

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE - ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO**  
**PATÓGENO-HOSPEDEIRO – PPGGIO-INTERAÇÃO**

**YAGO VINÍCIUS SERRA DOS SANTOS**

**Associação entre a mutação IL13 Gln144Arg (rs20541) e a infecção por**  
***Mansonella ozzardi* em uma área endêmica da Amazônia Central**

Manaus - AM

2019

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE - ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO**  
**PATÓGENO-HOSPEDEIRO – PPGGIO-INTERAÇÃO**

**YAGO VINÍCIUS SERRA DOS SANTOS**

**Associação entre a mutação IL13 Gln144Arg (rs20541) e a infecção por**  
***Mansonella ozzardi* em uma área endêmica da Amazônia Central**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, do Instituto Leônidas e Maria Deane ILMD/FIOCRUZ- AM, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

Orientador: Dr. James Lee Crainey

Co-orientador: Dr. Sergio Luiz Bessa Luz

Manaus - AM

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

S237a

Santos, Yago Vinicius Serra dos.

Associação entre a mutação IL13 Gln144Arg (rs20541) e a infecção por *Mansonella ozzardi* em uma área endêmica da Amazônia Central. / Yago Vinicius Serra dos Santos. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

43 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Prof. Dr. James Lee Crainey.

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Luiz Bessa Luz.

1. Mansonelose 2. Filariose humana I. Título

CDU 616.995132 (811) (043.3)

CDD 616.965209811

22. ed.

**Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – CRB-11/ 287**

**YAGO VINÍCIUS SERRA DOS SANTOS**

**Associação entre a mutação IL13 Gln144Arg (rs20541) e a infecção por  
*Mansonella ozzardi* em uma área endêmica da Amazônia Central**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, do Instituto Leônidas e Maria Deane ILMD/FIOCRUZ – AM, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

**Defesa em:** 02/07/2019

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. James Lee Crainey – Orientador  
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Dra. Alessandra Ferreira Dales Nava – Membro Interno  
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Dr. Rajendranath Ramasawmy – Membro Externo  
Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado - FMT-HVD

Dedico este projeto à minha família, em especial  
ao Seu Sebastião e *in memoriam* à Dona Maria,  
cujo exemplo e amor fizeram de mim o que eu sou  
e o que almejo a ser.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto Leônidas & Maria Deane – Fiocruz Amazônia pelo suporte, seja na infraestrutura, seja na logística, o que foi fundamental para a realização desse projeto.

Agradeço à Capes e à Fapeam pelo fomento dado ao programa de pós-graduação e pela concessão de bolsa de mestrado.

Agradeço ao Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia (EDTA), especialmente aos meus orientadores Dr. James L. Crainey e Dr. Sergio Luz, por me acolherem desde dezembro de 2014, como apoio técnico e agora como mestrando; pelos ensinamentos e pelas oportunidades dadas, fundamentais para minha formação.

Agradeço à Dra. Ana Carolina (IOC/Fiocruz) e ao Dr. Felipe Pessoa (ILMD/Fiocruz) pela colaboração direta à realização desse projeto e pela disposição em ajudar.

Agradeço aos amigos, com todo o significado da palavra: Túllio Romão e Lorena Leles pela parceria constante durante toda essa caminhada. Olha só!!! Vocês são demais!

Agradeço a todos os amigos que contribuíram indireta, mas valiosamente nesse processo, tanto aqueles de longa data (IENC, Fundação Nokia e Ufam), quanto aqueles mais recentes (Fundação Cecon). Obrigado pelo apoio, ideias e críticas!

Agradeço a todos aqueles que em momentos de perdas profundas, dispuseram tempo da sua vida para estarem ao meu lado. Minha eterna gratidão!

Agradeço, sem dúvidas, àqueles com quem posso contar a qualquer hora e a qualquer distância, minha família: Seu Sebastião, Dona Maria (*in memoriam*) e Yara. Sou grato, porque o sucesso de um experimento depende de fórmulas, reagentes e equipamentos, mas o sucesso de um pesquisador depende muito de quem está ao seu lado.

A Deus, autor e consumidor da minha fé, muito obrigado!

## EPÍGRAFE

“Sou biólogo e viajo muito pela savana do meu país. Nessas regiões encontro gente que não sabe ler livros. Mas que sabe ler o seu mundo. Nesse universo de outros saberes, sou eu o analfabeto.”

- Mia Couto

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Representação esquemática do ciclo de transmissão de *Mansonella ozzardi*. .....17

**Figura 2** - Representação esquemática dos tipos de receptores que interagem com IL13 .....20

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Frequências alélicas globais do SNP rs20541 a partir de estudos populacionais. .21	
<b>Tabela 2</b> – Características gerais dos indivíduos de São Gabriel da Cachoeira, AM, participantes do estudo. ....24	
<b>Tabela 3</b> – Comparação entre as frequências genotípica e alélica do SNP 20541 em São Gabriel da Cachoeira, AM, com aquelas observadas no Brasil, na África Ocidental (Gana e Guiné), Japão e Eslováquia.....30	
<b>Tabela 4</b> - Associação entre as frequências genotípica e alélica do SNP rs20541 e a infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> . ....31	
<b>Tabela 5</b> - Associação entre as frequências genotípica e alélica do SNP rs20541 e a microfilaremia nos indivíduos infectados por <i>Mansonella ozzardi</i> .....32	
<b>Tabela 6</b> – Associação entre as frequências genotípica e alélica do SNP rs20541 e os sintomas clínicos relatados pelos indivíduos infectados por <i>Mansonella ozzardi</i> com baixa e alta microfilaremia .....34	
<b>Tabela 7</b> – Frequências genotípicas do SNP rs20541 em São Gabriel da Cachoeira, AM e sua consistência com o princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg entre indivíduos com baixa e com alta microfilaremia.....37	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Estado do Amazonas
COI	Citocromo oxidase I
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IL13	Interleucina-13
ILC2	Células linfoides inatas do tipo 2, do inglês, " <i>innate lymphoid cells 2</i> "
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
ITS	Internal Transcribed Spacer
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
q.s.p.	Quantidade suficiente para
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SP	Estado de São Paulo
Th1	Células auxiliares do tipo 1, do inglês " <i>T helper 1</i> "
Th17	Células auxiliares do tipo 17, do inglês " <i>T helper 17</i> "
Th2	Células auxiliares do tipo 2, do inglês " <i>T helper 2</i> "

