*, *TLRs*, bem como *IL-13* e *IL-4*, estão associados com toxoplasmose congênita em estudos realizados com indivíduos da Europa e EUA (Blackwell - comunicação pessoal). Portanto, a avaliação desses genes quanto à contribuição para manifestações oculares da toxoplasmose faz-se pertinente.

ABCA4 ou *ABCR* é um membro da família de transportadores ABC, que codifica uma proteína transportadora localizada na retina, e tem sido amplamente relacionado à apresentação de doenças genéticas oculares (Allikments *et al.*, 1997a; Allikments *et al.*, 1997b). Evidências sugerem que *ABCA4* pode agir como uma enzima dependente de ATP (adenosina tri-fosfato) que transloca N-retinylidene-phosphatidylethanolamine (-PE) do lúmen para o lado citoplasmático da membrana do disco do fotorreceptor do cone. Esta ação promove a reciclagem de substâncias retinóides tóxicas, chamadas “*all-trans*”, liberadas via ciclo retinóide. Além disso, tem sido sugerido que a atividade comprometida do transportador *ABCA4* pode levar ao acúmulo desses derivados retinóides tóxicos em cones, o que resulta em apoptose das células do epitélio retinal e, até mesmo, degeneração dos fotorreceptores (Sun *et al.*, 1999; Mata *et al.*, 2000).

Atualmente, mais de 400 variações na seqüência do gene que codifica *ABCA4* têm sido documentadas e ligadas a doenças retiniais degenerativas, sendo as mais bem estudadas a doença de “Stargardt” (STGD), distrofia “cone-rod” tipo 3 (CRD3), retinose pigmentar tipo 19 (RP19) e degeneração macular relacionada à idade (AMD) (Kaminski *et al.*, 2006).

Análises anteriores de mutações *ABCA4* em indivíduos com STGD, CRD3, RP19 e AMD, sugeriram um modelo no qual mutações *ABCA4* podem causar um espectro de doença retinal com o fenótipo determinado pelo nível de atividade da proteína *ABCA4* residual (Rozet *et al.*, 1998; Bernstein *et al.*, 2002). Por exemplo, a mutação “frameshift” 5917delG em homozigotos, está associada ao fenótipo STGD relativamente severo e a mutação truncada Y362X e R1300X, respectivamente, estão associadas com sintomas clínicos mais brandos (Rivera *et al.*, 2000).

O gene *COL2A1* é responsável pela produção de cadeia alfa 1 do colágeno tipo II, o qual fornece estrutura e resistência ao tecido conectivo, sendo encontrado em cartilagens, no corpo vítreo, porção central do disco entre a vértebra e a espinha, dentre outros locais. Mutações no gene *COL2A1* podem resultar em uma condição denominada descolamento de retina regmatogênico dominante autossomal, que se caracteriza pela separação do tecido retiniano da coróide, levando a dificuldades de visão e, algumas vezes, cegueira (Go *et al.*, 2003).

Necrose avascular na cabeça do fêmur (ANFH) causa problemas que freqüentemente requerem intervenções cirúrgicas. Embora seja esporádica a ocorrência dessa doença, um estudo recente identificou três famílias nas quais havia herança dominante autossomal da doença e mapearam a região cromossomal na posição 12p13 do gene. Por abordagem de genes candidatos, as regiões promotoras e exônicas do gene que codificam colágeno tipo II foram seqüenciadas. Observou-se que todos os pacientes estudados que apresentavam ANFH carregavam mutações no gene *COL2A1* (Liu *et al.*, 2005).

Os genes membros da família *Fox* são fatores de transcrição que exercem papéis relevantes no estágio embrionário, desenvolvimento, metabolismo, câncer e no processo de senescência (Choi *et al.*, 2006). Recentemente, vários genes pertencentes à família *Fox* têm sido mostrados serem cruciais no desenvolvimento de linfócitos e funções efetoras, incluindo *Foxp3* no desenvolvimento de células T reguladoras, *Foxj1* e *Foxo3a* na regulação da tolerância de células TCD4⁺ e *Foxn1* no desenvolvimento tímico (Jonsson and Peng, 2005). Nesse cenário, observamos que esses genes atuam como mecanismos de imunoregulação em várias linhagens de células do sistema imune, e polimorfismos em genes que codificam tais fatores podem induzir desregulação de células e, dessa forma, contribuir para a patogênese de várias desordens imunológicas (Jonsson and Peng, 2005).

Retinóides, um grupo de elementos naturais e/ou sintéticos análogos à vitamina A, exercem efeitos profundos em vários processos biológicos, tais como, no desenvolvimento embriogênico de vertebrados (Ross *et al.*, 2000), crescimento e diferenciação celular (Gudas *et al.*, 1994). A insuficiência de vitamina A durante a gravidez resulta em morte do feto, assim como em má formação congênita, afetando olhos e tecidos oculares, miocárdio e sistemas circulatório e urogenital (Ross *et al.*, 2000).

Os efeitos biológicos dos retinóides são primariamente mediados por duas classes de receptores retinóides: receptores de ácido retinóico (RARs) e receptores X retinóides (RXRs). RARs podem regular especificamente vários genes que codificam fatores de transcrição, moléculas de transdução de sinal para a superfície celular e enzimas metabólicas, incluindo *FOXQ1* (Zhuang *et al.*, 2003).

Basicamente todos os tipos celulares expressam receptores na membrana plasmática para nucleotídeos denominados receptores P2. Atualmente, os membros dessa família têm sido clonados e classificados em duas subfamílias: P2Y e P2X. Os receptores P2X são canais cátions-seletivos nos quais a ativação sustentada por ATP extracelular causa a formação de um poro reversível na membrana plasmática, permeável a solutos hidrofílicos de massa molecular acima de 900 Da (Di Virgilio, 1995).

Efeitos de cascata intracelular são observados após ativação de *P2X7* incluindo a estimulação de fosfolipase D e apoptose. Fosfolipase D está envolvida na fusão fagossoma-lisossoma e, conseqüentemente, na morte de organismos intracelulares em macrófagos. A apoptose é importante no controle de infecções intracelulares e a ativação de *P2X7* por ATP extracelular é um importante mecanismo no controle de infecções por *Mycobacteria* e *Toxoplasma gondii* (Saunders *et al.*, 2003).

A ligação de ATP a receptores *P2X7* expressos em macrófagos humanos infectados com *Mycobacteria* induz morte celular e subseqüente perda de viabilidade intracelular de bactérias. Acentuada heterogeneidade foi observada em células de doadores quanto ao padrão de resposta induzida por ATP, o que sugere que este mecanismo anti-micobactéria possa ser geneticamente regulado. Para avaliar a hipótese acima, cinco polimorfismos em nucleotídeo único, previamente identificados na região promotora do gene *P2X7*, foram investigadas para associações com tuberculose clínica em indivíduos Gambienses. Associações significantes contra tuberculose foram encontradas em um polimorfismo em nucleotídeo único na posição -762 do promotor de *P2X7*. Tal associação confirma o papel importante de *P2X7* na regulação da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e outros patógenos intracelulares (Li *et al.*, 2002).

TLRs são receptores críticos na defesa do hospedeiro contra infecções microbiais e, portanto, alterações na estruturas do gene que codifica tais moléculas têm sido, freqüentemente, associadas com manifestações clínicas e suscetibilidade a várias doenças infecciosas (Lasker and Nair, 2006). Um exemplo recente mostrou que determinado genótipo, contendo repetição GT causada por

polimorfismo no íntron II do gene que codifica TLR2, parece conferir suscetibilidade ao desenvolvimento de artrite reumatóide em indivíduos Koreanos (Lee *et al.*, 2006).

Nesse cenário, a natureza multifatorial da doença justifica a proposta deste estudo no empenho de esforços conjuntos na investigação associativa entre fatores imunológicos e genéticos potencialmente envolvidos na manifestação da doença ocular causada pela infecção por *T. gondii*.

II. JUSTIFICATIVA

A investigação de parâmetros moleculares a partir de levantamentos epidemiológicos é importante tanto por fornecer sustentação no contexto da doença, como por ampliar sua dimensão de importância enquanto modelo para a pesquisa básica. O *Toxoplasma gondii* ocupa o segundo lugar no *ranking* de publicações dos modelos de protozoários causadores de doenças em seres humanos, estando à sua frente apenas o *Plasmodium* (Tenter *et al.*, 2000). Entretanto, no Brasil, estudos envolvendo o parasita *T. gondii* pouco têm explorado o potencial deste como modelo de estudo em projetos de pesquisas na área de imunogenética e epidemiologia molecular, o que é pertinente considerando-se a importância epidemiológica da toxoplasmose.

A endemicidade da toxoplasmose em Campos dos Goytacazes-RJ é alta (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003) atingindo 57,2% de uma amostragem populacional de 1436 indivíduos. Na população de baixo poder aquisitivo, que recebe pouca atenção médica, o nível de prevalência atinge 84,8%. Estes valores percentuais vêm favorecer estudos acerca do perfil de resposta imune de indivíduos expostos a fatores de risco para infecção pelo parasita, no contexto das manifestações oculares da doença. Esses estudos evoluíram para que se procedesse à investigação concomitante de genes candidatos, envolvidos na resposta imune contra o *T. gondii* ou diretamente relacionados ao ambiente ocular, na população de Campos dos Goytacazes.

Infecções parasitárias geram basicamente dois tipos de resposta mediada por linfócitos T CD4+ (helper). A resposta do tipo Th1 (pró-inflamatória) e Th2 (anti-inflamatória) induzem a produção de fatores solúveis (citocinas) que são produzidos durante a infecção. O entendimento acerca do controle desses fatores solúveis pode colaborar na elaboração de hipóteses sobre a etiologia da toxoplasmose ocular sendo de importância fundamental para vislumbrar protocolos de intervenções imunológicas.

Modelos animais mostram que a replicação do *T. gondii* no olho é controlada por IFN- γ e por subpopulações de células T CD4⁺/CD8⁻ e células T CD4⁻/CD8⁺ (Khan *et al.*, 1994).

Níveis elevados de IFN- γ e IL-13 foram observados em pacientes portadores de lesões oculares tipo C, as quais são caracterizadas por danos teciduais menos severos, em relação às lesões observadas em pacientes apresentando lesão ocular tipo A e B (Azevedo-Silva, 2001). Estes dados sugerem papel importante da IL-13, posto que relato da literatura demonstra que a injeção experimental de IL-13 no sangue periférico modula a inflamação intraocular, indicando que elementos da periferia podem atingir e exercer efeitos moduladores da inflamação nos compartimentos intraoculares (Marie *et al.*, 1999).

Estudos realizados com indivíduos da comunidade europeia e norte-americana têm mostrado o envolvimento dos genes *ABCA4*, *COL2A1*, *FOXQ1*, *P2X7*, *TLR9*, *IL-4* e *IL-13* no acometimento congênito da infecção toxoplásmica (Blackwell – comunicação pessoal), e que em bebês portadores de toxoplasmose congênita, polimorfismos nos genes *ABCR* e *COL2A1* apresentaram-se associados à manifestação ocular da toxoplasmose (Blackwell, 2006). É digno de nota que a investigação da associação do gene da IL-13 no contexto da toxoplasmose congênita no estudo mencionado ocorreu em função da interação da Dra. Jenefer Blackwell (especialista em genética de doenças infecciosas - Universidade de Cambridge – Cambridge/Reino Unido) com o nosso grupo a partir do conhecimento de nossos resultados que avaliaram a produção dessa citocina em grupos de pacientes portadores de diferentes tipos de lesão ocular.

Pelo exposto, nos propusemos a estudar parâmetros da imunidade de indivíduos: a) não infectados para toxoplasmose e, b) portadores de toxoplasmose crônica com ou sem acometimento visual (nucleados em famílias ou não), bem como avaliar por meio de análises genéticas, a possível influência de gene(s) na infecção e/ou na manifestação diferencial de formas oculares da doença. O estudo combinado de parâmetros imunogenéticos, por meio da análise de polimorfismos em genes relacionados a componentes moleculares envolvidos na resposta contra

o *T. gondii*, certamente elucidará aspectos relevantes ligados à susceptibilidade de alguns indivíduos ao desenvolvimento de lesões oculares toxoplásmicas.

III. OBJETIVO

Visando relacionar o perfil de parâmetros imunes periféricos e polimorfismos em genes candidatos com a manifestação ocular da toxoplasmose humana, propôs-se como objetivos específicos desse estudo:

- 1) Correlacionar parâmetros da resposta imune periférica (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-5, IL-2, IL-13 e TNF- α), com a ocorrência ou não de doença ocular proveniente de infecção pelo *T. gondii*, bem como com a presença ou não de infecção em indivíduos residentes no município de Campos dos Goytacazes, por meio de “Cytometric Beads Array - CBA”;
- 2) Relacionar a presença de polimorfismos em nucleotídeo único (SNPs) presentes nos genes candidatos *ABCR*, *COL2A*, *FOXQ1*, *P2X7*, *IL-4*, *IL-13*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR9* e *CFH* com a manifestação ocular da toxoplasmose, por meio de associações alélicas e/ou genótípicas em famílias de indivíduos afetados, ou por comparação do fenótipo clínico dos indivíduos com os diferentes genótipos por eles apresentados;
- 3) Avaliar o impacto da mudança no perfil clínico de indivíduos, acompanhados ao longo de 5 anos, sobre os parâmetros imunes (produção de citocinas), no intuito de melhor compreender os fatores imunológicos que possam influenciar na predisposição a manifestação diferencial da toxoplasmose ocular.

IV. População Estudada, Material e Métodos

4.1 Indivíduos Sujeitos da Pesquisa

Participaram deste estudo 303 indivíduos residentes no município de Campos dos Goytacazes/RJ, que foram selecionados considerando-se como critério: 1) sorologia para toxoplasmose; 2) fundoscopia para verificação de lesões oculares decorrentes da infecção pelo *T. gondii*, e classificação das mesmas de acordo com suas características morfológicas; 3) sexo; 4) idade; 5) classe e/ou grupo social; e 6) estado imunológico, tendo sido excluído aqueles indivíduos com imunodepressão (por uso de drogas imunossupressoras, neoplasias, etc) e/ou debilitados no seu estado geral de saúde. Os indivíduos foram, então, agrupados de acordo com o estudo no qual foram envolvidos (genético e/ou imunológico), como mostrado na **Tabela 1**.

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

É relevante ressaltar a colaboração do Hospital Geral de Guarus, pertencente à rede hospitalar da prefeitura do município de Campos dos Goytacazes, por meio de concessão de uso de espaço físico e equipamentos do setor de atendimento oftalmológico e do laboratório de análises clínicas, bem como por meio de disponibilização de profissionais (médicos oftalmologistas e técnicos) ligados a esse hospital. Os médicos oftalmologistas que participaram do estudo realizando os exames fundoscópicos foram: Dr. Ricardo Peixe, Dr^a. Elisa Waked, Dr. Wesley Campos, Drs. Carlos Veloso, Carlos Heringer e Fernando Oréfice.

Esse projeto foi aprovado pelo CEP (FIOCRUZ/RJ – Parecer nº. 347/06) e pelo CONEP (Ministério da Saúde - Parecer nº. 013/2007).

4.2 Classificação das Lesões Oculares Toxoplásmicas por Tamanho e Localização

Após constatação da presença de lesões oculares toxoplásmicas (tipo A, tipo B e/ou tipo C) por exame fundoscópico, todos os pacientes foram submetidos ao registro fotográfico de tais cicatrizes, utilizando-se o aparelho retinógrafo. Posteriormente, as imagens foram analisadas, minuciosamente, e classificadas quanto ao tamanho (unidades de diâmetro de disco) e localização (equatorial, macular, pólo posterior/mácula, pólo posterior e regiões periféricas ou periferia).

A classificação dos tipos de lesão (A, B e C) em relação ao tamanho e localização foi realizada no intuito de se observar a relevância estatística dessas variáveis quanto ao desenvolvimento de tipos de lesões de severidade diferentes. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0.

4.3 Estudo Genético

Esta etapa do projeto foi desenvolvida na Universidade de Cambridge (“University of Cambridge” – Cambridge/Reino Unido) em colaboração com o grupo de pesquisa em genética de doenças infecciosas, liderado pela Dr^a. Jennefer M. Blackwell. As atividades de estágio de doutorado no exterior foram desenvolvidas em 6 meses com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio de concessão de bolsa na modalidade PDEE (Programa de Doutorado com Estágio no Exterior).

Tabela 1: População estudada no projeto toxoplasmose, compreendendo um total de 302 indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes

Sorologia para Toxoplasmose	Diagnóstico Clínico Oftalmológico	Estudo Imunológico (n)	Estudo Genético (n)	ND*
Negativa	com lesão	5		
	sem lesão	9	13	
Positiva	com lesão	59	120	
	sem lesão	22	71	
Total		95	204	4

*ND – Não determinado, no que se refere à sorologia e/ou exame de fundo de olho.

4.3.1 Casuística do Estudo Genético

Neste estudo, foram avaliadas 60 famílias, sendo 30 núcleos familiares constituídos por pelo menos um indivíduo afetado e seus progenitores biológicos, enquanto os outros 30 núcleos familiares foram constituídos por pelo menos um indivíduo afetado e um ou mais irmãos co-sangüíneos (**Tabela 2**). As amostras de DNA dos duzentos e oito indivíduos, incluindo indivíduos infectados (afetados e não afetados) e não infectados pelo *T. gondii*, foram genotipadas para 36 SNPs (**Tabela 3**). Após genotipagem, as análises genéticas utilizando essas famílias foram realizadas por aplicação de testes de associação baseados em famílias. Além das amostras de indivíduos nucleados em famílias, 48 amostras de indivíduos afetados (sem família) foram também genotipadas para os mesmos 36 SNPs, porém os dados foram usados apenas para análise da proporção de alelos envolvidos na configuração de genótipos em indivíduos apresentando diferentes fenótipos clínicos de lesão ocular (lesão tipo A, tipo B e tipo C).

Aproximadamente 4ml de amostra de sangue total foram coletadas de cada indivíduo por venopunção por meio do sistema de tubos a vácuo (Vacurette – Greiner Bio One), contendo o anticoagulante citrato de sódio. Posteriormente, as amostras foram aliquotadas e armazenadas a -20°C até o uso.

Tabela 2: Casuística de indivíduos portadores de toxoplasmose ocular, analisados por meio de estudo genético, baseado em família, quanto ao polimorfismo em genes candidatos relacionados à susceptibilidade a manifestação ocular da toxoplasmose

Tipo de Agrupamento	Número de Famílias	Número de Indivíduos							
		Prole			Progenitores				
		infectada		não infectada	infectados		não infectados	ND*	
Nucleados em Família		afetada	não afetada		afetados	não afetados			
Com ambos pais									
1 filho afetado	28	28	0	0	4	43	6	3	
2 filhos afetados	2	4	0	0	0	3	0	1	
Irmãos consanguíneos (sem os pais)									
1 afetado	25	25	25	6	0	0	0	0	
2 afetados	4	8	0	1	0	0	0	0	
3 afetados	1	3	0	0	0	0	0	0	
Afetados (sem família)	***	48	***	***	***	***	***	***	
Total Geral	60	116	25	7	4	46	6	4	

*ND – não determinados no que se refere a sorologia e/ou exame de fundo de olho.

Tabela 3: Informações sobre os SNPs genotipados na população de Campos dos Goytacazes

SNP	Posição Bp	Posição no Gene	Mudança de AA	Alelo 1 (strand)	Alelo 2 (strand)
ABCA4 (reverse strand Chr 1p22.1):					
rs1801574	94248976	exon 40	Leu-1894-Leu	G(-)	C(-)
rs2297633	94283261	intron 19		T(+)	G(+)
rs1761375	94310599	intron 11		G(+)	A(+)
rs3112831	94316822	exon 10	Arg-423-His	T(-)	C(-)
rs952499	94331013	intron 6		T(-)	C(-)
CFH (foward strand Chr 1q31.3):					
rs1061170	194925860	exon 7	Tyr-402-His	C(+)	T(+)
TLR5 (reverse strand Chr 1q42.11):					
rs1053954	221350474	exon 6	Lys-841-Lys	C(-)	T(-)
rs1341987	221375836	intron 2		C(-)	G(-)
TLR9 (reverse strand Chr 3p21.2):					
rs352140	52231737	exon 2	Pro-545-Pro	C(-)	T(-)
rs5743836	52235822	downstream/upstream		A(-)	G(-)
TLR2 (foward strand Chr 4q31.3):					
rs3804099	154844106	exon 3	Asn-199-Asn	C(+)	T(+)
rs5743708	154845767	exon 3	Gln-753-Arg	A(+)	G(+)
IL-13 (foward strand Chr 5q23.3):					
rs1800925	132020708	upstream		C(+)	T(+)
rs2066960	132022334	intron 1		A(+)	C(+)
rs1295686	132023742	intron 3		C(+)	T(+)
IL-4 (foward strand Chr 5q23.3)					
rs2070874	132037609	5' URT		C(+)	T(+)
rs2227284	132040624	intron 2		G(+)	T(+)
rs2243270	132042008	intron 2		A(+)	G(+)
FOXQ1 (foward strand Chr 6p25.3)					
rs1550199	1253575	upstream		C(+)	G(+)
rs920209	1261548	downstream		A(+)	G(+)
TLR4 (forward strand Chr 9q33.1)					
rs4986790	119515123	exon 3	Gly-299-Asp	G(+)	A(+)
rs4986791	119515423	exon 3	Ile-399-Thr	T(+)	C(+)
COL2A1 (reverse strand Chr 12q13.11)					
rs2070739	46654243	exon 53	Ser-1405-Gly	T(-)	C(-)
rs2276455	46662404	intron 34		A(-)	G(-)
rs2276454	46662558	exon 34	Gly-2245-Gly	G(+)	A(+)
rs1635544	46666289	intron 23		T(-)	C(-)
rs1793958	46678700	intron 2		G(+)	A(+)
rs3803183	46684347	exon 1	Ser-9-Thr	T(-)	A(-)
P2X7 (foward strand Chr 12q24.31)					
rs208293	120084563	intron 4		C(+)	T(+)
rs28360457	120097612	exon 9	Gln-307-Arg	G(+)	A(+)
rs1718119	120099486	exon 11	Thr-348-Ala	A(+)	G(+)
rs2230911	120099514	exon 11	Ser-357-Thr	C(+)	G(+)
rs2230912	120106579	exon 13	Arg-460-Gln	A(+)	G(+)
rs3751143	120106687	exon 13	Ala-496-Glu	A(+)	C(+)
rs1653624	120106903	exon 13	Ile-568-Asn	A(+)	T(+)
rs1621388	120106946	exon 13	Pro-582-Pro	A(+)	G(+)

4.3.2 Extração de DNA Genômico de Amostras de Sangue Total

DNA genômico foi extraído e purificado de amostras de sangue total com kit comercial Nucleon BACC1 (Amersham), de acordo com as instruções do fabricante. Usando um procedimento asséptico, foi adicionado 2ml de reagente A tampão de lise (10mM Tris-HCL, 320M sucrose, 5mM MgCl₂, 1% (v/v) Triton X-100, pH 8.0) para cada 0.5ml de amostra de sangue total em tubos cônicos de 15ml. O material foi misturado, rotativamente, por 4 min a temperatura ambiente e, então, centrifugado a 1300g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e 350µl de reagente B foi adicionado ao sedimento, o qual foi ressuspendido usando o vórtex. A suspensão foi incubada a 37°C por, aproximadamente, 10 min para certificar que o sedimento foi bem ressuspendido.

Posteriormente, a suspensão foi transferida para um tubo de 1.5ml e 100µl de solução de perclorato de sódio foram adicionados e misturados, manualmente, por inversão do tubo, por pelo menos 7 vezes. Sem misturar as fases, 150µl de resina de Nucleon foi adicionado e centrifugado a 350g por 1 min. A etapa seguinte foi transferir, aproximadamente, 450µl da fase superior para um outro tubo de 1.5ml, sem perturbar a camada de resina de nucleon. A seguir, foi adicionado à fase superior o dobro do volume da mesma de etanol absoluto gelado, e misturado por inversão até o precipitado aparecer.

A suspensão foi centrifugada a 4000g por 5 min para recuperar o precipitado de DNA. O precipitado foi então lavado duas vezes por adição de 1ml de etanol gelado 70% (v/v), misturado várias vezes por inversão, e re-centrifugado a 4000g por 5 min. O sedimento de DNA precipitado foi novamente centrifugado, para garantir que todo o etanol havia sido removido e, então, foi deixado secar ao ar a temperatura ambiente por 3-5 min. O DNA foi dissolvido em 100µl de água Mili-Q autoclavada, tendo sido misturado rotativamente por 2 horas e, posteriormente, incubado por 18-20 horas a 4°C. As amostras de DNA foram estocadas a -20°C até o uso.

4.3.3 Quantificação de DNA por Espectrofotometria

A concentração de DNA foi determinada por medição da absorbância das amostras a 260nm, 280nm e 230nm no espectrofotômetro (Mini 1240 – Shimadzu). 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 foi considerado estar próximo a 1.8 e 1.2, respectivamente.

O DNA genômico foi testado por PCR em relação ao funcionamento em reações de amplificação e, então, estocado a -20°C até o uso.

4.3.4 Quantificação de DNA por Ensaio de Fluorescência usando Reagente de Picogreen

A concentração de DNA genômico foi também medida por um método de fluorescência preciso, o qual usa o reagente picogreen (Invitrogen) para quantificação de DNA de fita dupla (dsDNA). As amostras foram diluídas 1/100 com tampão TE (10mM Tris Base; 1mM EDTA; pH 8.0) em placas de 96 poços e incubadas a 4°C overnight para certificar que o DNA estava totalmente disperso. DNA padrão de timo de vaca foi diluído com tampão TE em tubos de 1.5ml nas seguintes concentrações: 800ng/ μl ; 400ng/ μl ; 200ng/ μl ; 100ng/ μl ; 50ng/ μl ; 25ng/ μl ; 12.5ng/ μl ; 6.25ng/ μl . Então, em uma placa ABgene de 96 poços, foram pipetados em duplicata 50 μl /poço de DNA padrão e 5 μl /poço de amostras. Após essa etapa, 50 μl de solução A (reagente de picogreen diluído 1/200 com TE) e 95 μl de solução B (reagente picogreen diluído 1/380 com TE), foram adicionados aos poços padrão e poços com amostras, respectivamente.

As placas foram centrifugadas para remover bolhas, cobertas com papel alumínio para protegê-las da luz, e a leitura foi feita no Cytofluor[®] Multi-well Plate Reader (Perspective Biosystem).

Os resultados do cytofluor foram transferidos para arquivo do excel intitulado PicoGreenCalc.xls, o qual é uma planilha elaborada para calcular as concentrações de DNA de leituras feitas no cytofluor. Então, usando esta planilha, as concentrações de DNA padrão foram calculadas e usadas para produzir curva padrão, a partir da qual, a concentração de todas as amostras foi automaticamente calculada.

4.3.5 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) “Touchdown”

As amostras de DNA de todos os indivíduos foram também avaliadas por PCR “touchdown” para checar o sucesso da extração, antes do início dos ensaios de genotipagem. Os PCRs foram feitos em placas de 96 poços (ABgene). Portanto, para cada poço foi adicionado 3µl de amostra de DNA genômico diluída 1:10. A seguir, foram adicionados 8.5µl de uma mistura de reação de PCR, contendo 7.45µl de uma mistura mestre (Tampão de PCR 10X; 25mM MgCl₂; 5mM dNTPs; 5M Betaine), 10µM de cada par de primer, e 0.25 U de AmpliTaq Gold DNA polimerase. A amplificação por PCR foi feita usando o termociclador MJ-Thermocycler sob as seguintes condições:

- 1) 94 °C por 10 min (aquecimento inicial)
 - 2) 94 °C por 20 s (desnaturação)
 - 3) 63-56 °C por 60 s usando decréscimo de 0,5 °C/ ciclo (anelamento)
 - 4) 72 °C por 60 s (extensão)
 - 5) 94 °C por 20 s
 - 6) 56 °C por 60 s
 - 7) 72 °C por 60 s
 - 8) 72 °C por 5 min
- } 14 ciclos
- } 20 ciclos

4.3.6 Gel de Agarose

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%. Reagente de agarose (electrophoresis grade ultra pure reagent - Invitrogen) foi dissolvido em tampão TBE 1X (0.44 M Tris-HCl pH 8.2; 0.44 M H₃BO₃; 10 mM EDTA) por aquecimento e, então, o brometo de etídio foi adicionado em proporção de 2µl para cada 100ml de volume de gel. Para 2µl de amostras foi adicionado 6µl de “Cresol Red”, e corrido por 0.7h a 120V. O comprimento do fragmento a ser visualizado era de 349bp. O padrão de peso molecular hyperladder I (Bioline) foi também usado para comparar as bandas àquelas das amostras.

4.3.7 Amplificação de DNA Total a partir de Amostras de Sangue Total pelo Método de MDA (Multiple Displacement Amplification)

Algumas amostras de DNA genômico, extraídas por meio do kit Nucleon BACC1, apresentaram baixa concentração de DNA, insuficiente para conduzir as análises genéticas, ou ainda, não funcionaram no PCR touchdown. Para esse conjunto de amostras, a amplificação de DNA foi feita a partir de sangue total pelo método de MDA usando o kit “GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit” (GE Life Science). Portanto, para 1µl de amostra de sangue total foi adicionado 2µl de PBS 1X. A suspensão foi incubada com 3.5µl de solução de lise, na proporção de 1:10 de DTT 1M e solução A (5M KOH, 0.5M EDTA), por 10 min sobre o gelo. Após esta etapa, 20µl da mistura de reação, a qual continha uma solução de mistura (4X concentrada) e DNA polimerase 29φ (ambos fornecidos pelo kit), foram adicionados às amostras.

As placas foram seladas, levadas ao vórtex e, brevemente, centrifugadas. A incubação foi feita a 30°C por 16h seguida por 65°C por 20min no termociclador MJ-Thermocycler. As amostras amplificadas foram diluídas por adição de água. O volume de água adicionado foi equivalente ao volume de produto de reação.

De modo a verificar o sucesso do MDA, os produtos amplificados foram corridos em gel de agarose 1%, sob as mesmas condições descritas no item 4.2.6. As amostras foram quantificadas pelo método de fluorescência usando reagente de picogreen, como previamente descrito (item 4.2.4), e estocadas a -20°C até o uso.

4.3.8 Ensaio de TaqMan

Neste estudo, 30 SNPs de 8 genes (*ABCR*, *COL2A*, *FOXQ1*, *IL-13*, *IL-4*, *P2X7*, *TLR2* e *TLR5*), foram genotipados pelo ensaio de TaqMan. O ensaio de TaqMan é um ensaio de nuclease 5', o qual utiliza a atividade exonuclease 5' 3' da enzima polimerase *Thermus aquaticus* (Taq) para clivar uma sonda marcada duplamente e anelada a uma seqüência alvo localizada entre os dois sítios ligantes do primer (Lie and Petropoulos, 1998) (**Figura 2**). A discriminação alélica foi feita usando PCR e, cada ensaio requereu dois primers não marcados, e duas sondas alelo-específicas duplamente marcadas com um corante repórter na extremidade 5' (VIC e FAM). O

ensaio de TaqMan utilizado, foi fornecido pronto pelo fabricante (Applied Biosystem) com os primers e sondas misturados juntos. As seqüências dos primers e das sondas não foram fornecidas pelo fabricante.

Para conduzir os ensaios de TaqMan, o PCR foi feito usando 3 μ l de uma Solução Mistura (contendo TaqMan[®] Universal Master Mix, primers/sondas - 20x ou 40x concentrado e água destilada) e 2.5ng de DNA, previamente diluído em placas estoque de 96 poços-fundos (Beckman), de modo que o volume final de reação de PCR ficasse em 5 μ l. Solução Mistura e amostras de DNA foram previamente aliquotadas em placas COSTAR de 96 poços (Corning) e em placas ópticas de 384 poços (Applied Biosystem - ABI), respectivamente. Posteriormente, a Solução Mistura e amostras de DNA foram misturadas em uma outra placa de reação de 384 poços por manipulação robótica. Para tanto, um programa específico foi selecionado no software Biomek FX Robotics System de acordo com o número de SNPs e amostras de DNA. Primeiramente, o software apresentou um modelo para organização das placas sobre a plataforma do robô. As placas contendo a solução mistura e o DNA foram organizadas como indicado pelo modelo, assim como as placas de reação (placas de 384 poços ABGENE), na qual o DNA e a solução mistura foram juntados. As placas de reação foram seladas com um adesivo óptico (ABI), brevemente centrifugadas e, então, colocadas no termociclador (MJ Thermocycler).

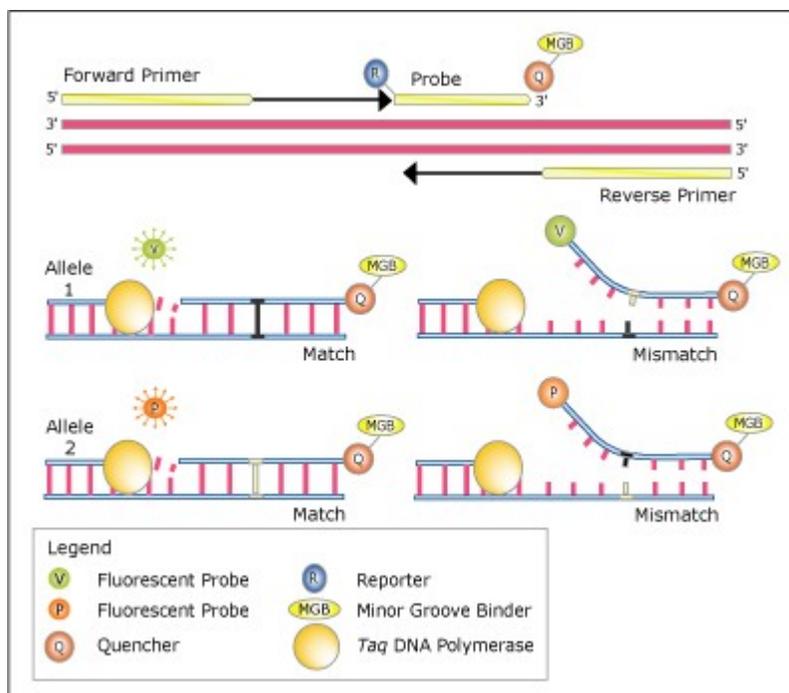


Figura 2: Esquema representativo do ensaio de TaqMan utilizado para genotipar SNPs potencialmente associados com a toxoplasmose ocular. Durante o PCR, cada sonda anela especificamente a uma seqüência complementar entre os sítios de ambos primers. À medida que a enzima Taq polimerase cliva a sonda que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

A ciclagem termal do PCR foi como a seguir: desnaturação inicial a 95°C por 10min; 92°C por 15s e 60°C por 1min. Em geral, o número de ciclos foi 40, porém alguns marcadores tiveram o número de ciclos aumentado para 50, ou até mesmo 60 ciclos, quando necessário. As placas de PCR foram lidas por meio do software SDS v2.1 (ABI). Os genótipos foram determinados, visualmente, baseado na emissão dos corantes fluorescentes plotados num gráfico de coordenadas X-Y do software SDS (**Figura 3**). Os alelos 1 e 2 foram marcados com os corantes FAM e VIC, respectivamente.

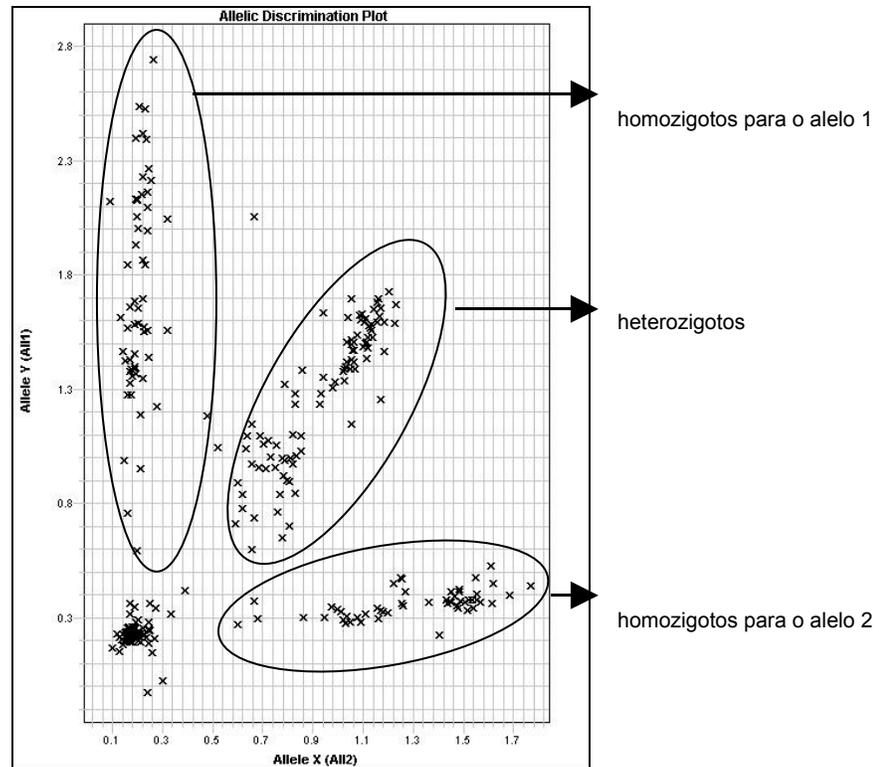


Figura 3: Gráfico gerado de uma tabela de resultados obtida durante as análises de dados do ensaio de TaqMan. Grupos de genótipos homozigotos e heterozigotos estão destacados. Grupos não especificados foram considerados como dados de genotipagem que falharam.

4.3.9 Reação SNaPshot Multiplex

Ensaio de SNaPshot multiplex foi usado para genotipar 6 SNPs de um painel TLR – Toll Like Receptor - contendo 4 genes (*TLR2*, *TLR4*, *TLR9* e *CFH*). Essa reação envolve a extensão de uma sonda oligonucleotídeo, desenhada para se ligar adjacientemente ao SNP de interesse por um dos quatro dideoxynucleotídeos marcados fluorescentemente, complementar à base encontrada no sítio do SNP.

Essas sondas extendidas fluorescentemente são então, separadas por meio de um sistema de eletroforese capilar ABI 3100 na presença de um padrão de peso molecular também marcado fluorescentemente (**Figura 4**).

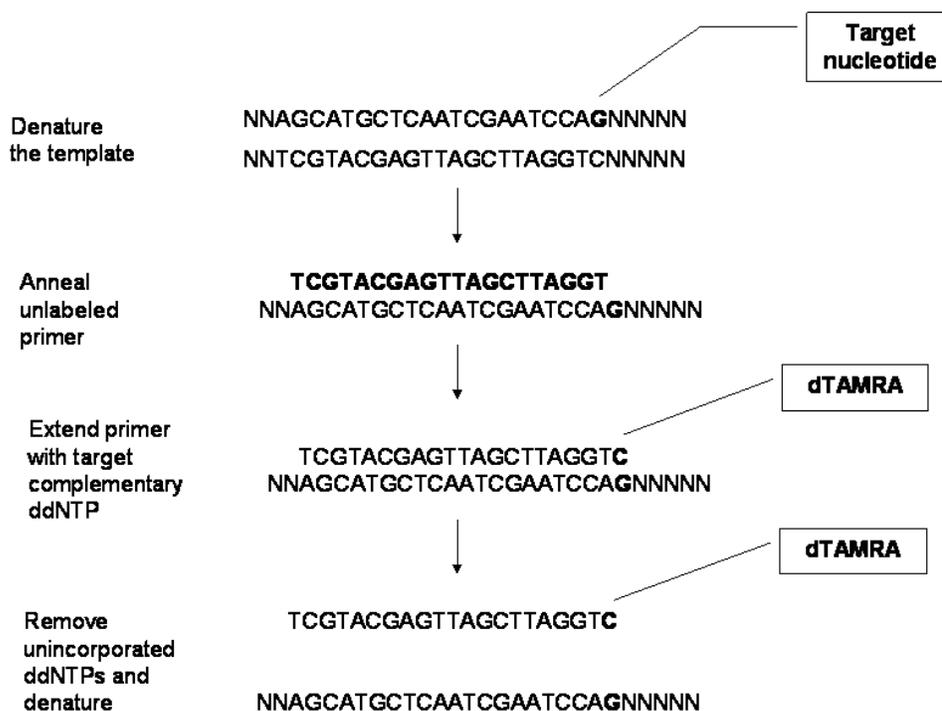


Figura 4: Resumo esquemático do procedimento de SNaPshot obtido do website do ABI.