## RESUMO

A mansonelose é uma filariose humana cuja importância para a saúde pública vem sendo crescentemente demonstrada. Na Amazônia, seu principal agente etiológico é *Mansonella ozzardi* e São Gabriel da Cachoeira (SGC), AM, é uma das principais áreas endêmicas de mansonelose na região. Nessas áreas, alguns indivíduos são aparentemente imunes à infecção e há um grande número de casos assintomáticos de infecção. Uma das hipóteses é que isso esteja ligada ao perfil genético dos indivíduos. A partir do que foi relatado para o tipo raro de oncocercose, chamado *sowda*, sugere-se que a mutação no gene da citocina IL13 Gln144Arg, SNP rs20541 (A/G), esteja associada à suscetibilidade e ao desenvolvimento clínico da infecção por *M. ozzardi* em SGC. A fim de avaliar essa associação, foram genotipados 85 indivíduos de SGC para a mutação IL13 Gln144Arg (A/G), sendo 38 indivíduos negativos (MO-) e 47 indivíduos positivos (MO+) para infecção por *M. ozzardi*. Do total de genótipos identificados, foram 57,32% AA, 29,37% (AG) e 13,41%(GG). Entre MO- (55,26% AA / 34,21% AG / 10,53% GG) e MO+ (59,09% AA / 25% AG / 15,91% GG). Dentre MO+, três foram casos confirmados de co-infecção *M. ozzardi-M. perstans*, sendo 2 deles com genótipo AA e 1, genótipo GG. Não foi possível observar associação entre IL13 Gln144Arg e a condição de infecção por *M. ozzardi* ou de co-infecção *M. ozzardi-M. perstans*. Quando avaliada a carga parasitária dos indivíduos MO+, o genótipo AG vs. AA+GG esteve associado à alta microfilaremia ( $p=0,039$ ). Não foi possível observar associação de IL13 Gln144Arg e a presença de sintomas entre os indivíduos com alta e baixa microfilaremia. Esses resultados indicam que a população de SGC possui um perfil genético distinto do que tem sido relatado para diferentes populações, havendo uma alta prevalência do alelo mutante IL13 Gln144Arg. Nessa área, indivíduos com e sem a mutação IL13 Gln144Arg são suscetíveis à infecção por *M. ozzardi* e, inclusive, à co-infecção *M. ozzardi-M. perstans*, sendo que indivíduos com o genótipo heterozigoto (AG) têm maior pré-disposição a cargas parasitárias mais elevadas. Com isso, confirma-se a hipótese de que a mutação IL13 Gln144Arg tenha implicação sobre o desenvolvimento clínico da mansonelose e não com a suscetibilidade à infecção, assim como visto na oncocercose e sugere-se que o papel da citocina IL13 na imunidade humana se estenda para as filarioses humanas em geral, indo além do que tem sido relatado. Dessa forma, este é o primeiro trabalho a demonstrar a ocorrência da mutação IL13 Gln144Arg no Norte do Brasil, e sua associação com o desenvolvimento clínico da mansonelose em São Gabriel da Cachoeira, AM.

Palavras-chave: filariose, mansonelose, IL13, resposta imune, Amazônia

## ABSTRACT

Mansonellosis is a human filariasis, whose importance for public health has been increasingly demonstrated. In Amazonia, its major etiological agent is *Mansonella ozzardi* and São Gabriel da Cachoeira (SGC), AM, is one of the principal mansonellosis endemic areas in the region. In these areas, some individuals are apparently immune to infection and there are a large number of asymptomatic cases of infection. One hypothesis is that this is related to the genetic profile of individuals. Based on what has been reported for the rare type of onchocerciasis, called *sowda*, it is suggested that the mutation in the cytokine gene IL13 Gln144Arg, SNP rs20541 (A/G), is associated with susceptibility and clinical development of *M. ozzardi* infection in SGC. In order to evaluate this association, 85 individuals from SGC were genotyped for the IL13 Gln144Arg (A/G) mutation, of which 38 were negative (MO-) and 47 positive (MO+) for *M. ozzardi* infection. Of the total, the identified genotypes were 57.32% AA, 29.37% AG and 13.41% GG. Between MO-: 55.26% AA / 34.21% AG / 10.53% GG and MO+: 59.09% AA / 25% AG / 15.91% GG. Among MO +, there were three confirmed cases of *M. ozzardi-M perstans* co-infection., being two individuals with genotype AA and one with genotype GG. No association between IL13 Gln144Arg and the *M. ozzardi* infection or *M. ozzardi-M perstans* co-infection could be observed. When evaluated the parasite load of MO+ individuals, the genotype AG vs. AA+GG was associated with high microfilaraemia (p=0.039). No association between IL13 Gln144Arg mutation and the presence of symptoms among individuals with high and low microfilaraemia could be observed. These results indicate that the SGC population has a distinct genetic profile than has been reported for different populations, with a high prevalence of the mutant allele IL13 Gln144Arg. In this area, individuals with and without the IL13 Gln144Arg mutation are susceptible to *M. ozzardi* infection and, even, *M. ozzardi-M perstans* co-infection, although individuals with the heterozygous genotype have higher predisposition to present elevated parasitic loads. Thus, the hypothesis that the IL13 Gln144Arg mutation has implication on the clinical development of mansonellosis was confirmed, but not on the susceptibility, as seen in onchocerciasis, what suggests that the role of IL13 cytokine in human immunity can be extended to human filariasis in general, going beyond what has been reported. Thus, this is the first work to demonstrate the occurrence of the IL13 Gln144Arg mutation in the North of Brazil, and its association with the clinical development of mansonellosis in São Gabriel da Cachoeira, AM.

Keywords: filariasis, mansonellosis, IL13, immune response, Amazonia

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1. Importância da mansonelose para a saúde pública .....	15
1.2. Ciclo de transmissão da mansonelose.....	16
1.1. Epidemiologia da mansonelose.....	18
1.2. O papel efetor de IL13 na imunidade humana contra filarioses e o impacto da mutação IL13 Gln144Arg.....	19
1.3. Relação entre IL13 Gln144Arg e a oncocercose hiper-reativa ( <i>sowda</i> ) .....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos .....	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1. Áreas de estudo e coleta de amostras.....	24
4.2. Diagnóstico por microscopia de luz.....	25
4.3. Extração de DNA .....	25
4.4. Ensaio de PCR para detecção de <i>Mansonella</i> spp. ....	25
4.4.1. Nested PCR ITS.....	26
5.3.2. Citocromo oxidase I (COI) .....	27
5.3.3. 12S .....	27
4.5. Genotipagem dos indivíduos participantes .....	28
4.6. Clonagem dos produtos de PCR .....	28
4.7. Análise das sequências genéticas .....	29
4.8. Análise estatística.....	29
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
5.1. A alta prevalência de IL13 Gln144Arg em São Gabriel da Cachoeira, AM, indica uma população com perfil genético distinto .....	30
5.2. Indivíduos com e sem a mutação IL13 Gln144Arg são suscetíveis à infecção por <i>Mansonella ozzardi</i> e à co-infecção por <i>M. ozzardi</i> e <i>M. perstans</i> .....	31
5.3. A mutação IL13 Gln144Arg é mais comum entre indivíduos com baixa microfilaremia 32	
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>35</b>
<b>7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>37</b>
7.1. ANEXO 1 – Análise da consistência das frequências genotípica e alélicas do SNP rs20541 em São Gabriel da Cachoeira com o princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg	37

<b>8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES (2017/2019).....</b>	<b>38</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Importância da mansonelose para a saúde pública