Previamente aos experimentos de reação de SNaPshot, regiões contendo os SNPs foram amplificadas por PCR touchdown em 6 amplicons com tamanhos na faixa de 65 a 414 pb. A reação de PCR foi feita em um volume de 11µl contendo 0.25 U de Taq polimerase, 2.5ng de amostra de DNA, 7.45µl de mistura mestre de PCR 10X concentrada e 10µM de primers de amplificação. As condições do PCR "touchdown" foram aquelas previamente descritas no item 3.5. Os produtos de PCR foram verificados por corrida de 1µl do amplicom diluído em 5µl de Cresol Red em gel de agarose 2%. O produto remanescente foi, então, processado como indicado no protocolo de SNaPshot fornecido pelo fabricante (ABI), onde todos produtos amplificados a partir de primers diferentes foram unidos em igual volume em uma placa de 96 poços ABgene nova. A partir desse pool, 3µl foram transferidos para uma outra placa e, tratado com 1U de Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Amersham) para digerir primers de fita única e 0.4U de Exonuclease I (Biolab) para desativar

dNTPs não incorporados, por 1h a 37°C seguido por 15min a 80°C. Após esta etapa, a reação de SNaPshot foi conduzida em um volume final de 5.5µl, o qual continha 2µl do pool dos produtos de PCR limpos, 2.5µl da solução do kit SNaPshot multiplex com o ddNTP marcado (ABI), 0.5µl de água destilada e 0.5µl de primers de extensão não marcados e previamente misturados, sendo que a concentração final de cada primer variou dependendo de sua otimização. O programa de ciclagem foi de 25 ciclos de 96°C por 10s, 50°C por 5s, e 60°C por 60s. A seguir, o produto foi incubado novamente com 0.5U de SAP por 1h a 37°C seguido por 15min a 80°C, de modo a remover ddNTPs e, prevenir estes terminadores não incorporados, de co-migrarem com os primers estendidos e produzir alto sinal de background durante as análises no ABI 3100. Alíquotas de 9.5µl de formamida ultra (Bioproducts) e 0.5µl do padrão de peso molecular GS 120 LIZ standard (ABI) foram adicionadas a 1µl dos produtos de SNaPshot limpos em uma placa óptica de 96 poços (ABI). As placas foram cobertas com adesivo próprio e desnaturadas a 95°C por 5min e colocadas em gelo. A cobertura adesiva foi retirada e as placas foram lidas no aparelho “ABI 3100 genetic analyzer”. As placas foram corridas usando capilares de 36cm e o conjunto de corantes E5 (amarelo, vermelho, azul, verde e laranja). A discriminação alélica foi obtida usando o programa GeneMapper software 3.0 (ABI).

4.3.10 Análises Estatísticas

Os dados de genotipagem do ensaio de TaqMan e das reações SnaPshot foram importados para o banco de dados Genle desenvolvido por Richard Francis em “Cambridge Institute for Medical Research”. Antes de iniciar as análises de associação genética, inconsistências Mendelianas nos dados de genotipagem obtidos foram verificadas usando o programa “Pedcheck” (Jeffrey and O`Connell, 1998), de modo a prevenir que genótipos incorretos entre pais e descendentes fossem carregados para as análises genéticas futuras. Os dados de famílias que apresentaram quaisquer inconsistências foram deletados e o “pedcheck” foi corrido novamente até que não fosse detectada nenhuma inconsistência.

4.3.11 Análises de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

Análises de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram feitas usando o programa STATA v8.2, de modo a certificar que não havia nenhum desvio, desde que um desvio significativo nesse teste é interpretado como indicativo de erro de genotipagem. Então, antes das análises de associação, todos os dados de genotipagem foram verificados em relação ao EHW. Para tanto, as análises de EHW foram conduzidas usando indivíduos não relacionados (amostras apenas dos pais dos indivíduos) e, as frequências alélicas foram consideradas estarem na proporção de Hardy-Weinberg quando valores de p foram maiores ou equivalentes a 0.05 ($p \geq 0.05$) para cada marcador.

4.3.12 Análises de Associação Genética

4.3.12.1 Cálculo do Poder do TDT (Transmission Disequilibrium Test)

Previamente às análises de associação alélica, alguns cálculos foram feitos para estimar o poder das análises de TDT usando o método de Knapp (1999). Este método tem sido implementado usando scripts customizados e macro no programa Excel, onde o poder teórico para identificar associação alélica, assumindo-se um modelo multiplicativo, foi calculado sobre o número de trios (prole afetada e progenitores biológicos) de acordo com a frequência alélica hipotética do SNP e tamanho do efeito (effect size), expresso por valores de razão de chance (odds ratio). Todas essas variáveis foram consideradas em três níveis de significância: $p = 0.05$, $p = 0.01$ e $p = 0.001$. Este cálculo é uma boa ferramenta para geneticistas no momento que eles planejam desenvolver estudos de associação e/ou ligação genética.

4.3.12.2 Análises TDT

As análises TDT, baseadas em famílias, consistindo de pelo menos um indivíduo afetado e ambos pais, focalizam sobre a transmissão de alelos particulares. Portanto, este teste avalia se a frequência de transmissão de alelos, de pais heterozigotos para a prole afetada, desvia 50% da frequência Mendeliana esperada com nenhuma ligação ou associação (Schaid, 1998), na qual qualquer distorção foi considerada

sugerir associações genéticas entre o marcador e a doença. Valores de “p” foram considerados significantes quando eles foram iguais ou menores que 0.05 ($p \leq 0.05$). A distribuição de qui-quadrado (χ^2) sobre a hipótese nula com o grau de liberdade (df) igual a 1 foi também calculada no teste. Primeiramente, o teste assume que a transmissão, de pais heterozigotos para descendentes afetados, é independente quando considerando que a transmissão para um irmão afetado de uma família simples é usada no teste. No entanto, quando mais de um irmão afetado é considerado, o teste pode tratar os resultados para não-independência de irmãos, pelo uso de um estimador robusto da variância, fornecendo teste estatístico χ^2 robusto.

Em resumo, este método é bastante simples e considera três importantes fatores: (1) um locus de marcador bialélico, (2) um traço qualitativo (doença), e (3) a disponibilidade de ambos pais (Knapp, 1999).

Análises TDT foram conduzidas usando o pacote estatístico “GenAssoc Stata v8.2”, disponível em <http://www-gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/software/stata>, implementado pelo software stata 8.2.

4.3.12.3 Análises Caso-Pseudocontrole

O teste caso-pseudocontrole foi outro tipo de teste de associação baseado em família usado neste estudo, diferente do teste TD. O teste focaliza sobre os riscos relativos conferidos por genótipos específicos (Schaid and Sommer, 1993). Portanto, o filho afetado é tratado como caso e três pseudocontroles são construídos, via regressão logística condicional, de acordo com os genótipos parentais, onde os dois alelos de cada pai podem ser, potencialmente, combinados para criar quatro diferentes genótipos. Um desses é o caso, e os outros três são os pseudocontroles, cujos genótipos são derivados de alelos parentais não transmitidos. A associação da doença com alelos de um marcador particular é avaliada por métodos caso-controle tradicionais, onde as frequências de alelos de determinados marcadores entre casos e pseudocontroles são usadas para originar um valor de razão de chance (odds ratio). Um estimador robusto da variância é também empregado para estimar o teste estatístico de Wald χ^2 , de modo a corrigir para a não-independência de irmãos.

Semelhante ao teste TDT, o teste caso-pseudocontrole não se aplica para casos provenientes de famílias de pais ausentes.

O programa Stata v8.2, no qual foi gerado casos e pseudocontroles combinados, foi também acessado do mesmo website descrito no item 4.2.12.2.

4.3.12.4 Teste de Associação Baseado em Família (FBAT)

O teste FBAT (Rabinowitz and Laird, 2000; Laird *et al.*, 2000) é uma abordagem unificada para testes de associação baseados em família construídos sobre o método TDT original (Spielman *et al.*, 1993), no qual alelos transmitidos para os descendentes afetados são comparados com a distribuição esperada de alelos entre descendentes sob a hipótese nula. Entretanto, este teste pode trabalhar, diferente do TDT, considerando uma variedade de caracteres num mesmo modelo de estudo, tais como: (1) testes de associação bi-alélica e multi-alélica usando modelos genéticos padrão (aditivo, dominante, recessivo e genótipo); (2) diferentes tipos de amostragem (núcleos familiares com ambos pais ou com um dos pais ausentes ou com pais completamente ausentes, no caso de amostras somente de irmãos co-sangüíneos); (3) diferentes fenótipos de doenças (Lange *et al.*, 2004). Para dados parentais completos, a distribuição nula é obtida por condicionamento sobre os traços observados em todos os membros da família, e sobre o genótipo do marcador parental. Por outro lado, para dados parentais incompletos, a distribuição nula é obtida, não somente por condicionamento sobre todos os traços observados e qualquer genótipo marcador observado, mas também sobre a configuração do genótipo dos descendentes. Então, qualquer genótipo parental parcialmente observado e a configuração do genótipo dos descendentes são estatisticamente suficientes para estimar o genótipo do pai ausente (Rabinowitz and Laird, 2000).

No teste FBAT uma família é informativa quando ela tem uma contribuição diferente de zero para a estatística de FBAT. Os testes Z e χ^2 são também baseados sobre o número de famílias informativas (Rabinowitz and Laird, 2000). Um valor de p significativo foi aceito quando $p \leq 0.05$.

4.4 Estudo Imunológico

Esta etapa do estudo foi desenvolvida na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, na cidade de Campos dos Goytacazes/RJ – Brasil.

4.4.1 Casuística do Estudo Imunológico

Ao todo participaram desse estudo 95 indivíduos, os quais foram agrupados de acordo com seu perfil sorológico (positivo ou negativo) e clínico (presença ou ausência de cicatrizes oculares decorrentes de infecção pelo *T. gondii*), como mostrado na Tabela 4. A média aritmética de idade dos indivíduos voluntários neste estudo foi de 31 anos.

Aproximadamente 20ml de amostras de sangue periférico foram coletadas por venopunção por meio do sistema de tubos a vácuo (Vacuette – Greiner Bio One), contendo o anticoagulante heparina sódica e, logo a seguir, foram processadas para separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e, posterior utilização destas na análise de parâmetros imunológicos em culturas estimuladas com extrato solúvel do antígeno de *T. gondii*.

4.4.2 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico

O sangue total coletado com heparina foi lentamente adicionado sobre Ficoll (LSM®, ORGANON TEKNIKA – 1,08g/mL), na proporção de 2:1 em tubos cônicos de 50 mL, e submetido a centrifugação (a 500Xg por 40 minutos a 25°C) de fracionamento dos componentes do sangue que ocorre por diferença de densidade dos mesmos. As PBMC coletadas foram lavadas com meio RPMI-1640 (Meio HEPES modificado – GIBCO-BRL) através de três centrifugações de 500Xg, a 4°C durante 10 minutos, cada. Após o processo de lavagem, as células foram ressuspensas em RPMI, e uma alíquota dessa suspensão foi retirada e diluída em Azul de Tripán (0,2%) para a realização da contagem em câmara de Neubauer do número de células e avaliação da viabilidade. Toda manipulação do sangue foi feita em condições estéreis.

Tabela 4: Indivíduos residentes em Campos dos Goytacazes participantes do estudo imunológico para toxoplasmose, agrupados segundo exames sorológicos e de fundo de olho

Sorologia	Fundoscopia		
	perfil clínico	número de indivíduos	tipo de lesão
Negativa	sem lesão	9	
	com lesão	2	C
		1	BC
		2	B
Positiva	sem lesão	22	
	com lesão	4	A
		5	AB
		7	ABC
		2	AC
		14	B
		7	BC
		20	C
Total		95	

4.4.3 Manutenção de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) e Preparação de Lisado Protéico

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 CO₂. 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 CO₂ 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 10^4 parasitas recolhidos do lavado peritoneal. Após este processo, o material coletado foi centrifugado a 500Xg, por 5 minutos, a temperatura ambiente, para retirada de células peritoneais. Posteriormente, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 913Xg por 30 minutos a 4°C, para separar parasitas. O sedimento obtido foi ressuspensionado e os organismos foram contados em câmara de Neubauer e adicionados à cultura de HFS-F numa proporção de 5-10 parasitas por fibroblasto.

Os parasitas coletados a partir da segunda passagem em culturas de fibroblastos foram centrifugados a 500Xg, 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 parasitas lisados, após o último ciclo, foi ressuspensionada em PBS gelado e ultracentrifugada a 40.000Xg, 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 0,22 µm. 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°C até o uso.

4.4.4 Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico

As PBMC separadas, como descrito no item 4.3.2, foram cultivadas em placas de cultura de 24 ou 96 poços de fundo chato, nas quais foram distribuídas, aproximadamente, $2,0 \times 10^6$ células ou $2,5 \times 10^5$ / poço, respectivamente. O meio utilizado para cultura foi o “Culture Medium for Blastogenesis (CMBlast)” [RPMI – 1640 (GIBCO BRL); L-Glutamina 2mM (MERK); Antibiótico Gentamicina 20µg/ml (GIBCO BRL) e soro humano AB normal (SIGMA) inativado, com sorologia negativa para toxoplasmose, a 5%].

As culturas de PBMC foram estimuladas antigenicamente através da adição de extratos solúveis derivados de *T. gondii* (STAg – 2µg/ml), ou enterotoxina B estafilocócica (SEB – 0,25µg/ml) como parâmetro de estimulação inespecífico.

Culturas de PBMC não estimuladas antígenicamente foram mantidas como controles experimentais. As culturas celulares foram mantidas em estufas úmidas de CO₂ (5%) a 37°C durante um período variado de tempo, dependente do parâmetro a ser analisado, como descrito nos itens seguintes.

4.4.5 Obtenção de Sobrenadante de Cultura Celular para Avaliação de Citocinas Secretadas

As PBMC dos pacientes foram cultivadas para se investigar o perfil das citocinas secretadas, seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.3.2.

As suspensões celulares foram coletadas no 1º e 6º dias após o início da cultura. Esses dias de coleta foram escolhidos com base na cinética de produção das citocinas a serem analisadas (Azevedo-Silva, 2001). Após a coleta, as suspensões celulares foram transferidas para tubos cônicos de 1,5ml para microcentrifugação. Os sobrenadantes foram separados das PBMC por centrifugação a 13.000Xg durante 60 segundos em microcentrífuga (*Eppendorf 5415R*). Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior análise quanto à secreção de citocinas por meio de citometria de fluxo.

4.4.6 Análise de Citocinas em Sobrenadantes de Cultura de PBMC por Ensaio Citofluorométrico com Microesferas Fluorescentes - “Cytometric Bead Array” (CBA)

A caracterização de citocinas secretadas por PBMC em sobrenadantes de cultura foi realizada por meio de citometria de fluxo, utilizando-se kits CBA da BD™. Os kits utilizados foram: Human Th1/Th2 Cytokine Kit e Human IL-13 Flex Set.

As análises de citocinas, produzidas *in vitro* por PBMC cultivadas sob estímulos antigênicos ou não, foram realizadas de acordo com as orientações do fabricante do Kit CBA. As amostras avaliadas quanto ao perfil de produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α por meio de uso do kit “Human Th1/Th2 Cytokine Kit” foram lidas e analisadas no citômetro de fluxo BD FACScan™ do Instituto de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ/BH - Brasil. O software de aquisição utilizado foi o BD CellQuest™ e o software de análise foi o BD™ CBA Analysis.

Enquanto as amostras avaliadas quanto ao perfil de produção de IL-13 por meio do kit “Human IL-13 Flex Set” foram lidas e analisadas no BD FACSAarray™ Bioanalyzer System. Os softwares de aquisição e análise utilizados foram BD FACSAarray software e FCAP Array™ software, respectivamente.

Considerando-se as curvas-padrão obtidas em cada experimento a partir de leitura de amostras padrões fornecidas pelo kit, procedeu-se o cálculo da concentração das citocinas nas amostras, expresso em pg/ml, a partir da Intensidade Média de Fluorescência (Mean Fluorescence Intensity - MFI).

4.4.7 Análises Estatísticas

Análises estatísticas dos gráficos, referentes à avaliação de citocinas nos sobrenadantes das culturas, foram realizadas utilizando-se o programa Prisma (GraphPad Prism 4.0).

Antes de proceder às análises estatísticas no prisma, os dados foram analisados no programa estatístico SPSS quanto à simetria ou não dos dados, isto é, se os mesmos deveriam ser analisados como paramétricos ou não-paramétricos. A normalidade dos dados pode ser testada até mesmo por meio do uso de gráficos de histograma, ou gráficos próprios para testar a normalidade, como o Q-Q Plot ou o P-P Plot. No entanto, a forma mais rigorosa de se testar a normalidade é por meio dos testes estatísticos.

Existem dois testes estatísticos largamente usados para testar a normalidade de uma distribuição - o teste de Kolmogorov-Smirnov (com correção de Lilliefors) e o teste de Shapiro-Wilk. Nesse estudo, utilizaremos o teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) devido ao fato do número de amostras ser maior que 50. O teste K-S compara uma distribuição cumulativa observada (DO) com uma distribuição teórica normal (DN). Neste teste a significância é de 5%. Então, uma distribuição é normal quando não há significância ($\geq 0,05$).

O padrão de secreção de citocinas foi comparado intragrupos e intergrupos. A análise intragrupos objetivou avaliar o impacto dos estímulos antigênicos específico (STAg) e inespecífico (SEB) sobre a resposta imune de cada grupo de paciente em relação às culturas controle. Por outro lado, a análise intergrupos comparou diferentes

grupos de pacientes entre eles, considerando-se a produção diferencial das citocinas em cada condição de cultura, isto é. com ou sem estímulo antigênico.

Os dados do estudo imunológico foram considerados não-paramétricos e, portanto, a comparação de dois grupos independentes empregou o teste de Mann-Whitney. Enquanto, a comparação de mais de dois grupos independentes utilizou o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's. Para todos os testes foi usado nível de significância de 5%.

4.5 Detecção de Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em Amostras de Soro de Indivíduos por Enzimaimunoensaio (ELISA)

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.

V. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão divididos em três seções conforme se segue: 5.1 Tamanho e localização das lesões retinianas abordadas nesse estudo; 5.2 Estudo Genético e 5.3 Estudo Imunológico.

5.1 Tamanho e Localização das Lesões Retinianas Abordadas nesse Estudo

As lesões retinianas classificadas como tipo A B ou C, correspondendo respectivamente às lesões tipo I, II e III conforme proposto por Oréfice and Bahia Oliveira 2005, foram analisadas quanto ao seu tamanho e localização. A cada região foi atribuído um número conforme se segue: equatorial (1), macular (2), pólo posterior/mácula (3), pólo posterior (4) e regiões periféricas ou periferia (5). A foto retirada ao exame fundoscópico da retina mostrada na **Figura 5** indica as regiões com exceção da periferia (5) que não é visualizada neste tipo de fotografia. Cada lesão foi computada em separado independente se um mesmo indivíduo apresentava mais de uma lesão de um ou mais tipos, isto é, ou A ou B ou C, ou a combinação desses tipos, independente de sua localização. Assim dos 49 indivíduos portadores de lesões, foram consideradas para a análise de tamanho e localização: 15 lesões do tipo A, 34 lesões do tipo B e 36 lesões do tipo C.

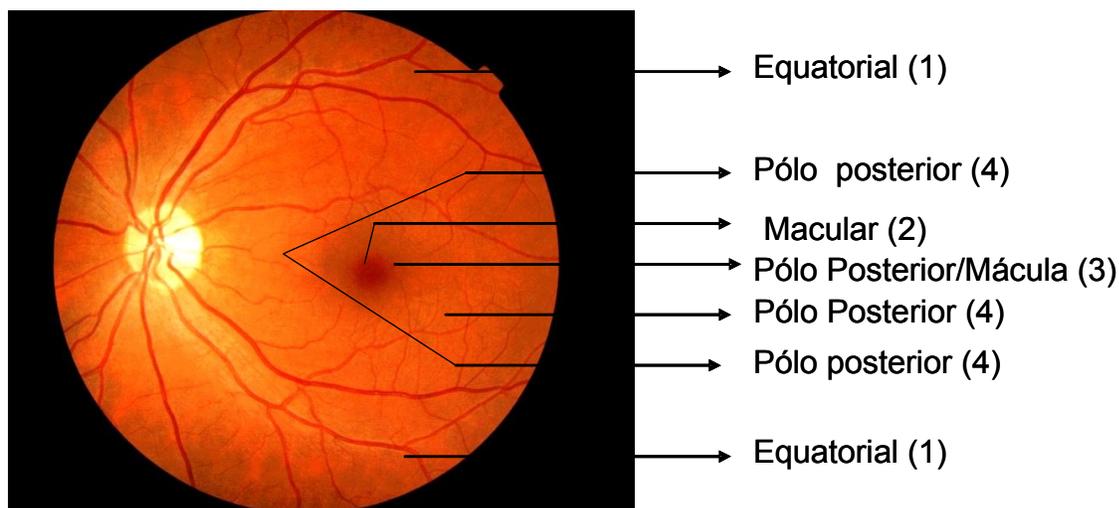


Figura 5: Fotografia fundoscópica da retina indicando as regiões: Equatorial (1) Macular (2), Pólo Posterior/Mácula (3) e Pólo Posterior (4).

5.1.1 Relação entre o Tipo de Lesão Retiniana e o seu Tamanho

As imagens das lesões de 49 indivíduos portadores de um ou mais tipos de lesão ocular (A, B ou C) foram analisadas minuciosamente, e todas as lesões, (totalizando 85) foram medidas em unidades de diâmetro de disco (o diâmetro do disco óptico de cada indivíduo foi usado como parâmetro para determinação do tamanho das lesões dos mesmos). As 15 lesões tipo A, 34 lesões tipo B e 36 lesões tipo C estão mostradas quanto à sua frequência de ocorrência pelo tamanho. Os valores em diâmetro de disco foram expressos em índices de tamanho conforme mostrado na **Tabela 5**, sendo que o valor numérico do índice não apresenta relação de proporção definida com o tamanho do disco.

Tabela 5: Avaliação da frequência de tamanho em diâmetros disciais de retinocoroidites toxoplásmicas tipo A, tipo B e tipo C

Tamanho da Lesão em Diâmetro de Disco (dd)	Código (índice) de Tamanho da Lesão Retiniana	Frequência de Ocorrência (n) de Cada Tipo de Lesão
0 – 0,5	1	A(3) B (17) C (35)
0,6 - 1	2	A(7) B (9) C (1)
1,1 – 1,5	3	A(2) B (6) C (0)
1,6 – 2,0	4	A(3) B (2) C (0)

A **Figura 6** mostra o gráfico representativo dos resultados obtidos a partir da análise de relação entre tipo de lesão (A, B e C) e índice de tamanho de lesão ocular (dd). Podemos observar que as lesões tipo A (mais severa) apresentam tamanho médio de lesão significativamente maior ($p \leq 0,001$) que lesões tipo C (menos severa), porém não significativamente maior que lesões tipo B (de severidade mediana). Diferença significativa ($p \leq 0,001$) em relação ao tamanho da lesão ocular também foi observada entre lesões tipo B e C, onde lesões mais brandas (tipo C) tendem a apresentar tamanho menor. Portanto, observamos que a severidade da lesão está

associada ao tamanho da mesma, ou seja, quanto mais severa a lesão, maior tende ser seu tamanho em medida de diâmetro de disco (**Figura 6**).

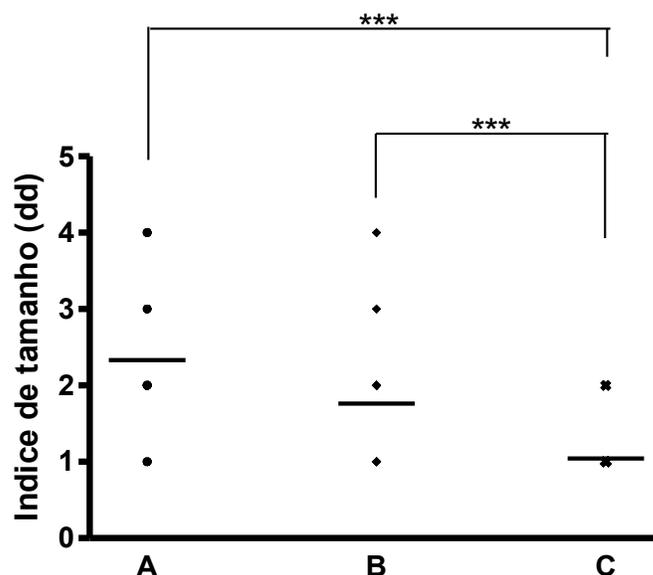


Figura 6: Índice de tamanho obtido a partir de valores atribuídos em diâmetro de disco (dd) e relacionados aos diferentes tipos de lesão ocular decorrente da infecção pelo *T. gondii*. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns. O símbolo *** representa a diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,001$) do tamanho da lesão entre os diferentes tipos de lesão (A, B e C). As barras indicam valores de mediana.

5.1.2 Relação entre o Tipo de Lesão Ocular e a Localização da Lesão na Retina

As 15 lesões tipo A, 34 lesões tipo B e 36 lesões tipo C, totalizando 85 lesões, também foram analisadas no contexto da frequência de sua localização na retina, utilizando-se códigos tomados como índices para denotar a sua localização conforme mostrado na **Tabela 6**. A atribuição das localizações em índices foi feita como a seguir:

Tabela 6: Avaliação da frequência de localização topográfica de retinocoroidites toxoplásmicas tipo A, tipo B e tipo C na retina

Região de Localização da Lesão	Código (índice) de Localização da Lesão na Retina*	Frequência de Ocorrência (n) de Cada Tipo de Lesão
Equatorial	1	A(6) B (15) C (9)
Macular	2	A(5) B (1) C (0)
Pólo Posterior/Mácula	3	A(1) B (0) C (0)
Pólo Posterior	4	A(1) B (5) C (2)
Periferia	5	A(2) B (13) C (25)

*conforme mostrado na Figura 5

A **Figura 7** mostra o gráfico representativo dos resultados obtidos a partir da análise de relação entre tipo de lesão (A, B e C) e índice de localização na retina das lesões oculares. Podemos observar que lesões mais severas (tipo A) apresentam média de índice de localização menor quando comparado aos valores médios obtidos pela localização das lesões B e C. Este fato mostra que a localização da lesão tipo A é preferencialmente em regiões mais próximas da mácula, enquanto que lesões tipo C localizam-se preferencialmente em regiões periféricas. Em resumo, observamos na **Fig. 7** que há tendência significativa de localização de lesões menos severas em direção a regiões mais periféricas.

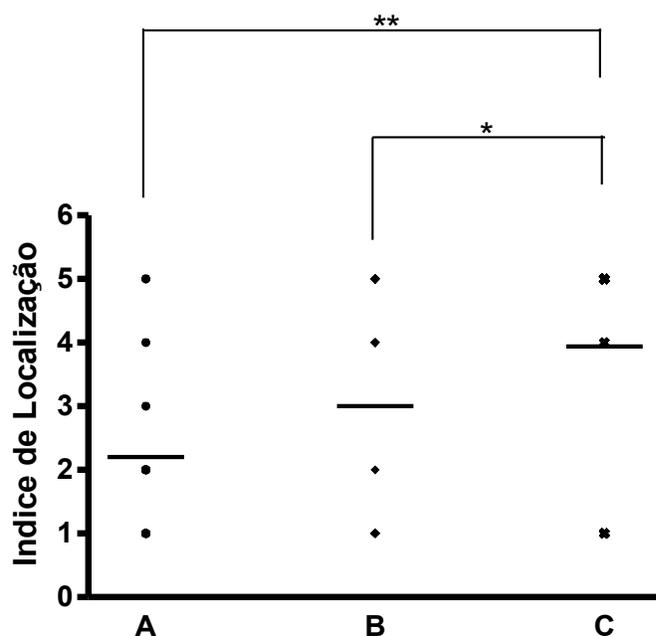


Figura 7: Índice de localização de regiões da retina, relacionado aos diferentes tipos de lesão ocular decorrente da infecção pelo *T. gondii*. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns. Os símbolos * e ** representam as diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente) da localização da lesão entre os diferentes tipos de lesão (A, B e C). As barras indicam valores de mediana.

5.2 Estudo Genético

Conforme descrito na Seção 4.2 (Material e Métodos), para o estudo genético foram genotipadas amostras de DNA de 72 pacientes afetados e 84 não afetados sendo 71 positivos para o *Toxoplasma gondii* e 13 com sorologia negativa para o parasita. Após genotipagem, as amostras foram investigadas quanto a influência de

polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes candidatos sobre a propensão ao desenvolvimento de retinocoroidites causadas pela toxoplasmose.

5.2.1 Freqüências Alélicas no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

O Equilíbrio ou princípio de Hardy-Weinberg considera que numa grande população, sob acasalamento ao acaso, na ausência de migração, mutação e seleção, as freqüências alélicas e genótípicas são constantes, de geração em geração. Portanto, as amostras estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando as freqüências alélicas observadas são próximas daquelas esperadas para a proporção de Hardy-Weinberg. Baseado nessa premissa, freqüências alélicas no EHW foram calculadas para cada genótipo marcador neste estudo. O resultado das análises não mostrou significância ($p \geq 0.05$) entre as freqüências alélicas observadas e esperadas para todos marcadores, exceto para os marcadores CFH_rs1061170 e IL-13_rs1800925 (**Tabela 7**). Após confirmação que a amostragem estava em equilíbrio, as análises genéticas foram iniciadas.

Tabela 7: Freqüências alélicas no Equilíbrio de Hard-Weinberg (EHW) e freqüências dos alelos de menor freqüência para cada marcador

Marcador	Alelo	Freqüência do Alelo de Menor Freqüência (%)	EHW
<i>ABCR_rs1801574</i>	A1	20,45	0,44
<i>ABCR_rs2297633</i>	A1	23,00	0,19
<i>ABCR_rs1761375</i>	A2	29,59	0,12
<i>ABCR_rs3112831</i>	A2	37,18	0,79
<i>ABCR_rs952499</i>	A1	52,13	0,19
<i>CFH_rs1061170</i>	A2	22,55	0.04
<i>TLR5_rs1053954</i>	A1	8,49	0.5
<i>TLR5_rs1341987</i>	A2	36,54	0.24
<i>TLR9_rs352140</i>	A1	42,55	0.14
<i>TLR9_rs5743836</i>	A1	20,41	0.07
<i>TLR2_rs3804099</i>	A2	47,37	0.91
<i>TLR2_rs5743708</i>	A1	0,98	0.94
<i>IL13_rs1800925</i>	A1	25,00	0,02
<i>IL13_rs2066960</i>	A1	11,70	0,61
<i>IL13_rs1295686</i>	A1	36,36	0,59
<i>IL4_rs2070874</i>	A1	29,35	0,16
<i>IL4_rs2227284</i>	A2	46,00	0.42
<i>IL4_rs2243270</i>	A1	39,13	0.98
<i>FOXQ1_rs1550199</i>	A1	46,77	0,38
<i>FOXQ1_rs920209</i>	A2	5,56	0,76
<i>TLR4_rs4986790</i>	A2	6,60	0.09
<i>TLR4_rs4986791</i>	A2	7,00	0.59
<i>COL2A1_rs2070739</i>	A1	9,43	0,45
<i>COL2A_rs2276455</i>	A2	49,04	0,78
<i>COL2A1_rs2276454</i>	A1	47,06	0,87
<i>COL2A_rs1635544</i>	A1	46,88	0,15
<i>COL2A_rs1793958</i>	A2	47,87	0,10
<i>COL2A1_rs3803183</i>	A1	21,15	0,78
<i>P2X7_rs208293</i>	A2	34,78	0,71
<i>P2X7_rs28360457</i>	N/A	N/A	N/A

<i>P2X7_rs1718119</i>	A2	33,33	0.66
<i>P2X7_rs2230911</i>	A1	16,04	0.52
<i>P2X7_rs2230912</i>	A1	7,45	0,58
<i>P2X7_rs3751143</i>	A2	23,00	0,61
<i>P2X7_rs1653624</i>	N/A	N/A	N/A
<i>P2X7_rs1621388</i>	A1	31,52	0,77

N/A – não analisados (homozigotos)

5.2.2 Análises de Associação

Métodos de ligação baseados em família são úteis para identificar regiões que estejam ligadas ao traço da doença. No entanto, essas regiões tendem ser grandes (10 – 20 cM) e podem conter numerosos genes que poderiam potencialmente ser o locus da doença (Jorde, 2000). De modo a definir essas regiões de ligação, métodos de associação baseados em família ou métodos caso-controle de associação baseados em população podem ser empregados de forma a estreitar tais intervalos para <1 Mb. Nesse estudo, especificamente, utilizamos três testes estatísticos de associação baseados em família: teste de desequilíbrio de transmissão (transmission disequilibrium teste – TDT), teste caso-pseudocontrole (Case-pseudocontrol test) e o teste de associação baseado em família (Family based association test – FBAT).

5.2.2.1 Cálculos de Poder para as Análises “Transmission Disequilibrium Test” (TDT) como uma Ferramenta para Estimar o Tamanho da Amostragem Adequada

Cálculo para verificar o poder da análise do TDT foi feita de modo a demonstrar a resolução potencial deste teste de associação baseado em família. Em geral, os resultados mostraram poder do TDT muito baixo em relação ao número de famílias com ambos pais equivalente a 30 (**Tabela 8**), usado neste estudo. Considerando uma frequência alélica de 0.5 e razão de chance (odds ratio) de 3, pode ser observado que até mesmo considerando-se um nível de significância equivalente a $p=0.05$, o poder de cálculo apresentou-se bastante baixo, em torno de 81.1%. À medida que, o nível de significância (p) e a razão de chance diminuíram, o poder estatístico se tornou ainda menor, para a mesma frequência alélica. É interessante notar ainda, que a frequência alélica se apresentou diretamente proporcional ao poder, o que significa que quando a frequência alélica é reduzida perde-se poder para detectar

associações, sendo necessário uma amostragem muito maior para tentar compensar. Pode também ser percebido na **Tabela 8** que, uma vez considerado o mesmo valor da razão de chance, o poder de análise diminui, quando é imposto um valor de p mais restrito, tal como 0,01 e 0,001. Isto ocorre porque a medida que o nível de significância (p) diminui, aumenta-se a chance da hipótese alternativa (há associação entre o marcador e a doença) se tornar mais próxima a 100%, reduzindo o poder estatístico.

Por meio deste tipo de cálculo, pode ser determinado o número adequado de trios (ambos os pais e filho) suficientes para conduzir um estudo de associação e/ou ligação genética. A faixa de razão de chance usada é apropriada para o cálculo em questão, posto que para doenças complexas, tal como toxoplasmose, é esperado encontrar vários genes contribuindo de forma modesta na causa da doença.

Tabela 8: Simulação do cálculo do poder do TDT para um estudo de associação baseado em família, consistindo de famílias com um único indivíduo afetado e seus genitores, baseado sobre o método Knapp (1999)

Frequência Alélica dos SNPs	Tamanho do Efeito (razão de chance)	% Poder N = 30 (Trios de ambos os Pais e Filho)		
		valor de p		
		0,05	0,01	0,001
0,5	3	81,1	57,3	26,6
	2	44,4	21,5	6,15
	1,5	19,0	6,59	1,27
0,4	3	75,0	49,2	20,4
	2	40,5	18,7	5,0
	1,5	17,9	6,1	1,13
0,3	3	64,5	37,4	13,0
	2	34,1	14,5	3,5
	1,5	15,7	5,1	0,9
0,2	3	48,2	23,1	6,2
	2	25,5	9,6	2,0
	1,5	12,7	3,8	0,6

5.2.2.2 Teste Estatístico “Transmission Disequilibrium Test” (TDT) para Investigar a Associação entre Marcadores e a Manifestação de Doença Ocular

Este teste de associação baseado em família foi usado para detectar a associação entre marcadores genotipados a partir de genes candidatos (descritos na metodologia) e a doença ocular toxoplásmica. Um sumário dos resultados das análises TDT é apresentado na **Tabela 9**. Foi observada uma enorme diferença, entre o número total de descendentes afetados genotipados e o número de transmissões informativas, o que pode ser explicado pela presença de famílias com pais ausentes. O teste TDT requer os dados de genotipagem de ambos pais para gerar os resultados e, por causa disso, somente as famílias completas foram consideradas neste teste. Além disso, famílias com pais homocigotos foram também consideradas não informativas, causando o decréscimo no número de famílias com ambos os pais, usadas para conduzir as análises TDT. Até mesmo para um número pequeno de transmissão informativa, três marcadores apresentaram uma associação significativa com a doença ocular nessas famílias (**Tabela 9**). Os marcadores *TLR9_rs352140* ($\chi^2= 7,20$; $p= 0,007$), *P2X7_rs1718119* ($\chi^2= 5,76$; $p= 0,02$) e *P2X7_rs1621388* ($\chi^2= 4,00$; $p= 0,05$) apresentaram valores de p menores ou iguais a 0,05 ($p \leq 0,05$), e todos os três marcadores mantiveram a significância no teste robusto. O resultado da distribuição qui-quadrada (χ^2) é também avaliado no teste TDT. Essa distribuição expressa a discrepância entre frequências observadas e esperadas, onde o maior valor de χ^2 é o menos concordante que há, entre frequências observadas e esperadas, enquanto que o menor valor de χ^2 significa que mais intimamente as frequências observadas e esperadas concordam entre si. Portanto, pode-se observar que para os três marcadores (*TLR9_rs352140*, *P2X7_rs1718119* e *P2X7_rs1621388*), que apresentaram significância ao nível de 5%, os valores de χ^2 a 1 grau de liberdade (1gl) foram maiores que àqueles valores apresentados pelos demais marcadores, considerando o mesmo nível de significância (**Tabela 9**). Este resultado sugere uma associação significativa entre esses marcadores e a apresentação da toxoplasmose ocular.

Tabela 9: Análise TDT baseada em família de marcadores presentes em genes candidatos potencialmente envolvidos com a manifestação ocular da toxoplasmose na população brasileira

Marcador	Nº de Descendentes Genotipados	Nº de Transmissões Informativas	TDT		TDT Robusto		
			χ^2 (1gl)	p	Nº de Grupos	χ^2 (1gl)	p
ABCR_rs1801574	57	12	1.33	0.25	10	1.33	0.25
ABCR_rs2297633	58	16	1.00	0.32	13	1.14	0.29
ABCR_rs1761375	57	19	0.47	0.49	15	0.47	0.49
ABCR_rs3112831	51	12	1.33	0.25	9	1.60	0.21
ABCR_rs952499	62	24	0.00	1.00	17	0.00	1.00
CFH_rs1061170	65	20	3.20	0.07	16	2.66	0.10
TLR5_rs1053954	65	9	1.00	0.32	7	1.00	0.31
TLR5_rs1341987	62	28	0.57	0.45	22	0.80	0.37
TLR9_rs352140	64	16	9.00	0.003	12	7.20	0.007
TLR9_rs5743836	63	20	0.20	0.65	13	0.17	0.68
TLR2_rs3804099	64	28	0.57	0.45	20	0.66	0.41
TLR2_rs5743708	66	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
IL13_rs1800925	60	11	0.09	0.76	10	0.11	0.74
IL13_rs2066960	62	9	1.00	0.32	8	1.28	0.26
IL13_rs1295686	59	21	1.19	0.28	15	0.86	0.35
IL4_rs2070874	57	20	0.20	0.65	15	0.15	0.69
IL4_rs2227284	55	17	0.06	0.81	13	0.08	0.78
IL4_rs2243270	58	18	0.22	0.64	13	0.20	0.65
FOXQ1_rs1550199	32	12	0.00	1.00	8	0.00	1.00
FOXQ1_rs920209	38	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TLR4_rs4986790	65	4	1.00	0.32	4	1.00	0.32
TLR4_rs4986791	65	5	0.20	0.65	5	0.20	0.65
COL2A1_rs2070739	64	7	1.28	0.26	7	1.28	0.26
COL2A_rs2276455	63	24	1.50	0.22	18	1.50	0.22
COL2A1_rs2276454	59	24	0.66	0.41	17	0.61	0.43
COL2A_rs1635544	59	15	1.66	0.20	12	1.19	0.28
COL2A_rs1793958	58	23	1.08	0.30	17	1.66	0.20
COL2A1_rs3803183	59	16	0.25	0.62	13	0.40	0.53
P2X7_rs208293	58	16	1.00	0.32	12	1.00	0.32
P2X7_rs28360457	65	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
P2X7_rs1718119	59	19	6.37	0.01	16	5.76	0.02
P2X7_rs2230911	64	11	0.09	0.76	9	0.09	0.76
P2X7_rs2230912	63	7	0.14	0.71	7	0.14	0.71
P2X7_rs3751143	61	17	0.06	0.81	13	0.08	0.78
P2X7_rs1653624	63	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
P2X7_rs1621388	60	16	4.00	0.05	14	4.00	0.05

N/A – não analisados

5.2.2.3 Análises Caso-Pseudocontrole Usadas em Estudos de Associação entre Marcadores Genéticos e o Fenótipo da Doença Ocular Toxoplásmica

Dados de genotipagem de SNPs foram também avaliados em relação “à associação com a toxoplasmose ocular, usando o teste Caso-Pseudocontrole baseado em família. Análises estatísticas mostraram $p \leq 0.05$ para os mesmos 3 marcadores dos genes *TLR9* e *P2X7* que apresentaram significância no teste TDT (**Tabela 10**). Esses marcadores, *TLR9_rs352140*, *P2X7_rs1718119* e *P2X7_rs1621388*, também apresentaram valores elevados da distribuição de χ^2 , o que indica desacordo entre as frequências observadas e esperadas. O valor da razão de chance (Odds Ratio) é também um parâmetro crucial para identificar associação entre marcadores e doenças. Os valores da razão de chance apresentados pelos marcadores *TLR9_rs352140*, *P2X7_rs1718119* e *P2X7_rs1621388* foram 7, 3.75 e 0.33, respectivamente (**Tabela 10**). Estes valores de razão de chance mostram que, apesar do fato dos três marcadores terem apresentado significância ao nível de 5%, a maneira pela qual cada um contribui em termos quantitativos para o desenvolvimento da doença ocular parece ser diferente. Os marcadores do gene *P2X7* apresentaram menor tamanho de efeito (effect size) em relação à associação com a doença, comparado com o tamanho de efeito mostrado pelo marcador do gene *TLR9*. Esse conjunto de dados confirma aquele obtido no teste TDT, reforçando a hipótese de envolvimento desses marcadores presentes nos genes candidatos *TLR9* e *P2X7* com a manifestação ocular da toxoplasmose, apesar do pequeno número de famílias com ambos os genitores avaliados neste estudo.