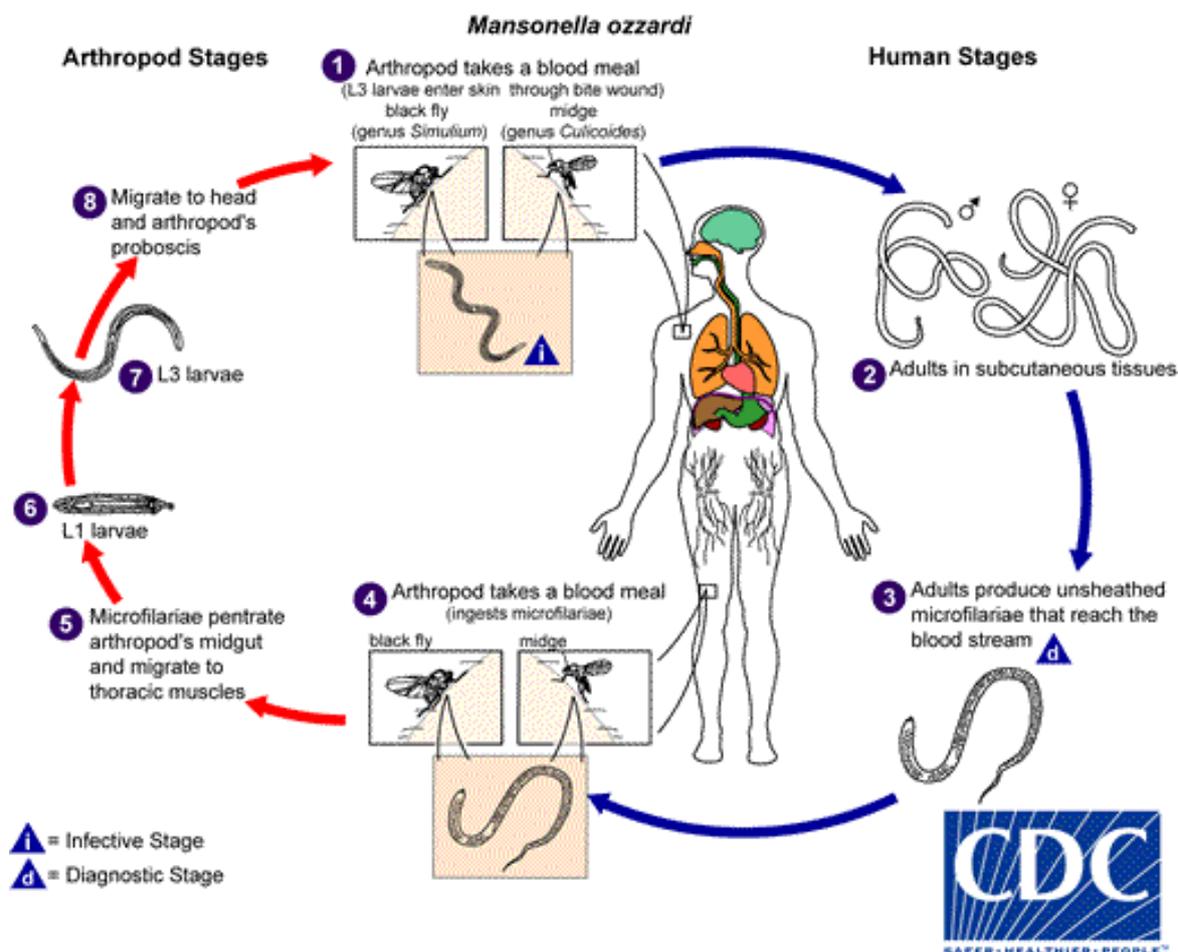
A mansonelose é uma das filarioses humanas amplamente distribuídas e prevalentes nos Trópicos (LIMA et al., 2016; MEDEIROS et al., 2017). Apesar disso, pouco é conhecido sobre os mecanismos biológicos associados à mansonelose, e suas implicações clínicas e epidemiológicas. O fato de ser uma infecção silenciosa e cuja sintomatologia não é bem definida faz com que ela seja considerada não patogênica e, por isso, negligenciada pelas agendas de prioridades para a saúde pública nacional e global (MEDEIROS; PESSOA; CAMARGO, 2014). Entretanto, a mansonelose pode interferir de diferentes formas em programas de vigilância e controle de outras filarioses de maior importância para a saúde humana. Por exemplo, a mansonelose pode confundir o diagnóstico parasitológico da oncocercose e da filariose linfática nas áreas de mesma ocorrência, pelo fato das microfilárias, i.e. formas larvais presentes na corrente sanguínea, de ambas apresentarem características morfológicas similares (TA-TANG et al., 2018). Além disso, a mansonelose pode produzir resultados falso-positivos em imunodiagnósticos em decorrência de reações cruzadas, pondo em cheque a viabilidade dessas técnicas em diversas áreas de mesma ocorrência (WANJI et al., 2015). Contudo, uma questão ainda mais importante diz respeito aos programas de vacinação. Pelo fato de as infecções filariais serem capazes de modular a resposta imune humana (KWARTENG; AHUNO, 2017), tem sido sugerido que isso pode afetar a responsividade a vacinas (NOOKALA et al., 2004), inclusive com efeitos sobre a responsividade imunológica estendidos à progênie (BAL et al., 2016), é fundamental compreender se isso ocorre na mansonelose e quais suas consequências sobre o sucesso de programas de imunização nas áreas endêmicas.

Na Amazônia, a mansonelose ainda representa uma das doenças mais negligenciadas, embora seja prevalente em várias localidades. É importante enfatizar que os grupos mais afetados, comunidades ribeirinhas e indígenas, são também aqueles que estão em condições de vulnerabilidade social (MEDEIROS; PESSOA; CAMARGO, 2014). Por isso, a mansonelose constitui um problema atual para a saúde pública nacional e global, mas cuja extensão ainda é pouco conhecida. Por isso, é necessário compreender melhor os seus aspectos biológicos e epidemiológicos, a fim de expandir a fronteira do conhecimento, sobretudo em um dos seus principais focos.

## 1.2. Ciclo de transmissão da mansonelose

A epidemiologia das filaríases é resultante das características do ciclo de vida dos seus agentes etiológicos e, isso explica em boa parte as similaridades existentes entre elas. Todos os filarídeos possuem ciclos de vida com semelhanças biológicas (Figura 1): são transmitidos por insetos da ordem Diptera; apresentam uma fase de vida chamada microfilaria; suas formas adultas estabelecem infecções de longo prazo no hospedeiro humano; e, na sua maioria, apresentam uma interação mutualística com bactérias intracelulares *Wolbachia* (BOUCHERY et al., 2013; MEDEIROS et al., 2017; MOLYNEUX et al., 2014).

Todos os insetos envolvidos na transmissão de filaríases são dípteros hematófagos taxonomicamente muito próximos, sendo que todos pertencem à subordem Nematocera, infraordem Culicomorpha, que inclui mosquitos e simulídeos (LANE; CROSSKEY, 2012). Entre estes, os gêneros *Culicoides* e *Simulium* são os responsáveis pela transmissão da mansonelose na África e nas Américas (SIMONSEN et al., 2014). Para *M. perstans*, apenas insetos do gênero *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), popularmente chamados de “maruim” ou “mosquito-pólvora”, têm sido incriminados na sua transmissão (MEDEIROS et al., 2017; SIMONSEN; ONAPA; ASIO, 2011). No caso de *M. ozzardi*, ambos os gêneros têm sido implicados na transmissão, contudo, na América do Sul e especialmente na região amazônica, *Simulium* spp. (Diptera: Simuliidae), popularmente chamados de “pium” ou “borrachudos”, têm desempenhado papel central na transmissão (RACCURT, 2017).



**Figura 1** - Representação esquemática do ciclo de transmissão de *Mansonella ozzardi*.  
(Fonte: CDC, EUA).

As etapas do ciclo de vida de *Mansonella* spp. apresentam similaridades com outros filarídeos, o que se reflete também nas características biológicas dessas infecções. No momento do repasto sanguíneo, os parasitos na forma infectante L3, alojados na probóscide de um inseto infectado, são liberados na derme do hospedeiro humano através da lesão tecidual, causada pelo aparelho bucal do inseto. A partir disso, as larvas L3 migram ativamente, em direção a um determinado local anatômico onde se desenvolverão nas formas adultas. Acredita-se que as formas adultas de *M. perstans* se alojem nas cavidades serosas, mesentério e retroperitônio (KNOFF et al., 2012), enquanto as formas adultas de *M. ozzardi*, nas camadas subcutâneas (ALHASSAN et al., 2015). Uma vez nestes locais, estes parasitos adultos podem persistir por 12 anos em média, constituindo uma infecção de longo prazo (MEDEIROS et al., 2017).

As espécies do gênero *Mansonella*, assim como todos os nematódeos filariais conhecidos, são dioicas, i.e. apresentam machos e fêmeas. Após a reprodução sexuada, são liberadas na corrente sanguínea formas larvais dotadas de motilidade e sem bainha, chamadas

“microfilárias”, processo que se inicia aproximadamente 149 dias após a infecção (ORIHIEL; EBERHARD; LOWRIE, 1993). Por estarem presentes em grandes quantidades na corrente sanguínea, as microfilárias têm sido implicadas no desencadeamento da resposta imune humana contra filarioses, como a oncocercose (BABU; NUTMAN, 2014). Uma vez na corrente sanguínea, as microfilárias podem ser ingeridas por um novo inseto vetor. Algumas horas após a ingestão, as microfilárias de *Mansonella* spp. migram do trato digestório do inseto em direção à musculatura das asas, na região torácica, processo em que perdem sua motilidade e se desenvolvem no estágio larval L1. As larvas L1, então, migram em direção à cabeça do inseto. Durante o processo de migração, elas atingem o estágio L3 e se alojam na probóscide do inseto, o que permite que um novo hospedeiro humano seja infectado, durante o repasto sanguíneo (LOK; WALKER; SCOLES, 2000; MEDEIROS et al., 2017).