Tabela 10: Análise genética baseada em família usando o teste Caso-Pseudocontrole para detectar associação entre marcadores e manifestação ocular da toxoplasmose

Marcador	Nº de Famílias com ambos Pais Inteiramente Genotipadas	Teste Não-Robusto					Teste Robusto				
		p (0.05)		χ^2		OR	p (0.05)		χ^2		OR
		alelo	genótipo	alelo	genótipo	alelo	alelo	genótipo	alelo	genótipo	alelo
ABCR_rs1801574	18	0.24	0.14	1.36	3.94	0.50	0.29	0.21	1.1	3.15	0.50
ABCR_rs2297633	21	0.31	0.59	1.01	1.07	1.66	0.28	0.57	1.19	1.14	1.66
ABCR_rs1761375	23	0.49	0.56	0.48	1.16	0.72	0.48	0.52	0.5	1.3	0.72
ABCR_rs3112831	13	0.24	0.46	1.36	1.57	0.50	0.19	0.32	1.71	2.27	0.50
ABCR_rs952499	22	1.00	0.77	0.00	0.53	1.00	1.00	0.76	0.00	0.55	1.00
CFH_rs1061170	22	0.07	N/A	3.29	N/A	2.33	0.09	N/A	2.93	N/A	2.33
TLR5_rs1053954	26	0.31	0.46	1.02	1.56	0.50	0.30	N/A	1.08	N/A	0.50
TLR5_rs1341987	26	0.45	0.56	0.57	1.17	1.33	0.38	0.61	0.77	1	1.33
TLR9_rs352140	19	0.002	0.01	10.12	10.13	7.00	0.01	0.03	7.14	7.26	7.00
TLR9_rs5743836	22	N/A	0.65	N/A	0.20	0.82	0.67	N/A	0.669	N/A	0.82
TLR2_rs3804099	29	0.45	0.48	0.57	1.47	1.33	0.42	0.56	0.64	1.17	1.33
TLR2_rs5743708	22	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
IL13_rs1800925	20	0.76	0.75	0.09	0.59	0.83	0.74	N/A	0.11	N/A	0.83
IL13_rs2066960	20	0.31	0.53	1.02	1.27	0.50	0.27	N/A	1.24	N/A	0.50
IL13_rs1295686	21	0.27	0.09	1.20	4.86	1.62	0.34	0.10	0.9	4.63	1.62
IL4_rs2070874	22	0.65	0.73	0.20	0.61	0.81	0.70	0.74	0.15	0.6	0.81
IL4_rs2227284	24	0.81	0.67	0.06	0.80	1.12	0.78	0.66	0.08	0.82	1.12
IL4_rs2243270	21	0.64	0.68	0.22	0.78	1.25	0.65	0.69	0.2	0.76	1.25
FOXQ1_rs1550199	15	1.00	0.77	0.00	0.53	1.54	1.00	0.78	0.00	0.5	1.54
FOXQ1_rs920209	6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
TLR4_rs4986790	24	0.31	0.31	1.05	1.05	0.33	0.34	0.34	0.91	0.91	0.33
TLR4_rs4986791	21	0.65	0.65	0.20	0.20	1.50	0.66	0.66	0.2	0.2	1.50
COL2A1_rs2070739	25	0.25	0.25	1.33	1.33	0.40	0.27	0.27	1.2	1.2	0.40
COL2A_rs2276455	24	0.22	0.38	1.52	1.92	0.60	0.22	0.38	1.48	1.95	0.60
COL2A1_rs2276454	24	0.41	0.71	0.67	0.67	1.40	0.43	0.72	0.63	0.65	1.40
COL2A_rs1635544	22	0.19	0.39	1.70	1.87	2.00	0.25	0.49	1.33	1.41	2.00
COL2A_rs1793958	21	0.30	0.28	1.10	2.55	1.55	0.22	0.45	1.53	1.58	1.55
COL2A1_rs3803183	25	0.62	0.42	0.25	1.73	0.77	0.53	N/A	0.4	N/A	0.77
P2X7_rs208293	19	0.31	0.20	1.01	3.2	1.66	0.33	0.23	0.95	2.94	1.66
P2X7_rs28360457	25	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
P2X7_rs1718119	23	0.01	N/A	6.78	N/A	3.75	0.02	N/A	5.8	N/A	3.75
P2X7_rs2230911	26	0.76	0.53	0.09	1.27	0.83	0.77	0.60	0.09	1.03	0.83
P2X7_rs2230912	21	0.71	0.71	0.14	0.14	0.75	0.71	0.71	0.14	0.14	0.75
P2X7_rs3751143	24	0.81	0.06	0.89	0.24	0.88	0.78	0.86	0.08	0.3	0.88
P2X7_rs1653624	25	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
P2X7_rs1621388	20	0.04	N/A	4.19	5.1	0.33	0.05	N/A	3.95	N/A	0.33

OR- Odds Ratio (razão de chance); N/A – não analisados

5.2.2.4 Teste de Associação Baseado em Família (FBAT) usado para Detectar Associação entre os SNPs e a Toxoplasmose Ocular

Como previamente descrito, o FBAT é um teste baseado em família no qual modelos genéticos diferentes podem ser avaliados, tais como aditivo, dominante, recessivo e genotípico. Os outros métodos baseados em família usados neste estudo geraram os resultados apenas usando o modelo aditivo ou multiplicativo. Os três marcadores dos genes *P2X7* e *TLR9*, que apresentaram valores de $p \leq 0.05$ nos testes TDT e Caso-Pseudocontrole, também mantiveram a significância no teste FBAT para todos os modelos (**Tabela 11**). Entretanto, outros cinco marcadores dos genes *ABCR* (rs1801574), *COL2A* (rs1635544, rs2276455, rs2070739) e *CFH* (rs1061170) também apresentaram valores de p significantes nos modelos dominante, recessivo e genotípico, mas não no modelo aditivo, como observado nos outros testes, de análise de associação, empregados neste estudo (**Tabela 11**). Para esses últimos cinco marcadores citados, pôde-se observar que eles apresentaram melhor resultado para o modelo dominante do que para o modelo aditivo. Isto pode indicar um “parent of origin”, que é um fenômeno no qual o efeito de um alelo particular sobre o risco de doença varia de acordo com a fonte parental do alelo. Tabelas contendo os resultados completos obtidos na análise FBAT encontram-se no **anexo 2**.

Tabela 11: Teste de associação baseado em família (FBAT) para correlacionar polimorfismos em nucleotídeo único (SNP) nos genes candidatos com a toxoplasmose ocular

Marcador	FBAT								
	Aditivo		Dominante		Recessivo		Genotípico		
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1/A1	A1/A2	A2/A2
<i>ABCR_rs1801574</i>	0.14	0.14	0.03	N/A	N/A	0.03	N/A	0.01	0.03
<i>ABCR_rs2297633</i>	0.24	0.24	0.17	N/A	N/A	0.17	N/A	0.17	0.18
<i>ABCR_rs1761375</i>	0.73	0.73	N/A	0.54	0.54	N/A	0.54	0.43	N/A
<i>ABCR_rs3112831</i>	0.41	0.41	N/A	0.48	0.48	N/A	0.48	0.78	N/A
<i>ABCR_rs952499</i>	0.34	0.34	0.22	0.77	0.77	0.22	0.77	0.53	0.22
<i>CFH_rs1061170</i>	0.06	0.06	N/A	0.05	0.05	N/A	0.05	0.09	N/A
<i>TLR5_rs1053954</i>	0.21	0.21	0.31	N/A	N/A	0.31	N/A	0.53	0.31
<i>TLR5_rs1341987</i>	0.92	0.92	0.57	0.61	0.61	0.57	0.61	0.43	0.57
<i>TLR9_rs352140</i>	2*10⁻⁵	2*10⁻⁵	5*10⁻⁴	0.003	0.003	5*10⁻⁴	3.0*10⁻³	0.21	4.8*10⁻⁴
<i>TLR9_rs5743836</i>	0.95	0.95	0.55	N/A	N/A	0.55	N/A	0.23	0.55
<i>TLR2_rs3804099</i>	0.49	0.49	0.64	0.57	0.57	0.64	0.57	0.93	0.64
<i>TLR2_rs5743708</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>IL13_rs1800925</i>	0.48	0.48	0.67	N/A	N/A	0.67	N/A	0.92	0.67
<i>IL13_rs2066960</i>	0.61	0.61	0.97	N/A	N/A	0.97	N/A	0.50	0.97
<i>IL13_rs1295686</i>	0.72	0.72	0.57	N/A	N/A	0.57	N/A	0.15	0.57
<i>IL4_rs2070874</i>	0.65	0.65	0.97	0.40	0.40	0.97	0.40	0.65	0.97
<i>IL4_rs2227284</i>	0.79	0.79	0.98	0.68	0.68	0.98	0.68	0.77	0.98
<i>IL4_rs2243270</i>	0.91	0.91	0.79	0.87	0.87	0.79	0.87	0.71	0.79
<i>FOXQ1_rs1550199</i>	0.63	0.63	0.18	N/A	N/A	0.18	N/A	0.11	0.18
<i>FOXQ1_rs920209</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>TLR4_rs4986790</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>TLR4_rs4986791</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>COL2A1_rs2070739</i>	0.15	0.15	0.15	0.02	N/A	0.10	N/A	0.15	0.15
<i>COL2A_rs2276455</i>	0.07	0.07	0.01	0.89	0.89	0.01	0.89	0.08	0.02
<i>COL2A1_rs2276454</i>	0.40	0.40	1.00	0.20	0.20	1.00	0.27	0.39	1.00
<i>COL2A_rs1635544</i>	0.06	0.06	0.87	0.01	0.01	0.87	0.01	0.03	0.88
<i>COL2A_rs1793958</i>	0.34	0.34	0.46	0.48	0.48	0.46	0.49	0.95	0.46
<i>COL2A1_rs3803183</i>	0.4	0.4	0.5	N/A	N/A	0.5	N/A	0.65	0.50
<i>P2X7_rs208293</i>	0.06	0.06	0.81	0.01	0.01	0.81	0.01	0.04	0.81
<i>P2X7_rs28360457</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>P2X7_rs1718119</i>	0.002	0.002	N/A	0.01	0.01	N/A	0.007	0.07	N/A
<i>P2X7_rs2230911</i>	0.30	0.30	0.17	N/A	N/A	0.17	N/A	0.11	0.17
<i>P2X7_rs2230912</i>	0.63	0.63	0.63	N/A	N/A	0.63	N/A	0.63	0.63
<i>P2X7_rs3751143</i>	0.96	0.96	N/A	0.51	0.51	N/A	0.51	0.23	N/A
<i>P2X7_rs1653624</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>P2X7_rs1621388</i>	0.011	0.011	0.026	N/A	N/A	0.026	N/A	0.11	0.03

5.2.3 Relação entre Genótipo e Tipo de Lesão Ocular Toxoplásmica

Indivíduos portadores de doença ocular foram classificados em três tipos (A, B e C), neste estudo, de acordo com a severidade da lesão causada pela toxoplasmose. Visto que no estudo genético indivíduos portadores de polimorfismos em nucleotídeo único nos genes *ABCA4*, *CFH*, *COL2A1* e, principalmente, em *P2X7* e *TLR9* apresentaram maior propensão ao desenvolvimento de lesões oculares toxoplásmicas, fomos investigar se havia correlação entre genótipo para os marcadores e severidade da lesão ocular apresentada. Dos SNPs supracitados 5 estão localizados em regiões exônicas, enquanto 2 em regiões de introns. Dentre os SNPs localizados em regiões de exons, 3 configuram mudança de aminoácido, sendo eles: *CFH_rs1061170* (Tyr-402-His), *COL2A1_rs2070739* (Ser-1405-Gly) e *P2X7_rs1718119* (Thr-348-Ala).

A **Figura 8** mostra a proporção de indivíduos portadores de lesão A, B e C, que possuem genótipos GG, GC ou CC para o marcador *ABCR_rs1801574*. Indivíduos com genótipo GG e GC tendem apresentar mais lesões tipo C que indivíduos cujos genótipos são CC. Por outro lado, indivíduos portadores de genótipo GC e CC preferencialmente apresentam genótipo tipo B e tipo A. Portanto, indivíduos portadores de genótipo GC tendem apresentar mais lesões tipo C e A do que lesões tipo B.

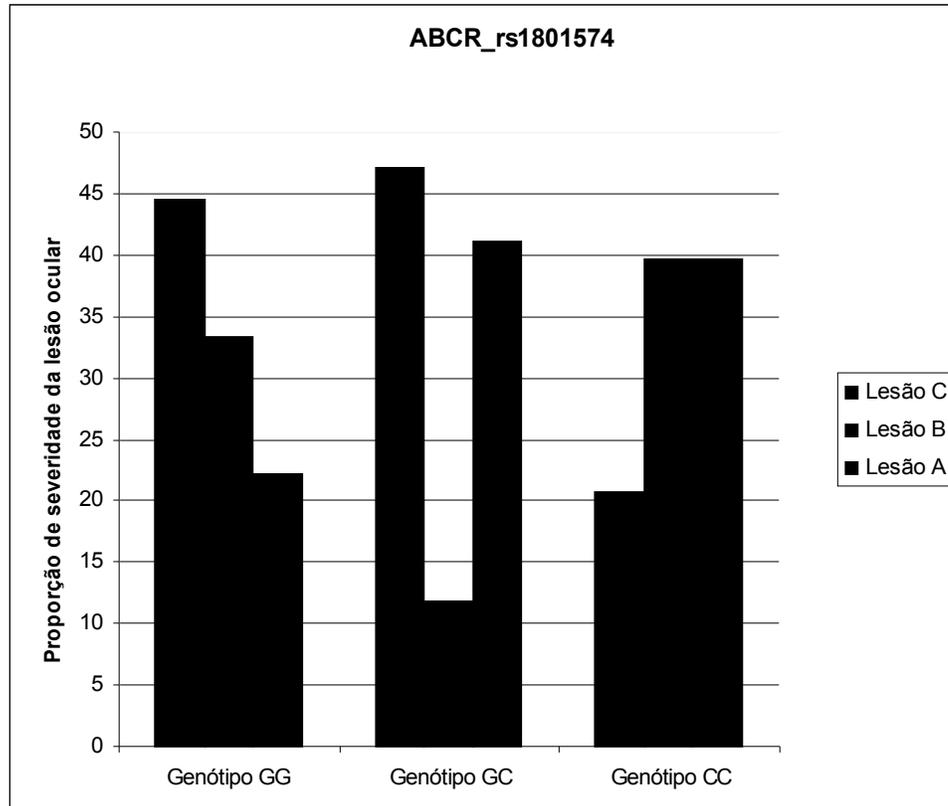


Figura 8: Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo homocigoto para o alelo 1 (GG), heterocigoto para os alelos 1 e 2 (GC) ou homocigoto para o alelo 2 (CC) do marcador ABCR_rs1801574.

A proporção de indivíduos portadores de lesão A, B e C, que possuem genótipos CC, CT ou TT para o marcador CFH_rs1061170 está representada na **Figura 9**. Indivíduos homocigotos para ambos alelos (CC ou TT) apresentam maior tendência a manifestação de lesões severas (tipo B e A), enquanto indivíduos heterocigotos (CT) possuem maior propensão ao desenvolvimento de lesões de menor severidade como, por exemplo, lesões tipo C.

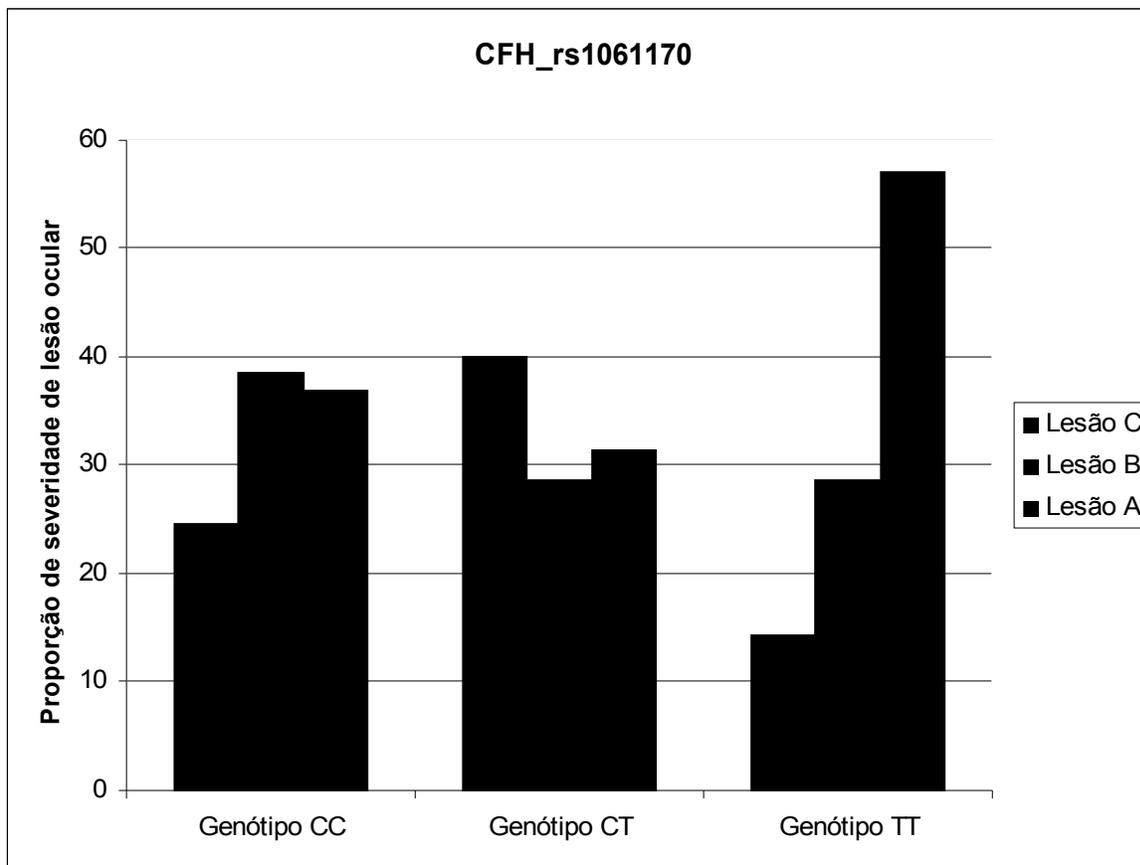


Figura 9: Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo homocigoto para o alelo 1 (CC), heterocigoto para os alelos 1 e 2 (CT) ou homocigoto para o alelo 2 (TT) do marcador CFH_rs1061170.

Em **Fig. 10** observamos que indivíduos portadores de genótipo TT e TC para o marcador COL2A1_rs1635544 tendem manifestar lesões mais severas (tipo A e tipo B) que indivíduos portadores de genótipo CC para o mesmo marcador, os quais apresentam maior número de indivíduos com lesão tipo C.

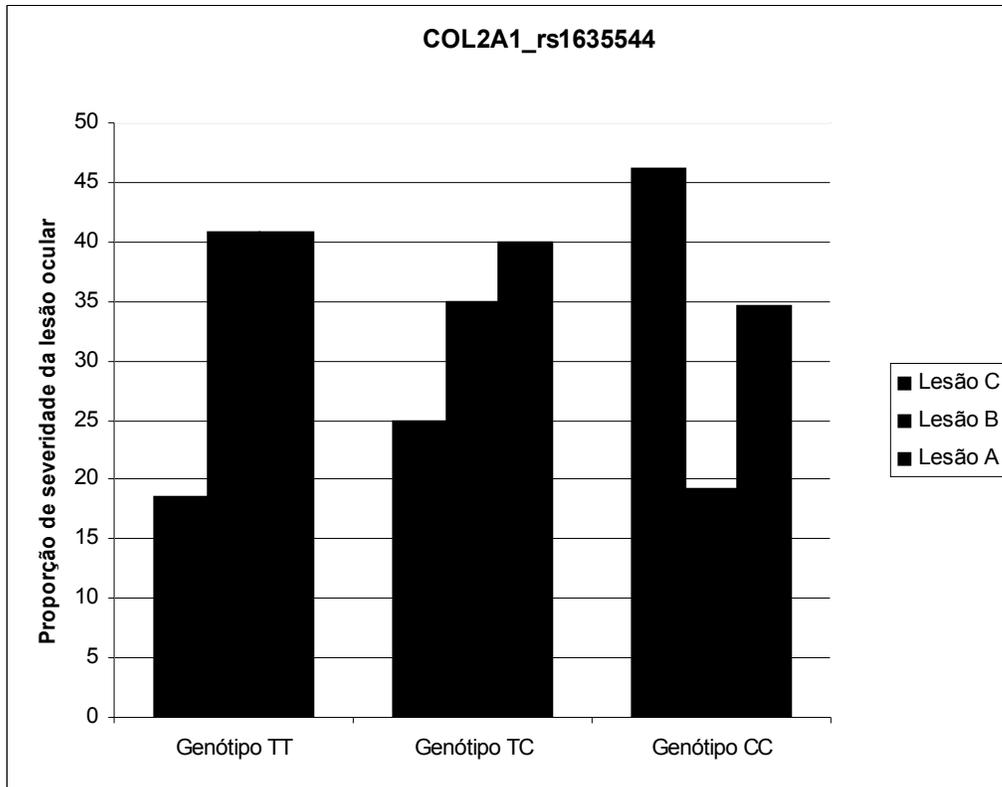


Figura 10: Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo homocigoto para o alelo 1 (TT), heterocigoto para os alelos 1 e 2 (TC) ou homocigoto para o alelo 2 (CC) do marcador COL2A1_rs1635544.

A **Figura 11** mostra os resultados relativos a proporção de indivíduos portadores de lesão tipo A, tipo B e tipo C que possuem genótipos AA, AG e GG para o marcador COL2A1_rs2276455. Neste caso, observamos que os genótipos AA e AG estão relacionados ao maior número de indivíduos com lesão tipo C e tipo A, enquanto o genótipo GG está claramente associado a manifestação de lesões mais severas.

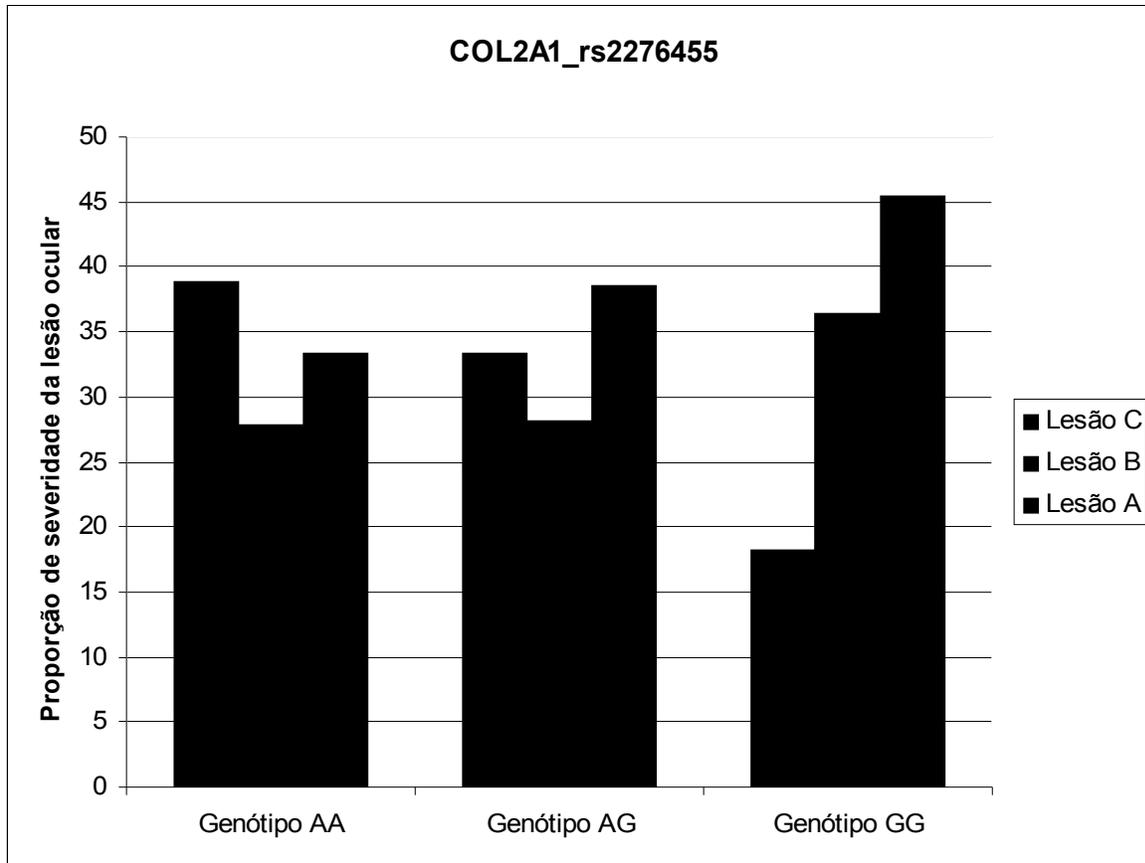


Figura 11: Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo homocigoto para o alelo 1 (AA), heterocigoto para os alelos 1 e 2 (AG) ou homocigoto para o alelo 2 (GG) do marcador COL2A1_rs2276455.

A análise da proporção de indivíduos com lesão A, B e C portadores de genótipos TT, TC e CC para o marcador COL2A1_rs2070739, revelou que os três genótipos possuem maior número de indivíduos com lesões mais severas, sendo que nenhum indivíduo com lesão tipo C apresentou genótipo TT (**Figura 12**).

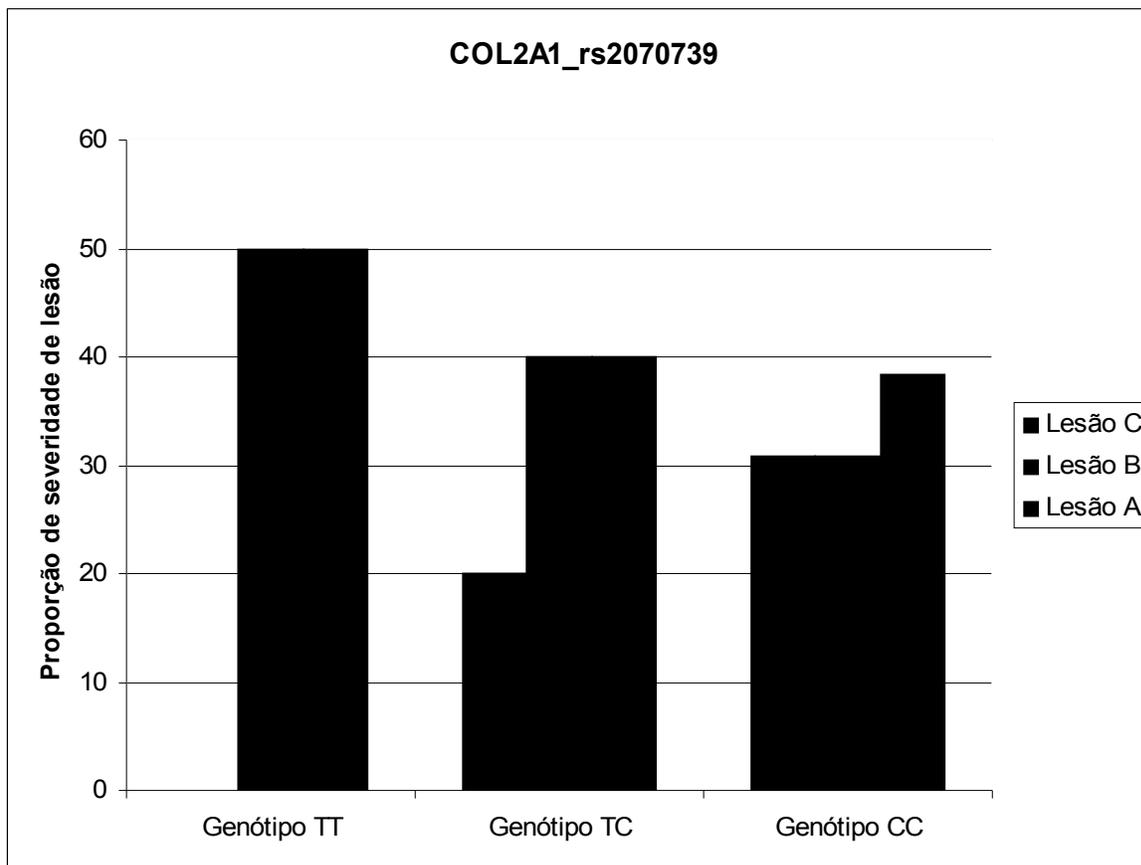


Figura 12: Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo homozigoto para o alelo 1 (TT), heterozigoto para os alelos 1 e 2 (TC) ou homozigoto para o alelo 2 (CC) do marcador COL2A1_rs2070739.

As **figuras 13 e 14** mostram os resultados referentes aos marcadores do gene *P2X7* que apresentaram significância no estudo baseado em família.

Na **Figura 13** observamos que genótipos AA e GG, para o marcador rs1718119, possuem maior número de indivíduos com lesão severa tipo B e tipo A, respectivamente. Enquanto genótipo heterozigoto (AG), para o mesmo marcador, possui maior número de indivíduos com lesão tipo C e lesão tipo A. Nenhum indivíduo com lesão tipo B apresentou genótipo GG.

Por outro lado, na **Figura 14** observamos que genótipos AA e GG, para o marcador rs1621388, está associado ao maior número de indivíduos com lesão tipo A

e tipo B, respectivamente; e que o genótipo AG possui maior número de indivíduos com lesão tipo C e tipo A.

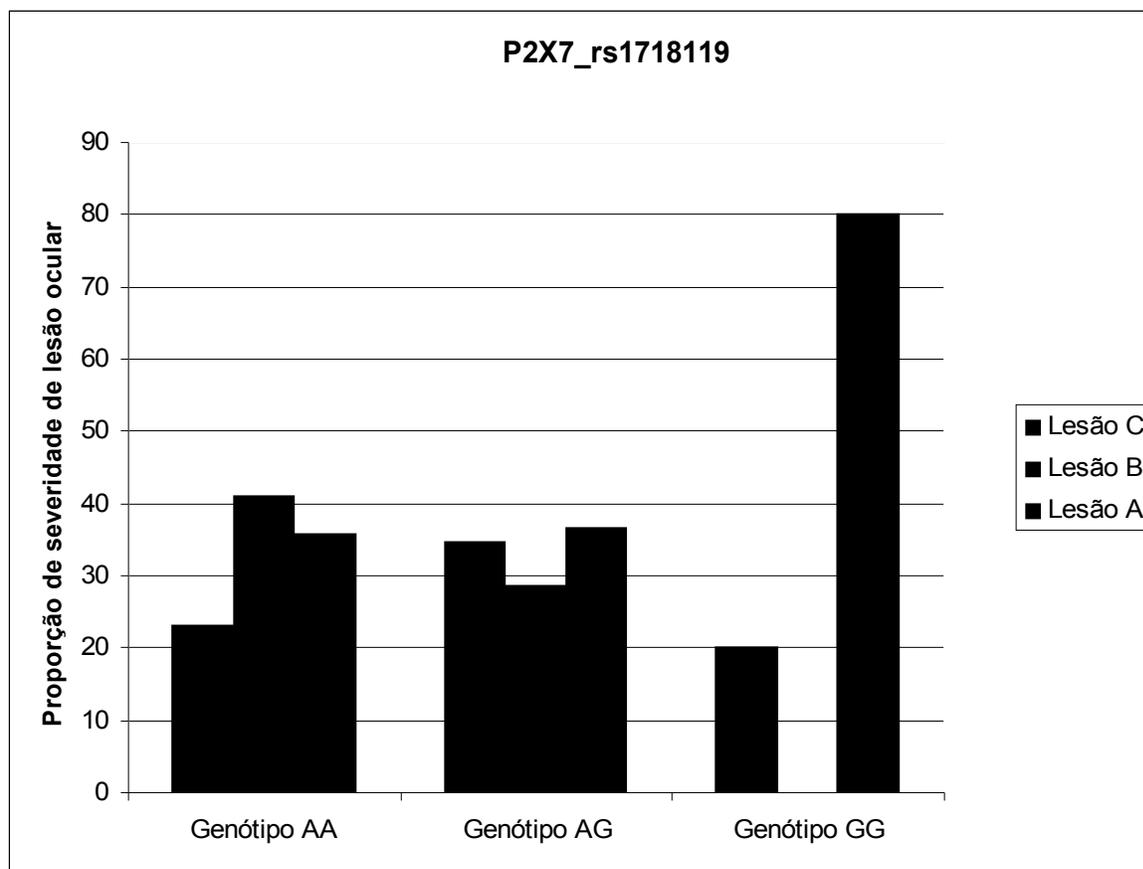


Figura 13: Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo homocigoto para o alelo 1 (AA), heterocigoto para os alelos 1 e 2 (AG) ou homocigoto para o alelo 2 (GG) do marcador P2X7_rs1718119.

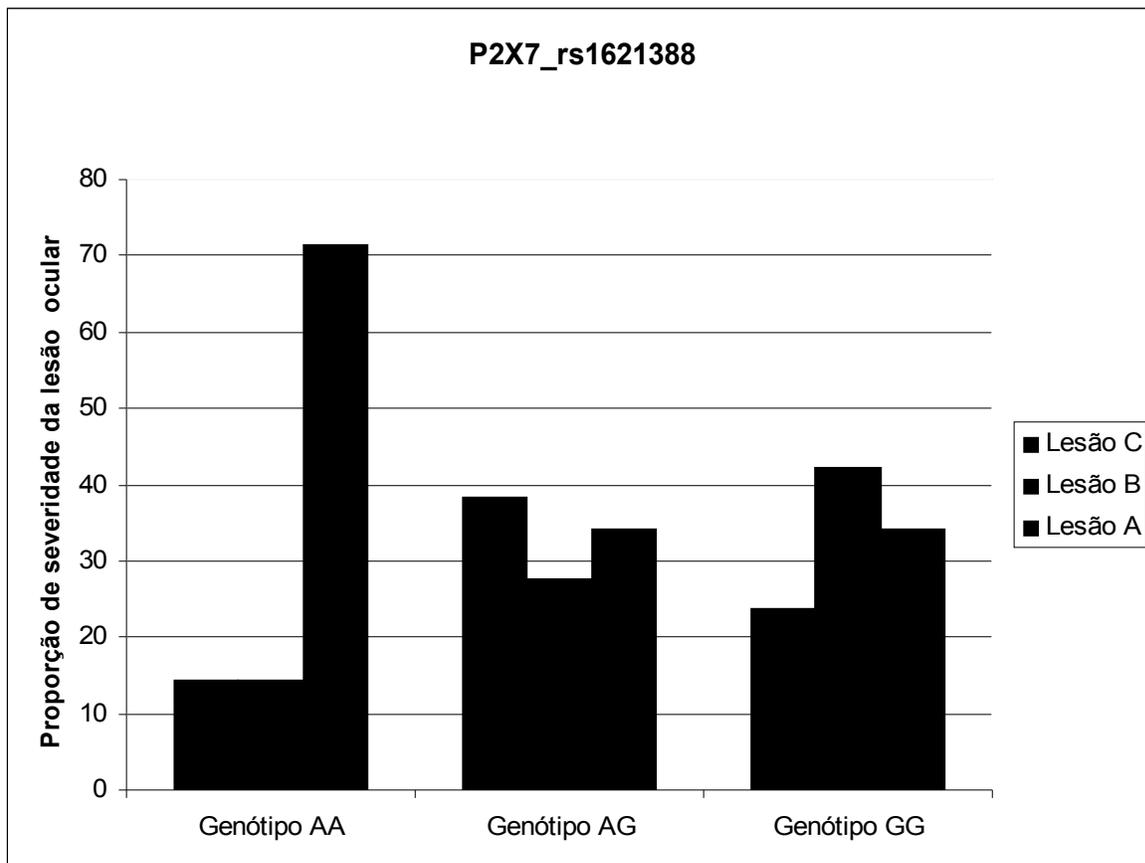


Figura 14: Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo homocigoto para o alelo 1 (AA), heterocigoto para os alelos 1 e 2 (AG) ou homocigoto para o alelo 2 (GG) do marcador P2X7_rs1621388.

A **Figura 15** mostra a proporção de indivíduos com lesão A, B e C em relação ao genótipo CC, CT e TT apresentado para o marcador TLR9_rs352140. Indivíduos com genótipo CC tendem apresentar mais lesões tipo B que A e C, respectivamente; enquanto indivíduos com genótipo TT tendem apresentar mais lesões tipo A que tipo

B e C. Indivíduos heterozigotos para este marcador apresentam propensão semelhante de manifestação de lesão tipo A, B e C.

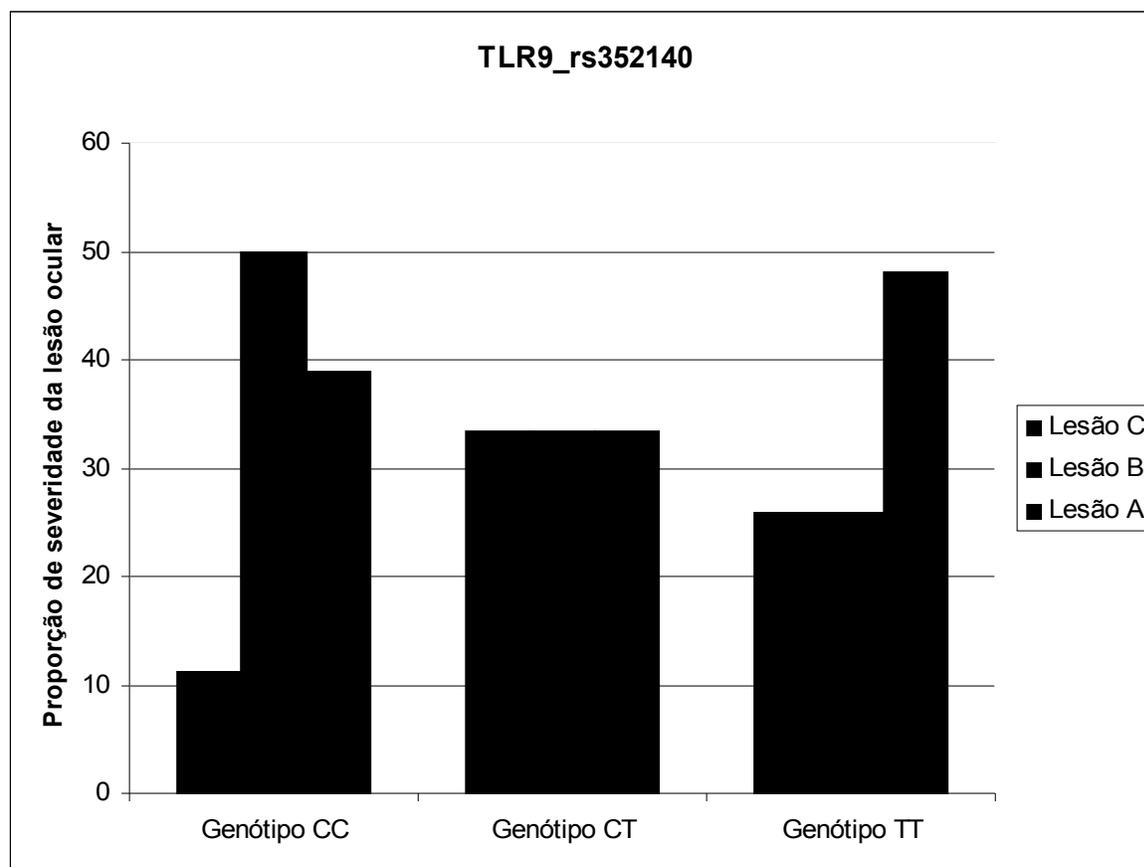


Figura 15: Avaliação da proporção de indivíduos portadores de diferentes fenótipos da lesão ocular toxoplásmica (A, B e C) com genótipo homocigoto para o alelo 1 (CC), heterocigoto para os alelos 1 e 2 (CT) ou homocigoto para o alelo 2 (TT) do marcador TLR9_rs352140.

Este conjunto de dados não nos permite demonstrar que a propensão ao desenvolvimento de lesões oculares, mostrada pela significância desses marcadores no estudo genético baseado em família, esteja claramente associada ao genótipo apresentado para cada marcador. Entretanto, estudos posteriores com número maior de indivíduos será conduzido no intuito de avaliar melhor esta questão.

5.3 Estudo Imunológico

A resposta imune específica para o *T. gondii* foi avaliada por meio de dosagem de citocinas pela técnica de “Cytometric Beads Array” (CBA) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), de indivíduos soropositivos e soronegativos para toxoplasmose, portadores de doença ocular ou não. As culturas de PBMC foram estimuladas com extrato solúvel de *T. gondii* (STAg) e com antígeno inespecífico de SEB. Todavia, os resultados de produção de citocinas após estímulo com SEB foram usados como parâmetro de controle do experimento e, portanto, não serão mostrados.

Os resultados das análises fornecidos pelos softwares Cell Quest e FCAP Array (no caso de IL-13) foram expressos em intensidade média de fluorescência (MFI) e concentração (pg/ml). Os gráficos apresentados a seguir mostram os resultados das análises em concentração e a comparação dos níveis de citocinas produzidos intra e/ou intergrupos. Amostras que apresentaram valor de concentração igual e/ou menor que zero (≤ 0.00 pg/ml), porém, valor de MFI diferente de zero, tiveram seus valores de MFI convertidos em pg/ml por meio de regra de três, uma vez que apresentavam valor de R^2 da equação maior e/ou igual que 0,9 (**dados não-mostrados**).

5.3.1 Perfil de Produção de Citocinas *in vitro* por PBMC de Diferentes Grupos de Indivíduos

A dosagem de sete citocinas (IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-10 e IL-13) foi realizada em todos os grupos de pacientes deste estudo, no primeiro e sexto dias após o início das culturas por meio de CBA.

No entanto, níveis detectáveis de citocinas produzidas espontaneamente, isto é, no primeiro dia após o início das culturas, foram obtidos somente para TNF- α e IL-10. As demais citocinas não apresentaram níveis detectáveis em sobrenadantes de primeiro dia de cultura e, portanto, resultados referentes à produção espontânea de tais citocinas não serão mostrados. Todas as citocinas avaliadas apresentaram níveis detectáveis em sobrenadantes de culturas de sexto dia como mostrado a seguir.

5.3.1.2 Dosagem das Citocinas TNF- α e IL-10 em Sobrenadantes de Cultura de PBMC Coletadas no Primeiro Dia após o Início da Cultura

Os resultados das análises de produção das citocinas TNF- α e IL-10, dosadas em amostras de sobrenadante de cultura coletadas no primeiro dia após o início das culturas, são mostrados nas **figuras 16 e 17**, respectivamente.

Na **Fig. 16A** podemos observar que não há diferença significativa da produção de TNF- α entre os grupos de indivíduos soropositivos e soronegativos. E que essa ausência de aumento considerável da produção de TNF- α persistiu mesmo após a adição de STAg às culturas.

Perfil de resultados semelhantes ao da **Fig. 16A** pode ser observado em **16B e 16C**, onde também não se observou aumento significativo da produção de TNF- α , entre os grupos avaliados, mesmo após estímulo com antígeno de *T. gondii*.

Na **Fig. 16D** é importante notar que indivíduos portadores de lesão ocular tipo C apresentaram níveis de TNF- α maiores comparado aos níveis de produção dessa citocina por indivíduos portadores de outros tipos de lesão ocular e indivíduos soronegativos (SN), apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa. E que os níveis de produção de TNF- α por indivíduos portadores de lesão tipo C foram semelhantes aos níveis de produção dessa citocina por indivíduos sem lesão ocular (SL).

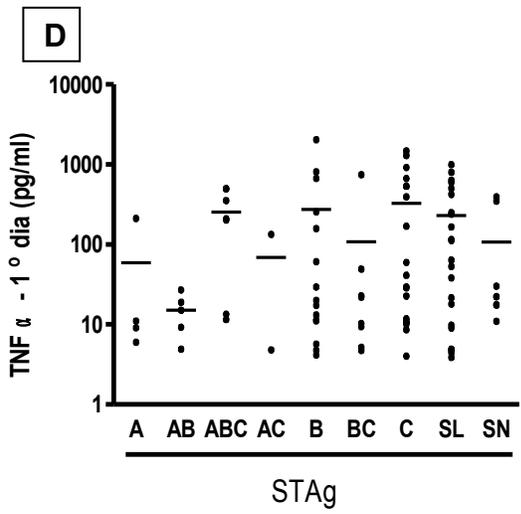
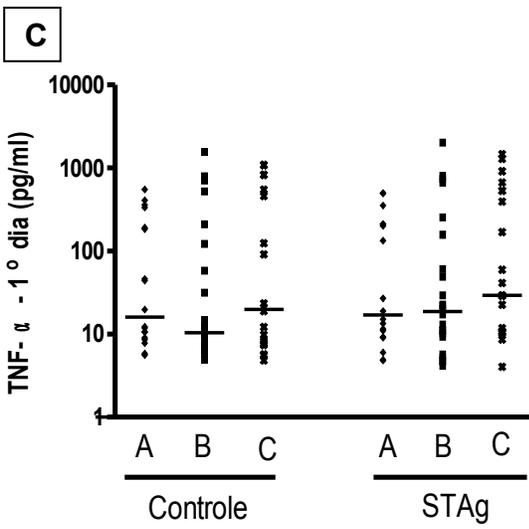
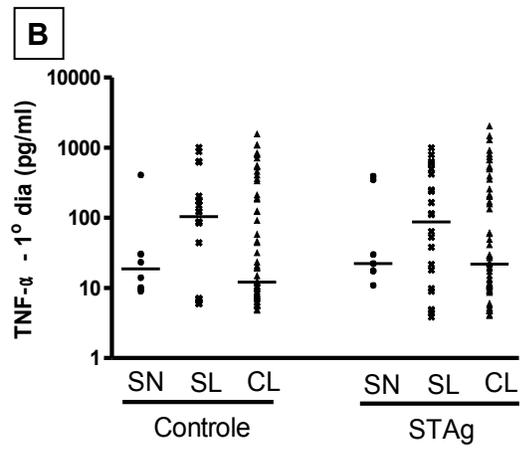
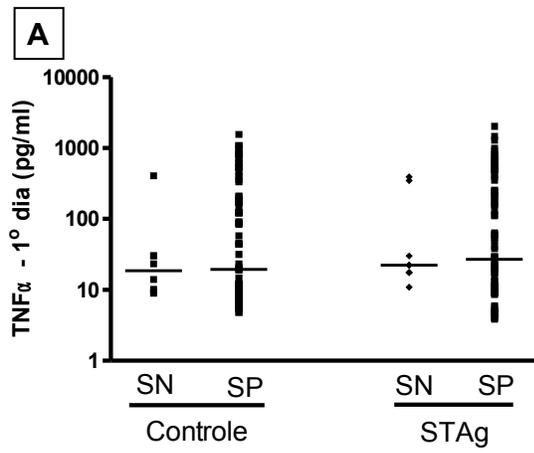
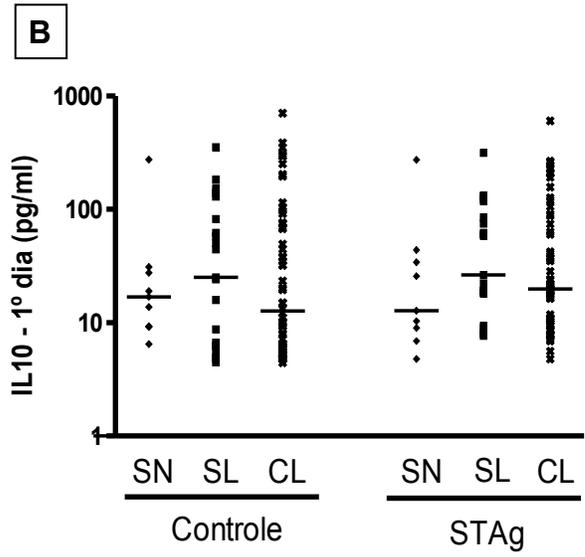
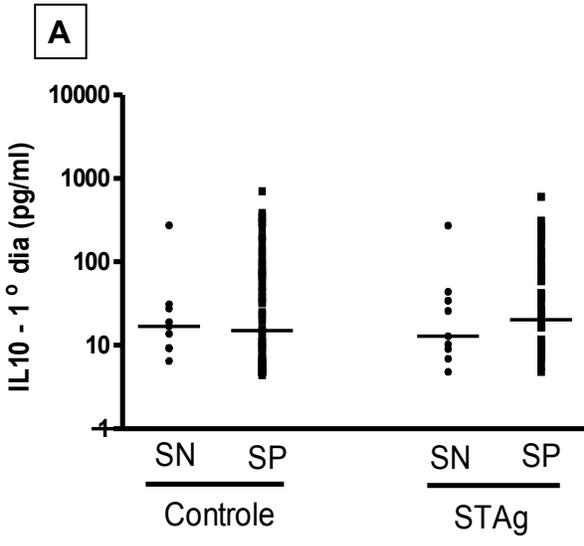


Figura 16: Avaliação da produção de TNF- α em sobrenadantes de cultura de PBMC coletadas no primeiro dia após o início da cultura. Comparação da produção de TNF- α entre: **A** - indivíduos soronegativos (SN) e soropositivos (SP) para toxoplasmose; **B** – indivíduos soronegativos (SN), soropositivos sem lesão ocular (SL) e soropositivos e/ou soronegativos com lesão ocular (CL); **C** – indivíduos com lesão tipo A e/ou AB, ABC e AC (A), indivíduos com lesão tipo B e/ou BC (B) e indivíduos com lesão tipo C (C), sob estímulo antigênico específico (STAg) ou Controle sem estímulo; **D** – indivíduos agrupados como sendo portadores de lesão tipo A, AB, ABC, AC, B, BC, C, soropositivos sem lesão (SL) e soronegativos (SN) submetidos ao estímulo de STAg. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal- Wallis seguido de Dunns para comparação entre mais de dois grupos, enquanto para comparação entre 2 grupos o teste aplicado foi Mann-Whitney. Os testes consideraram o nível de significância de 5%. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

Semelhante aos resultados de avaliação da produção espontânea de TNF- α , na **Fig. 17A** podemos observar também que não há diferença significativa da produção de IL-10 entre os grupos de indivíduos soropositivos e soronegativos. E que essa ausência de aumento considerável da produção de IL-10 persistiu mesmo após a adição de STAg às culturas.

Em **17B** e **17C**, também não se observou aumento significativo da produção de IL-10, entre os grupos avaliados, mesmo após estímulo com antígeno de *T. gondii*. Na **Fig. 17D** notamos que indivíduos portadores de lesão ocular tipo C apresentaram níveis de IL-10 semelhantes aos níveis de produção dessa citocina por indivíduos sem lesão ocular (SL).

Em síntese, não foi observada diferença significativa da produção espontânea de TNF- α e IL-10 entre e/ou intra-grupos analisados.



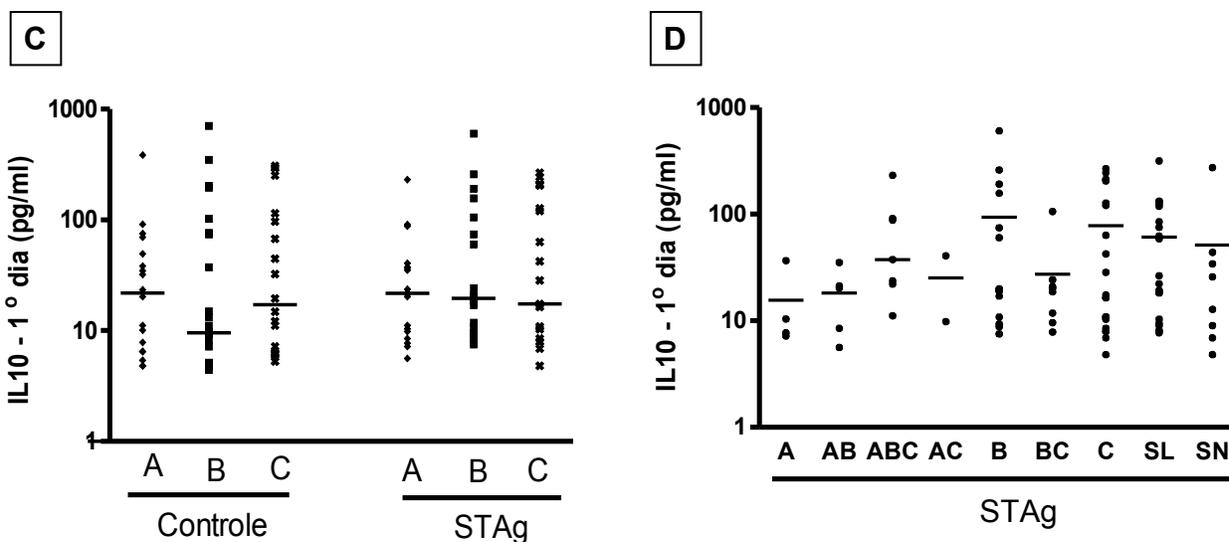


Figura 17: Avaliação da produção de IL-10 em sobrenadantes de cultura de PBMC coletadas no primeiro dia após o início da cultura. Comparação da produção de IL-10 entre: **A** - indivíduos soronegativos (SN) e soropositivos (SP) para toxoplasmose; **B** - indivíduos soronegativos (SN), soropositivos sem lesão ocular (SL) e soropositivos e/ou soronegativos com lesão ocular (CL); **C** - indivíduos com lesão tipo A e/ou AB, ABC e AC (A), indivíduos com lesão tipo B e/ou BC (B) e indivíduos com lesão tipo C (C), sob estímulo antigênico específico (STAg) ou Controle sem estímulo; **D** - indivíduos agrupados como sendo portadores de lesão tipo A, AB, ABC, AC, B, BC, C, soropositivos sem lesão (SL) e soronegativos (SN) submetidos ao estímulo de STAg. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal- Wallis seguido de Dunns para comparação entre mais de dois grupos, enquanto para comparação entre 2 grupos o teste aplicado foi Mann-Whitney. Os testes consideraram o nível de significância de 5%. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

5.3.1.3 Dosagem de IL-2 em Sobrenadantes de Culturas de PBMC Coletadas no Sexto Dia após o Início da Cultura

A comparação da produção de IL-2 por células de indivíduos pertencentes aos diferentes grupos de análise pode ser vista na **Figura 18**. Não houve diferença significativa da produção de IL-2 entre os grupos de indivíduos em nenhum dos tipos de análises realizados, mesmo após a adição de STAg (**Figuras 18A, 18B, 18C e 18D**).

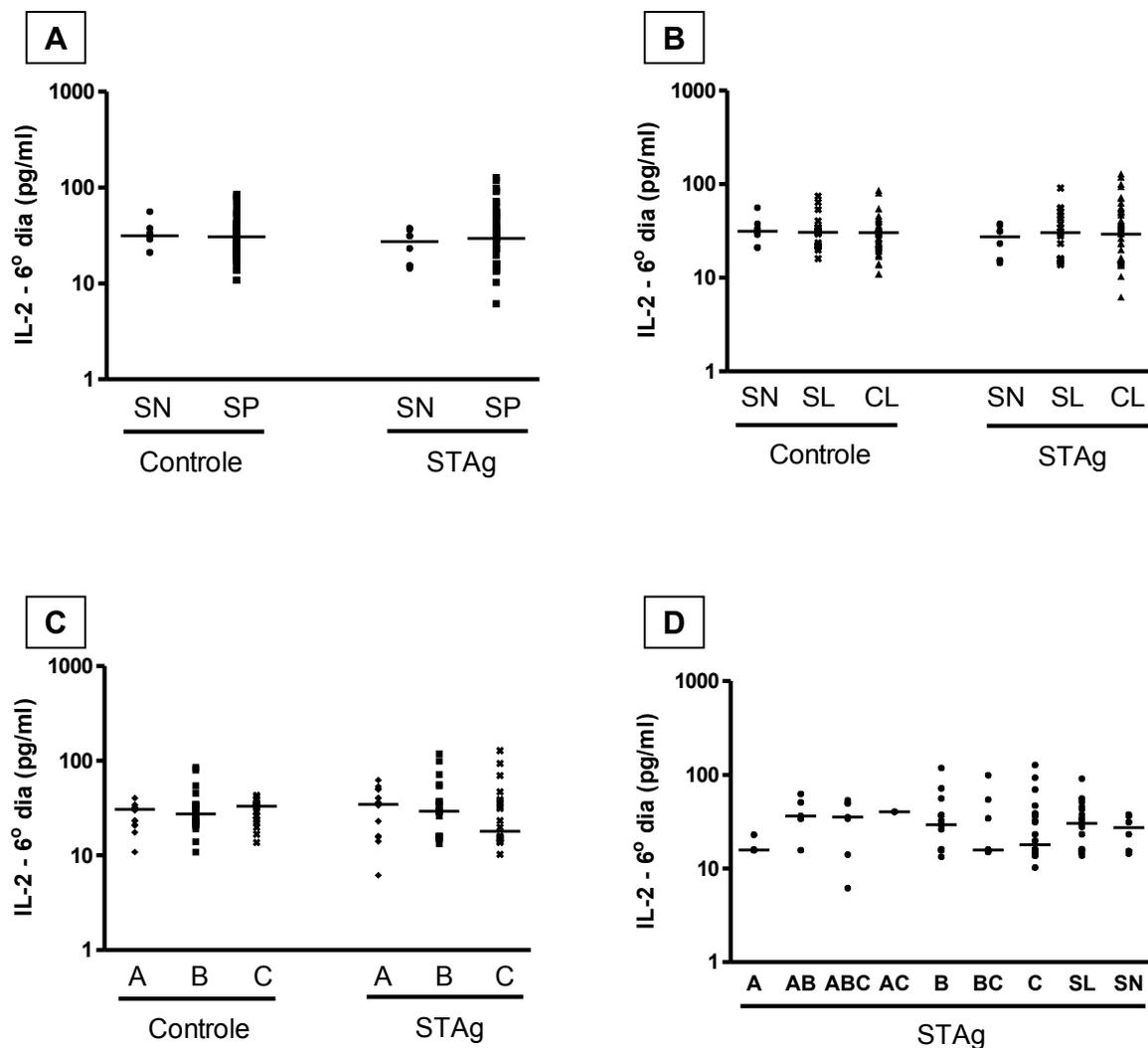


Figura 18: Avaliação da produção de IL-2 em sobrenadantes de cultura de PBMC coletadas no sexto dia após o início da cultura. Comparação da produção de IL-2 entre: **A** - indivíduos soronegativos (SN) e soropositivos (SP) para toxoplasmose; **B** – indivíduos soronegativos (SN), soropositivos sem lesão ocular (SL) e soropositivos e/ou soronegativos com lesão ocular (CL); **C** – indivíduos com lesão tipo A e/ou AB, ABC e AC (A), indivíduos com lesão tipo B e/ou BC (B) e indivíduos com lesão tipo C (C), sob estímulo antigênico específico (STAg) ou Controle sem estímulo; **D** – indivíduos agrupados com sendo portadores de lesão tipo A, AB, ABC, AC, B, BC, C, soropositivos sem lesão (SL) e soronegativos (SN) submetidos ao estímulo de STAg. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns para comparação entre mais de dois grupos, enquanto para comparação entre 2 grupos o teste aplicado foi Mann-Whitney. Os testes consideraram o nível de significância de 5%. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

5.3.1.4 Dosagem de TNF- α em Sobrenadantes de Cultura de PBMC Coletadas no Sexto Dia após o Início da Cultura

A produção de TNF- α foi também avaliada no sexto dia após o início da cultura de PBMC de indivíduos soronegativos e soropositivos para toxoplasmose, portadores ou não de doença ocular (**Fig. 19**). Observamos na **Fig. 19A** que houve aumento significativo na produção de TNF- α por indivíduos SP quando o antígeno solúvel de *T. gondii* foi adicionado às culturas, e que esse aumento parece estar relacionado à produção elevada desta citocina por indivíduos do grupo CL (**Fig. 19B**), mas não por indivíduos do grupo SL. Todos os indivíduos portadores de lesão ocular apresentaram aumento significativo na produção de TNF- α quando estimulados com STAg em relação as culturas-controle (**Fig. 19C**). No entanto, os níveis de TNF- α , produzidos por células de indivíduos portadores de lesão tipo C, apresentaram-se similares àqueles produzidos por PBMC de indivíduos SL.

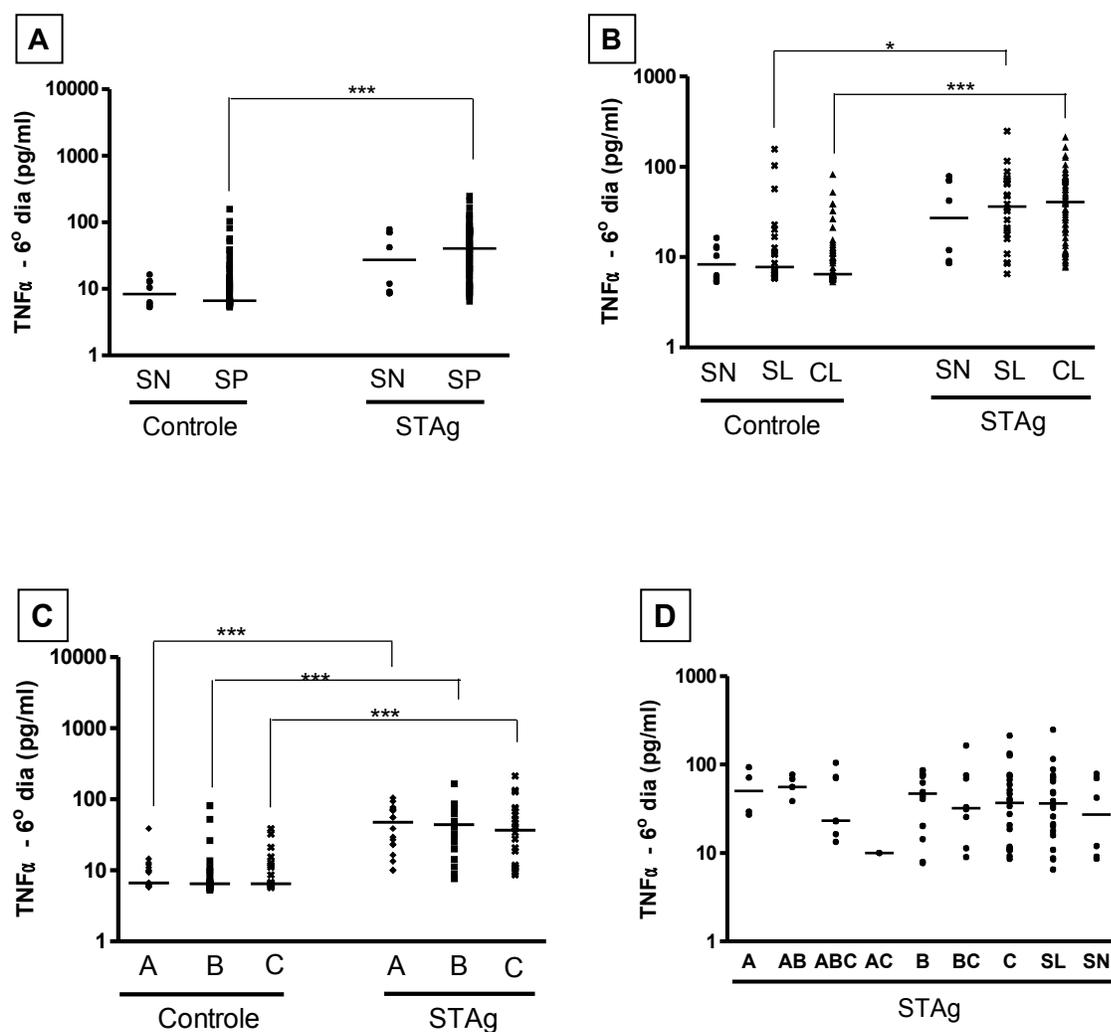


Figura 19: Avaliação da produção de TNF- α em sobrenadantes de cultura de PBMC coletadas no sexto dia após o início da cultura. Comparação da produção de TNF- α entre: **A** - indivíduos soronegativos (SN) e soropositivos (SP) para toxoplasmose; **B** - indivíduos soronegativos (SN), soropositivos sem lesão ocular (SL) e soropositivos e/ou soronegativos com lesão ocular (CL); **C** - indivíduos com lesão tipo A e/ou AB, ABC e AC (A), indivíduos com lesão tipo B e/ou BC (B) e indivíduos com lesão tipo C (C), sob estímulo antigênico específico (STAg) ou Controle sem estímulo; **D** - indivíduos agrupados como sendo portadores de lesão tipo A, AB, ABC, AC, B, BC, C, soropositivos sem lesão (SL) e soronegativos (SN) submetidos ao estímulo de STAg. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns para comparação entre mais de dois grupos, enquanto para comparação entre 2 grupos o teste aplicado foi Mann-Whitney. Os testes consideraram o nível de significância de 5%. Os símbolos ** e *** representam as diferenças

estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,001$, respectivamente) dos níveis de produção da citocina entre e/ou intragrupos. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

5.3.1.5 Dosagem de IFN- γ em Sobrenadantes de Cultura de PBMC Coletadas no Sexto Dia após o Início da Cultura

A **Figura 20** mostra os resultados relativos ao perfil de produção de IFN- γ no sexto dia após o início da cultura. Em **20A** observamos que indivíduos soropositivos com ou sem lesão ocular (SP) apresentaram aumento significativo ($p \leq 0,001$) na produção de IFN- γ na presença de estímulo antigênico específico (STAg) em comparação com a produção dessa citocina pelo grupo SP em culturas não estimuladas (Controle). PBMC de indivíduos SP estimuladas com STAg produziram níveis mais elevados de IFN- γ em relação a produção dessa citocina por células de indivíduos soronegativos (SN) também submetidas ao estímulo antigênico específico de *T. gondii* (**Figura 20A**), sugerindo que a resposta imune Th1 expressa pela produção de IFN- γ é específica e significativamente maior ($p \leq 0,001$) em indivíduos infectados que em indivíduos não infectados pelo *T. gondii*. Além disso, o efeito da adição de STAg sobre a elevação dos níveis de IFN- γ produzidos em culturas de PBMC de indivíduos SP, foi observado ser independente da ausência (SL) ou presença (CL) de lesão ocular (**Fig. 20B**). No entanto, indivíduos CL apresentaram maior produção de IFN- γ ($p \leq 0,001$) em relação a indivíduos SN, que indivíduos SL ($p \leq 0,01$) também comparados a indivíduos SN (**Fig. 20B**). Indivíduos pertencentes aos grupos A (portadores de lesão tipo A, AB, ABC e AC), B (portadores de lesão B e BC) e C (portadores de lesão C) mostraram um aumento na produção de IFN- γ ($p \leq 0,001$) quando estimulados pelo antígeno de *T. gondii*, comparado com a produção da citocina em culturas não estimuladas antigenicamente (**Fig. 20C**). É interessante notar que indivíduos portadores apenas de lesão tipo C (lesão menos severa) produzem IFN- γ em níveis semelhantes a indivíduos pertencentes ao grupo SL e menores que portadores de lesão A sozinha ou A combinada com outros tipos de lesão (AB e ABC) (**Fig. 20D**), sugerindo um papel para IFN- γ no âmbito da severidade da doença ocular.

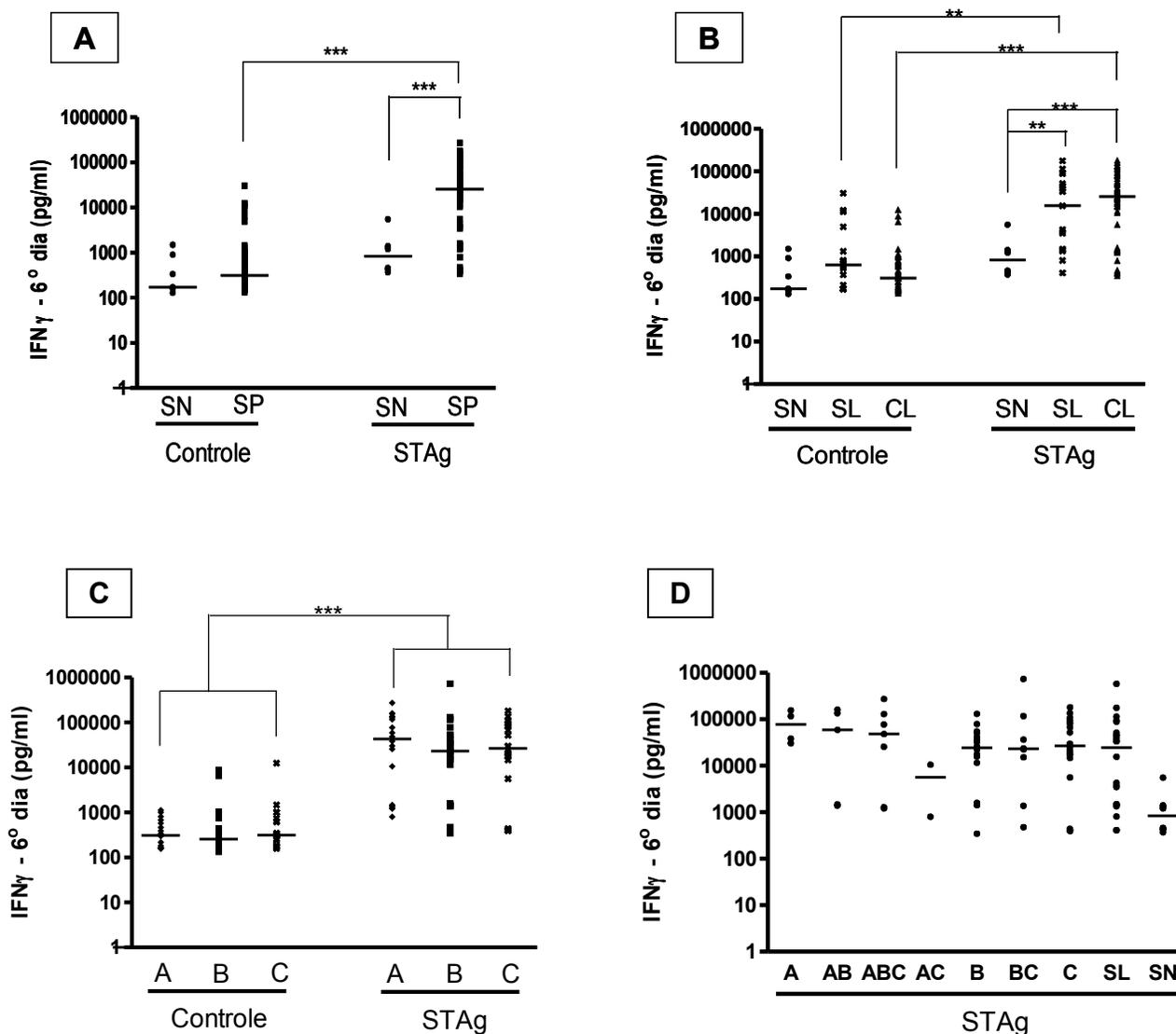


Figura 20: Avaliação da produção de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de PBMC coletadas no sexto dia após o início da cultura. Comparação da produção de IFN- γ entre: **A** - indivíduos soronegativos (SN) e soropositivos (SP) para toxoplasmose; **B** - indivíduos soronegativos (SN), soropositivos sem lesão ocular (SL) e soropositivos e/ou soronegativos com lesão ocular (CL); **C** - indivíduos com lesão tipo A e/ou AB, ABC e AC (A), indivíduos com lesão tipo B e/ou BC (B), e indivíduos com lesão tipo C (C), sob estímulo antigênico específico (STAg) ou Controle sem estímulo; **D** - indivíduos agrupados como sendo portadores de lesão tipo A, AB, ABC, AC, B, BC, C, soropositivos sem lesão (SL) e soronegativos (SN) submetidos ao estímulo de STAg. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-

Wallis seguido de Dunns para comparação entre mais de dois grupos, enquanto para comparação entre 2 grupos o teste aplicado foi Mann-Whitney. Os testes consideraram o nível de significância de 5%. Os símbolos ** e *** representam as diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente) dos níveis de produção da citocina entre e/ou intragrupos. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

5.3.1.6 Dosagem de IL-5 em Sobrenadantes de Cultura de PBMC Coletadas no Sexto Dia após o Início da Cultura

A **Figura 21** mostra os resultados da comparação dos níveis de IL-5 produzidos entre os diferentes grupos de indivíduos analisados neste estudo. Indivíduos SP apresentaram um aumento na produção de IL-5 quando estimulados com STAg em relação aos mesmos indivíduos (SP) não submetidos a estímulos antigênicos (**Fig. 21A**). Além disso, quando células de indivíduos SP e SN foram estimuladas com antígeno solúvel de *T. gondii*, foi observado aumento significativo da produção de IL-5 entre ambos os grupos (**Fig. 21A**). A comparação dos níveis de produção de IL-5 entre indivíduos SN, SL e CL, estimulados com STAg, mostrou que indivíduos CL apresentaram aumento significativo da produção de IL-5 em relação a indivíduos SN (**Fig. 21B**). A avaliação separada dos grupos A, B e C (constituintes do grupo CL), mostrou que o aumento da produção de IL-5, em resposta ao estímulo com STAg, não estaria associado com a severidade da doença ocular, mas com a manifestação ou não desse fenótipo clínico (**Fig. 21C**). Indivíduos portadores de lesão ocular tipo C e indivíduos SL produziram também níveis comparáveis de IL-5 sob estímulo antigênico específico (**Fig. 21D**), contribuindo para a reafirmação do comportamento semelhante de indivíduos pertencentes a ambos grupos no que se refere a resposta imune ao *T. gondii*.

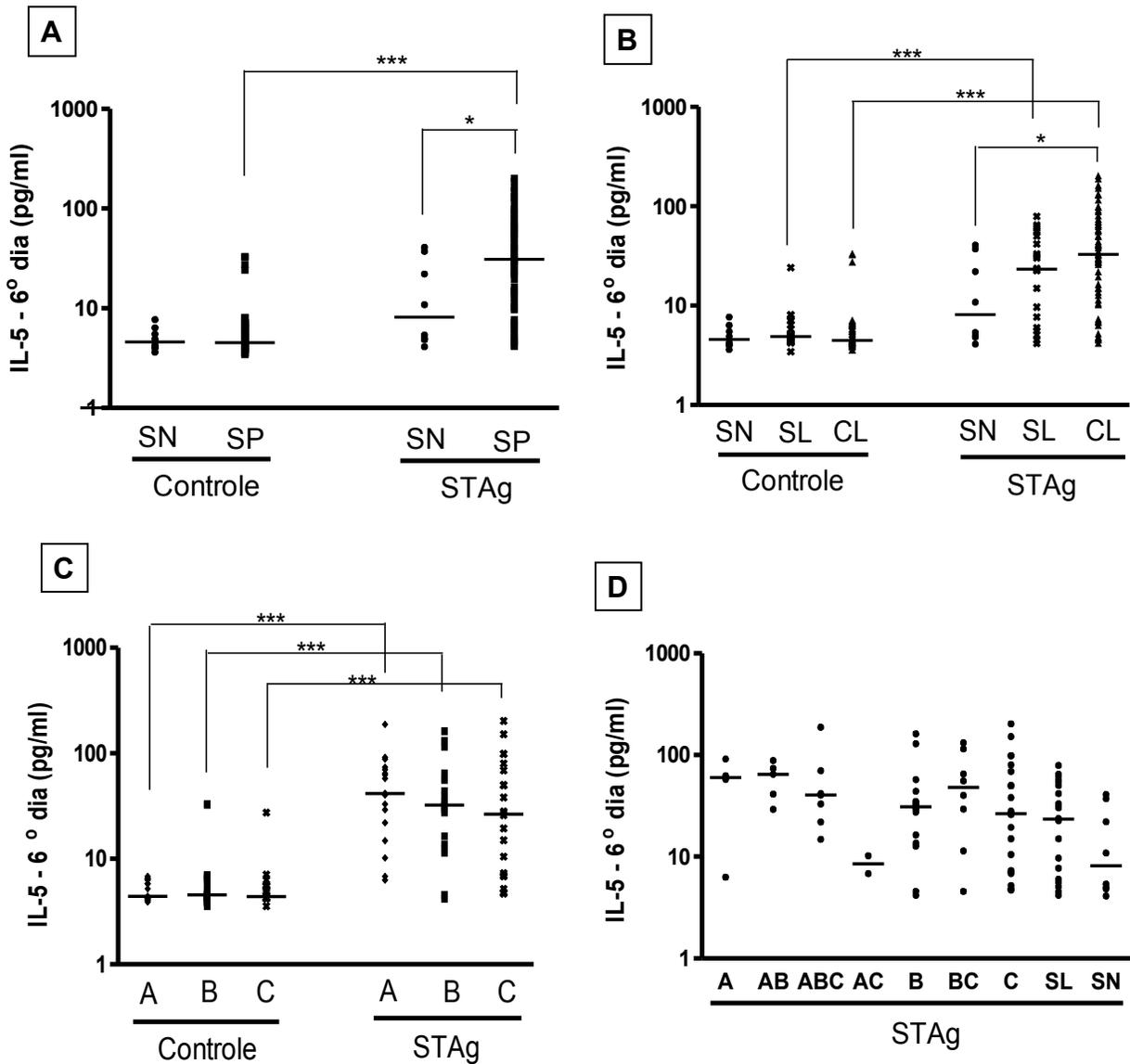


Figura 21: Avaliação da produção de IL-5 em sobrenadantes de cultura de PBMC coletadas no sexto dia após o início da cultura. Comparação da produção de IL-5 entre: **A** - indivíduos soronegativos (SN) e soropositivos (SP) para toxoplasmose; **B** – indivíduos soronegativos (SN), soropositivos sem lesão ocular (SL) e soropositivos e/ou soronegativos com lesão ocular (CL); **C** – indivíduos com lesão tipo A e/ou AB, ABC e AC (A), indivíduos com lesão tipo B e/ou BC (B) e indivíduos com lesão tipo C (C), sob estímulo antígeno específico (STAg) ou Controle sem estímulo; **D** – indivíduos agrupados como

sendo portadores de lesão tipo A, AB, ABC, AC, B, BC, C, soropositivos sem lesão (SL) e soronegativos (SN) submetidos ao estímulo de STAg. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns para comparação entre mais de dois grupos, enquanto para comparação entre 2 grupos o teste aplicado foi Mann-Whitney. Os testes consideraram o nível de significância de 5%. Os símbolos * e *** representam as diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,001$, respectivamente) dos níveis de produção da citocina entre e/ou intragrupos. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

5.3.1.7 Dosagem de IL-4 em Sobrenadantes de Cultura de PBMC Coletadas no Sexto Dia após o Início da Cultura

A produção de IL-4 foi avaliada e comparada entre os grupos de indivíduos participantes deste estudo (**Figura 22**). Diferença significativa ($p \leq 0,001$) sobre a produção desta citocina foi observada entre sobrenadantes de culturas de células de indivíduos SP, previamente estimulados com STAg, e de indivíduos SP não estimulados com antígeno solúvel de *T. gondii* (**Fig. 22A**). Entretanto, indivíduos portadores de retinocoroidite toxoplásmica não produziram níveis significativamente diferentes de IL-5, sob estímulo de STAg, comparado aos níveis dessa citocina produzidos por indivíduos SL e SN também em resposta ao estímulo específico (**Fig. 22B**). Indivíduos portadores de lesões mais severas (tipo A e tipo B) produziram níveis aumentados de IL-4, em resposta ao estímulo de STAg, quando comparados aos níveis de IL-4 produzidos por células, dos mesmos indivíduos, não estimuladas (**Fig. 22C**). Além disso, indivíduos do grupo B (portadores de lesão B e BC) produziram níveis mais altos de IL-4 que indivíduos do grupo C (portadores de lesão C), ambos estimulados com STAg (**Fig. 22C**). Em **22D** observamos que indivíduos portadores de lesão tipo C apresentaram padrão de resposta imune de produção de IL-4 similar ao padrão de resposta apresentado por indivíduos SL após estímulo com STAg.