### **1.3. Epidemiologia da mansonelose**

Dentre o total de casos de mansonelose, não há uma distribuição uniforme na população, diferenciando-se pela faixa etária, gênero e ocupação econômica dos indivíduos. Tem sido observado que o risco de infecção é menor entre pessoas mais jovens (<20 anos) e maior entre adultos a partir dos 45 anos. Em trabalhos conduzidos nos municípios de Lábrea e Pauini, no Estado do Amazonas, foi observado que mais de 50% dos casos de mansonelose foi entre indivíduos acima dos 45 anos, com altas taxas de prevalência (MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2008, 2009a). Essa característica pode ser igualmente observada em outros países endêmicos de mansonelose, como no Haiti (RACCURT et al., 2014) e na Bolívia (BARTOLONI et al., 1999).

Por sua vez, os homens representam o grupo com maior risco de infecção (MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2009a). Quando observados em conjunto, os dados indicam que, ao longo da vida, homens são infectados mais cedo do que mulheres, mas essa diferença diminuiu no grupo de indivíduos com idade acima de 40 anos. A idade e o gênero não influenciam apenas a prevalência de infecção na população, mas também a carga parasitária nos indivíduos infectados (MEDEIROS et al., 2009b; MEDEIROS; PY-DANIEL; BARBOSA, 2011). Isso pode estar relacionado ao fato desses indivíduos terem sofrido mais eventos de infecção ao longo da vida, somado também o reflexo da modulação da resposta imunológica do hospedeiro, promovida pelo parasito.

A ocupação econômica é outro fator importante na epidemiologia da mansonelose. Isso porque os indivíduos que exercem atividades econômicas mais ligadas à agricultura e/ou que residem em áreas rurais têm maior risco de serem infectados (MARTINS et al., 2010; MEDEIROS et al., 2009a). A razão disso está no fato de as principais fontes de renda nas comunidades ribeirinhas serem desenvolvidas próximas do rio e/ou de áreas florestadas, o que faz estes indivíduos estarem presentes nos locais de reprodução dos vetores de *M. ozzardi* e mais expostos às picadas, comparativamente àqueles em áreas urbanas (AYBAR; DANTUR JURI; ZAIDENBERG, 2016; MEDEIROS et al., 2007).

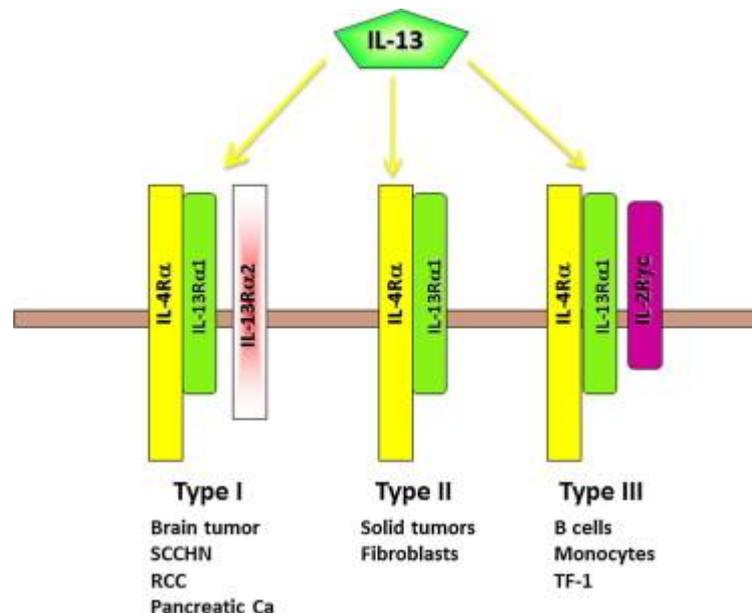
O município de São Gabriel da Cachoeira, no Estado do Amazonas, é uma importante área endêmica de mansonelose na Amazônia Central, não somente pela proporção de casos registrados (SILVA, 2016), como também pela ocorrência simpátrica de *Mansonella ozzardi* e *M. perstans* (SILVA et al., 2017), inclusive com casos clínicos de co-infecção recentemente registrados (dados não publicados). Contudo, pouco é conhecido sobre quais fatores participam na configuração desse cenário epidemiológico. Uma questão importante é por que alguns indivíduos, ainda que expostos à infecção ao longo da vida, acabam não sendo infectados. Além disso, quando infectados, não apresentam infecções patentes no diagnóstico microscópico (MEDEIROS et al., 2015). Uma das hipóteses é de que fatores individuais têm implicações sobre a suscetibilidade à infecção, sobretudo, fatores genéticos. Uma relação similar foi observada na oncocercose, na qual a presença da mutação no gene da citocina IL13, Gln144Arg, torna os indivíduos infectados por *Onchocerca volvulus* mais pré-dispostos um tipo raro de manifestação clínica, chamado de oncocercose hiper-reativa ou *sowda*, o qual é diretamente associado a uma baixa microfilaremia (HOERAUF et al., 2002). Se essa relação existe na oncocercose e leva a um perfil distinto de resposta imune humana, é possível que isso também esteja ocorrendo entre os casos de mansonelose na Amazônia, influenciando a suscetibilidade e o desenvolvimento clínico dessas infecções.

#### **1.4. O papel efetor de IL13 na imunidade humana contra filaríases e o impacto da mutação IL13 Gln144Arg**

Interleucina-13 (IL13) é uma citocina característica da resposta imune do tipo Th2 e cujos efeitos pleiotrópicos têm sido associados a diferentes fenótipos alérgicos e inflamatórios (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015; MAO et al., 2019). IL13 pode atuar sobre o sistema imune estimulando expressão de antígenos de superfície como MHC II e CD23

em linfócitos B, e a produção de imunoglobulinas do tipo IgG1 e IgE por estes; induzindo a ativação de macrófagos alternativamente ativados e a atividade de células epiteliais, sinergicamente com outras citocinas da resposta Th2 (ZHU, 2015). Apesar de ser classicamente associada à resposta Th2, IL13 também pode ser secretada por células Th1, Th17 e ILC2s (do inglês, “*innate lymphoid cells*”), mastócitos e macrófagos, por exemplo (MAO et al., 2019), o que reforça o papel dessa citocina nas vias tanto da resposta inata, como da adaptativa.

IL13 pode exercer todos esses efeitos graças à expressão dos seus receptores em diferentes células do sistema imune. Os receptores de IL13 são classificados em três tipos, conforme a estrutura do complexo formado, a partir da combinação entre as cadeias IL13R $\alpha$ 1, IL13R $\alpha$ 2 e IL4R $\alpha$ , e aparentemente há interferência direta de uma cadeia chamada IL-2 $\gamma$ c na ativação das vias de sinalização por IL13, conforme esquematizado por Suzuki et al. (2015).



**Figura 2** - Representação esquemática dos tipos de receptores que interagem com IL13 [adaptado de Suzuki et al. (2015)].