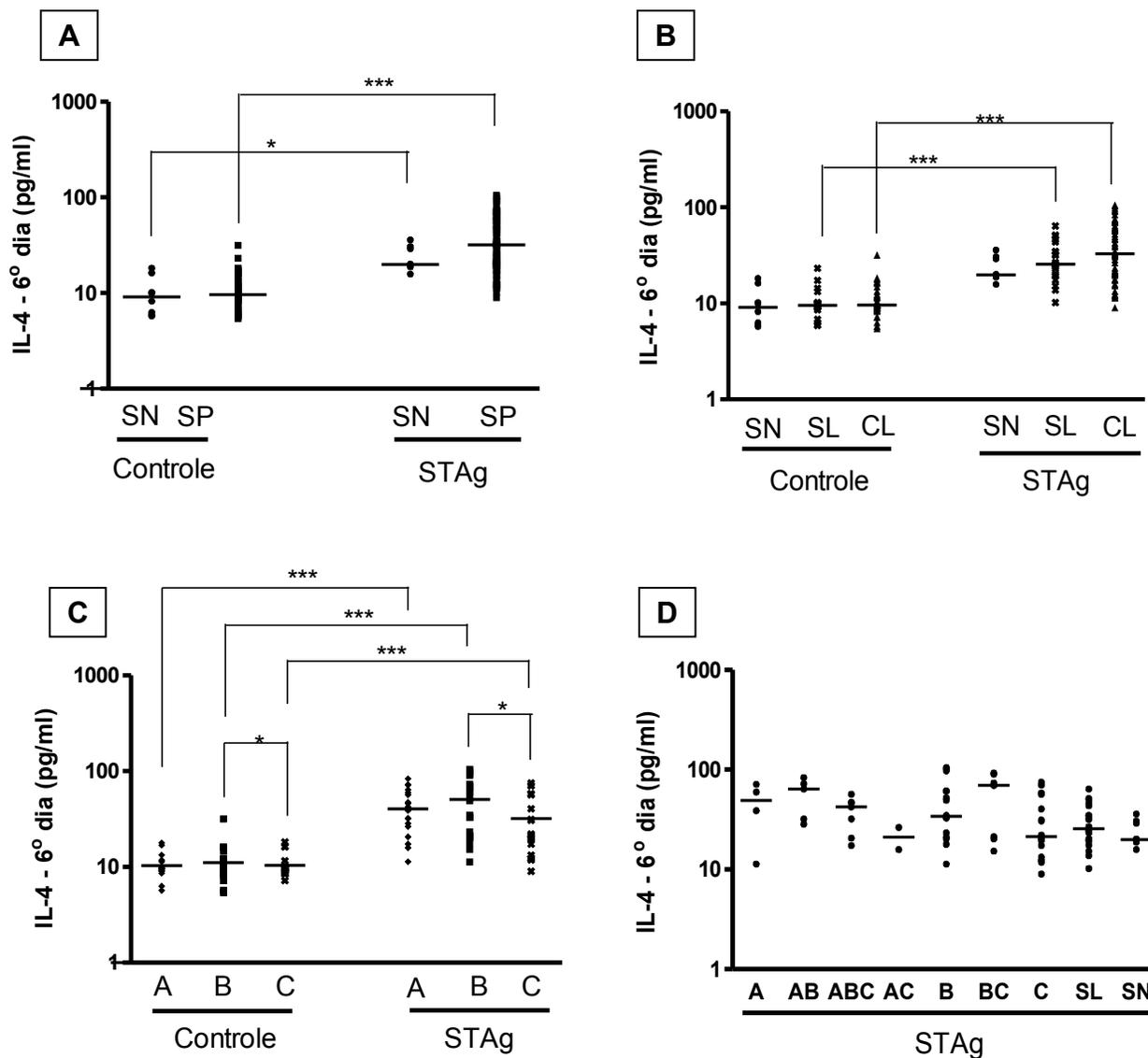


Figura 22: Avaliação da produção de IL-4 em sobrenadantes de cultura de PBMC coletadas no sexto dia após o início da cultura. Comparação da produção de IL-4 entre: **A** - indivíduos soronegativos (SN) e soropositivos (SP) para toxoplasmose; **B** - indivíduos soronegativos (SN), soropositivos sem lesão ocular (SL) e soropositivos e/ou soronegativos com lesão ocular (CL); **C** - indivíduos com lesão tipo A e/ou AB, ABC e AC (A), indivíduos com lesão tipo B e/ou BC (B) e indivíduos com lesão tipo C (C), sob estímulo antigênico específico (STAg) ou Controle sem estímulo; **D** - indivíduos agrupados como

sendo portadores de lesão tipo A, AB, ABC, AC, B, BC, C, soropositivos sem lesão (SL) e soronegativos (SN) submetidos ao estímulo de STAg. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns para comparação entre mais de dois grupos, enquanto para comparação entre 2 grupos o teste aplicado foi Mann-Whitney. Os testes consideraram o nível de significância de 5%. Os símbolos * e *** representam as diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,001$, respectivamente) dos níveis de produção da citocina entre e/ou intragrupos. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

5.3.1.8 Dosagem de IL-10 em Sobrenadantes de Cultura de PBMC Coletadas no Sexto Dia após o Início da Cultura

Os dados referentes à dosagem de IL-10 em sobrenadantes de cultura coletados no sexto dia após o início do cultivo podem ser observados na **Figura 23**. Comparando-se os níveis de produção de IL-10 entre indivíduos soronegativos (SN) e soropositivos (SP), podemos observar que houve um aumento significativo ($p \leq 0,001$) na produção de IL-10 por PBMC de pacientes soropositivos (SP) em resposta ao estímulo com STAg em relação ao mesmo grupo sem estímulo antigênico (**Fig. 23A**). Entretanto, esse aumento na produção de IL-10 está relacionado ao grupo de indivíduos CL (**Fig. 23B**), e não ao grupo SL. Indivíduos do grupo B (com lesão tipo B e BC) apresentaram um aumento significativo na produção de IL-10 após estímulo com STAg (**Fig. 23C**) em relação as culturas-controle, porém esse efeito da adição de antígeno sobre a produção de IL-10 não ocorreu em indivíduos do grupo A (portadores de lesão tipo A, AB, ABC e AC) e do grupo C (portadores de lesão tipo C). Em **23D**, pudemos observar que indivíduos portadores de lesão tipo C se comportaram de forma semelhante a indivíduos SL em relação aos níveis de IL-10 produzidos, sugerindo mais uma vez que esses dois grupos de indivíduos apresentam um padrão de resposta imune muito similar.

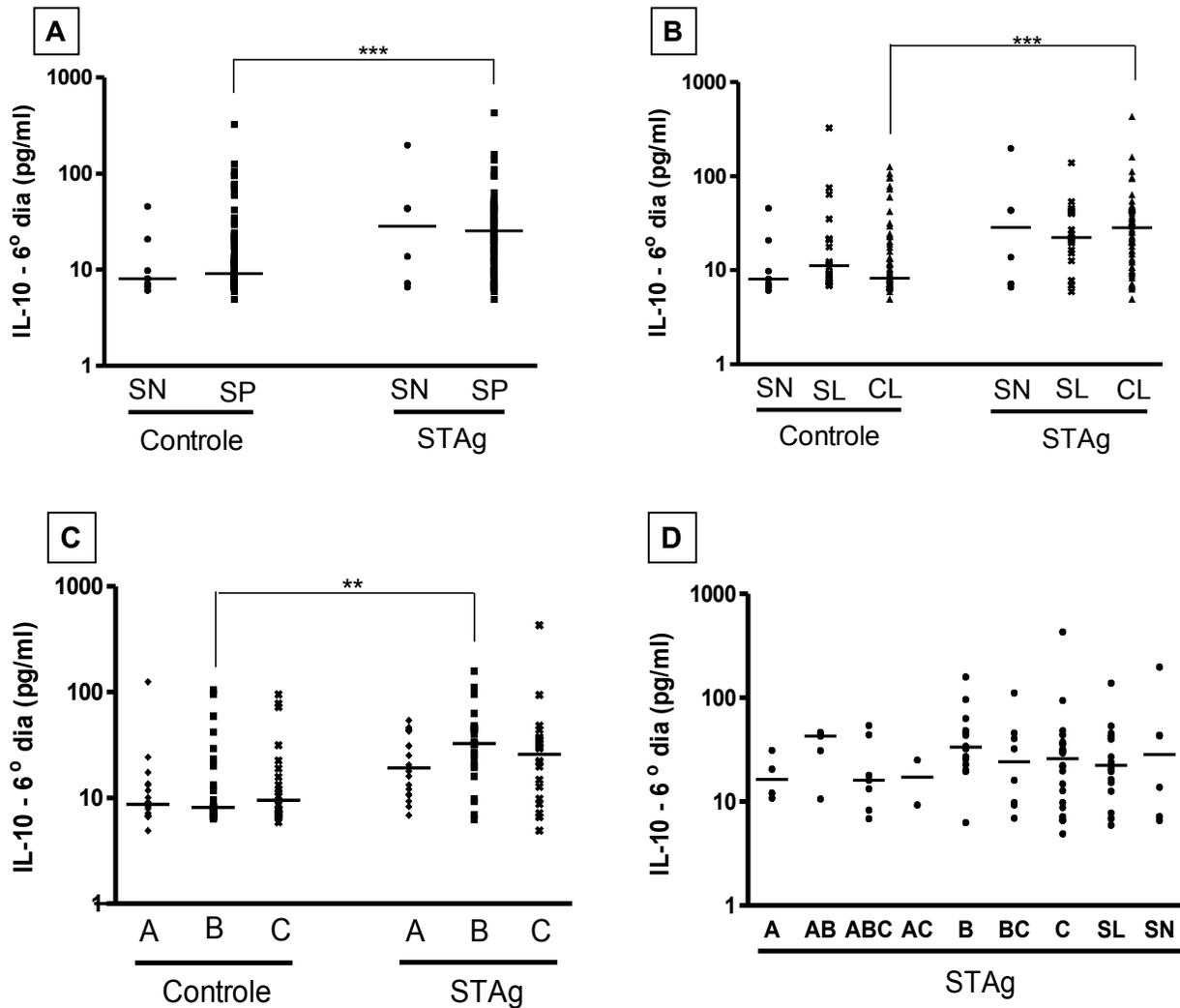


Figura 23: Avaliação da produção de IL-10 em sobrenadantes de cultura de PBMC coletadas no sexto dia após o início da cultura. Comparação da produção de IL-10 entre: **A** - indivíduos soronegativos (SN) e soropositivos (SP) para toxoplasmose; **B** - indivíduos soronegativos (SN), soropositivos sem lesão ocular (SL) e soropositivos e/ou soronegativos com lesão

tipo A e/ou AB, ABC e AC (A), indivíduos com lesão tipo B e/ou BC (B) e indivíduos com lesão tipo C (C), sob estímulo antigênico específico (STAg) ou Controle sem estímulo; **D** – indivíduos agrupados como sendo portadores de lesão tipo A, AB, ABC, AC, B, BC, C, soropositivos sem lesão (SL) e soronegativos (SN) submetidos ao estímulo de STAg. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns para comparação entre mais de dois grupos, enquanto para comparação entre 2 grupos o teste aplicado foi Mann-Whitney. Os testes consideraram o nível de significância de 5%. Os símbolos ** e *** representam as diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente) dos níveis de produção da citocina entre e/ou intragrupos. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

5.3.1.9 Dosagem de IL-13 em Sobrenadantes de Culturas de PBMC Coletadas no Sexto Dia após o Início da Cultura

A **Figura 24** resume os resultados referentes à dosagem de IL-13 no sobrenadante de cultura de células estimuladas com STAg, bem como não estimuladas, nos diferentes grupos de indivíduos.

Indivíduos SP produziram níveis de IL-13 significativamente mais altos, quando estimulados com STAg, que indivíduos SP não submetidos ao estímulo antigênico (**Fig. 24A**), e esse incremento na produção de IL-13 está relacionado tanto com a infecção como com a manifestação da doença ocular (**Fig. 24B**). Células de pacientes portadores de lesão ocular tipo A, tipo B e tipo C apresentaram aumentada produção de IL-13 sob estímulo de STAg em comparação às células dos mesmos pacientes em culturas controle (**Fig. 24C**). Entretanto, a magnitude do aumento de IL-13 foi superior nos pacientes com lesão tipo C em relação aos pacientes com lesões mais severas (**Fig. 24D**).

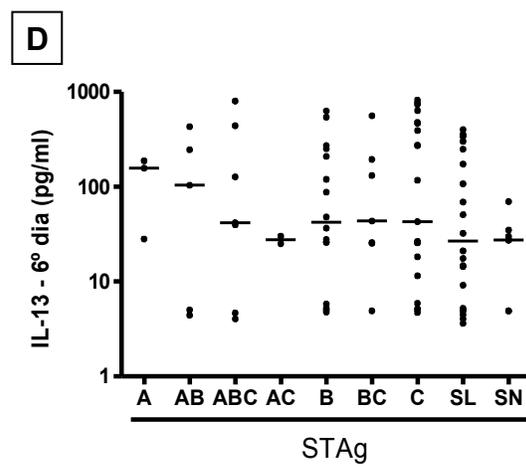
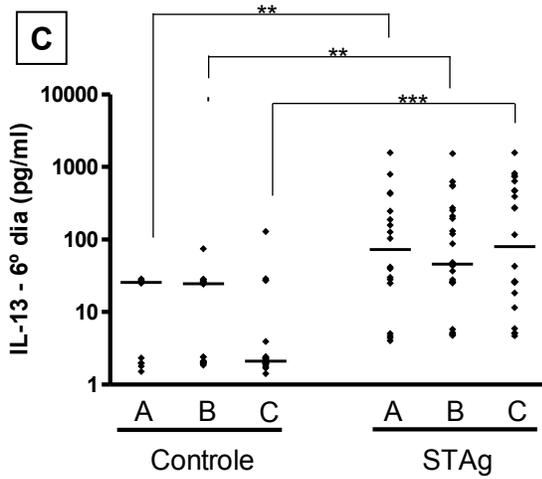
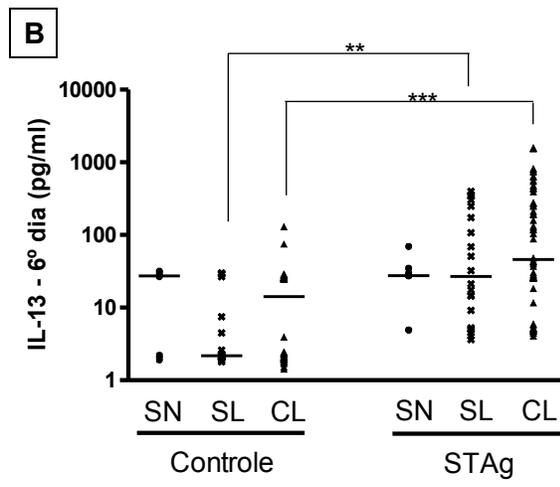
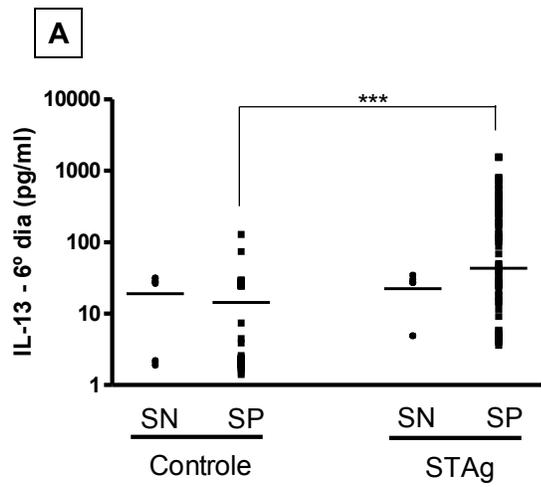


Figura 24: Avaliação da produção de IL-13 em sobrenadantes de cultura de PBMC coletados no sexto dia após o início da cultura. Comparação da produção de IL-13 entre: **A** - indivíduos soronegativos (SN) e soropositivos (SP) para toxoplasmose; **B** – indivíduos soronegativos (SN), soropositivos sem lesão ocular (SL) e soropositivos e/ou soronegativos com lesão ocular (CL); **C** – indivíduos com lesão tipo A e/ou AB, ABC e AC (A), indivíduos com lesão tipo B e/ou BC (B) e indivíduos com lesão tipo C (C), sob estímulo antigênico específico (STAg) ou Controle sem estímulo; **D** – indivíduos com lesão tipo A, AB, ABC, AC, B, BC, C, soropositivos sem lesão (SL) e soronegativos (SN) submetidos ao estímulo de STAg. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns para comparação entre mais de dois grupos, enquanto para comparação entre 2 grupos o teste aplicado foi Mann-Whitney. Os testes consideraram o nível de significância de 5%. Os símbolos ** e *** representam as diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente) dos níveis de produção da citocina entre e/ou intragrupos. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

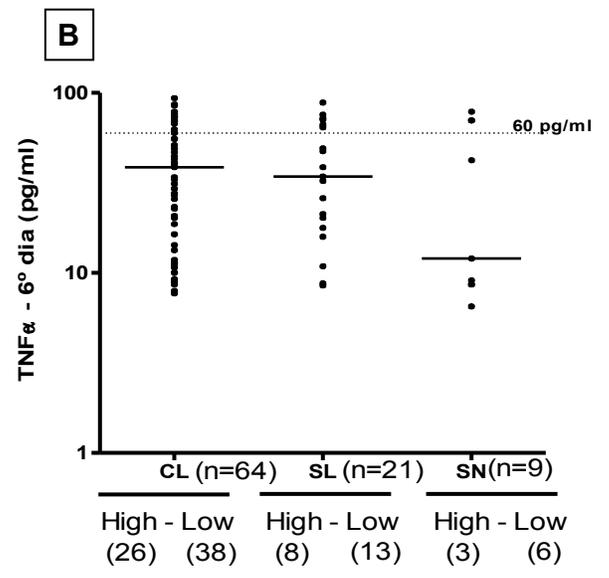
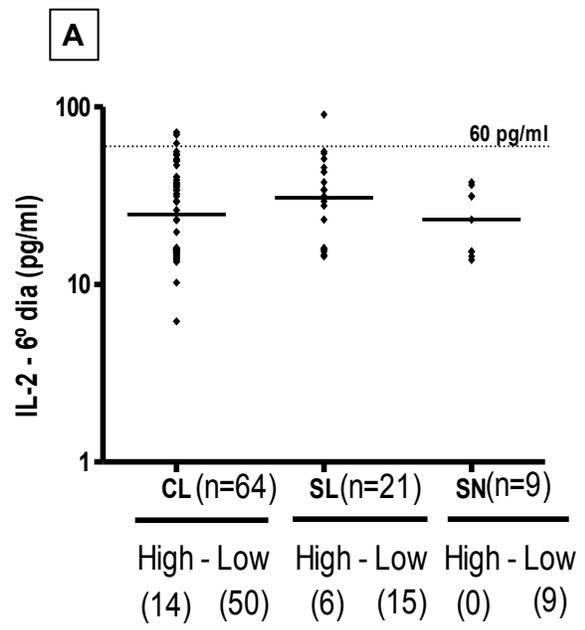
5.3.2 Análise da Produção de Citocinas em Grupos de Altos (“high”) e Baixos (“low”) Produtores de Citocinas

A análise dos gráficos de dispersão dos pontos referentes à concentração de IFN- γ e IL-13 mostrou que os mesmos se apresentavam em grupamentos distintos, de modo a ser possível identificar grupamentos de valores mais elevados e valores mais baixos separados por um pequeno intervalo onde não se observou pontos correspondentes à determinada concentração de citocina produzida no sobrenadante de cultura. Os gráficos de dispersão dos pontos, referentes à concentração das demais citocinas, não apresentaram esses tipos de grupamentos distintos. Um ponto arbitrário de corte (“cut off”) foi determinado a partir da distribuição dos indivíduos CL (com lesão), considerando-se a análise visual da dispersão dos valores em gráficos de concentração. O valor do “cut off” foi determinado de acordo com a dispersão dos valores observados, tomando-se como base o padrão de dispersão do grupo de indivíduos CL. O valor do “cut off” para o grupo CL foi adotado também como “cut off” para identificar pontos acima e abaixo de tal valor em todos os demais grupos isto é, nos grupos SL e SN (soropositivos sem lesão e soronegativos, respectivamente). Os indivíduos pertencentes ao grupamento de valores mais elevados ou de IFN- γ ou de IL-13 foram classificados como altos (“high”) produtores da citocina em questão e aqueles pertencentes ao grupamento de valores mais baixos foram classificados como baixos (“low”) produtores da citocina em questão. A produção das demais

citocinas (IL-2, TNF- α , IL-5, IL-4 e IL-10) mostrou-se ser mais homogênea em relação à concentração produzida, não sendo possível observar claramente grupamentos distintos, separados por intervalo, de altos e baixos valores. Para essas citocinas, o valor arbitrário de 60 pg/ml na escala Log 10 foi utilizado como valor de corte para distinguir altos (valores \geq 60 pg/ml) e baixos (valores $<$ 60 pg/ml) produtores da citocina em questão. Os indivíduos produtores de níveis mais elevados que 60 pg/ml foram considerados altos produtores de citocinas, enquanto indivíduos produtores de níveis mais baixos que 60 pg/ml foram considerados baixos produtores daquelas citocinas (**Figura 25**).

A **Fig. 25** mostra a distribuição dos indivíduos em relação aos níveis de produção de IL-2, TNF- α , IL-5, IL-4 e IL-10. Podemos observar que a maioria dos indivíduos produz citocinas na faixa de 10 a 100 pg/ml. Entretanto, observamos que número expressivo de indivíduos (34 de 94), no caso de IL-13, e a totalidade destes, no caso de IFN- γ , produz níveis dessas citocinas acima de 100 pg/ml (**Figura 26**).

As figuras **26A** e **26B** representam os resultados referentes à produção de IL-13 e IFN- γ , respectivamente. Indivíduos soropositivos CL e SL, em ambas as figuras, produzem níveis mais elevados de IL-13 e IFN- γ comparado aos níveis produzidos por indivíduos SN (**26A** e **26B**), sendo que essa diferença foi mostrada ser estatisticamente significativa somente em relação à produção de IFN- γ (**Fig. 26B**). No entanto, observamos ainda que dentro do grupamento “high” tanto de IFN- γ quanto de IL-13, existe um outro grupamento de dispersão de pontos, referentes à concentração de citocinas, que pode ser classificado como pontos de concentração “muito alta” ou “very high”. Os indivíduos pertencentes a esse grupamento foram classificados como produtores “very high” de IL-13 e IFN- γ , e encontram-se acima da linha contínua representada nos gráficos das **Figuras 26A** e **26B**.



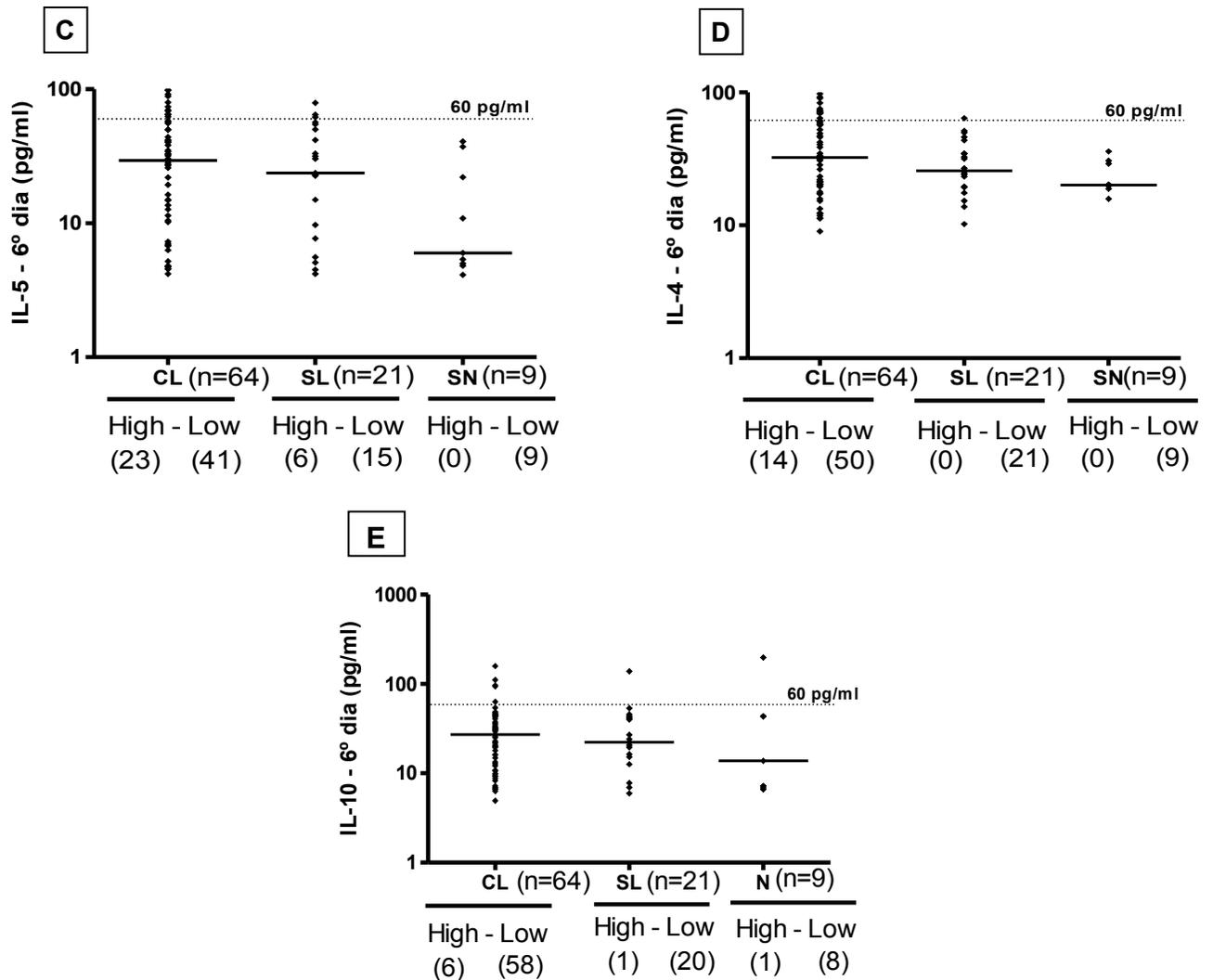
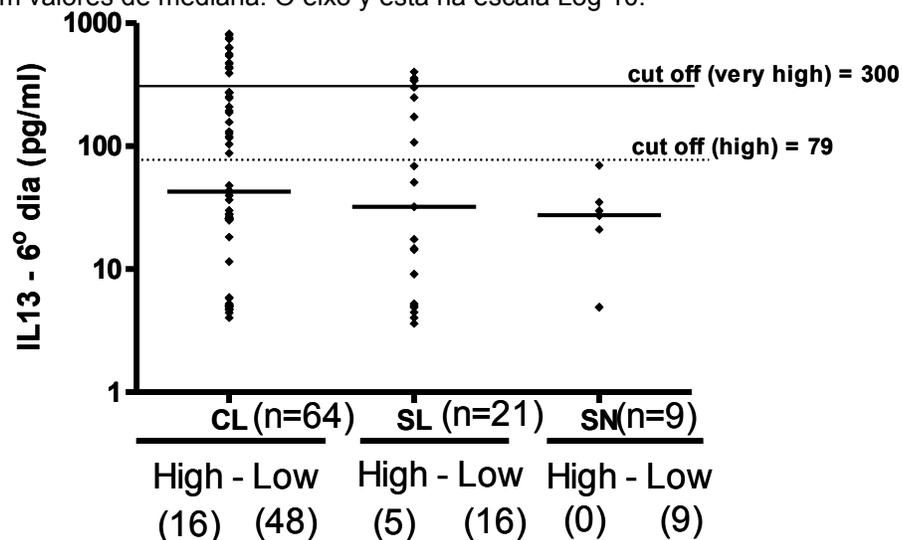


Figura 25: Avaliação do padrão de distribuição dos indivíduos em relação a produção de citocinas em sobrenadantes de cultura de PBMC coletadas no sexto dia após o início da cultura. Indivíduos pertencentes ao grupo CL - soropositivos com lesão ocular, SL - soropositivos sem lesão ocular e SN - soronegativos foram classificados como alto (“high”) ou baixo (“low”) produtores de: **A** – IL-2; **B** TNF- α ; **C** – IL-5; **D** – IL-4; **E** – IL-10. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.



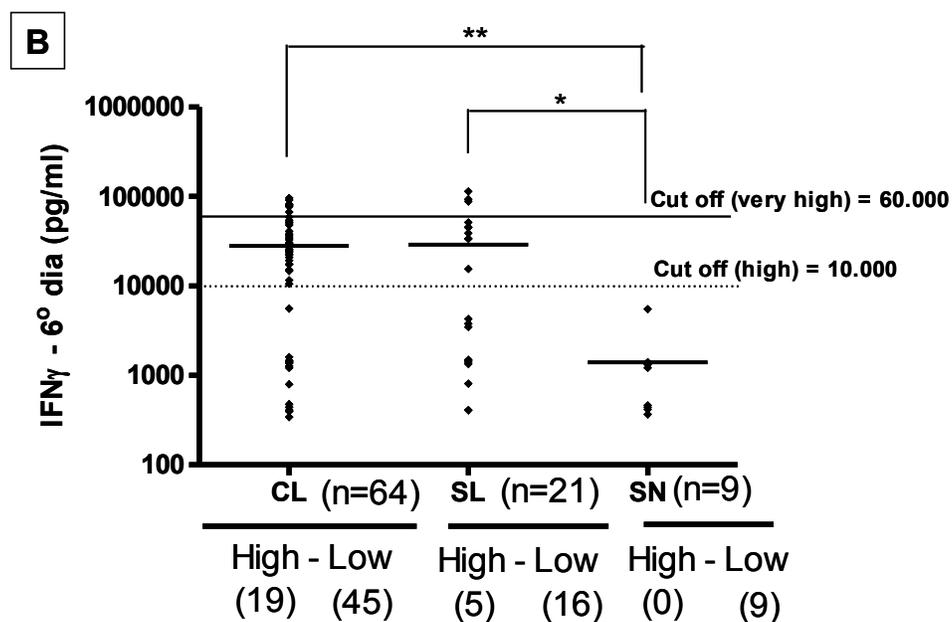


Figura 26: Avaliação do padrão de dispersão dos valores de concentração de citocinas em sobrenadantes de cultura de PBMC coletadas no sexto dia após o início da cultura. Indivíduos pertencentes ao grupo CL - soropositivos com lesão ocular, SL - soropositivos sem lesão ocular e SN - soronegativos foram classificados como altos (“high”) ou baixos (“low”) produtores de: **A** – IL-13; **B** – IFN- γ . Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns. Os símbolos * e ** representam as diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente) dos níveis de produção da citocina entre e/ou intragrupos. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10. Os valores de ponto de corte (cut off) para o grupamento “high” foi de 79 pg/ml para IL-13 e 10.000 pg/ml para IFN- γ ; enquanto os valores de corte (cut off) para o grupamento “very high” foi de 300 pg/ml para IL-13 e 60.000 pg/ml para IFN- γ .

5.3.2.1 Investigação do Perfil de Secreção de Citocinas em Grupo de Altos Produtores de Citocinas Portadores ou Não de Doença Ocular

A contribuição de fatores, tais como: a) presença e/ou ausência de lesão ocular; b) severidade da lesão ocular; c) e a multiplicidade das lesões oculares, foi analisada em função do comportamento dos indivíduos quanto à sua capacidade de produzir elevados níveis de citocinas. Assim, altos produtores de todas citocinas foram plotados em conjunto em um gráfico, cuja concentração logarítmica das mesmas variou entre 60 pg/ml e 1000000 pg/ml. Esse gráfico mostra a produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4, IL-5, IL-2 e IL-13) de indivíduos classificados como altos (“high”) e muito altos (“very high”) produtores de citocinas, após estímulo de culturas de PBMC com STAg. Essa escala de plotagem permite a observação de que indivíduos produtores de concentrações muito elevadas de citocinas “very high” estão presentes em todos os grupos de pacientes apresentando-se com ou sem lesão toxoplásmica retiniana.

Observamos que o grupo de indivíduos, chamados de “very high” (mostrados no círculo da **Figura 27**), os quais representam 40,7% dos indivíduos “high” para IFN- γ (mostrados na **Figura 26B**), aparece em todos os indivíduos portadores dos diferentes fenótipos clínicos para toxoplasmose.

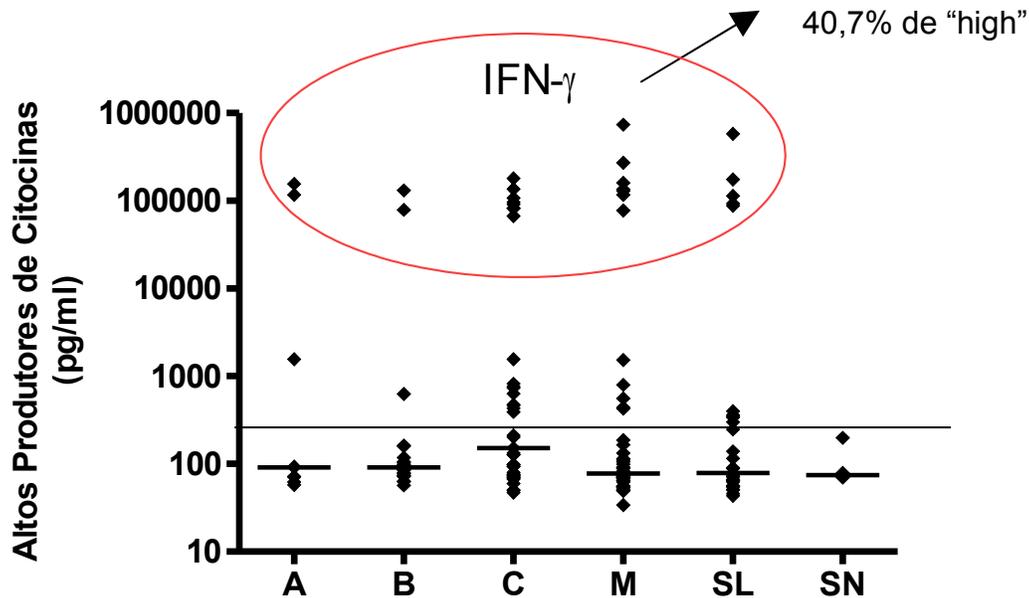


Figura 27: Perfil de produção de citocinas por PBMC, estimuladas com STAg, de altos produtores de citocinas nos grupos de indivíduos: A (portadores de lesão tipo A), B (portadores de lesão tipo B), C (portadores de lesão tipo C), M (portadores de lesão múltipla tipo AB, ABC e BC), SL (soropositivos para toxoplasmose sem lesão ocular) e SN (soronegativos para toxoplasmose sem lesão ocular). O círculo indica indivíduos muito altos (“very high”) produtores de IFN- γ . A linha preta contínua mostra separa os indivíduos “very high” para IL-13. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis seguido de Dunns. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

Observa-se ainda que abaixo do grupamento “very high” há uma dispersão de pontos conforme mostrado pela linha contínua na **Figura 27**. Para melhor investigar essa dispersão, subtraímos os pontos com valores acima de 10.000 pg/ml. Essa subtração é mostrada na **Figura 28**, onde observamos que acima de 300 pg/ml havia grupamento correspondente à área circulada da **Figura 28**. Esses pontos correspondem aos indivíduos classificados como aqueles “very high” (mostrados na Figura 26A) para IL-13, os quais representam 53,8% dos pontos “high” para IL-13 (mostrados na **Figura 26A**).

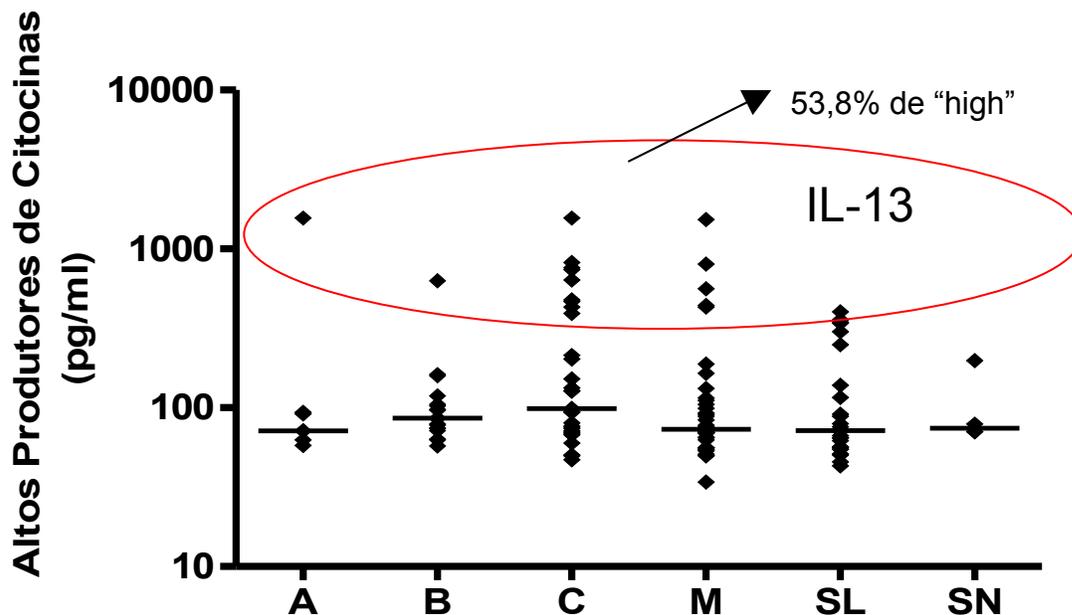


Figura 28: Perfil de produção de citocinas por PBMC, estimuladas com STAg, de altos produtores de citocinas nos grupos de indivíduos: A (portadores de lesão tipo A), B (portadores de lesão tipo B), C (portadores de lesão tipo C), M (portadores de lesão múltipla tipo AB, ABC e BC), SL (soropositivos para toxoplasmose sem lesão ocular) e SN (soronegativos para toxoplasmose sem lesão ocular). O círculo indica indivíduos muito altos ("very high") produtores de IL-13. As barras indicam valores de mediana.

5.3.2.2 Relação entre Genótipo e Produção de Citocinas em Grupo de Altos Produtores de Citocinas

Altos produtores das citocinas (IL-2, TNF- α , IL-5, IL-4 e IL-10) e muito altos produtores de IL-13 e IFN- γ foram também avaliados quanto ao genótipo para cada um dos 8 marcadores significantes no estudo genético em relação à propensão ao desenvolvimento de lesão ocular toxoplásmica (**Tabela 12**).