Uma das interações desempenhadas por IL13 tem sido observada sobre células Th17. Células Th17 produzem uma família de citocinas conhecidas como IL17, com ação pró-inflamatória que tem sido associada a várias desordens inflamatórias crônicas e autoimunes (YASUDA; TAKEUCHI; HIROTA, 2019). Hoje já se sabe que IL13 é capaz de reduzir a produção de IL17 por células Th17, isso devido à expressão de receptores de IL13 na superfície dessas células (NEWCOMB et al., 2011). Um dado interessante é que indivíduos infectados por *Mansonella perstans* apresentam uma resposta Th2 elevada, com produção elevada de IL13,

como também de IL17A, citocina típica da resposta Th17, relativamente a indivíduos sem infecção (RITTER et al., 2018). Fato este que também foi observado em indivíduos infectados por *Onchocerca volvulus*, nos quais a produção elevada de citocinas da família IL13 e IL17 resulta em uma resposta imune hiper-responsiva, com sérias implicações clínicas (KATAWA et al., 2015). Tais dados sugerem que os perfis da resposta imune na oncocercose e na mansoniase são muito próximos, nos quais Th2 e Th17 atuam conjuntamente, com destaque para a participação de IL13.

A mutação no gene de IL13 Gln144Arg é produto de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) não sinônimo na posição 7100 (A/G), codificando o aminoácido glutamina (Gln) no lugar de arginina (Arg). Esse SNP, referenciado como rs20541, foi registrado pela primeira vez por Heinzmann et al. (2000), que, a partir de modelos computacionais, sugeriram que o resíduo de aminoácido na posição 144 do precursor da isoforma 1 de IL13 atuaria diretamente na interação entre IL13 e seu receptor. A presença de Gln (alelo A) implicaria uma maior afinidade de IL13 por seu receptor e, conseqüentemente, uma atividade efetora mais intensa. A mutação IL13 Gln144Arg tem sido observada em diferentes populações humanas (Tabela 1), principalmente em associação a fenótipos alérgicos e doenças autoimunes (CHEN et al., 2018; GOUR; WILLS-KARP, 2015; MAO et al., 2019; WANG et al., 2018).

**Tabela 1** – Frequências alélicas globais do SNP rs20541 a partir de estudos populacionais.

<b>Região *</b>	<b>Alelo A</b>	<b>Alelo G</b>	<b>Nº indivíduos</b>
<b>África</b>	0,19	0,81	1322
<b>Ásia oriental</b>	0,36	0,64	1008
<b>Ásia meridional</b>	0,27	0,73	978
<b>Europa</b>	0,207	0,793	1006
<b>América</b>	0,38	0,62	694

\*Fonte: The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)  
(Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs20541>>. Acesso em 10 jun. 2019)

A partir de análises *in silico*, Alasandagutti et al. (2017) sugerem que a modificação de arginina por glutamina na estrutura de IL13 implica uma alteração na polaridade do sítio de ligação da proteína ao seu receptor, havendo uma interação mais forte na variante Gln144, o que corroboraria o que foi sugerido por Heinzmann et al. (2000). Embora a presença dessa mutação seja comum em diferentes populações, a maioria dos dados disponíveis dizem respeito

a populações asiáticas e caucasianas, para as quais as evidências de associação entre IL13 Gln144Arg e fenótipos alérgicos são controversos (WANG et al., 2016; YING et al., 2013).

### **1.5. Relação entre IL13 Gln144Arg e a oncocercose hiper-reativa (*sowda*)**

Em áreas endêmicas da oncocercose na África Ocidental e na Península Arábica, a trajetória clínica da infecção se comporta de forma distinta entre os indivíduos, ocorrendo um tipo raro de oncocercose chamado *sowda*. O *sowda* ou oncocercose hiper-reativa, é um quadro clínico mais grave da infecção por *Onchocerca volvulus*, em que os pacientes apresentam manifestações cutâneas como forte dermatite e hiperpigmentação, além da formação de nódulos restritos a uma área do corpo, comumente nos membros inferiores (CRAINEY et al., 2017). O *sowda* foi relatado pela primeira vez por Fawdry (1957) em populações do Iêmen, na Península Arábica, onde hoje o *sowda* é considerado uma questão de sério risco para a saúde pública (AL-KUBATI et al., 2018). Hoerauf et al. (2002) observaram que uma mutação em IL13 estava diretamente associada ao quadro de *sowda*. No estudo conduzido em comunidades de Gana e da Guiné, na África Ocidental, Hoerauf et al. (2002) observaram que os indivíduos com o alelo mutante A apresentaram risco quase três vezes maior de desenvolverem o quadro de *sowda*, o que foi observado ainda que em heterozigose. A presença da mutação também estava fortemente associada a uma baixa carga parasitária, caracterizada pela quantidade de microfilárias (microfilaremia) de *O. volvulus* na pele e não patentes no diagnóstico por microscopia. Essa baixa microfilaremia é uma das características do *sowda*, sendo em alguns casos indetectável a presença de microfilárias na pele (TAMAROZZI et al., 2011; TAYLOR; HOERAUF; BOCKARIE, 2010). A resposta imune dos indivíduos com a mutação IL13 Gln144Arg é notadamente hiper-responsiva à infecção por *Onchocerca volvulus*.

Isso revela que a presença da mutação IL13 Gln144Arg em áreas endêmicas da oncocercose faz com que alguns indivíduos tenham pré-disposição distinta à infecção, ainda que expostos. Do mesmo modo, como já mencionado, na mansoniase alguns indivíduos têm aparentemente pré-disposição distinta à infecção. Baseado nisso, é plausível supor que a presença da mutação da IL13 Gln144Arg em São Gabriel da Cachoeira, AM, esteja associada a uma suscetibilidade e a um desenvolvimento clínico da infecção por *Mansonella ozzardi* distintos entre os indivíduos, o que seria comparável ao observado no *sowda*, inclusive com uma possível implicação sobre a manifestação sintomática da infecção.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A mansonelose é uma filariose humana cujo impacto na saúde pública vem sendo cada vez mais demonstrada e São Gabriel da Cachoeira, AM, é uma das suas principais áreas endêmicas na Amazônia. Contudo, pouco é conhecido sobre quais fatores participam na configuração do cenário epidemiológico da mansonelose nessas áreas. Uma das questões que têm sido levantadas é por que alguns indivíduos, ainda que expostos ao longo da vida, acabam não sendo infectados. E uma vez infectados, por que alguns indivíduos não apresentam infecções patentes. Essa diferença na imunidade à mansonelose pode estar associada ao perfil genético dos indivíduos. Tal relação foi observada na oncocercose, na qual a mutação IL13 Gln144Arg (rs20541) está associada a uma redução significativa na carga parasitária da infecção por *Onchocerca volvulus*, inclusive com implicações manifestações clínicas evidentemente distintas. Sabendo-se que essas filarioses são intrinsecamente relacionadas e que a citocina IL13 tem papel importante na imunidade humana contra filarioses, é possível que a mutação IL13 Gln144Arg esteja associada à suscetibilidade e ao desenvolvimento clínico da infecção por *Mansonella ozzardi*, como visto em *sowda*. Dessa forma, investigar a presença da mutação IL13 Gln144Arg em São Gabriel da Cachoeira, AM e a sua relação com os casos de infecção por *M. ozzardi* é importante para compreender qual a influência do perfil genético populacional sobre a epidemiologia da mansonelose no seu contexto amazônico, permitindo assim melhorar as estratégias de vigilância e controle de uma das filarioses humanas mais negligenciadas no mundo.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo geral**

Investigar a associação entre a mutação IL13 Gln144Arg (rs20541) e a suscetibilidade e o desenvolvimento clínico da infecção por *Mansonella ozzardi* em indivíduos de uma área endêmica da Amazônia Central.