Indivíduos analisados em família (representados pelo código CG) perfizeram um total de 21 famílias, sendo que em 8 (38,1%) destas famílias houve mais de um membro familiar detectado como sendo alto produtor de citocinas.

A análise do genótipo para o marcador do gene *ABCR* (rs1801574) em altos e muito altos produtores de citocinas, mostrou que 70% dos indivíduos apresentavam o genótipo CC contra 23,3% e 6,7% com genótipos GC e GG, por exemplo.

Indivíduos altos e muito altos produtores de citocinas apresentaram, preferencialmente, genótipo CC para o marcador CFH_rs1061170 (51,3%) que os genótipos CT e TT com porcentagens de 40,5% e 8,1%, respectivamente.

A análise dos genótipos para os marcadores do gene *COL2A1* em altos e muito altos produtores de citocinas, mostrou que 52,9% dos indivíduos apresentavam genótipo heterozigoto (TC) para o marcador rs1635544, contra 26,5% e 20,6% para os genótipos CC e TT, respectivamente. Em relação ao marcador rs2276455, observamos que as porcentagens de indivíduos apresentando os diferentes genótipos (AA, AG e GG) não foram bastante discrepantes, onde 40,6% dos indivíduos apresentaram genótipo AG, 37,5% apresentaram genótipo GG e 21,9% eram portadores de genótipo AA. O marcador rs2070739 apresentou, ao contrário do marcador anterior, discrepância na prevalência de indivíduos portadores de genótipos TT, TC e CC, visto que 80,6% dos indivíduos eram CC, enquanto 16,7% e 2,8% eram TC e TT, respectivamente.

Altos e muito altos produtores de citocinas, avaliados para os marcadores do gene *P2X7*, mostraram que o genótipo heterozigótico AG para o marcador rs1718119 era mais freqüente entre estes indivíduos com um percentual de 52,8%, contra 41,7% e 5,5% para os genótipos AA e GG, respectivamente. Além disso, nas análises referentes ao marcador rs1621388, o genótipo AG apresentou-se mais freqüente entre indivíduos altos e muito altos produtores de citocinas, perfazendo percentual de 48,5%. Enquanto os genótipos GG e AA estiveram presentes em 45,4% e 6%, respectivamente.

A análise do genótipo para o marcador do gene *TLR9* (rs352140), em altos e muito altos produtores de citocinas, mostrou que 41,7% dos indivíduos apresentavam genótipo TT contra 33,3% e 25% com genótipos CT e CC, por exemplo.

Este conjunto de dados sugerem que os polimorfismos em nucleotídeo único verificados como relevantes no contexto da manifestação ocular da toxoplasmose,

também podem estar associados à capacidade de alta e/ou baixa produção de citocinas.

Tabela 12: Genótipos dos altos produtores de citocinas para os marcadores dos genes *ABCR*, *CFH*, *COL2A1*, *P2X7* e *TLR9*

Código dos Indivíduos (Altos Produtores de Citocinas)	Genótipo							
	ABCR	CFH	COL2A1			P2X7		TLR9
	rs1801574	rs1061170	rs1635544	rs2276455	rs2070739	rs1718119	rs1621388	rs352140
CG_07_03	CC	CC	TT	GG	TC	AA	GG	CT
CG_08_03	ND	ND						
CG_10_05	ND	ND						
CG_10_06	ND	ND						
CG_11_03	ND	ND						
CG_14_04	ND	ND						
CG_16_04	ND	ND						
CG_18_03	CC	CC	TC	GG	CC	AG	ND	TT
CG_18_04	ND	ND						
CG_26_04	CC	CT	TC	AA	CC	AA	GG	CT
CG_28_03	CC	CC	TC	GG	CC	AA	GG	CT
CG_29_04	ND	ND						
CG_35_03	GC	CC	TC	AA	CC	AG	AG	TT
CG_41_02	GC	CT	CC	AG	CC	AA	GG	TT
CG_41_03	ND	ND	ND	ND	CC	ND	ND	ND
CG_45_03	GC	CT	ND	GG	CC	AA	GG	CC
CG_51_02	ND	ND						
CG_51_03	CC	CC	TC	AG	CC	AA	GG	CT
CG_52_04	ND	ND						
CG_54_03	ND	CC	CC	AA	CC	AG	AG	TT
CG_54_04	ND	ND						
CG_56_03	ND	ND						
CG_57_03	ND	ND						
CG_57_04	ND	ND						
CG_58_03	ND	CT	TT	AA	TC	AA	GG	CT
CG_58_04	ND	ND						
CG_59_02	ND	ND						
CG_59_03	GC	CC	ND	ND	ND	AG	AG	CC
CG_60_04	ND	ND						
SCG_06	CC	CC	TC	AG	CC	AG	AG	TT
SCG_08	CC	CT	TC	AG	CC	AG	AG	CC
SCG_09	CC	CC	TT	ND	CC	AA	GG	CC
SCG_11	CC	CC	TC	AG	TC	AG	AG	CT
SCG_12	GC	TT	CC	GG	CC	AG	AG	CT
SCG_14	GG	CT	CC	ND	CC	AG	AG	CT
SCG_15	CC	CT	TT	GG	CC	AG	AG	CT
SCG_17	GC	CT	CC	GG	CC	AA	GG	TT
SCG_18	GC	CC	TC	AG	CC	AG	AG	TT
SCG_19	GG	CC	CC	AG	CC	AA	GG	TT
SCG_20	CC	CT	TC	AG	CC	AG	AG	CC
SCG_21	CC	TT	CC	AA	CC	AA	GG	TT
SCG_23	CC	CC	TC	ND	CC	AG	AG	TT
SCG_24	CC	CT	ND	ND	CC	AA	GG	TT
SCG_26	ND	CT	TC	ND	ND	ND	ND	ND
SCG_27	ND	CT	TC	AG	TC	AG	AG	CT
SCG_28	ND	TT	TC	GG	CC	GG	AA	CC
SCG_29	ND	CC	TC	AG	TC	AG	ND	CC
SCG_32	ND	CT	CC	AA	CC	GG	AA	TT
SCG_34	CC	CT	TC	AG	CC	AG	AG	CC
SCG_35	CC	CC	TT	GG	TT	AG	AG	TT
SCG_36	CC	CC	CC	GG	CC	AA	GG	TT
SCG_37	CC	CT	TC	AG	CC	AA	GG	TT
SCG_39	CC	CC	TT	GG	TC	AG	AG	CT
SCG_42	CC	CC	TT	GG	CC	AA	GG	CC
SCG_44	CC	CC	TC	AG	CC	AG	ND	CT

ND – não determinado; CG – indivíduos em famílias (com ou sem lesão ocular); SCG – indivíduos sem família (com lesão ocular)

5.3.3 Razão IFN- γ /IL-13 em Indivíduos Avaliados em 2001 e 2006

Investigamos os valores da razão IFN- γ /IL-13 produzida por PBMC estimuladas com STAg, de indivíduos portadores soropositivos e soronegativos para toxoplasmose, portadores de lesão ocular ou não, acompanhados por um período equivalente a cinco anos. Foram nove indivíduos analisados em dois momentos: 2001 e 2006, sendo sete, deles portadores de lesões. Na análise fundoscópica, nenhuma dessas lesões progrediu apresentando-se como mais grave em 2006. Observamos na **Figura 30** que os valores da razão entre a produção de IFN- γ e IL-13 foi significativamente maior em 2006 quando comparado à mesma razão obtida cinco anos antes (2001). Além disso, observamos que a maioria dos indivíduos que em 2001 apresentava valor de razão IFN- γ /IL-13 abaixo da concentração logarítmica equivalente a 100 pg/ml, em 2006 passaram a produzir mais IFN- γ e, conseqüentemente, apresentaram valor de razão acima da concentração de 100 pg/ml.

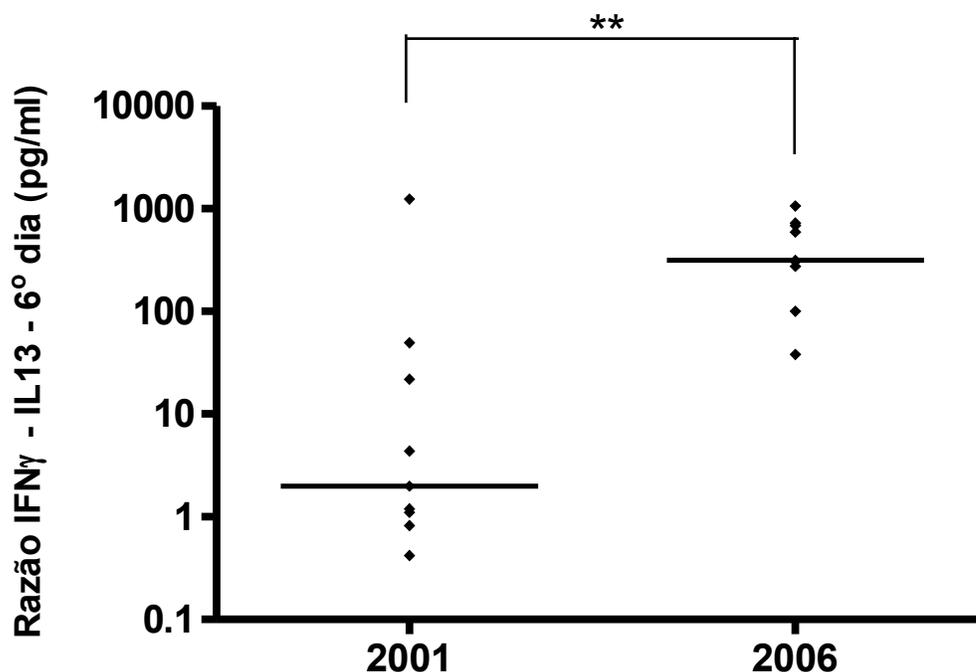


Figura 29: Determinação da média de razão IFN- γ /IL-13 produzida por PBMC estimuladas com STAg, de indivíduos soropositivos e soronegativos para toxoplasmose, portadores de lesão ocular ou não, acompanhados por um período equivalente a cinco anos. 2001 representa o ano da primeira análise, enquanto 2006 indica o ano da segunda análise. O teste estatístico utilizado foi teste Mann-Whitney, no

nível de significância de 5%. O símbolo ** representa a diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$) da razão IFN- γ /IL-13 em 2001 e 2006. As barras indicam valores de mediana. O eixo y está na escala Log 10.

VI. DISCUSSÃO

A manifestação clínica mais comum decorrente da infecção de humanos pelo *Toxoplasma gondii* é a retinocoroidite necrosante, a qual acomete de 28 a 50% de todos os casos de manifestação ocular da toxoplasmose do mundo (Holland, 2004). Neste sentido, vários estudos de interesse particular sobre o comprometimento de fatores genéticos e imunológicos preponderantes na patogênese da toxoplasmose ocular têm sido conduzidos com a finalidade de melhor compreender a dinâmica dessa doença.

É importante ressaltar que este trabalho foi o primeiro a investigar o potencial envolvimento de genes e parâmetros imunológicos, concomitantemente, na diversidade das manifestações clínicas da toxoplasmose ocular crônica.

A frequência observada nesse estudo, de pacientes da população positiva para toxoplasmose, portadores de lesões toxoplásmicas tipo A, AB, ABC, AC, B, BC e C foram 4,4%, 7,4%, 7,4%, 2,1%, 14,9%, 8,5% e 23,4%, respectivamente. Em relação à severidade das lesões, em tese, qualquer uma delas pode causar comprometimento visual dependendo da localização topográfica em que estiver na retina. No entanto, as lesões tipo C (mais brandas) tendem ser mais periféricas que lesões tipo A e B (lesões mais severas). As lesões tipo B (de severidade mediana) tendem se localizar em regiões medianas da retina, enquanto as lesões tipo A (mais severas) tendem se localizar em regiões mais centrais. Além disso, lesões mais severas, tipo A, apresentam tamanho maior do que lesões do tipo B e C, respectivamente. Especula-se que lesões são mais severas e/ou causam maior dano tecidual à medida que sua localização se aproxima de áreas centrais do globo ocular, como por exemplo, o pólo posterior da retina, por tais regiões serem mais vascularizadas propiciando uma reação inflamatória mais intensa. Além disso, a densidade de células foto-receptoras é maior em regiões mais centrais da retina como, por exemplo, a mácula, a qual possui concentração máxima de foto-receptores (cerca de 160.000 por milímetro quadrado) (Tosini *et al.*, 2008). Este fato vem adir conhecimento que auxilia a sustentação da hipótese de que esta seja também uma região preferencial de localização do *T. gondii* na retina, visto que o mesmo possui cloroplasto na constituição do apicoplasto

(Marechal and Cesbron-Delaum, 2001). Recentemente, um relato da literatura mostrou haver evidências de associação de lesões mais severas na toxoplasmose congênita com a virulência do parasita, visto que crianças brasileiras com toxoplasmose congênita apresentaram doença ocular mais freqüentemente e mais graves do que crianças Européias. Essa hipótese é sustentada pelo fato de no Brasil haver predominância de genótipos mais virulentos do parasita *T. gondii* do que na Europa (Gilbert *et al.*, 2008 – *in press*). Alguns trabalhos prévios também sustentam a tese de que cepas do Tipo I e as atípicas parecem associar-se com doença ocular mais severa (Valloci *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2006) que cepas do Tipo II, que predominam na Europa e na América do Norte (Ajzenberg *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007). Virulência aumentada das cepas predominantes no Brasil em comparação com as que predominam na Europa pode refletir a reprodução sexual mais freqüente dentro do ciclo vital do *T.gondii* no Brasil, assim como maior exposição humana a cepas recombinantes, devida ao fato de, no Brasil, a aquisição da infecção dar-se mais freqüentemente através de oocistos (Ferreira *et al.*, 2006). Portanto, estudos de genotipagem de parasitas em indivíduos portadores de diferentes tipos de lesão ocular, devem ser desenvolvidos para maior esclarecimento de questões dessa natureza.

Assumindo que lesões tipo A tenham grande probabilidade de serem oriundas de infecções congênitas e, por essa razão apresentarem-se mais severas, pelo fato de, no momento da infecção o sistema imunológico dos indivíduos não estar suficientemente desenvolvido. Neste estudo, especificamente, mostramos que as lesões severas tendem a ocorrer em áreas centrais da retina, porém os fatores que influenciam na severidade dessas lesões de acordo com sua localização na retina precisam ser melhor investigados.

No que tange ao estudo genético, foi investigada a hipótese específica de que polimorfismos em genes potencialmente envolvidos na manifestação de doenças oculares (*ABCA4*, *CFH*, *TLR5*, *TLR9*, *TLR2*, *IL-13*, *IL-4*, *FOXQ1*, *TLR4*, *COL2A1* e *P2X7*), estejam associados à doença ocular causada pela toxoplasmose. Esses genes, especificamente, foram eleitos como candidatos para este estudo de associação genética, porque alguns deles apresentaram desordens definidas em genes únicos que resultam em: (a) toxoplasmose congênita ou doença ocular precoce, (b) patologias

clínicas ou mecanismos patogênicos pontuais que poderiam estar envolvidos entre as desordens genéticas e a doença ocular induzida pela infecção pelo *T. gondii* e (c) ligados ao desenvolvimento da resposta imune contra o *T. gondii* (Saunders *et al.*, 2003; Jonson and Peng, 2005; Laskers and Nair, 2006; Jamieson *et al.*, 2008; Blackwell – comunicação pessoal).

Embora amplamente definidas como retinocoroidites, a doença ocular causada pela toxoplasmose está associada a um amplo espectro de patologias vitreoretiniais oftalmológicas, incluindo necrose retinal com coroidites adjacentes, e menos frequentemente, vasculites, hemorragias, neovascularização coroidal, descolamento do vítreo posterior, afinamento da retina, descolamento retinal, mudanças no nervo óptico, cataratas, glaucoma e miopia (Kodjikian *et al.*, 2006; Oréfice *et al.*, 2007; Eckert *et al.*, 2007; Bonfioli and Oréfice, 2005).

Observamos que polimorfismos em três marcadores rs1718119, rs1621388 (gene *P2X7*) e rs352140 (*TLR9*) estão intimamente associados com a manifestação de doença ocular causada pela toxoplasmose por meio da utilização de testes estatísticos de associação baseados em família (TDT, Case-Pseudocontrol e FBAT).

Em geral, polimorfismos no gene *P2X7* que codifica para o receptor canal cátion-seletivo ligante (Surprenant *et al.*, 1996) expresso em monócitos, macrófagos, linfócitos, células dendríticas, micróglia e vários outros tipos de células do sistema imunológico, têm sido associados à predisposição ao desenvolvimento de várias desordens, tais como leucemia linfocítica crônica (Dão-Ung *et al.*, 2004), doença de Alzheimer (Parvathenani *et al.*, 2003), desordens afetivas bipolares (Barden *et al.*, 2006), esclerose múltipla (Yiangou *et al.*, 2006) e diabetes (Elliot and Higgins, 2004).

Tendência de associação entre o marcador rs1718119 do gene *P2X7* e desordens de ansiedade foi vista em indivíduos homozigotos AA, preferencialmente, do que em indivíduos homozigotos GG num estudo caso-controle (Erhardt *et al.*, 2007). Nesse estudo, especificamente, polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em rs1718119 (Thr-348-Ala) foi relacionado à manifestação ocular da toxoplasmose em indivíduos baseado na diferença entre a transmissão observada e esperada de alelos individuais entre progenitores e prole, segundo a lei de segregação de Mendel. A mutação rs1718119 (Thr-348-Ala) codifica para uma mudança de carga de aminoácido de uma

treonina polar para uma alanina apolar na segunda região transmembrânica do receptor P2X7, induzindo possíveis mudanças na estabilidade deste ou mudanças alostéricas nas formações homoméricas de subunidades de P2X7 e estrutura do poro formado (Erhardt *et al.*, 2007). A adenosina trifosfato (ATP) parece atuar como um sinal de risco liberado por células sob estresse (Gallucci and Matzinger, 2001) para P2X7R, causando a formação de poros os quais capacitam o transporte de substâncias hidrofílicas, com massa molecular acima de 900 Da, através da membrana celular. Essa ativação do canal por ATP é o pré-requisito para ativação também de caspase 1 e subsequente secreção e maturação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e IL-18 (Gudipaty *et al.*, 2003; Verhoef *et al.*, 2005; Sluyter *et al.*, 2004). IL-1 causa o acúmulo de metabólitos de ácido aracdônico, os quais regulam positivamente a enzima indutora de óxido nítrico (NO), sustentando a produção de óxido nítrico necessário para a eliminação de parasitas intracelulares. Além disso, essa citocina aumenta a expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais, promove o extravasamento de leucócitos, modula o metabolismo do músculo, dentre outras funções (Dinarello, 2002; Alan *et al.*, 2005). IL-18 compartilha características estruturais com IL-1 e, uma vez ligada ao receptor $\alpha\beta$ heterodimérico induz a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ), e várias quimiocinas, além de aumentar a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 sobre células endoteliais (Dinarello, 2002). Neste contexto, em última instância, o polimorfismo no gene *P2X7* (rs1718119) pode induzir um déficit da resposta imune específica contra o *T. gondii* por prejudicar a produção de citocinas, tal como INF- γ , e conferir resistência à infecção pelo *T. gondii*, em estudos *in vitro*, por induzir a degradação de triptofano, um aminoácido essencial para o crescimento do parasita (Taylor and Feng, 1991). Esse resultado corrobora aqueles de um relato de polimorfismo Glu-496-Ala, também no gene *P2X7*, que foi mostrado prejudicar a resposta imune (mediada por ATP) contra micobactérias por macrófagos humanos por prevenir a liberação de IL-1 β e IL-18 a partir de monócitos (Saunders *et al.*, 2003; Sluyter *et al.*, 2004). Neste estudo, observamos que indivíduos altos (“high”) e muito altos (“very high”) produtores de citocinas são, em maioria, portadores de genótipo AG (52,8%) e AA (41,7%), em comparação com GG (5,5%) para o marcador rs1718119 do gene *P2X7*.

Observamos também que polimorfismo em um outro marcador, o rs1621388 (Pro-582-Pro), do gene *P2X7*, está associado ao acometimento de doença ocular toxoplásmica em indivíduos da população estudada. Diferente dos casos supracitados, é interessante notar que não houve mudança de aminoácido apesar da mudança de nucleotídeo neste tipo de polimorfismo. Este fato pode ser explicado pelo código degenerado, no qual um único aminoácido pode ser constituído por quatro diferentes códons, os quais resultam da combinação de nucleotídeos, tais como CCT, CCC, CCA e CCG, por exemplo, no caso da Prolina. Portanto, como nesse caso não há mudança de aminoácido, presume-se que o marcador não tenha influência direta sobre a doença. Uma das possíveis formas de influência indireta desse marcador sobre a doença seria por ele estar em desequilíbrio de ligação (LD) com a verdadeira variante causal da doença. No entanto, dentre as variantes polimórficas tipadas no gene *P2X7*, este marcador encontra-se em fraco desequilíbrio de ligação com outros marcadores (**anexo 3**). Além disso, este SNP poderia também estar em LD com uma variante causal que não tenha sido tipada neste estudo. Outra possível explicação sobre a forma em que este SNP poderia estar influenciando na manifestação da doença ocular, estaria no fato da mudança de nucleotídeo poder influenciar no “splicing” de RNA, embora isto seja normalmente controlado por seqüências dentro dos íntrons e não nos exons. Ou ainda, por influência no controle transcricional, isto é, se alguns códons são traduzidos mais eficientemente que outros.

O controle da toxoplasmose tem sido extensivamente estudado no modelo murino e, além da resposta por IFN- γ , sabidamente essencial para a resistência ao *T. gondii* (Yap and Sher, 1999; Sacks and Sher, 2002), a via de sinalização Toll/IL-1R (TIR) também exerce importante papel na ativação de imunidade inata durante a infecção por este parasita (Scanga *et al.*, 2002).

Enquanto que TLR1, TLR2, TLR4 e TLR5 são expressos na superfície celular, TLR9, dentre outros, possui localização intracelular, o que confere uma posição vantajosa para o reconhecimento de patógenos intracelulares (Nishiya and DeFranco, 2004). Neste estudo foi mostrado que indivíduos portadores de polimorfismo Pro-545-Pro (rs352140) na região exônica do gene *TLR9*, apresentaram maior propensão ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular que os indivíduos não-polimórficos para o

marcador em questão. O engajamento de DNA CpG (principal ligante de TLR9) com TLR9 resulta na ativação de uma variedade de fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1 ou Fator Regulatório 7 de IFN) por vias de sinalização dependentes de MyD88, que em último estágio, induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias Th1, tais como IL-12 e IFNs tipo I, bem como aumentam a expressão de moléculas de adesão e produção de quimiocinas (Kim *et al.*, 2005; Honda *et al.*, 2004). No entanto, relatos da literatura mostraram que DNA CpG não é o único ligante para TLR9. Esquizontes de *Plasmodium falciparum* no estágio sangüíneo, extratos solúveis de esquizontes e pigmentos de hemozoína ativam células dendríticas através da via de sinalização TLR9-MyD88, indicando que TLR9 exerce papel essencial no reconhecimento de infecções Apicomplexa (Pichyangkul *et al.*, 2004; Coban *et al.*, 2005). Por meio de abordagem genética, confirmamos essa relevância do papel de TLR9 na resposta imune contra o *T. gondii*, um outro parasita do Filo Apicomplexa, uma vez que o polimorfismo Pro-545-Pro, no gene *TLR9*, demonstrou estar intimamente relacionado a apresentação de doença ocular causada pela toxoplasmose.

Neste trabalho, outros polimorfismos, em cinco marcadores dos genes *ABCA4* (rs1801574), *COL2A1* (rs1635544, rs2276455, rs2070739) e *CFH* (rs1061170), podem também influenciar na propensão ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular, por meio da utilização do teste de associação baseado em família (FBAT). É necessário ressaltar que esses marcadores mostraram estar envolvidos no acometimento ocular da toxoplasmose em análises considerando os modelos genéticos dominante, recessivo e genotípico, mas não quando o modelo genético aditivo foi utilizado. Isto explica em parte o fato destes marcadores não terem sido revelados como significantes para predisposição à toxoplasmose ocular, quando testes baseados em análises de modelos aditivos, como por exemplo, TDT e Case-pseudocontrol, foram utilizados.

O gene age sobre o traço de maneira recessiva, dominante ou aditiva, cada uma das quais origina um sistema de pontuação específico no teste FBAT (Schaid, 1996). A maioria dos testes que não fornece opção de escolha do modelo genético a ser utilizado baseia-se em modelos aditivos de análise. Vários estudos têm mostrado que o modelo aditivo tem poder elevado, até mesmo quando o modelo genético verdadeiro não é um modelo aditivo (Knapp, 1999; Tu *et al.*, 2000; Horvath *et al.*, 2001). O modelo

aditivo pode ser usado tanto para marcadores bialélicos como multialélicos (Horvath *et al.*, 2001).

No teste FBAT, no caso de um marcador bialélico, com alelos A1 e A2, um código recessivo é dado pelo conjunto igual a 1 se o indivíduo tem genótipo A1A1 e, caso contrário, zero. O código dominante é alcançado de maneira similar: isto envolve código igual a 1 se os descendentes têm qualquer número de um alelo específico, por exemplo, A1, e zero por outro lado. Um código aditivo reflete um modelo genético aditivo ou multiplicativo e é obtido por calcular o número de alelos A1. Isto favorece que o modelo genético aditivo funcione bem, até mesmo quando o modelo genético verdadeiro não é aditivo (Knapp, 1999; Tu *et al.*, 2000; Horvath *et al.*, 2001).

Polimorfismos no gene *ABCA4* têm sido extensivamente associados a doenças genéticas, especificamente distrofias retiniais (Allikmets *et al.*, 1997a; Allikmets *et al.*, 1997b). O gene *ABCA4* codifica para uma proteína transportadora cassete ligante de ATP específica da retina que está localizada no rim do segmento de disco externo do fotorreceptor e, está envolvida no transporte de retinóides através do disco de membrana (Beharry *et al.*, 2004). Pouco é conhecido sobre o padrão cronológico, no desenvolvimento embrionário, de expressão de *ABCA4* no olho durante o desenvolvimento, embora frequência alta de clones cDNA positivos para *ABCA4* tenha sido relatado em varreduras de bibliotecas de cDNA preparadas a partir do desenvolvimento do olho de camundongos (Allikmets, 1997). Portanto, diferente dos genes *P2X7* e *TLR9*, o gene *ABCA4* não está diretamente ligado a resposta imune contra o *T. gondii*, porém parece exercer função relevante na predisposição ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular, visto que a atividade comprometida causada pelo polimorfismo Leu-1894-Leu deste transportador pode levar ao acúmulo de derivados retinóicos tóxicos em cones, o que resulta em apoptose de células do epitélio retinal (Sun *et al.*, 1999; Mata *et al.*, 2000).

O gene *COL2A1* codifica para colágeno tipo II, o qual é encontrado no humor vítreo, córnea, esclera, corpos ciliares, epitélio pigmentar retinal e retina (Ihanamaki *et al.*, 2004). Este gene também não está diretamente ligado à resposta imune, porém polimorfismos em *COL2A1* já mostraram associação com a doença ocular na toxoplasmose congênita, provavelmente como consequência de diferenças na

expressão de colágeno na retina e vítreo, influenciando a migração ou disseminação do parasita dentro do olho, ou estabilidade das estruturas do olho quando existem múltiplos parasitas na coróide, retina ou nervo óptico (Savontaus *et al.*, 1997). Isto teria, provavelmente, efeito mais profundo sobre a patologia durante os estágios iniciais da embriogênese, quando o olho está se formando e *COL2A1* é primeiramente expresso. Neste estudo, observamos que polimorfismos nos marcadores rs1635544, rs2276455 e rs2070739 estão também envolvidos na manifestação de retinocoroidites toxoplásmicas em casos “não sabidamente” congênitos. No entanto, não observamos clara associação entre frequência de um determinado genótipo para esses marcadores e lesão tipo A. Como a toxoplasmose é uma doença complexa, múltiplos genes e modificadores contribuirão para a patologia num estágio final. Além disso, não é esperado que a patologia vista na toxoplasmose congênita seja a mesma daquela observada no caso de uma desordem genética muito específica como a doença de Stickler. Entretanto, diferenças na expressão de colágeno poderiam contribuir para conseqüências clínicas similares como, por exemplo, descolamento retinal que ocorre raramente na toxoplasmose (<10% daqueles com toxoplasmose congênita mais severa), mas comumente (>70%) na doença de Stickler. Diferenças na expressão de colágeno poderiam também afetar a angiogênese e fibrinogênese, as quais parecem causar seqüelas oftalmológicas (Benevento *et al.*, 2008). É interessante notar que genes de colágeno do hospedeiro estão entre aqueles com aumentada expressão quando *T. gondii* infecta fibroblastos (Saeij *et al.*, 2007).

Uma outra questão chave é como os parasitas influenciam a patogênese da doença regulada geneticamente. Isto poderia ser via polimorfismos em sítios de NF- κ B, por exemplo, os quais regulam a expressão gênica e processos de desenvolvimento. O *T. gondii* é um potente alvo e regulador direto desta via de sinalização (Molestina and Sinai, 2005a; Molestina and Sinai, 2005b) e sua presença poderia regular positivamente o programa de expressão desses 2 genes (*COL2A1* e *ABCA4*), que tem sítios ligantes do fator de transcrição NF- κ B em seus promotores (Grabe, 2002; Cartharius *et al.*, 2005), durante o desenvolvimento do olho. É possível ainda que o parasita possa diretamente interferir com padrões de metilação e ou acetilação de

histonas de DNA do hospedeiro, portanto, diretamente afetando a regulação da expressão de genes (Molestina and Sinai, 2005a).

Polimorfismos no gene *CFH* (Complement Factor H) estão envolvidos com a Degeneração Macular Relacionada com a Idade (AMD). Esta doença ocorre na mácula, zona central da retina, responsável pela visão detalhada e central, sendo responsável por graves perturbações oculares em indivíduos com mais de 50 anos.

Outro polimorfismo associado à propensão ao desenvolvimento de lesões oculares toxoplásmicas, encontrado neste estudo, foi observada no marcador do gene *CFH* (Complement Factor H). Este gene é um regulador chave do sistema complemento (Córdoba *et al.*, 2004). O sistema complemento protege contra uma variedade de infecções. CFH sobre células e na circulação regula a atividade do complemento por inibir a ativação de C3 para C3a e C3b e, por inativar C3b existente. Este polimorfismo Thr-402-His (rs1061170) foi primeiramente relatado ser uma variação patogênica primária que aumentava o risco de desenvolver AMD. Os dados aqui apresentados mostram, no entanto, que este polimorfismo está também envolvido com o aumento no risco de desenvolver toxoplasmose ocular. CFH é composto de 20 unidades repetitivas de 60 aminoácidos chamados de repetições de consenso curto (SCRs). O polimorfismo Try-402-His está localizado na região SCR7, a qual contém os sítios ligantes para heparina, proteína C reativa (CPR) e proteína M (International HapMap Consortium, 2003). Soros de pacientes AMD apresentaram-se com quantidades mais elevadas de CPR que aqueles soros de indivíduos saudáveis (Templeton and Boerwinkle, 1987), sugerindo que polimorfismo em Try-402-His no gene *CFH* causou mudanças no sítio ligante para CPR o que impossibilitou a ligação desta proteína à região SCR7 de CFH.

Os demais marcadores avaliados nesse estudo, incluindo aqueles de genes de citocinas tais como IL-13, IL-10 e IL-4, não apresentaram associação com a doença ocular decorrente da toxoplasmose. No entanto, para esclarecer e confirmar a contribuição dos genes avaliados neste estudo baseado em família para o desenvolvimento da toxoplasmose ocular, um estudo caso-controle deverá ser conduzido na seqüência deste trabalho com casuística maior para aumentar o poder estatístico de análise.

Um conjunto de evidências experimentais e clínicas sugere que as citocinas exerçam papel chave na patogênese da toxoplasmose. Nesse contexto, citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ e TNF- α), foram dosadas em sobrenadantes de culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos soropositivos e soronegativos para toxoplasmose, portadores ou não de lesão ocular, tendo sido os sobrenadantes das culturas coletados no primeiro e sexto dias após o início das culturas estimuladas com STAg ou não.

No intuito de melhor compreender a relação entre o perfil de citocinas produzidas *in vitro* e a manifestação clínica de lesões oculares decorrentes da toxoplasmose, os indivíduos foram agrupados segundo a severidade das lesões. Para tanto, um critério de classificação da severidade das lesões de acordo com o aspecto morfológico apresentado foi estabelecido. A classificação das lesões oculares descritas neste estudo trata-se de uma nova proposta que considera, principalmente, o grau de destruição tecidual baseado na distribuição de pigmentação e/ou na ausência dela nas cicatrizes observadas na retina (Oréfice and Bahia Oliveira 2005).

Primeiramente, o perfil de produção dessas citocinas produzidas no sexto dia após o início das culturas foi observado nos grupos de pacientes soropositivos (SP) e soronegativos (SN) para toxoplasmose. Observamos que PBMC de indivíduos SP apresentaram aumento significativo da produção de todas citocinas avaliadas, exceto IL-2, após adição de STAg às culturas, comparado aos níveis produzidos pelos controles não estimulados. Esses dados sugerem que as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ e TNF- α possuem papel relevante na resposta imune específica para *T. gondii*.

Na infecção experimental pelo *T. gondii* observa-se o desenvolvimento de imunidade celular fortemente polarizada para o perfil Th1. A fase aguda é marcada por níveis elevados de IFN- γ e IL-12, assim como de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , GM-CSF, IL-6 e IL-1. Entretanto, IL-10, uma citocina anti-inflamatória, é também induzida neste estágio da infecção. Durante a fase crônica, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são requeridos para prevenir a reativação da toxoplasmose. Quando estas células são estimuladas *in vitro* com antígenos do parasita, produzem altos níveis de IFN- γ e IL-2. Ao contrário, da fase aguda da infecção, células NK parecem não

contribuir significativamente com a produção de IFN- γ durante a fase crônica. Entretanto, quando células NK e monócitos são cultivados na presença de antígenos de *T. gondii*, estas produzem IFN- γ e monocinas, tais como IL-12, TNF- α , IL-1 e IL-15 (revisado por Gazzinelli *et al.*, 1994). Embora a morte do parasita mediada por IFN- γ seja importante para o controle da infecção, no modelo experimental murino, as taxas de mortalidade em ambos animais (IL-4^{-/-} e IL-10^{-/-}) infectados com *T. gondii* foram significativamente maiores do que nos controles imunocompetentes, o que pode ser explicado pela exacerbação da resposta imune inflamatória no intestino daqueles animais que morreram de enterite aguda (Gazzinelli *et al.*, 1996).

Citocinas como IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 e TGF- β podem, dependendo das circunstâncias, apresentar efeitos de regulação negativa em níveis basais sobre a atividade do sistema imune (Minty *et al.*, 1993). Este fato pôde ser observado também no conjunto de resultados apresentados neste estudo, relativos a tais citocinas. Observamos que a citocina IFN- γ foi produzida em quantidades muito maiores que as demais citocinas pertencentes ao padrão Th2 de resposta imune. No entanto, o estímulo de STAg funciona de forma específica também para citocinas do padrão TH2, podendo ser observado pelo aumento da produção dessas citocinas após adição do estímulo antigênico específico. Algumas citocinas TH2 como, por exemplo, IL-4 e IL-13 possuem mecanismos de ação semelhantes. As atividades interrelacionadas de IL-4 e IL-13 são, pelo menos parcialmente, devido ao uso compartilhado do complexo receptor heterodimérico IL-4/IL-13 (Zurawski *et al.*, 1994). IL-13 compartilha com os glicocorticóides um efeito de regulação negativa sobre a imunidade mediada por células. IL-13 inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP-1 α) (Arima *et al.*, 2000; Nasu *et al.*, 2001). IL-13 também suprime a produção de óxido nítrico, assim como a indução de ciclo-oxigenase-2 em macrófagos (Nasu *et al.*, 1999; Nasu *et al.*, 2001). IL-13 não afeta diretamente células T, contudo, por inibir a produção de IL-12 e IFN- γ , IL-13 pode evitar o desenvolvimento de linfócitos TH1, os quais parecem ser determinantes para a maioria das uveítes posteriores (Mosmann *et al.*, 1986; Arima *et al.*, 2000).

Observamos ainda que diferenças significativas na produção de citocinas entre grupos de indivíduos soropositivos (SP) e soronegativos (SN), ambos submetidos ao

tratamento com STAg, foram detectadas somente em relação à produção de IFN- γ . Quando pacientes soropositivos para *T. gondii* apresentando lesão (CL) e, soropositivos para *T. gondii* saudáveis (SL) foram analisados em separado, observamos que indivíduos CL produziram mais IFN- γ que indivíduos SL e SN. Este resultado confronta com um dado da literatura que mostrou que pacientes assintomáticos soropositivos produziram significativamente mais IFN- γ em resposta a STAg que pacientes portadores de retinocoroidites ou indivíduos soronegativos (Yamamoto *et al.*, 2000). Todavia, esses dados confirmam um achado anterior, o qual mostrou que a média de IFN- γ obtida em pacientes soropositivos com lesão ocular foi significativamente maior que a concentração média obtida pelos pacientes soropositivos sem lesão (Azevedo-Silva, 2001).

Na comparação do perfil de produção de citocinas entre indivíduos CL, SL e SN, indivíduos SL e CL apresentaram também aumento significativo da produção de todas citocinas avaliadas, exceto IL-2 e IL-10 (para SL), após adição de STAg às culturas, comparado aos níveis produzidos pelos controles não estimulados.

É importante notar que, sob estímulo do extrato solúvel de *T. gondii*, PBMC de indivíduos CL produziram quantidades significativamente maiores de IFN- γ e IL-5 comparado aos níveis de ambas produzidos por indivíduos SN, e adicionalmente, aos níveis de IFN- γ produzidos por indivíduos SL. A IL-5 é uma citocina produzida principalmente por linfócitos T CD4⁺ (Th2) e desempenha alguns efeitos sobre linfócitos B. No contexto da toxoplasmose experimental, esta citocina parece desempenhar papel protetor, visto que na sua ausência, camundongos infectados apresentaram susceptibilidade aumentada à infecção pelo parasita, observada através da mortalidade acelerada, elevação do número de parasitas no cérebro e rápida perda de peso durante a fase aguda (Zhang and Denkers, 1999). A análise por RT-PCR revelou que IL-5 é induzida tanto na fase aguda quanto na fase crônica. A análise do perfil de produção de citocinas em camundongos deficientes em IL-5 revelou que estes apresentaram níveis mais baixos de IL-12, sugerindo uma relação de dependência entre a produção de IL-5 e a produção de IL-12 (Zhang and Denkers, 1999). Por este motivo é possível sugerir que o papel de IL-5 sobre a proteção seja indireto, e que a proteção desta se dê pelos efeitos de IL-12 sobre a produção de IFN- γ , que por sua vez atuaria diretamente na

proteção do hospedeiro contra os parasitas. Este resultado referente à produção mais elevada de IL-5 em indivíduos CL comparado aos níveis desta citocina produzidos por outros grupos de indivíduos corroboram com achados prévios, onde a dosagem de IL-5 nos sobrenadantes de culturas de células de pacientes com toxoplasmose crônica apresentando lesão ocular do tipo A foi maior que aquelas dosadas nos sobrenadantes de culturas de células de pacientes com lesões oculares toxoplásmicas dos tipos B e C, e ainda foi significativamente maior que daquelas culturas de PBMC de pacientes soropositivos para toxoplasmose sem lesão ocular (Azevedo-Silva, 2001).

Indivíduos portadores de lesão tipo A, B e C, agrupados de acordo com a presença de lesão mais severa, foram também comparados em relação à produção de citocinas. Observamos que houve aumento significativo na produção de IFN- γ , TNF- α , IL-5 e IL-13 nos grupos de indivíduos portadores de lesão A, lesão B e lesão C, após adição de STAg às culturas. Tem sido descrito na literatura que tanto IFN- γ quanto TNF- α são importantes durante a fase crônica da infecção murina por *T. gondii* (Suzuki *et al.*, 1988; Suzuki e Remington 1990; e Gazzinelli *et al.*, 1992), visto que a depleção destas citocinas resulta em respostas inflamatórias mais intensas em olhos de camundongos infectados (Gazzinelli *et al.*, 1994). Durante a fase aguda, células NK foram identificadas como as principais fontes de IFN- γ , mediante a indução de IL-12. A citocina IL-12 é principalmente produzida na fase aguda da infecção pelo *T. gondii*. Esta citocina juntamente com IFN- γ direciona a resposta imune celular específica para o perfil Th1, uma resposta adequada para o controle da fase crônica da infecção toxoplásmica.

Somente indivíduos com lesão B apresentaram produção aumentada de IL-10 após adição de STAg. Especificamente, IL-10 é capaz de inibir a produção de IFN- γ por células T e NK através da supressão da produção de citocinas, tais como, IL-1, TNF- α e IL-12 por macrófagos. Na ausência de IL-10, em modelos experimentais, os níveis séricos de IFN- γ e IL-12 encontram-se aumentados e camundongos morrem precocemente durante a fase aguda por resposta inflamatória intensa no intestino (Gazzinelli *et al.*, 1996; Neyer *et al.*, 1997; e Suzuki 1999). Portanto, acredita-se que citocinas TH2 desempenhem papel importante na toxoplasmose, não só murina como humana, no que se refere à função de modular a intensidade da resposta inflamatória.

A citocina IL-2 é produzida principalmente por células T estando, portanto, mais envolvida na resposta imune adaptativa. IL-2 tem como função: o estímulo da proliferação celular, aumento da síntese de citocinas, potencialização da apoptose mediada por Fas, promoção do desenvolvimento de células T reguladoras, sobrevivência celular, dentre outras (Margolin, 2008). Não foi observado aumento significativo da produção de IL-2 em nenhum dos grupos de análise conduzido neste estudo. Esse fato indica que a resposta imune ao estímulo específico contra o *T. gondii* não induz produção diferencial de IL-2, o que de fato faz sentido pela fase da infecção (crônica) em que se encontram os indivíduos envolvidos nesse estudo, posto que a produção de IL-2 na fase crônica de determinada doença infecciosa é menor do que sua produção na fase aguda.

Quando os indivíduos foram separados considerando-se cada tipo de lesão apresentada, pudemos observar que, em geral, indivíduos portadores de lesão tipo C demonstraram tendência à produção de citocinas com padrão semelhante aos observados para indivíduos SL.

Smith e colaboradores (2004), comparando a infecção de *T. gondii* em várias linhagens de células endoteliais humanas *in vitro*, demonstraram uma predileção destes por tecidos retinianos, com maior proliferação em células do endotélio vascular retinal (RVE) comparado às outras linhagens celulares.

Embora taquizoítas de *T. gondii* demonstrem clara capacidade de causar destruição tecidual, através da lise de células que eles infectam, lesões retinocoroidais produzem resposta inflamatória, a qual é evidente clinicamente e em modelos experimentais. Tal ativação imune é importante no controle da infecção toxoplásmica, mas algumas evidências do modelo murino sugerem que quantidade substancial de necrose retinal e, destruição tecidual, vista na retinocoroidite ativa, é atribuível à resposta agressiva de linfócitos T (Lu *et al.*, 2004).

A produção de IFN- γ tem sido freqüentemente associada com uveítes autoimunes. A destruição tecidual autoimune seguida de infecção pelo *T. gondii* pode causar danos teciduais que levam à diminuição da acuidade visual, dependendo da região ocular atingida. Modelos animais de retinocoroidite toxoplásmica têm demonstrado que, embora cistos teciduais estivessem presentes na retina, há consistente perda seletiva

da camada fotorreptora, provavelmente, por meio de mecanismos de autoimunidade secundária (McMenamin *et al.*, 1986; Dutton *et al.*, 1986). Além disso, linfócitos de pacientes com retinocoroidite toxoplásmica mostraram aumentada resposta proliferativa a antígenos solúveis retiniais *in vitro* (Nussenblat *et al.*, 1989). Isto sugere que a infecção inicial pode liberar grandes quantidades destes antígenos, os quais podem induzir uveíte autoimune experimental em primatas e humanos (Nussenblat *et al.*, 1989; Caspi, 2006). Em apoio à teoria autoimune, vários estudos têm investigado respostas de anticorpos anti-retiniais em pacientes com retinocoroidites toxoplásmica. Quando testada contra antígenos retiniais bovinos, o soro destes pacientes com retinocoroidite mostrou elevada prevalência e título de anticorpos comparado com controles saudáveis (Abrahams *et al.*, 1983). Em um segundo estudo, a maioria do soro dos pacientes com retinocoroidites toxoplásmica mostrou atividade contra tecido retiniano humano, e títulos de anticorpos anti-fotorreceptores foram significativamente maiores em pacientes portadores de retinocoroidites comparado com controles saudáveis (Whittle *et al.*, 1998). No entanto, estudos da resposta imune *in vitro* contra o *T. gondii* em grupos de indivíduos soropositivos com lesão ocular, bem como em grupos controles, de certo auxiliam no esclarecimento dos fatores envolvidos no disparo da doença ocular.

Polimorfismos de nucleotídeos únicos em regiões reguladoras de genes de citocinas afetam os níveis de expressão de algumas citocinas. Além disso, diferenças genéticas que afetam a expressão de genes de citocinas podem influenciar a extensão e a duração da resposta imune, podendo até mesmo induzir predisposição a desordens imunológicas (Awad *et al.*, 1998). Observamos, neste estudo, que alguns indivíduos comportam-se como altos (“high”) e muito altos (“very high”) produtores de citocinas, enquanto outros aparecem como baixos (“low”) produtores de citocinas. Analisando os dados, constatamos que de um total de 94 indivíduos, 65 deles (sendo 4 SN, 15 SL e 46 CL) aparecem pelo menos uma vez como “high” ou “very high” produtores de alguma das sete citocinas avaliadas. Indivíduos que se apresentam como altos produtores mais freqüentemente (4 ou mais vezes para as 7 citocinas avaliadas) totalizam 18 de um universo de 65. Dentre esses 18 indivíduos 15 são portadores de um ou mais tipos de lesão ocular (A, AB, ABC, AC, B, BC e C) e os outros 3 são

indivíduos SL e SN. Portanto, indivíduos portadores de lesão ocular tendem produzir níveis mais elevados das citocinas avaliadas.

A elevada frequência de altos e muito altos produtores de citocinas (em 4 ou mais das sete citocinas) não foi relacionada ao tipo de lesão ocular (A, B ou C), visto que indivíduos portadores de lesões A, B e C apresentaram frequências de altos e muito altos produtores similares: 5 (14), 6 (17) e 4 (15), respectivamente. Esse conjunto de dados reforça a idéia de que outros fatores, que não o tipo de lesão ocular, estejam atuando de forma que indivíduos particulares tenham maior capacidade de resposta por produção de citocinas.

A frequência de apresentação de genótipos para cada marcador, significativa neste estudo, foi avaliada em indivíduos “high” e “very high” (no caso de IL-13 e IFN- γ) para produção de citocinas. Um determinado genótipo, para cada marcador, foi observado ser mais freqüente em relação aos outros genótipos do mesmo marcador. Quando a frequência de genótipos em indivíduos “high” e “very high” foi comparada à frequência dos genótipos de cada marcador em todos indivíduos genotipados, foi constatada uma frequência diferente daquela obtida nos indivíduos “high” e “very high” somente para o marcador rs352140 (TLR9). A frequência de genótipos para este marcador, dentre indivíduos “high” e “very high”, foi de 20,9% (CC), 53,3% (CT) e 25,7% (TT), enquanto no total de indivíduos genotipados para este marcador, as frequências obtidas foram 25% (CC), 33,3% (CT), 41,7% (TT). No entanto, estudos de avaliação da frequência dos genótipos de cada marcador devem ser realizados, *a posteriori*, em estudo caso-controle, visto que neste estudo somente indivíduos com lesão e seus pais e/ou irmãos co-sangüíneos foram genotipados.

Retinocoroidite toxoplásmica ativa associada à idade do paciente tem sido assunto de estudo (Bosch-Driessen *et al.*, 2002; Friedmann *et al.*, 1969; Gilbert *et al.*, 1999). O foco desses estudos reside sobre a tendência de indivíduos mais velhos desenvolverem lesões mais severas (Holland, 2008). Indivíduos “high” e “very high” produtores de citocinas foram também avaliados neste contexto. Não foram observadas diferenças significativas de idade entre os grupos de indivíduos analisados neste estudo. A média de idade dos indivíduos analisados foi 31 anos. A mesma média de idade (31 anos) foi observada entre os indivíduos “high” produtores de citocinas. No

entanto, a média de idade dentre os indivíduos “very high” para produção de ambas as citocinas, IFN- γ e IL-13, foi de 35 anos. A média de idade dentre indivíduos “very high” para produção IFN- γ foi 38,4 anos, enquanto que a média de idade dentre os indivíduos “very high” para produção de IL-13 foi de 30,6 anos. Esses resultados indicam que indivíduos mais velhos tendem a produzir maiores níveis de IFN- γ , o que pode explicar em parte os achados da literatura que dizem que indivíduos mais velhos tendem a apresentar lesões mais severas. Estes dados corroboram com dados de um estudo recente desenvolvido no Brasil, onde foi mostrado que idade mais elevada foi o maior fator de risco para doença ocular entre membros infectados com *T. gondii* (Portela *et al.*, 2004), tendo sido a prevalência de toxoplasmose ocular significativamente mais alta em indivíduos com mais de 50 anos.

Estudo de investigação da evolução da resposta imune de indivíduos associado a mudanças no perfil clínico para toxoplasmose foi também realizado neste estudo através da avaliação da razão IFN- γ /IL-13 em grupo de nove indivíduos analisados em dois momentos, com intervalo de 5 anos (2001 e 2006). Tal análise mostra que indivíduos produzem níveis significativamente mais altos de IFN- γ em 2006 comparados aos níveis de produção desta citocina em 2001. Dentre os nove indivíduos analisados, sete são portadores de lesão ocular. Destes, 4 possuem mais de 40 anos, 1 possui 35 anos e 2 possuem idade de 19 anos, sendo a média de idade neste grupo de nove pacientes de 36 anos. Esta média é próxima daquela observada para indivíduos “very high” produtores de IFN- γ . Dados da literatura sugerem que pacientes mais velhos de fato tem um risco maior de envolvimento ocular, seguido de infecção recentemente adquirida do que indivíduos jovens. Pesquisadores na Holanda, por exemplo, têm demonstrado que a maioria dos pacientes com toxoplasmose ocular que tem evidência sorológica de infecção recente são mais velhos (Bosch-Driessen *et al.*, 2002; Ongkosuwito *et al.*, 1999; Ronday *et al.*, 1995). Pacientes onde a toxoplasmose ocular foi primeiramente vista, quando eles tiveram evidência sorológica de infecção adquirida remotamente, tinham uma média de idade de 29,9 anos, enquanto pacientes onde a toxoplasmose ocular foi primeiramente detectada quando eles tiveram evidência sorológica de infecção recente tinham média de idade de 50,6 anos (Bosch-Driessen *et al.*, 2002).

Evidência de sinergismo de ação entre IL-13 e IFN- γ no olho, tem sido descrita no modelo experimental em ratos de uveíte induzida por endotoxina, onde foi mostrado que IL-13 promove o decréscimo da expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, proteína quimioatraente de monócitos-1 (CCL2/MCP-1) e proteína inflamatória de macrófago-2 (CXCL-2/MIP-2) como medido por níveis de mRNAs no corpo ciliar e na retina, enquanto níveis aumentados de expressão de mRNA de IFN- γ foram observados no corpo ciliar e íris. O pré-tratamento de macrófagos com IL-13 aumenta a produção de óxido nítrico (NO) induzido por LPS, potencializando a inibição da replicação intracelular de *T. gondii* (Hélène *et al.*, 2008). Este fato corrobora com nossa hipótese de que IL-13 exerça papel protetor por prevenir os danos causados por uma resposta inflamatória exacerbada no olho. Entretanto, o aumento da expressão de mRNA de IFN- γ no corpo ciliar e íris indica o desenvolvimento de um mecanismo compensatório de indução de resposta inflamatória que poderia estar sendo desencadeado por citocinas TH2 como, por exemplo, a própria IL-13. Esta hipótese é sustentada por dados que descrevem um possível papel inflamatório para IL-13 (D'Andrea *et al.*, 1995; Major *et al.*, 2002; Marshall *et al.*, 1997), o qual é sugerido estar intimamente ligado ao estado de pré-ativação de macrófagos com IL-13 (Hélène *et al.*, 2008). Nesse sentido, à medida que o indivíduo se torna mais velho, os níveis elevados de IL-13 poderiam estar atuando como pré-tratamento para macrófagos se ativarem pela via não-clássica. Isto, por sua vez, contribuiria para o aumento nos níveis de IFN- γ à medida que o indivíduos se torna mais velho, causando, portanto, danos ainda maiores ao tecido retiniano como consequência de uma resposta inflamatória intensa. Os resultados referentes à razão IFN- γ /IL-13 mostraram que os níveis de IFN- γ 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- γ , o que poderia explicar o desenvolvimento de lesões severas em indivíduos mais velhos (Holland, 2008).

O melhor entendimento da dinâmica de produção de citocinas com a idade associado ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular, certamente propiciará a elaboração de estratégias para prevenção desta doença.

VI. CONCLUSÃO

- Cicatrizes de lesões toxoplásmicas de tamanho entre 0,6 e 2 DD (lesões maiores) tendem se localizar em regiões mais centrais da retina, comparado com lesões menores (entre 0 e 0,5 DD), as quais ocorrem com maior frequência em regiões periféricas, indicando que a severidade da lesão está diretamente ligada ao tamanho e localização da mesma;

- Polimorfismos em nucleotídeo único nos genes *P2X7* e *TLR9* estão intimamente relacionados com o desenvolvimento de toxoplasmose ocular em todos os testes baseados em família (TDT, Case-pseudocontrol e FBAT) utilizados neste estudo;

- Polimorfismos em marcadores dos genes *ABCA4*, *COL2A1* e *CFH*, avaliados pelo teste FBAT, estão envolvidos no acometimento visual causado pela infecção pelo *T. gondii*;
- Células mononucleares do sangue periférico de indivíduos soropositivos para toxoplasmose (com ou sem lesão ocular) apresentaram aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ e TNF- α , após estímulo de STAg, em comparação a PBMC de indivíduos soronegativos, sugerindo que tais proteínas estejam envolvidas na resposta imune específica contra o *T. gondii*;
- A produção de IFN- γ apresentou-se significativamente maior em indivíduos soropositivos que em soronegativos, ambos estimulados com antígeno de *T. gondii*, e esta produção aumentada em indivíduos soropositivos (SP) está relacionada à produção significativamente mais elevada de IFN- γ em indivíduos com lesão ocular (CL), em comparação com indivíduos sem lesão (SL) e soronegativos (SN);
- Células mononucleares do sangue periférico de indivíduos CL produziram quantidades significativamente maiores de IFN- γ e IL-5, quando estimuladas por STAg, comparado aos níveis de ambas citocinas produzidas por indivíduos SN e SL, sugerindo papel relevante dessas moléculas na manutenção da resposta imune eficiente em indivíduos portadores de doença ocular;
- Indivíduos portadores de lesão tipo C apresentaram padrão de produção de citocinas semelhante àquele observado em indivíduos SL, sugerindo que tal padrão possa protegê-los da manifestação de lesões oculares severas;
- Não foi observada relação entre o tipo de lesão ocular apresentada e a produção de níveis elevados de citocinas.

- Determinados genótipos para cada marcador aparecem com maior frequência que outros em indivíduos altos (“high”) e muito altos (“very high”) produtores de citocinas, no entanto a frequência de genótipos nesses indivíduos somente foi significativamente diferente daquela observada na população genotipada em relação ao marcador *TLR9_rs352140*;

- Indivíduos muito altos (“very high”) para produção de IFN- γ possuem média de idade mais elevada que indivíduos pertencentes aos demais grupos, sugerindo que indivíduos mais velhos tendem a produzir níveis mais elevados desta citocina que indivíduos jovens;

- Faz-se necessário estudar em maiores detalhes a produção concomitante e adequada em termos de proporção a ser identificada, de IFN- γ e IL-13 considerando o potencial de ambas as citocinas para eliminação do parasita e proteção contra danos no tecido retiniano, respectivamente;

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMS I. W. AND GREGERSON D. S. Longitudinal study of serum antibody responses to bovine retinal S-antigen in endogenous granulomatous uveitis. *British Journal of Ophthalmology*, 67 (10), pp. 681-684. 1983.
- AJZENBERG D., BAÑULS A. L., SU C., DUMÈTRE A., DEMAR M., CARME B. AND DARDÉ M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 34 (10), pp. 1185-1196. 2004.

- ALEXANDER J. AND HUNTER C. A. Immunoregulation during Toxoplasmosis. *Chem Immunol* 70: 81-102, 1998.
- ALLAN S. M., PARKER L. C., COLLINS B., DAVIES R., LUHESHI G. N. AND ROTHWELL N. J. Cortical cell death induced by IL-1 is mediated via actions in the hypothalamus of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5580–5585, 2000.
- ALLIKMETS R., SHROYER N. F., SINGH N., SEDDON J. M., LEWIS R. A., BERNSTEIN P. S., PEIFFER A., ZABRISKIE N. A., LI Y., HUTCHINSON A., DEAN M., LUPSKI J. R. AND LEPPERT M. Mutation of the Stargardt disease gene (*ABCR*) in age-related macular degeneration. *Science* 277: 1805–1807, 1997b.
- ALLIKMETS R., SINGH N., SUN H., SHROYER N. F., HUTCHINSON A., CHIDAMBARAM A., GERRARD B., BAIRD L., STAUFFER D., PEIFFER A., RATTNER A., SMALLWOOD P., LI Y., ANDERSON K.L., LEWIS R.A., NATHANS J., LEPPERT M., DEAN M. AND LUPSKI J.R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (*ABCR*) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* 15: 236–246, 1997a.
- ALLISON A. C. – Natural selection and population diversity. *J. Biosoc. Sci. Suppl.* 1: 15-30, 1969.
- AZEVEDO-SILVA J. Avaliação da resposta imunológica contra antígenos de *Toxoplasma gondii* e *Ascaris lumbricoides* em pacientes residentes em áreas co-endêmicas para ambos os parasitas 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. M. G., JONES J. L., AZEVEDO-SILVA J., ALVES C. C. F. AND ORÉFICE F. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 9 (1): 55-62, 2003.
- BAHIA-OLIVEIRA L. M. G. AND OREFICE F. Toxoplasmosis. *Seminars in Ophthalmology*, 20 (3): 129-141. 2005.
- BAHIA-OLIVEIRA L. M. G., WILKEN DE ABREU A. M., AZEVEDO-SILVA J. AND 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.
- BARDEN N., HARVEY M., GAGNÉ B., SHINK E., TREMBLAY M., RAYMOND C., LABBÉ M., (...), MÜLLER-MYHSOK, B. Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 141 (4): 374-382, 2006.
- BARRAGAN A. AND SIBLEY L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology* 11(9): 426 – 430, 2003.
- BEHARRY S., ZHONG M., MOLDAY R. S. N-retinylidene-phosphatidylethanolamine is the preferred retinoid substrate for the photoreceptor-specific ABC transporter ABCA4 (ABCR). *Journal of Biological Chemistry*, 279 (52):53972-53979, 2004.
- BENEVENTO J. D., JAGER R. D., NOBLE A. G., LATKANY P., MIELER W. F., SAUTTER M., MEYERS S., METS M., GRASSI M. A., RABIAH P., BOYER K., SWISHER C. AND MCLEOD R. Toxoplasmosis-associated neovascular lesions treated successfully with ranibizumab and antiparasitic therapy. *Archives of Ophthalmology* 126(8): 1152-1156, 2008.
- BERNSTEIN P. S., LEPPERT M., SINGH N., DEAN M., LEWIS R. A., LUPSKI J. R., ALLIKMETS R. AND SEDDON J. M. Genotype–phenotype analysis of ABCR variants in macular degeneration probands and siblings. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 43: 466–473, 2002.
- BHOPALE G. M. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes Infect* 5: 457 – 462, 2003.
- BLACKWELL J. M. Research report. Cambridge Institute for Medical Research – University of Cambridge, 2006.
- BLACKWELL J. M. – Genetics and Genomics in Infectious Disease Susceptibility. *Trends in Molecular Medicine* 7 (11): 521 – 526, 2001.
- BOCH J. Coccidiosis in cats. *Tierarztl Prax.* 12(3):383-90, 1984.
- CARTHARIUS K., FRECH K., GROTE K., KLOCKE B., HALTMEIER M., KLINGENHOFF A., FRISCH, M., (...), WERNER, T. MatInspector and beyond:

Promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, 21 (13): 2933-2942, 2005.

CASPI, R.R. Ocular autoimmunity: The price of privilege? *Immunological Reviews*, 213 (1), pp. 23-35. 2006.

CHAKIR H., LEMAY A. M. AND WEBB J. R. Cytokine expression by murine DX5+ cells in response to IL-12, IL-18, or the combination of IL-12 and IL-18. *Cell Immunol* 25;212(1):71-81, 2001.

CHOI V. M., HARLAND R. M. AND KHOKHA M. K. Developmental expression of FoxJ1.2, FoxJ2, and FoxQ1 in *Xenopus tropicalis*. *Gene Expr Patterns*. Jun;6(5):443-7, 2006.

COBAN C., ISHII K. J., KAWAI T., HEMMI H., SATO S., UEMATSU S., YAMAMOTO M., (...) AND AKIRA S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *Journal of Experimental Medicine*, 201 (1):19-25, 2005.

CONNOR T. B., ROBERTS A. B., SPORN M. B. *et al.* Correlation of fibrosis and transforming growth factor- β type 2 levels in the eye. *J Clin Invest* 83:1661–6, 1989.

CULBERTSON W. W, TABBARA K. F. AND O'CONNOR G.R. Experimental ocular toxoplasmosis in primates. *Arch Ophthalmol* 100: 321 – 323, 1982.

DAO-UNG L.-P., FULLER S. J., SLUYTER R., SKARRATT K. K., THUNBERG U., TOBIN G., BYTH K., BAN M., ROSENQUIST R., STEWART G. J. AND WILEY J. S. Association of the 1513C polymorphism in the P2X7 gene with familial forms of chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 125 (6): 815-817. 2004.

DE BOAR J. H., LIMPENS J., ORENGO-NANIA S., DE JONG P. V. T. M., HEIJ E. L. AND KOJLSTRA A. Low mature TGF- β 2 levels in aqueous humor during uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3702–3710, 1994.

DE PAOLI P., BASAGLIA G., GENNARI D., CROVATTO M., MODOLO M. L. AND SANTINI G. Phenotypic profile and functional characteristics of human gamma and delta T cells during acute toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 30(3):729-731, 1992.

- DENKERS E. Y., SCHARTON-KERSTEN T., BARBIERI S., CASPER P. AND SHER A. A role for CD4+ NK1+ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection. *J Exp Med* 184: 131, 1996.
- DENKERS E. Y. AND 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.
- DESSEIN A. J., CHEVILLARD C., MARQUET S., HENRI S., HILLAIRE D. AND DESSEIN H. – Genetics of parasitic infections. *Drug Metabolism and Disposition* 29(4) part 2: 484-488, 2001.
- DI VIRGILIO F. The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol. Today* 16: 524–528, 1995.
- DINARELLO C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 20 (5 SUPPL. 27): 1-13, 2002.
- DUBEY J. P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *Journal of Parasitology* 82 (6): 951-956, 1996.
- DUBEY J. P. Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189 (2):166-170, 1986.
- DUBEY J. P. AND FRENKEL J. K. Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts *Journal of Parasitology* 59 (3): 505-512, 1973.
- DUBEY J. P., LUNNEY J. K., SHEN S. K., KWOK O. C. H., ASHFORD D. A. AND THULLIEZ P. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *Journal of Parasitology* 82 (3): 438-443, 1996.
- DUTTON G. N., MCMENAMIN P. G., HAY J. AND CAMERON S. The ultrastructural pathology of congenital murine toxoplasmic retinochoroiditis. Part II: the morphology of the inflammatory changes. *Experimental Eye Research*, 43 (4), pp. 545-560. 1986.
- ECKERT G. U., MELAMED J. AND MENEGAZ B. Optic nerve changes in ocular toxoplasmosis. *Eye*, 21 (6): 746-751. 2007.

- ELLIOTT J. I. AND HIGGINS C. F. Major histocompatibility complex class I shedding and programmed cell death stimulated through the proinflammatory P2X7 receptor: a candidate susceptibility gene for NOD diabetes. *Diabetes* 53: 2012-2017, 2204.
- ERHARDT A., LUCAE S., UNSCHULD P. G., ISING M., KERN N., SALYAKINA D., LIEB R., (...) AND HOLSBOER F. Association of polymorphisms in P2RX7 and CaMKKb with anxiety disorders *Journal of Affective Disorders* 101 (1-3):159-168, 2007.
- EVANS R. J. AND SURPRENANT A. P2X receptors in autonomic and sensory neurons *Seminars in the Neurosciences* 8 (4): 217-223, 1996.
- FARDEAU C., ROMAND S., RAO N. A. *et al.* Diagnosis of toxoplasmic retinochoroiditis with atypical clinical features. *Am J Ophthalmol* 134: 196 – 203, 2002.
- FERREIRA A., DE MELO V. R. W. A., GAZZINELLI R. T. AND MELO M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP . *Genet Evol.* 6, pp. 22–31. 2006.
- GALLUCCI S. AND MATZINGER P. Danger signals: SOS to the immune system *Current Opinion in Immunology*, 13 (1): 114-119, 2001.
- GAO N., SCHWARTZBERG P., WILDER J. A., BLAZAR B. R. AND YUAN D. B cell induction of IL-13 expression in NK cells: role of CD244 and SLAM-associated protein. *J Immunol* 176(5):2758-64, 2006.
- GAZZINELLI R. T., XU Y., HIENY S., CHEEVER A. AND 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., BREZIN A., LI Q., NUSSENBLATT R. B. AND CHAN C. C.: *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Exp Parasitol* 78: 217-29, 1994.
- GAZZINELLI R. T., WYSOCKA M., HIENY S., SCHARTON-KERSTEN T., CHEEVER A., KÜHN R., MÜLLER W., TRINCHIERI G. AND SHER A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4 T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ , and TNF- α . *Journal of Immunology*, 157 (2), pp. 798-805. 1996.

- GLASNER P. D., SILVEIRA C., KRUSZON-MORAN D. *et al.* An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*, 114:136-44, 1992.
- GO S. L., MAUGERI A., MULDER J. J., VAN DRIEL M. A., CREMERS F. P. AND HOYNG C. B. Autosomal dominant rhegmatogenous retinal detachment associated with an Arg453Ter mutation in the *COL2A1* gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Sep;44(9):4035-43, 2003.
- GRABE N. AliBaba2: Context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biology*, 2 (1): S1-S15, 2002.
- GUDAS L. J., SPORN M. B. AND ROBERTS A. B. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: M. B. Sporn, A. B. Roberts, and D. S. Goodman (eds.), *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, Second edition, pp. 443 – 520. New York: Raven Press, 1994.
- GUDIPATY L., MUNETZ J., VERHOEF P. A., DUBYAK G. R. Essential role for Ca in regulation of IL-1 β secretion by P2X nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK-293 cells *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 285: 286-299, 2003.
- HANCHARD N. A. Genetic susceptibility and single-nucleotide polymorphisms. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 10: 283-289, 2005.
- HAUSER W., SHARMA S. AND REMINGTON J. Augmentation of natural killer cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 131(1): 458 – 463, 1983.
- HENAO M. I., MONTES C., PARÍS S. C. AND GARCÍA L. F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 86(1): 11-19, 2006.
- HENDERLY D. E., GENSTLER A. J., SMITH R. E. AND RAO, N. A.: Changing patterns of uveitis. *Am J Ophthalmol* 103(2): 131-6, 1987.
- HERBERT J. M., SAVI P., LAPLACE M-C., LALE A., DOL F., DUMAS A., LABIT C., (...), AND MINTY A. IL-4 and IL-13 exhibit comparable abilities to reduce pyrogen-induced expression of procoagulant activity in endothelial cells and monocytes. *FEBS Letters*, 328 (3), pp. 268-270. 1993.

- HILL A. V. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol.* 16:593-617, 1998.
- HOFFMANN K. F., MCCARTY T. C., SEGAL D. H., CHIARAMONTE M., HESSE M., DAVIS E. M., CHEEVER A. W., MELTZER P. S., MORSE H. C. R. D. AND WYNN T. A. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEB J.* Nov;15(13):2545-7, 2001.
- HOHLFELD P., DAFFOS F., COSTA J. M., THUYLLIEZ P., FORESTIER F. AND VIDAUD M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase – chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 331: 695 – 699, 1994.
- HOLLAND G. N. Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. *Am Journal of Ophthalmology* 128: 502 – 505, 1999.
- HOLLAND G. N. Ocular Toxoplasmosis: A Global Reassessment. Part I: Epidemiology and Course of Disease. LX Edwards Jackson Memorial Lecture. *Am J of Ophthalmol* 136(6): 913 – 988, 2003.
- HOLLAND G. N., O'CONNOR G.R., BELFORT R. Jr. AND REMINGTON J. S. Toxoplasmosis: In: Pepose J.S, HOLLAND G.N., WILHELMUS K.R., editors. Ocular Infection and Immunity. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc. 1183 – 1223, 1996.
- HOLLAND G. N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. *Am J Ophthalmol*;137:1–17. 2004.
- HONDA K., YANAI H., MIZUTANI T., NEGISHI H., SHIMADA N., SUZUKI N., OHBA Y., (...), AND TANIGUCHI T. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (43): 15416-15421, 2004.
- HORVATH S., WEI E., XU X., PALMER L. J., BAUR M. Family-based association test method: Age of onset traits and covariates. *Genetic Epidemiology*, 21 (SUPPL. 1): 403-408, 2001.

- HOSHINO T., WINKLER-PICKETT R. T., MASON A. T., ORTALDO J. R., YOUNG H. A. IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN-gamma. *J Immunol* 162(1):51-9, 1999.
- HUGHES W. E., GONZALEZ A., GUHL F. AND HUDSON L. Antigen-specific lymphocyte transformation in congenital toxoplasmosis. *Immunol Lett* 10: 95 – 98, 1985.
- HUNTER C. A., SUBAUSTE C., VAN CLEAVE V. AND REMINGTON J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii* –infected SCID mice: regulation by IL-10, IL-12 e TNF-alpha *Infect Immunity* 62(7): – 2818 - 2824, 1994.
- IHANAMÄKI T., PELLINIEMI L. J. AND VUORIO E. Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23 (4): 403-434, 2004.
- JACKSON M. H. AND HUTCHISON W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv. Parasitol.* 28: 55 - 105, 1989.
- JONSSON H AND PENG S.L. Forkhead transcription factors in immunology. *Cell Moll Life Sci* 62(4): 397 – 409, 2005.
- KAMALI-SARVESTANI E., ZOLGHADRI J., GHARESI-FARD B. AND SARVARI J. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. *Journal of Reproductive Immunology* 65: 171-178, 2005.
- KAMINSKI W. E., PIEHLER A. AND WENZEL J. J. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762: 510–524, 2006.
- KAWAZOE U. In: Neves, DP. *Parasitologia Humana*, 9ª edição, São Paulo: Atheneu, p.174-187, 1995.
- KHAN A., SU C., GERMAN M., STORCH G. A., CLIFFORD D. B., SIBLEY L. D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (12), pp. 5881-5887. 2005.

- KHAN I. A., ELY K. H. AND KASPER L. H. Antigen-specific CD8+ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* 152 (4): 1856-60, 1994.
- KIM E., BOK Y. K. AND TAE S. K. Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages by hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, via suppression of nuclear factor- κ B binding activity. *Immunology Letters*, 99 (1)24-92, 2005.
- KNAPP M. A note on power approximations for the transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 64(4):1177-85, 1999.
- KODJIKIAN L., WALLON M., FLEURY J., DENIS P., BINQUET C., PEYRON F. AND GARWEG J. G. Ocular manifestations in congenital toxoplasmosis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 244 (1): 14-21. 2006.
- KWIATKOWSKI K. Susceptibility, medicine, and the future: Susceptibility to infection. *BMJ* 321: 1061-5, 2000.
- LAIRD N. M., HORVATH S. AND XU X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol.* 19 Suppl 1:S36-42, 2000.
- LANGE C., BLACKER D., LAIRD N. M. Family-based association tests for survival and times-to-onset analysis. *Stat Med.* 2004 Jan 30;23(2):179-89.
- LASKER M. V. AND NAIR S. K. Intracellular TLR signaling: a structural perspective on human disease. *J Immunol* 177(1): 11-6, 2006.
- LEE E. Y., YIM J. J., LEE H. S., LEE Y. J., LEE E. B., SONG Y. W. Dinucleotide repeat polymorphism in intron II of human Toll-like receptor 2 gene and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet* 33(3): 211-5, 2006.
- LEHMANN T., MARCET P. L., GRAHAM D. H., DAHL E. R., DUBEY J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (30), pp. 11423-11428. 2006.
- LEMAITRE C., GOLDENBERG B. T., NAUD M. C. AND KOZAK Y. The effect of intraocular injection of interleukin-13 on endotoxin-induced uveitis in rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 42(9): 2022 – 2030, 2001.

- LI C. M., CAMPBELL S. J., KUMARARATNE D. S., BELLAMY R., RUWENDE C., McADAM K. P., HILL A. V. AND LAMMAS D. A. Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *J Infect Dis* 186(10): 1458-62, 2002.
- LIEBERMAN J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 361-370, 2003.
- LINDSAY D. S., COLLINS M. V., MITCHELL S. M., COLE R. A., FLICK G. J., WETCH C. N., LINDQUIST A., DUBEY J. P. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. *J Eukaryot Microbiol* 50:687-688, 2003.
- LIU Y. F., CHEN W. M., LIN Y. F., YANG R. C., LIN M. W., LI L. H., CHANG Y. H., JOU Y. S., LIN P. Y., SU J. S., HUANG S. F., HSIAO K. J., FANN C. S., HWANG H. W., CHEN Y. T. AND TSAI S. F. Type II collagen gene variants and inherit osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Méd* 352(22): 2268 – 2270, 2005.
- LOWRY O. H., ROSEMBROUGH J. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. Protein measurement with the fenol reagent. *J. Biol. Chem.* Vol. 193: 265-275, 1951.
- LU F., HUANG S. AND KASPER L. H. CD4 T cells in the pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. *Infection and Immunity*, 72(9): 4966–4972, 2004.
- LÜDER C. G. K. AND GROSS U. Toxoplasmosis: From Clinics to Basic Science. *Parasitology Today* 14 (2): 43 – 45, 1998.
- LYONS R. E., ANTHONY J. P., FERGUSON D. J. P., BYRNE N., ALEXANDER J., ROBERTS F. AND ROBERTS C. W. Immunological studies of chronic ocular toxoplasmosis: up-regulation of major histocompatibility complex class I and transforming growth factor β and a protective role for interleukin-6. *Infect and Immunity* 69: 2589 – 2595, 2001.
- MACKENZIE C. R., GONZÁLEZ R. G., KNIEP E., ROCH S. AND DÄUBENER W. Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation. *Adv Exp Med Biol.* 467:533-539, 1999.
- MARGOLIN K. Cytokine therapy in cancer. *Expert Opinion Biology Therapy* 8(10):1495-1505, 2008.
- MARIE O., THILLAYE-GOLDENBERG B., NAUD M. C., DE KOZAK Y. Inhibition of endotoxin-induced uveitis and potentiation of local TNF-alpha and interleukin-6

- mRNA expression by interleukin-13. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(10):2275-82, 1999.
- MATA N. L., WENG J. AND TRAVIS G. H. Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 7154–7159, 2000.
- McCABE R. E., BROOKS R. G. AND DORFMAN R. F. Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis.* 9: 754, 1987.
- McLEOD R. AND REMINGTON J. S. – *Toxoplasma gondii*. In *Tratado de Pediatria*, 2ªed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p: 779-786, 1994.
- MCMENAMIN P. G., DUTTON G. N., HAY J. AND CAMERON S. The ultrastructural pathology of congenital murine toxoplasmic retinochoroiditis. Part I: the localization and morphology of toxoplasma cysts in the retina. *Experimental Eye Research*, 43 (4), pp. 529-543. 1986.
- MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1(2): 135-45, 2001.
- MOLESTINA R. E. AND SINAI A. P. Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host I κ B α . *Cellular Microbiology*, 7 (3): 351-362, 2005.
- MOLESTINA R. E. AND SINAI A. P. Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF- κ B activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of Cell Science*, 118 (24): 5785-5796, 2005.
- MONTOYA J. G. AND LIESENFELD O. Toxoplasmosis. *The Lancet* 363: 1965 – 1975, 2004.
- MONTOYA J. G. AND REMINGTON J.S. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 23: 277 – 282, 1996.
- MONTOYA J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 185: S73 – S82, 2002.
- MONTOYA J. G., PARMLEY S., LIESENFELD O., JAFFE G. J. AND REMINGTON J. S. Use of the polymerase chain reaction for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmol* 106: 1554 – 1563, 1999.

- MOSMANN T. R., CHERWINSKI H., BOND M. W., GIEDLIN M. A. AND COFFMAN R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348. 1986.
- MUN H. S., AOSAI F., NOROSE K., CHEN M., PIAO L. X., TAKEUCHI O., AKIRA S., ISHIKURA H. AND YANO A. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *International Immunology*, 15(9): 1081-1087, 2003.
- NAGINENI C. N., DETRICK B., HOOKS J. J. Transforming growth factor-beta expression in human retinal pigment epithelial cells is enhanced by *Toxoplasma gondii*: A possible role , 2002.
- NEWMAN P. E., GHOSHEH R. AND TABBARA K. F. The role of hypersensitivity reactions to *Toxoplasma* antigens in experimental ocular toxoplasmosis in nonhuman primates. *Am J Ophthalmol* 94:159 – 164, 1982.
- NEYER L. E., GRÜNIG G., FORT M., REMINGTON J. S., RENNICK D. AND HUNTER, C.A. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, 65 (5), pp. 1675-1682. 1997.
- NISHIYA T. AND DeFRANCO A. L. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the toll-like receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (18):19008-19017, 2004.
- NUSSENBLATT R. B., PALESTINE A. G. Acute retinal necrosis *Uveitis: Fundamentals and Clinical Practice*, pp. 407-414. 1989.
- O'CONNOR G. R. Factors related to the initiation and recurrence of uveitis. XL Edwards Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 96: 577 – 599, 1983.
- ONGKOSUWITO J. V., BOSCH-DRIESSEN E. H., KIJLSTRA A. AND ROTHOVA A. Serologic evaluation of patients with primary and recurrent ocular toxoplasmosis for evidence of recent infection. *Am J Ophthalmol* 128(4):407-412, 1999.
- ORÉFICE F. AND BAHIA-OLIVEIRA L. M. G. Toxoplasmose. In: Oréfice F. editor. *Uveíte Clínica e Cirúrgica – Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica p. 619-680, 2005.*

- ORÉFICE J. L., COSTA R. A., ORÉFICE F., CAMPOS W., DA COSTA-LIMA J. R. D. AND SCOTT I. U. Vitreoretinal morphology in active ocular toxoplasmosis: A prospective study by optical coherence tomography *British Journal of Ophthalmology*, 91 (6): 773-780. 2007.
- PARKER J. S., ROBERTS C. W. AND ALEXANDER J. CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clin Exp Immunol* 84: 207 – 212, 1991.
- PARVATHENANI L. K., TERTYSHNIKOVA S., GRECO C. R., ROBERTS S. B., ROBERTSON B. AND POSMANTUR R. P2X mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry* 278 (15):13309-13317, 2003.
- PICHYANGKUL S., YONGVANITCHIT K., KUM-ARB U., HEMMI H., AKIRA S., KRIEG A. M., HEPPNER D. G., STEWART V. A., HASEGAWA H., LOOAREESUWAN S., SHANKS G. D., MILLER R. S. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a toll-like receptor 9-dependent pathway. *Journal of Immunology*, 172 (8):4926-4933, 2004.
- PRAVICA V., ASDERAKIS A., PERREY C., HAJEER A., SINNOTT P. J. AND HUTCHINSON I. V. In vitro production of gamma-IFN correlates with CA repeat polymorphism in the human gamma-IFN gene. *Eur J Immunogenet* 26: 1-3, 1999.
- RABINOWITZ D. AND LAIRD N. A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. *Hum Hered.* Jul-Aug;50(4):211-23, 2000.
- RAO N. A. AND FONT R. L. Toxoplasmic retinochoroiditis: electron microscopic and immunofluorescence studies of formalin fixed tissue. *Arch Ophthalmol* 95: 273 – 277, 1977.
- REMINGTON J. S. Toxoplasmosis in the adult. *Bull NY Acad Med* 50: 211-227, 1974.
- RIVERA A., WHITE K., STOHR H., STEINER K., HEMMRICH N., GRIMM T., JURKLIES B., LORENZ B., SCHOLL H. P., APFELSTEDT-SYLLA E. AND WEBER B. H. A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 800–813, 2000.