### **3.2. Objetivos específicos**

- I. Avaliar as frequências alélica e genotípica do SNP rs20541 (A/G) no gene da citocina IL13 em indivíduos de São Gabriel da Cachoeira, AM;

- II. Avaliar a associação entre os genótipos identificados e a condição de infecção por *Mansonella ozzardi*;
- III. Avaliar a associação entre os genótipos identificados e a carga parasitária nos casos de infecção por *Mansonella ozzardi*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Áreas de estudo e coleta de amostras

As amostras e algumas informações utilizadas neste trabalho são provenientes do trabalho realizado por [Silva \(2016\)](#). O trabalho foi conduzido no município de São Gabriel da Cachoeira, no Estado do Amazonas, Brasil (00°07'S, 67°05'W). No total, foram utilizadas 85 amostras, cujas características são apresentadas na Tabela 2. Amostras de sangue venoso (5-15ml) foram coletadas e por impregnação em papel de filtro. Essas amostras foram armazenadas a 4°C e, posteriormente, levadas para o Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia, onde foram processadas para as etapas de diagnóstico molecular de mansonelose e genotipagem dos participantes do estudo. A coleta e utilização das amostras foram aprovadas por Comitê de Ética em Pesquisa (41678515.1.0000.5248/CEP/IOC).

**Tabela 2** – Características gerais dos indivíduos de São Gabriel da Cachoeira, AM, participantes do estudo.

CARACTERÍSTICAS	MO- <sup>*</sup> (n=38)	MO+ (n=47)
<b>Faixa etária</b>		
10 - 25 anos	18,42% (7)	8,50% (4)
26 - 37 anos	23,68% (9)	12,80% (6)
38 - 49 anos	31,59% (12)	23,40% (11)
50 - 62 anos	21,05% (8)	19,10% (9)
63 - 75 anos	5,26% (2)	21,30% (10)
> 75anos	0% (0)	14,90% (7)
<b>Gênero</b>		
Mulheres	42,11% (16)	40,91% (18)
Homens	57,89% (22)	59,09% (26)
<b>Escolaridade</b>		
1 – 3 anos	21,05% (8)	17,02% (8)
4 – 7 anos	21,05% (8)	29,79% (14)

8 – 11 anos	26,33% (10)	17,02% (8)
≥ 12 anos	21,05% (8)	10,64% (5)
Nenhuma	5,26% (2)	25,53% (12)
Não declarado	5,26% (2)	0% (0)
<b>Ocupação</b>		
Agricultor (a)	71,05% (27)	78,72% (37)
Aposentado (a)	0% (0)	8,51% (4)
Estudante	10,53% (4)	6,38% (3)
Prestador (a) de serviço	2,63% (1)	0% (0)
Profissional da saúde	10,53% (4)	2,13% (1)
Não declarada	5,26% (2)	4,26% (2)

\*MO-: negativos para *M. ozzardi* / MO+: positivos para *M. ozzardi*

#### 4.2. Diagnóstico por microscopia de luz

Para o diagnóstico por microscopia de luz, lâminas de gota espessa foram preparadas utilizando azul de metileno para remoção da hemoglobina. Em seguida, as lâminas foram coradas com eosina-Giemsa e, enfim, examinadas no microscópio óptico LEICA DMLB. A identificação morfológica de *Mansonella ozzardi* foi baseada nos critérios descritos por Post et al. (2003).

#### 4.3. Extração de DNA

As amostras de DNA foram obtidas a partir do processamento das amostras de sangue venoso, utilizando o kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Alemanha), conforme instruções do fabricante. As amostras coletadas por impregnação em papel de filtro foram processadas utilizando reagente de purificação FTA® (Whatman International Ltd., EUA) mais CHELEX® 5% (Sigma, EUA), conforme descrito por Medeiros et al. (2015). Após a extração, as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até a execução dos ensaios moleculares.

#### 4.4. Ensaio de PCR para detecção de *Mansonella* spp.

Para o diagnóstico molecular de *Mansonella ozzardi*, foram utilizados três protocolos diferentes, conforme descritos abaixo. Os reagentes utilizados em todas as reações foram adquiridos comercialmente (GoTaq® DNA Polymerase, Promega, EUA) e a mistura de reação

seguiu as instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (2,0%), com 1% de brometo de etídio (10mg/ml).

#### 4.4.1. Nested PCR ITS

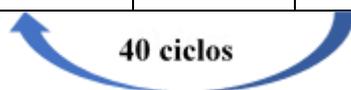
A reação de Nested PCR foi executada conforme descrito por Tang et al. (2010), e o fragmento esperados para *Mansonella ozzardi* foi de 305pb:

a) 1ª reação de PCR - 5ul de amostra de DNA (~10ng), 10ul de tampão de reação (5x), 5μl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1μl mix de dNTPs (10mM), 0,2μl de GoTaq® DNA Polymerase (5u/μl), 0,5μl iniciador JM-F-0021-F largo (5'-GTGCTGTAACCATTACCGAAAGG-3'), 0,5ul iniciador JM-U-0022-R largo (5'-CGCAGCTAGCTGCGTTCTTCATCG-3'), e água deionizada q.s.p. 50ul finais.

b) 2ª reação de PCR: 5ul do *amplicon* 1ª reação (1:10), 10ul de tampão de reação (5x), 5μl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1μl mix de dNTPs (10mM), 0,2μl de GoTaq® DNA Polymerase (5u/μl), 0,02μl do iniciador ITS1-F (5'-GGTGAACCTGCGGAAGGATC-3') (100μM), 0,02μl do iniciador degenerado ITS-F BIS (5'-GGTGAACCTGCRGMWGGATC-3') (100μM), 0,04μl do iniciador degenerado JM-F-0022-R corto (5'-TGCTTATTAAGTCTACTTAA-3') (100μM) e água deionizada q.s.p. 50μl finais.

As reações de PCR foram feitas conforme as condições de ciclagem descritas abaixo:

1ª REAÇÃO DE PCR						
<b>Tempo</b>	7 min	20s	20s	30s	10min	4°C
<b>Temperatura</b>	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	∞


  
40 ciclos

2ª REAÇÃO DE PCR						
<b>Tempo</b>	5 min	20s	20s	20s	10min	4°C
<b>Temperatura</b>	94°C	94°C	50°C	72°C	72°C	∞

---



35 ciclos

### 5.3.2. Citocromo oxidase I (COI)

A reação de PCR foi executada conforme adaptado de Marcos et al. (2012), tendo como alvo o gene da citocromo oxidase I (COI). O fragmento amplificado foi de 680pb. A mistura de reação foi de 5ul de amostra de DNA (~10ng), 10ul do tampão de reação (5x), 5μl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1μl mix de dNTPs (10mM), 0,2μl de GoTaq® DNA Polymerase (5u/μl), 0,5μl do iniciador COI-F (5'-TGATTGGTGGTGGTTTTGGTAA-3'), 0,5ul do iniciador COI-R (5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3'), e água deionizada q.s.p. 50ul finais. A reação foi executada conforme as condições de ciclagem descritas abaixo:

PCR COI						
<b>Tempo</b>	2min	30s	45s	1min	10min	4°C
<b>Temperatura</b>	94°C	94°C	52°C	70°C	72°C	∞



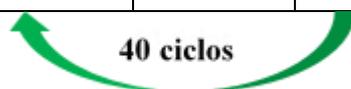
40 ciclos

### 5.3.3. 12S

A reação de PCR foi executada conforme adaptado de Marcos et al. (2012), tendo como alvo o gene da subunidade ribossomal 12S. O fragmento amplificado é de 450pb. A mistura de reação foi de 5ul de amostra de DNA (~10ng), 10ul do tampão de reação (5x), 5μl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1μl mix de dNTPs (10mM), 0,2μl de GoTaq® DNA Polymerase (5u/μl), 0,5μl do iniciador 12S-F (5'-GTTCCAGAATAATCGGCTA-3'), 0,5ul do iniciador 12S-R (5'-ATTGACGGATGRTTTGTACC-3'); e água deionizada q.s.p. 50ul finais. A reação foi executada conforme as condições de ciclagem descritas abaixo:

<b>PCR 12S</b>
----------------

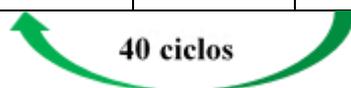
<b>Tempo</b>	2min	30s	45s	1min	10min	4°C
<b>Temperatura</b>	94°C	94°C	55°C	70°C	72°C	∞



#### 4.5. Genotipagem dos indivíduos participantes

Cada amostra foi genotipada para o SNP rs20541 (A/G), do gene de IL13, a partir do fragmento de DNA obtido por ensaio de PCR, utilizando os iniciadores descritos por Gatlin et al. (2009). A mistura de reação foi de 5ul de DNA, 10ul do tampão de reação (5x), 5μl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1μl da mistura de dNTPs (10mM), 0,2μl de GoTaq® DNA Polymerase (5u/μl), 0,3μl do iniciador IL13-G130A-F (5'-TGGCGTTCTACTCACGTGCT-3') (100uM), 0,3ul do iniciador IL13-G130A-R (5'-CAGCACAGGCTGAGGTCTAA-3') (100uM); e água deionizada q.s.p. 50ul finais. O fragmento obtido foi de 297pb. A reação foi conforme as condições de ciclagem descritas abaixo:

<b>PCR IL13 SNP rs20541</b>						
<b>Tempo</b>	5min	30s	30s	45s	10min	4°C
<b>Temperatura</b>	94°C	94°C	62°C	72°C	72°C	∞



Os fragmentos amplificados foram purificados, utilizando o kit comercial QIAquick PCR Purification (Qiagen, Alemanha), conforme as instruções do fabricante, e encaminhados à Plataforma Genômica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), RJ, onde foram sequenciados pelo método de Sanger. A partir da análise do cromatograma, os picos duplos para as bases A/G foram considerados indicativos de genótipo heterozigoto (AG), e do contrário, homozigoto normal (GG) ou mutante (AA). Para confirmar a acurácia da genotipagem, algumas amostras foram clonadas, conforme descrito a seguir.

#### 4.6. Clonagem dos produtos de PCR

O produto de PCR de algumas amostras genotipadas foram clonados para confirmação do genótipo. A clonagem foi realizada utilizando o kit comercial pGEM®-T Easy Vector e células de *Escherichia coli* JM109 competentes (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Foram selecionadas de cinco a oito colônias recombinantes de cada clonagem para sequenciamento genético pelo método de Sanger na Plataforma Genômica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), RJ.

#### **4.7. Análise das sequências genéticas**

As sequências genéticas obtidas foram analisadas, utilizando as ferramentas de bioinformática Chromas Lite (versão 2.1) e BioEdit (versão 7.0.5.3).

#### **4.8. Análise estatística**

Este é um estudo observacional, com desenho do tipo caso-controle. Uma análise de poder (*power calculation*) foi realizada, a fim de determinar o tamanho amostral mínimo para que uma possível associação entre as frequências alélicas de IL13 Gln144Arg e a infecção por *Mansonella ozzardi* em SGC seja detectável pelo Teste Exato de Fisher, e que foi de 43 amostras positivas para infecção por *Mansonella ozzardi* ( $p < 0,03$ ). Essa análise foi baseada nas frequências alélicas de IL13 Gln144Arg observadas por Hoerauf et al. (2002), pela qual, partindo do pressuposto hipotético de que haveriam as mesmas frequências alélicas em SGC, seria possível detectar uma associação significativa entre IL13 Gln144Arg e infecção por *M. ozzardi* com  $n \geq 43$  amostras positivas. Foi aplicado o teste da razão de verossimilhança para avaliar se os genótipos identificados estavam em proporção consistente com o princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). As frequências genotípica e alélica foram calculadas através de proporção simples. A associação entre os genótipos identificados e a infecção por *Mansonella ozzardi* foi avaliada por meio de uma tabela de contingência. O nível de confiança estabelecido foi de  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram executadas no programa R (versão 3.5.3), com o suporte do Núcleo de Apoio à Pesquisa do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. A alta prevalência de IL13 Gln144Arg em São Gabriel da Cachoeira, AM, indica uma população com perfil genético distinto

**Tabela 3** – Comparação entre as frequências genotípica e alélica do SNP 20541 em São Gabriel da Cachoeira, AM, com aquelas observadas no Brasil, na África Ocidental (Gana e Guiné), Japão e Eslováquia.

Genótipo	SGC <sup>a</sup>	SP <sup>b</sup>	ÁFRICA <sup>c</sup>	JAPÃO <sup>e</sup>	ESLOVÁQUIA <sup>f</sup>	<i>p</i> <sup>*</sup>
AA	57,32% (47)	3,14% (5)	5,45% (6)	14,28% (26)	7,0% (17)	<b>&lt;0,001</b>
AG	29,27% (24)	37,74% (60)	26,36% (29)	42,31% (77)	29,50% (72)	
GG	13,41% (11)	59,12% (94)	68,19% (75)	43,41% (79)	63,50% (155)	
<i>N total</i>	82	159	110	182	244	

<sup>a</sup>Dados de São Gabriel da Cachoeira (SGC), AM;

<sup>b</sup>Dados obtidos de Oliveira et al. (2011) e referentes ao Estado de São Paulo (SP), Brasil;

<sup>c</sup>Dados obtidos de Hoerauf et al. (2002)

<sup>e</sup>Dados obtidos de Utsumi et al. (2013);

<sup>f</sup>Dados obtidos de Smolkova et al. (2017)

<sup>\*</sup>Teste do chi-quadrado de Pearson entre as frequências genotípica de cada local em relação às de SGC.

Um dado importante observado em SGC foi que o genótipo AA, que codifica o mutante IL13 Gln144Arg, é bastante comum na população de SGC, o que diverge do que tem sido registrado em diferentes populações (Tabela 1). Como apresentado na Tabela 3, o genótipo AA esteve presente em 57,32% dos indivíduos estudados, em contraste aos 13,41% indivíduos com genótipo GG. A fim de confirmar a acurácia da genotipagem a partir do sequenciamento genético, os fragmentos amplificados de IL13 Gln144Arg de 37 indivíduos (43,53% do total) foram clonados (conforme descrito na seção 4.6), e todas as genotipagens foram corroboradas, confirmando as frequências genotípicas observadas. Essa diferença nas frequências genotípicas e alélicas de IL13 Gln144Arg foi fortemente significativa, em comparação àquelas registradas no próprio Sudeste brasileiro, mas também relativamente a populações da região asiática, da Europa Central e da África (Tabela 3). Quando comparado ao que foi observado por [Oliveira et al. \(2011\)](#) em um trabalho realizado em São Paulo, SP, o genótipo AA em SGC foi cerca de 18,25 vezes mais frequente. A frequência de IL13 Gln144Arg em SGC também difere de outras populações da América do Sul. Baseado nos dados genômicos disponibilizados pelo consórcio 1000 Genomes Project (THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM et al., 2015), a

frequência geral do alelo A registrada para o Peru é de 62,94% e para a Colômbia, 30,82%. Isso significa uma diferença de mais de 1,78 vezes da frequência alélica de IL13 Gln144Arg em SGC em relação a essas duas populações da América do Sul.

SGC tem uma grande contribuição indígena na sua composição, sendo a população brasileira com o maior percentual de indivíduos autodeclarados indígenas (DIAS et al., 2010). Isso provavelmente tem reflexos sobre o perfil genético dessa população. Embora possa ser um fator importante na epidemiologia de diversas doenças presentes nessa área, informações genéticas para essa população ainda são muito escassas. A distribuição genotípica de IL13 Gln144Arg em SGC, porém, indica que essa população possui um perfil genético muito particular. Como já mencionado anteriormente, IL13 tem papel importante na imunidade humana contra filarioses e a mutação Gln144Arg interfere diretamente sobre os efeitos de IL13. Esses resultados, os primeiros para o Norte do Brasil até onde se sabe, permitem que questões a respeito de IL13 Gln144Arg sejam levantadas também para outras doenças de importância médica para a região.