- ROBERTS F. AND MCLEOD R.: Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol Today* 15: 51-7, 1999.
- ROBERTSON M. J. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* 71: 173-183, 2002.
- RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA S., ESPARZA-GORDILLO J., GOICOECHEA DE JORGE E., LOPEZ-TRASCASA M., SÁNCHEZ-CORRAL P. The human complement factor H: Functional roles, genetic variations and disease associations. *Molecular Immunology*, 41 (4): 355-367, 2004.
- ROSS S. A., MCCAFFERY P. J., DRAGER U. C. AND DE LUCA L. M. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.*, 80: 1021 – 1054, 2000.
- ROZET J. M., GERBER S., SOUIED E., PERRAULT I., CHATELIN S., GHAZI I., LEOWSKI C., DUFIER J. L., MUNNICH A. AND KAPLAN J. Spectrum of ABCR gene mutations in autosomal recessive macular dystrophies. *Eur. J. Hum. Genet.* 6: 291–295, 1998.
- 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.
- SACKS D. AND SHER A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology*, 3 (11):1041-1047, 2002.
- SAEIJ J. P., COLLER S., BOYLE J. P., JEROME M. E., WHITE M. W. AND BOOTHROYD J. C. Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445(7125): 324-327, 2007.
- SAUNDERS B. M., FERNANDO S. L., SLUYTER R., BRITTON W. J. AND WILEY J. S. A loss-of-function polymorphism in the human P2X7 receptor abolishes ATP-mediated killing of Mycobacteria. *J. Immunol* 171(10): 5442-6, 2003.
- SCANGA C. A., ALIBERTI J., JANKOVIC D., TILLOY F., BENNOUNA S., DENKERS E. Y., MEDZHITOV R. AND SHER A. MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168:5997, 2002.
- SCHAID D. J. General score tests for associations of genetic markers with disease using cases and their parents. *Genetic Epidemiology*, 13 (5): 423-449, 1996.

- SCHAID D. J AND SOMMER, S.S. Genotype relative risks: methods for design and analysis of candidate-gene association studies. *Am J Hum Genet* 53(5):1114-26, 1993.
- SCHAID D. J. Use of parents, sibs, and unrelated controls for detection of associations between genetic markers and disease. *Am J Hum Gene* 63(5):1492-506, 1998.
- 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.
- SILVEIRA C., BELFORT R. JR., MUCCIOLI C., ABREU M. T., MARTINS M. C., VICTORA C., NUSSENBLATT R. B. AND HOLLAND G. N.: A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 131 (3): 351-4, 2001.
- SLUYTER R., DALITZ J. G. AND WILEY J. S. P2X receptor polymorphism impairs extracellular adenosine 5'-triphosphate-induced interleukin-18 release from human monocytes. *Genes and Immunity*, 5 (7):588-591, 2004.
- SMITH J. R., FRANC D. T., CARTER N. S., ZAMORA D., PLANCK S. R., ROSENBAUM J. T. Susceptibility of retinal vascular endothelium to infection with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45 (4), pp. 1157-1161. 2004.
- SPIELMAN R. S., MCGINNIS R. E., EWENS W. J. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* Mar;52(3):506-16, 1993.
- 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(1):610-619, 1995.
- SUN H., MOLDAY R. S. AND NATHANS J. Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATPbinding cassette

- transporter responsible for Stargardt disease, *J. Biol.Chem.* 274: 8269–8281, 1999.
- SUZUKI Y. AND REMINGTON J. S. The effect of anti-IFN-gamma antibody on the protective effect of Lyt- 2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. *J Immunol* 144: 1954 – 1956, 1990.
- SUZUKI Y. Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology*, 201 (2), pp. 255-271. 1998.
- SUZUKI Y., ORELLANA M. A., SCHREIBER R. D. AND REMINGTON J. S. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240: 516 - 518., 1988.
- SYBLEY L. D., ADAMS L. B. AND KRAHENBUHL J. L. Macrophage interactions in toxoplasmosis. *Res Immunol* 144(1): 38 - 40, 1993.
- TAYLOR M. W. AND FENG G. Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism *FASEB Journal*, 5 (11): 2516-2522, 1991.
- TENTER A. M., HECKEROTH A. R. AND WEISS L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30: 1217-1258, 2000.
- TRINCHIERI G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47: 187-376, 1989.
- TU I. P., BALISE R. R. AND WHITTEMORE A. S. Detection of disease genes by use of family data II. Application to nuclear families. *American Journal of Human Genetics*, 66 (4): 1341-1350, 2000.
- VANDENBROECK K. AND GORIS A. Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: gateways to novel targets for immunotherapy? *Trends in Pharmacological Sciences* 24(6): 284-289, 2003.
- VERHOEF P. A., KERTESY S. B., LUNDBERG K., KAHLENBERG J. M. AND DUBYAK G. R. Inhibitory effects of chloride on the activation of caspase-1, IL-1 β secretion, and cytolysis by the P2X7 receptor. *J. Immunol.* 175: 7623-7634, 2005.
- VINCENT N. A. K. AND PEEK R. Evidence for a compartmentalized B cell response as characterized by IgG epitope specificity in human ocular toxoplasmosis. *The J of Immunol* 167: 6263 – 6269, 2001.
- WEBB R. M., TABBARA K. F. AND O'CONNOR G. R. Retinal vasculitis in ocular toxoplasmosis in nonhuman primates. *Retina* 4: 182 – 188, 1984.

- WHITTLE R. M., WALLACE G. R., WHISTON R. A., DUMONDE D. C., STANFORD M. R. Human antiretinal antibodies in toxoplasma retinochoroiditis. *British Journal of Ophthalmology*, 82 (9), pp. 1017-1021. 1998.
- WYNN T. A. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 21: 425-56, 2003.
- YAMAMOTO J. H., VALLOCHI A. L., SILVEIRA C., KALIL-FILHO J., NUSSENBLATT R. B., CUNHA-NETO E., GAZZINELLI R. T., BELFORT R. JR., RIZZO L. V. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *Journal of Infectious Diseases*, 181 (6), pp. 2018-2022. 2000.
- YAP G. S. AND SHER A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- γ - and tumor necrosis factor (TNF)- α - dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *Journal of Experimental Medicine*, 189 (7):1083-1091, 1999.
- YAROVINSKY F., ZHANG D., ANDERSEN J. F., BANNENBERG G. L., SERHAN C. N., HAYDEN M. S., HIENY S., SUTTERWALA F. S., FLAVELL R. A., GHOSH S. AND SHER A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profiling-like protein. *Science* 308: 1626-1629, 2005.
- YIANGOU Y., FACER P., DURRENBERGER P., CHESSELL I. P., NAYLOR A., BOUNTRA C., BANATI R.R., (...), AND ANAND P. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord *BMC Neurology*, 6, art. no. 12, pp. 14, 2006.
- ZHANG D., ZHANG G., HAYDEN M. S., GREENBLATT M. B., BUSSEY C., FLAVELL R. A. AND GHOSH S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303: 1522-1526, 2004.
- ZHANG Y. AND DENKERS E.Y. Protective role for interleukin-5 during chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity*, 67 (9), pp. 4383-4392. 1999.
- ZHUANG Y., FARIA T. N., CHAMBON P. AND GUDAS L. J. Identification and Characterization of Retinoic Acid Receptor B2 Target Genes in F9 Teratocarcinoma Cells. *Molecular Cancer Research* 1: 619-630, 2003.

ZURAWSKI G. AND DE VRIES J. E. Interleukin 13 elicits a subset of the activities of its close relative interleukin 4. *Stem Cells*, 12 (2): 169-174, 1994.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO *Livre e Esclarecido*

Convidamos você a participar ou permitir que o(a) menor :-----participe do estudo “Toxoplasmose ocular em Campos dos Goytacazes: investigação de fatores imunogenéticos e ambientais determinantes na manifestação de retinocoroidites toxoplásmicas”. Esse estudo é desenvolvido na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), e se destina a compreender os fatores que contribuem para que melhor possamos compreender a doença que pode se desenvolver nos olhos por causa da toxoplasmose. Informamos que a sua participação e/ou do(a) menor nesse estudo é voluntária e será através de doação de amostras de sangue venoso (no máximo trinta mililitros) e exames oftalmológicos (exame de vista para ver a retina). Os riscos e desconfortos possíveis de ocorrerem são pequena dor no momento da entrada da agulha com a possibilidade de formação de hematomas (manchas roxas), após a coleta do sangue. Todo o material de coleta de sangue é descartável. O colírio para o exame de vista causa, por um tempo, a sensação de visão turva (embaçada), mas que logo passa. A sua participação ou do(a) menor como voluntário (a) não trará nenhum benefício financeiro. Porém é vantajoso o fato de uma pessoa saber se tem ou não a toxoplasmose, pois ela poderá planejar, caso seja positiva, visitas frequentes a oftalmologistas (oculistas) para o devido acompanhamento. Além disso, será importante para as mulheres, saberem antes da gravidez, se são positivas ou negativas para a toxoplasmose para contarem aos seus médicos a fim de receberem a orientação correta para prevenir a infecção do feto. Caso você aceite o convite de participar desse estudo como voluntário os seus dados não serão revelados a ninguém e a sua identidade será preservada. Somente a coordenadora do projeto, uma servidora técnica e uma aluna de doutorado terão acesso aos seus dados. Uma forma que utilizaremos para preservar sua identidade é o uso de códigos, ao invés de seu nome, durante todas as etapas do estudo.

É importante você saber que não deve esperar resultados imediatos ou pessoais a não ser o resultado do teste sorológico e do exame de vista. A qualquer momento você ou o(a) menor poderá se retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete em prejuízo à continuidade de seu acompanhamento médico como também a nenhum outro paciente de seu convívio ou membro de sua família. Esclarecemos que a amostra de sangue fornecida para o projeto de pesquisa, será enviada ao exterior, onde parte das análises será feita e, posteriormente, armazenado ou eliminado, segundo sua autorização expressa no termo de consentimento para estocagem e uso futuro da amostra de sangue coletada. Garantimos que não haverá armazenamento de suas amostras de sangue e formação de banco de dados no exterior que posteriormente à análise será destruído. O armazenamento de amostras de sangue e, formação de banco de dados do material biológico serão feitos somente no Brasil por até no máximo 5 (cinco) anos. Finalmente, tendo você compreendido perfeitamente tudo o que lhe foi informado sobre a sua participação no estudo e, estando consciente dos seus direitos, das suas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a sua participação implicam, gostaríamos de saber se você aceita o convite de participar desse projeto, dando o seu consentimento sem que para isso você tenha sido forçado ou obrigado.

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

Profa. Lílian Maria Garcia Bahia Oliveira
27625951

Telefone: (22)27261647 /

Doutoranda Alba Lucínia Peixoto Rangel
27261501

Telefone: (22)27261627 /

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ

Av. Brasil, - Manguinhos – Rio de Janeiro/RJ – CEP:

Telefone: (21)38829011

Campos dos Goytacazes, _____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário ou responsável pelo(a) menor

Assinatura do pesquisador responsável**CONSENTIMENTO PARA ESTOCAGEM E USO FUTURO DE ESPÉCIMES
COLETADAS COM AUTORIZAÇÃO DO CEP (COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA) ¹**

Caso o sangue que eu forneci (ou que o(a) menor-----forneceu com meu consentimento 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 em até 5 anos após o início do estudo, sem que seja utilizado em pesquisas futuras, a não ser que eu forneça novamente meu consentimento.
- Armazenado por até 5 anos e possa ser usado em pesquisas futuras com o mesmo propósito do atual projeto de pesquisa
- Armazenado por até 5 anos e possa ser usado em pesquisas futuras de qualquer tipo.
- Armazenado por 5 anos somente com autorização do CEP, ou quando for o caso, da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), podendo haver renovação do tempo mediante solicitação da instituição depositária acompanhada de justificativa e relatório das atividades desenvolvidas com o material, como previsto por lei na Res. 347/2005 .

Quero que minha identidade seja:

- Removida do material restante.

¹ Revisado de acordo com a res. 347/2005.

Mantida no material restante desde que minha identidade seja preservada

NOME DO PARTICIPANTE :

P:

ID:

ASSINATURA DO PARTICIPANTE :

NOME DO RESPONSÁVEL : _____

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL : _____

NOME DA TESTEMUNHA : _____

ASSINATURA DA TESTEMUNHA : _____

DATA: ____/____/____.

ANEXO 2

Cromossomo 1

ADDITIVE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
ABCR_rs1801574	1	0,222	19	9	12,833	6,917	-1,458	0,14496
ABCR_rs1801574	2	0,778	19	31	27,167	6,917	1,458	0,14496
ABCR_rs2297633	1	0,234	22	16	13	6,673	1,161	0,245493
ABCR_rs2297633	2	0,766	22	28	31	6,673	-1,161	0,245493
ABCR_rs1761375	1	0,709	27	41	40	8,951	0,334	0,738188
ABCR_rs1761375	2	0,291	27	19	20	8,951	-0,334	0,738188
ABCR_rs3112831	1	0,663	19	22	24	6,111	-0,809	0,418492
ABCR_rs3112831	2	0,337	19	20	18	6,111	0,809	0,418492
ABCR_rs952499	1	0,535	30	29	32	9,722	-0,962	0,335979
ABCR_rs952499	2	0,465	30	31	28	9,722	0,962	0,335979
CFH_rs1061170	1	0,739	28	46	40,667	8,339	1,847	0,064769
CFH_rs1061170	2	0,261	28	14	19,333	8,339	-1,847	0,064769
TLR5_rs1053954	1	0,092	14	8	10,5	4,028	-1,246	0,212881
TLR5_rs1053954	2	0,908	14	26	23,5	4,028	1,246	0,212881
TLR5_rs1341987	1	0,637	35	43	43,333	11,333	-0,099	0,921127
TLR5_rs1341987	2	0,363	35	29	28,667	11,333	0,099	0,921127
Total	number	of	test(s):	16				

DOMINANT_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
ABCR_rs1801574	1	0,222	19	6	10,778	4,606	-2,226	0,026009
ABCR_rs1801574	2	0,778	5	*****				
ABCR_rs2297633	1	0,234	22	15	11,914	5,286	1,342	0,179453

ABCR_rs2297633	2	0,766	4	****					
ABCR_rs1761375	1	0,709	8	****					
ABCR_rs1761375	2	0,291	26		14	15,497	6,057	-0,608	0,543005
ABCR_rs3112831	1	0,663	9	****					
ABCR_rs3112831	2	0,337	15		11	9,694	3,439	0,704	0,481429
ABCR_rs952499	1	0,535	17		8	10,361	3,745	-1,22	0,222407
ABCR_rs952499	2	0,465	21		13	12,361	4,8	0,292	0,770587
CFH_rs1061170	1	0,739	7	****					
CFH_rs1061170	2	0,261	25		9	13,914	6,23	-1,969	0,049001
TLR5_rs1053954	1	0,092	14		7	8,833	3,208	-1,024	0,306056
TLR5_rs1053954	2	0,908	3	****					
TLR5_rs1341987	1	0,637	14		10	9	3,091	0,569	0,569503
TLR5_rs1341987	2	0,363	29		18	16,667	6,869	0,509	0,610933
Total	number of		test(s):		10				

RECESSIVE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P	
ABCR_rs1801574	1	0,222	5	****					
ABCR_rs1801574	2	0,778	19		14	9,222	4,606	2,226	0,026009
ABCR_rs2297633	1	0,234	4	****					
ABCR_rs2297633	2	0,766	22		7	10,086	5,286	-1,342	0,179453
ABCR_rs1761375	1	0,709	26		15	13,503	6,057	0,608	0,543005
ABCR_rs1761375	2	0,291	8	****					
ABCR_rs3112831	1	0,663	15		6	7,306	3,439	-0,704	0,481429
ABCR_rs3112831	2	0,337	9	****					
ABCR_rs952499	1	0,535	21		8	8,639	4,8	-0,292	0,770587
ABCR_rs952499	2	0,465	17		9	6,639	3,745	1,22	0,222407
CFH_rs1061170	1	0,739	25		18	13,086	6,23	1,969	0,049001
CFH_rs1061170	2	0,261	7	****					
TLR5_rs1053954	1	0,092	3	****					
TLR5_rs1053954	2	0,908	14		10	8,167	3,208	1,024	0,306056
TLR5_rs1341987	1	0,637	29		12	13,333	6,869	-0,509	0,610933
TLR5_rs1341987	2	0,363	14		5	6	3,091	-0,569	0,569503
Total	number of		test(s):		10				

GENOTYPE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P	
ABCR_rs1801574	1/1	0,03	5	****					
ABCR_rs1801574	1/2	0,385	19		3	8,722	4,565	-2,678	0,007401
ABCR_rs1801574	2/2	0,585	19		14	9,222	4,606	2,226	0,026009
ABCR_rs2297633	1/1	0,022	4	****					
ABCR_rs2297633	1/2	0,425	22		14	10,827	5,47	1,357	0,174928
ABCR_rs2297633	2/2	0,553	22		7	10,086	5,286	-1,342	0,179453
ABCR_rs1761375	1/1	0,431	26		15	13,503	6,057	0,608	0,543005
ABCR_rs1761375	1/2	0,556	26		11	12,994	6,387	-0,789	0,43012
ABCR_rs1761375	2/2	0,013	8	****					
ABCR_rs3112831	1/1	0,43	15		6	7,306	3,439	-0,704	0,481429
ABCR_rs3112831	1/2	0,467	19		10	9,389	4,645	0,284	0,776758
ABCR_rs3112831	2/2	0,103	9	****					
ABCR_rs952499	1/1	0,234	21		8	8,639	4,8	-0,292	0,770587
ABCR_rs952499	1/2	0,601	30		13	14,722	7,367	-0,635	0,525751
ABCR_rs952499	2/2	0,165	17		9	6,639	3,745	1,22	0,222407

CFH_rs1061170	1/1	0,478	25	18	13,086	6,23	1,969	0,049001
CFH_rs1061170	1/2	0,522	28	10	14,494	7,137	-1,682	0,092532
CFH_rs1061170	2/2	0	7	*****				
TLR5_rs1053954	1/1	0	3	*****				
TLR5_rs1053954	1/2	0,185	14	6	7,167	3,417	-0,631	0,52793
TLR5_rs1053954	2/2	0,815	14	10	8,167	3,208	1,024	0,306056
TLR5_rs1341987	1/1	0,396	29	12	13,333	6,869	-0,509	0,610933
TLR5_rs1341987	1/2	0,481	35	19	16,667	8,586	0,796	0,425864
TLR5_rs1341987	2/2	0,123	14	5	6	3,091	-0,569	0,569503
Total	number of		test(s):	18				

Cromossomo 3

ADDITIVE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR9_G5991A	1	0,424	24	33	21,333	7,284	4,323	0,000015
TLR9_G5991A	2	0,576	24	17	28,667	7,284	-4,323	0,000015
TLR9_T1905C	1	0,216	21	14	14,167	6,972	-0,063	0,949671
TLR9_T1905C	2	0,784	21	30	29,833	6,972	0,063	0,949671
Total	number of		test(s):	4				

DOMINANT_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR9_G5991A	1	0,424	19	18	10,664	4,418	3,49	0,000482
TLR9_G5991A	2	0,576	10	2	6,33	2,14	-2,96	0,003074
TLR9_T1905C	1	0,216	21	14	12,667	5,097	0,591	0,554808
TLR9_T1905C	2	0,784	5	*****				
Total	number of		test(s):	3				

RECESSIVE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR9_G5991A	1	0,424	10	9	4,67	2,14	2,96	0,003074
TLR9_G5991A	2	0,576	19	1	8,336	4,418	-3,49	0,000482
TLR9_T1905C	1	0,216	5	*****				
TLR9_T1905C	2	0,784	21	8	9,333	5,097	-0,591	0,554808
Total	number of		test(s):	3				

GENOTYPE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR9_G5991A	1/1	0,195	10	9	4,67	2,14	2,96	0,003074
TLR9_G5991A	1/2	0,457	24	15	11,994	5,831	1,245	0,213188
TLR9_G5991A	2/2	0,348	19	1	8,336	4,418	-3,49	0,000482
TLR9_T1905C	1/1	0	5	*****				
TLR9_T1905C	1/2	0,432	21	14	11,167	5,472	1,211	0,225819
TLR9_T1905C	2/2	0,568	21	8	9,333	5,097	-0,591	0,554808
Total	number of		test(s):	5				

Cromossomo 4

ADDITIVE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR2_G2258A	1	0,011	1	*****				
TLR2_G2258A	2	0,989	1	*****				
TLR2_rs3804099	1	0,476	33	37	34,75	10,826	0,684	0,49409
TLR2_rs3804099	2	0,524	33	31	33,25	10,826	-0,684	0,49409
Total	number of		test(s):	2				

DOMINANT_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR2_G2258A	1	0,011	1	*****				
TLR2_G2258A	2	0,989	0	*****				
TLR2_rs3804099	1	0,476	20	13	12	4,5	0,471	0,637352
TLR2_rs3804099	2	0,524	22	13	14,25	4,826	-0,569	0,569368
Total	number of		test(s):	2				

RECESSIVE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR2_G2258A	1	0,011	0	*****				
TLR2_G2258A	2	0,989	1	*****				
TLR2_rs3804099	1	0,476	22	10	8,75	4,826	0,569	0,569368
TLR2_rs3804099	2	0,524	20	7	8	4,5	-0,471	0,637352
Total	number of		test(s):	2				

GENOTYPE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR2_G2258A	1/1	0	0	*****				
TLR2_G2258A	1/2	0,023	1	*****				
TLR2_G2258A	2/2	0,977	1	*****				
TLR2_rs3804099	1/1	0,213	22	10	8,75	4,826	0,569	0,569368
TLR2_rs3804099	1/2	0,526	32	17	17,25	7,826	-0,089	0,928793
TLR2_rs3804099	2/2	0,26	20	7	8	4,5	-0,471	0,637352
Total	number of		test(s):	3				

Cromossomo 5**ADDITIVE_MODEL**

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
IL13_rs1800925	1	0,254	24	11	12,75	6,049	-0,712	0,476739
IL13_rs1800925	2	0,746	24	39	37,25	6,049	0,712	0,476739
IL13_rs2066960	1	0,135	17	10	11,167	5,194	-0,512	0,608728
IL13_rs2066960	2	0,865	17	26	24,833	5,194	0,512	0,608728
IL13_rs1295686	1	0,311	26	22	21	8	0,354	0,723674
IL13_rs1295686	2	0,689	26	34	35	8	-0,354	0,723674
IL4_rs2070874	1	0,316	27	22	20,667	8,722	0,451	0,651654

IL4_rs2070874	2	0,684	27	32	33,333	8,722	-0,451	0,651654
IL4_rs2227284	1	0,545	26	25	25,833	9,528	-0,27	0,78718
IL4_rs2227284	2	0,455	26	29	28,167	9,528	0,27	0,78718
IL4_rs2243270	1	0,442	24	20	19,667	9,389	0,109	0,913372
IL4_rs2243270	2	0,558	24	30	30,333	9,389	-0,109	0,913372
Total	number of		test(s):	12				

DOMINANT_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
IL13_rs1800925	1	0,254	23	10	11	5,486	-0,427	0,669422
IL13_rs1800925	2	0,746	2	*****				
IL13_rs2066960	1	0,135	16	9	8,917	3,882	0,042	0,966263
IL13_rs2066960	2	0,865	3	*****				
IL13_rs1295686	1	0,311	24	14	15,333	5,431	-0,572	0,567214
IL13_rs1295686	2	0,689	9	*****				
IL4_rs2070874	1	0,316	23	13	12,917	5,41	0,036	0,971419
IL4_rs2070874	2	0,684	10	5	6,25	2,188	-0,845	0,398025
IL4_rs2227284	1	0,545	18	11	11,056	4,173	-0,027	0,978303
IL4_rs2227284	2	0,455	15	10	9,222	3,534	0,414	0,679066
IL4_rs2243270	1	0,442	21	13	12,417	4,826	0,266	0,790605
IL4_rs2243270	2	0,558	11	7	6,75	2,438	0,16	0,87278
Total	number of		test(s):	9				

RECESSIVE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
IL13_rs1800925	1	0,254	2	*****				
IL13_rs1800925	2	0,746	23	14	13	5,486	0,427	0,669422
IL13_rs2066960	1	0,135	3	*****				
IL13_rs2066960	2	0,865	16	8	8,083	3,882	-0,042	0,966263
IL13_rs1295686	1	0,311	9	*****				
IL13_rs1295686	2	0,689	24	12	10,667	5,431	0,572	0,567214
IL4_rs2070874	1	0,316	10	5	3,75	2,188	0,845	0,398025
IL4_rs2070874	2	0,684	23	10	10,083	5,41	-0,036	0,971419
IL4_rs2227284	1	0,545	15	6	6,778	3,534	-0,414	0,679066
IL4_rs2227284	2	0,455	18	8	7,944	4,173	0,027	0,978303
IL4_rs2243270	1	0,442	11	4	4,25	2,438	-0,16	0,87278
IL4_rs2243270	2	0,558	21	9	9,583	4,826	-0,266	0,790605
Total	number of		test(s):	9				

Cromossomo 6**ADDITIVE_MODEL**

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
FOXQ1_rs1550199	1	0,43	14	15	14	4,444	0,474	0,635256
FOXQ1_rs1550199	2	0,57	14	15	16	4,444	-0,474	0,635256
FOXQ1_rs920209	1	0,888	4	*****				
FOXQ1_rs920209	2	0,112	4	*****				

Total number of test(s): 2

DOMINANT_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
FOXQ1_rs1550199	1	0,43	10	9	7	2,194	1,35	0,176982
FOXQ1_rs1550199	2	0,57	8	*****				
FOXQ1_rs920209	1	0,888	1	*****				
FOXQ1_rs920209	2	0,112	4	*****				
Total	number of		test(s):					1

RECESSIVE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
FOXQ1_rs1550199	1	0,43	8	*****				
FOXQ1_rs1550199	2	0,57	10	2	4	2,194	-1,35	0,176982
FOXQ1_rs920209	1	0,888	4	*****				
FOXQ1_rs920209	2	0,112	1	*****				
Total	number of		test(s):					1

GENOTYPE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
FOXQ1_rs1550199	1/1	0,192	8	*****				
FOXQ1_rs1550199	1/2	0,476	14	11	8	3,444	1,616	0,105998
FOXQ1_rs1550199	2/2	0,332	10	2	4	2,194	-1,35	0,176982
FOXQ1_rs920209	1/1	0,777	4	*****				
FOXQ1_rs920209	1/2	0,223	3	*****				
FOXQ1_rs920209	2/2	0	1	*****				
Total	number of		test(s):					2

Cromossomo 9**ADDITIVE_MODEL**

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR4_A896G	1	0,911	6	*****				
TLR4_A896G	2	0,089	6	*****				
TLR4_C1196T	1	0,904	8	*****				
TLR4_C1196T	2	0,096	8	*****				
Total	number of		test(s):					0

DOMINANT_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR4_A896G	1	0,911	0	*****				
TLR4_A896G	2	0,089	6	*****				
TLR4_C1196T	1	0,904	0	*****				
TLR4_C1196T	2	0,096	8	*****				
Total	number of		test(s):					0

RECESSIVE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR4_A896G	1	0,911	6	*****				
TLR4_A896G	2	0,089	0	*****				
TLR4_C1196T	1	0,904	8	*****				
TLR4_C1196T	2	0,096	0	*****				
Total	number	of	test(s):		0			

GENOTYPE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TLR4_A896G	1/1	0,837	6	*****				
TLR4_A896G	1/2	0,147	6	*****				
TLR4_A896G	2/2	0,016	0	*****				
TLR4_C1196T	1/1	0,809	8	*****				
TLR4_C1196T	1/2	0,191	8	*****				
TLR4_C1196T	2/2	0	0	*****				
Total	number	of	test(s):		0			

Cromossomo 12**ADDITIVE_MODEL**

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
COL2A1_rs2070739	1	0,122	16		5 7,833	3,917	-1,432	0,152242
COL2A1_rs2070739	2	0,878	16		27 24,167	3,917	1,432	0,152242
COL2A_rs2276455	1	0,468	26		21 26	8	-1,768	0,0771
COL2A_rs2276455	2	0,532	26		33 28	8	1,768	0,0771
COL2A1_rs2276454	1	0,511	25		29 26,833	7,972	0,767	0,442864
COL2A1_rs2276454	2	0,489	25		23 25,167	7,972	-0,767	0,442864
COL2A_rs1635544	1	0,513	25		34 29,167	6,861	1,845	0,065005
COL2A_rs1635544	2	0,487	25		18 22,833	6,861	-1,845	0,065005
COL2A_rs1793958	1	0,538	28		34 31,167	9,139	0,937	0,348635
COL2A_rs1793958	2	0,462	28		24 26,833	9,139	-0,937	0,348635
COL2A1_rs3803183	1	0,266	24		16 17,917	6,604	-0,746	0,455772
COL2A1_rs3803183	2	0,734	24		34 32,083	6,604	0,746	0,455772
P2X7_rs208293	1	0,623	25		35 29,25	9,049	1,912	0,055939
P2X7_rs208293	2	0,377	25		17 22,75	9,049	-1,912	0,055939
P2X7_rs28360457	1	0,006	1	*****				
P2X7_rs28360457	2	0,994	1	*****				
P2X7_rs1718119	1	0,704	26		46 37,75	7,132	3,089	0,002007
P2X7_rs1718119	2	0,296	26		10 18,25	7,132	-3,089	0,002007
P2X7_rs2230911	1	0,158	16		8 10,167	4,417	-1,031	0,302556
P2X7_rs2230911	2	0,842	16		26 23,833	4,417	1,031	0,302556
P2X7_rs2230912	1	0,058	10		4 4,75	2,382	-0,486	0,627
P2X7_rs2230912	2	0,942	10		18 17,25	2,382	0,486	0,627
P2X7_rs3751143	1	0,726	29		41 40,833	8,861	0,056	0,95535
P2X7_rs3751143	2	0,274	29		19 19,167	8,861	-0,056	0,95535
P2X7_rs1653624	2	1	0	*****				
P2X7_rs1621388	1	0,309	23		8 14,25	6,132	-2,524	0,011604

P2X7_rs1621388	2	0,691	23	38	31,75	6,132	2,524	0,011604
Total	number	of	test(s):	24				

DOMINANT_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
COL2A1_rs2070739	1	0,122	16		5	7,833	3,917	-1,432 0,152242
COL2A1_rs2070739	2	0,878	0	*****				
COL2A_rs2276455	1	0,468	17		5	9,75	3,938	-2,394 0,016676
COL2A_rs2276455	2	0,532	14		9	8,75	3,438	0,135 0,892738
COL2A1_rs2276454	1	0,511	14		9	9	3,375	0 1
COL2A1_rs2276454	2	0,489	17		8	10,167	3,847	-1,105 0,269318
COL2A_rs1635544	1	0,513	11		6	6,25	2,562	-0,156 0,875896
COL2A_rs1635544	2	0,487	17		5	10,083	3,924	-2,566 0,010279
COL2A_rs1793958	1	0,538	15		11	9,667	3,264	0,738 0,460499
COL2A_rs1793958	2	0,462	20		10	11,5	4,625	-0,697 0,485499
COL2A1_rs3803183	1	0,266	21		10	11,5	5	-0,671 0,502335
COL2A1_rs3803183	2	0,734	6	*****				
P2X7_rs208293	1	0,623	13		9	8,583	2,904	0,245 0,806824
P2X7_rs208293	2	0,377	19		6	11,333	4,522	-2,508 0,012137
P2X7_rs28360457	1	0,006	1	*****				
P2X7_rs28360457	2	0,994	0	*****				
P2X7_rs1718119	1	0,704	5	*****				
P2X7_rs1718119	2	0,296	23		7	13,5	5,819	-2,694 0,00705
P2X7_rs2230911	1	0,158	16		7	9,667	3,792	-1,369 0,170851
P2X7_rs2230911	2	0,842	2	*****				
P2X7_rs2230912	1	0,058	10		4	4,75	2,382	-0,486 0,627
P2X7_rs2230912	2	0,942	0	*****				
P2X7_rs3751143	1	0,726	7	*****				
P2X7_rs3751143	2	0,274	27		13	14,667	6,361	-0,661 0,508729
P2X7_rs1653624	2	1	0	*****				
P2X7_rs1621388	1	0,309	21		6	11	5,069	-2,221 0,026371
P2X7_rs1621388	2	0,691	4	*****				
Total	number	of	test(s):	17				

RECESSIVE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
COL2A1_rs2070739	1	0,122	0	*****				
COL2A1_rs2070739	2	0,878	16		11	8,167	3,917	1,432 0,152242
COL2A_rs2276455	1	0,468	14		6	6,25	3,438	-0,135 0,892738
COL2A_rs2276455	2	0,532	17		12	7,25	3,938	2,394 0,016676
COL2A1_rs2276454	1	0,511	17		9	6,833	3,847	1,105 0,269318
COL2A1_rs2276454	2	0,489	14		6	6	3,375	0 1
COL2A_rs1635544	1	0,513	17		13	7,917	3,924	2,566 0,010279
COL2A_rs1635544	2	0,487	11		5	4,75	2,562	0,156 0,875896
COL2A_rs1793958	1	0,538	20		10	8,5	4,625	0,697 0,485499
COL2A_rs1793958	2	0,462	15		5	6,333	3,264	-0,738 0,460499
COL2A1_rs3803183	1	0,266	6	*****				
COL2A1_rs3803183	2	0,734	21		11	9,5	5	0,671 0,502335
P2X7_rs208293	1	0,623	19		14	8,667	4,522	2,508 0,012137
P2X7_rs208293	2	0,377	13		5	5,417	2,904	-0,245 0,806824
P2X7_rs28360457	1	0,006	0	*****				
P2X7_rs28360457	2	0,994	1	*****				

P2X7_rs1718119	1	0,704	23	18	11,5	5,819	2,694	0,00705
P2X7_rs1718119	2	0,296	5	*****				
P2X7_rs2230911	1	0,158	2	*****				
P2X7_rs2230911	2	0,842	16	10	7,333	3,792	1,369	0,170851
P2X7_rs2230912	1	0,058	0	*****				
P2X7_rs2230912	2	0,942	10	7	6,25	2,382	0,486	0,627
P2X7_rs3751143	1	0,726	27	15	13,333	6,361	0,661	0,508729
P2X7_rs3751143	2	0,274	7	*****				
P2X7_rs1653624	2	1	0	*****				
P2X7_rs1621388	1	0,309	4	*****				
P2X7_rs1621388	2	0,691	21	15	10	5,069	2,221	0,026371
Total	number of		test(s):	17				

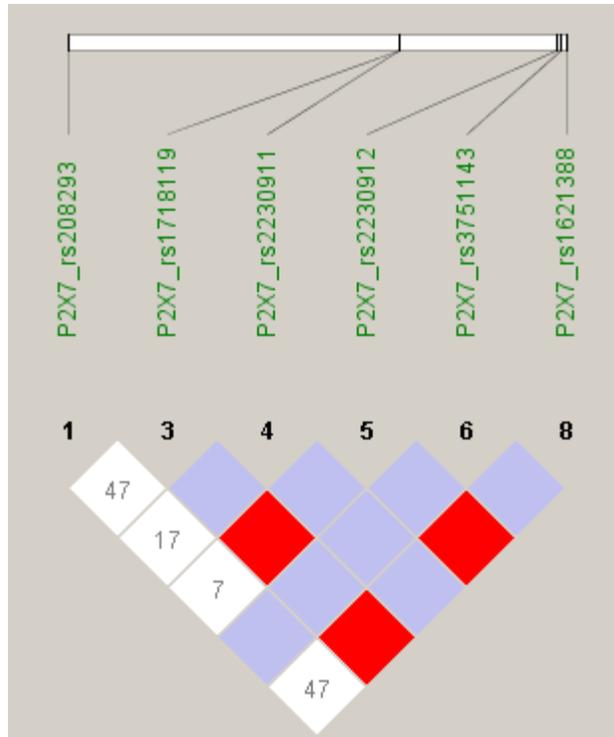
GENOTYPE_MODEL

Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
COL2A1_rs2070739	1/1	0	0	*****				
COL2A1_rs2070739	1/2	0,243	16	5	7,833	3,917	-1,432	0,152242
COL2A1_rs2070739	2/2	0,757	16	11	8,167	3,917	1,432	0,152242
COL2A_rs2276455	1/1	0,216	14	6	6,25	3,438	-0,135	0,892738
COL2A_rs2276455	1/2	0,505	26	9	13,5	6,75	-1,732	0,083265
COL2A_rs2276455	2/2	0,279	17	12	7,25	3,938	2,394	0,016676
COL2A1_rs2276454	1/1	0,248	17	9	6,833	3,847	1,105	0,269318
COL2A1_rs2276454	1/2	0,524	25	11	13,167	6,472	-0,852	0,394404
COL2A1_rs2276454	2/2	0,227	14	6	6	3,375	0	1
COL2A_rs1635544	1/1	0,265	17	13	7,917	3,924	2,566	0,010279
COL2A_rs1635544	1/2	0,496	25	8	13,333	6,111	-2,157	0,030971
COL2A_rs1635544	2/2	0,239	11	5	4,75	2,562	0,156	0,875896
COL2A_rs1793958	1/1	0,227	20	10	8,5	4,625	0,697	0,485499
COL2A_rs1793958	1/2	0,622	27	14	14,167	6,639	-0,065	0,948425
COL2A_rs1793958	2/2	0,152	15	5	6,333	3,264	-0,738	0,460499
COL2A1_rs3803183	1/1	0,04	6	*****				
COL2A1_rs3803183	1/2	0,45	24	12	13,083	5,854	-0,448	0,654338
COL2A1_rs3803183	2/2	0,509	21	11	9,5	5	0,671	0,502335
P2X7_rs208293	1/1	0,343	19	14	8,667	4,522	2,508	0,012137
P2X7_rs208293	1/2	0,559	24	7	11,917	5,802	-2,041	0,041227
P2X7_rs208293	2/2	0,098	13	5	5,417	2,904	-0,245	0,806824
P2X7_rs28360457	1/1	0	0	*****				
P2X7_rs28360457	1/2	0,011	1	*****				
P2X7_rs28360457	2/2	0,989	1	*****				
P2X7_rs1718119	1/1	0,5	23	18	11,5	5,819	2,694	0,00705
P2X7_rs1718119	1/2	0,408	26	10	14,75	6,632	-1,844	0,065114
P2X7_rs1718119	2/2	0,092	5	*****				
P2X7_rs2230911	1/1	0,038	2	*****				
P2X7_rs2230911	1/2	0,24	16	6	9,167	3,917	-1,6	0,109579
P2X7_rs2230911	2/2	0,722	16	10	7,333	3,792	1,369	0,170851
P2X7_rs2230912	1/1	0	0	*****				
P2X7_rs2230912	1/2	0,117	10	4	4,75	2,382	-0,486	0,627
P2X7_rs2230912	2/2	0,883	10	7	6,25	2,382	0,486	0,627
P2X7_rs3751143	1/1	0,498	27	15	13,333	6,361	0,661	0,508729
P2X7_rs3751143	1/2	0,456	28	11	14,167	6,861	-1,209	0,226685
P2X7_rs3751143	2/2	0,046	7	*****				
P2X7_rs1653624	2/2	1	0	*****				

P2X7_rs1621388	1/1	0,111	4	*****					
P2X7_rs1621388	1/2	0,397	23		8	11,75	5,632	-1,58	0,114069
P2X7_rs1621388	2/2	0,492	21		15	10	5,069	2,221	0,026371
Total	number of		test(s):						
					29				

ANEXO 3

D`



Mapa de desequilíbrio de ligação para *P2X7* gerado no haploview (<http://www.hapmap.org/>). Os valores de desequilíbrio de ligação ($\times 100$) entre dois marcadores 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 marcadores.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)