## 5.2. Indivíduos com e sem a mutação IL13 Gln144Arg são suscetíveis à infecção por *Mansonella ozzardi* e à co-infecção por *M. ozzardi* e *M. perstans*

**Tabela 4** - Associação entre as frequências genotípica e alélica do SNP rs20541 e a infecção por *Mansonella ozzardi*.

Genótipo	MO- (n=38)	MO+ (n=44)	<i>p</i> <sup>*</sup>	RP [IC 95%]
AA	55,26% (21)	59,09% (26)	0,603	1,0757** [0,7125 – 1,6239]
AG	34,21% (13)	25,00% (11)		
GG	10,53% (4)	15,91% (7)		
AA	55,26% (21)	59,09% (26)	0,824	
AG+GG	44,74% (17)	40,91% (18)		
Alelo				
A	72,37% (55)	71,59% (63)	1,0	1,3173 [0,9800 – 1,7706]
G	27,63% (21)	28,41% (25)		

\*Teste exato de Fisher entre MO- vs. MO+

\*\*Risco de Prevalência (RP) de infecção por *M. ozzardi* foi calculado para o modelo de dominância AA vs. AG+GG.

A fim de avaliar a associação entre a mutação IL13 Gln144Arg e a infecção por *Mansonella ozzardi* em SGC, foram comparados os dados de genotipagem de 38 indivíduos

negativos (MO-) e 44 positivos (MO+) para infecção por *Mansonella ozzardi*. Durante o trabalho, três dos indivíduos positivos para mansonelose (do total de 47) foram confirmados como casos de co-infecção entre *M. ozzardi* e *M. perstans* e por isso não foram considerados nas análises a seguir. A maior frequência de IL13 Gln144Arg (alelo A) em SGC foi observada entre os indivíduos infectados (59,09%) e não infectados (55,26%) por *Mansonella ozzardi* (Tabela 4), correspondendo a mais da metade dos indivíduos genotipados em ambos os grupos. Contudo, não foi possível observar diferença significativa na proporção da mutação IL13 Gln144Arg entre os grupos, ainda que considerando um modelo de dominância para o genótipo AA (AA vs. AG+GG). É importante mencionar que dentre os indivíduos com casos de co-infecção *M. ozzardi*-*M. perstans* (n=3), dois possuíam genótipo AA e um genótipo GG, não tendo sido identificado o genótipo AG. Logo, sugere-se que a mutação IL13 Gln144Arg não confere proteção total à mansonelose, sendo os indivíduos com e sem a mutação IL13 Gln144Arg suscetíveis à infecção por *M. ozzardi* e à co-infecção *M. ozzardi*-*M. perstans*.

### 5.3. A mutação IL13 Gln144Arg é mais comum entre indivíduos com baixa microfilaremia

Como visto no *sowda*, a associação observada entre a mutação IL13 Gln144Arg e a oncocercose foi em relação à carga parasitária da infecção por *Onchocerca volvulus*, na qual a presença da mutação aumentou mais de duas vezes a chance do indivíduo apresentar microfilaremia significativamente baixa (HOERAUF et al., 2002). A fim de avaliar se essa relação também existe na infecção por *M. ozzardi*, os indivíduos MO+ foram classificados entre baixa e alta microfilaremia. Os dados de 1 (um) indivíduo foram desconsiderados da análise, porque sua amostra de sangue foi coletada por impregnação em papel de filtro, o que não permitiu o diagnóstico por microscopia. Foi definido que do total de indivíduos (n=43), seriam considerados com alta microfilaremia [Mf(alta)] aqueles que foram positivos para mansonelose no diagnóstico por microscopia e diagnóstico molecular (n=23); e com baixa microfilaremia [Mf(baixa)] (n=20), aqueles positivos apenas no diagnóstico molecular.

**Tabela 5** - Associação entre as frequências genotípica e alélica do SNP rs20541 e a microfilaremia nos indivíduos infectados por *Mansonella ozzardi*.

Genótipo	Mf(baixa)* (n=20)	Mf(alta) (n=23)	<i>p</i> **
AA	75,00% (15)	43,48% (10)	0,066

<i>AG</i>	10,00% (2)	39,13% (9)	
<i>GG</i>	15,00% (3)	17,39% (4)	
<i>AA</i>	75,00% (15)	43,48% (10)	0,062
<i>AG+GG</i>	25,00% (5)	56,52% (13)	
<i>AG</i>	10,00% (2)	39,13% (9)	<b>0,039</b>
<i>AA+GG</i>	90,00% (18)	60,87% (14)	
<i>GG</i>	15,00% (3)	17,39% (4)	1,0
<i>AA+AG</i>	85,00% (17)	82,61% (19)	
<b>Alelo<sup>***</sup></b>			
<i>A</i>	80,00% (32/40)	70,59% (29/46)	0,099
<i>G</i>	20,00% (8/40)	29,41% (17/46)	

\*Mf(baixa): baixa microfilaremia / Mf(alta): alta microfilaremia

\*\*Teste exato de Fisher

\*\*\*Calculado sobre o número de haplótipos (n x 2)

As frequências alélicas do SNP rs20541 foram consistentes com o princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto entre indivíduos Mf(baixa) e Mf(alta) (Secção 7.1, Anexo 1 Tabela 7). Como apresentado na Tabela 5, o alelo mutante A foi o mais frequente em ambos os grupos, com frequência mais de vezes maior do que alelo G. Da mesma forma, o genótipo AA foi o mais prevalente em ambos os grupos, contudo, entre os indivíduos com baixa microfilaremia teve frequência três vezes maior. O fato de não ter sido observada uma associação estatisticamente significativa ( $p=0,066$ ) entre os genótipos de IL13 Gln144Arg e a microfilaremia provavelmente se deve novamente ao tamanho amostral, próximo do limite de detecção estabelecido a partir da análise de poder. Contudo, esses dados sugerem claramente uma relação entre a presença da mutação IL13 Gln144Arg e o estabelecimento de uma infecção não patente, caracterizada por uma baixa microfilaremia. Um dado interessante é que, quando avaliado para um modelo de sobredominância (*AG vs. AA+GG*), o genótipo AG esteve significativamente associado à microfilaremia, sendo que nesse modelo os indivíduos com genótipo AG têm cerca de seis vezes mais chances de apresentarem alta microfilaremia. Como dito, a frequência do genótipo AG foi maior do que esperando entre o grupo MO+, não estando em HWE (Tabela 7). Esses dados sugerem estar ocorrendo em SGC um caso de sobredominância. Um exemplo de sobredominância com que se pode fazer um paralelo é a chamada “hipótese da malária”. Nesse caso, uma mutação na estrutura da hemoglobina (recessiva) quando em homozigose, produz um fenótipo letal aos indivíduos, conhecido como anemia falciforme, na qual a mutação altera o formato dos eritrócitos, prejudicando o transporte de oxigênio (PIEL et al., 2010). Porém, em áreas endêmicas de malária na África, a presença

dessa mutação em heterozigose produz um fenótipo intermediário, no qual coexistem na corrente sanguínea eritrócitos normais e alterados, o que é protegido contra a infecção por *Plasmodium falciparum*, impedindo a progressão do ciclo eritrócito da malária, ao passo que não é letal para o indivíduo (PIEL et al., 2010). Talvez balanço equivalente entre os fenótipos de IL13 Gln144Arg esteja ligado ao genótipo AG, isto é, o fenótipo intermediário da mutação de IL13 Gln144Arg, provavelmente resultando na coexistência de formas proteicas normais e mutantes da citocina IL13, embora seja menos vantajoso para os indivíduos infectados *M. ozzardi* (elevada microfilaremia), do que em relação aos indivíduos homozigotos, talvez promova um equilíbrio dos efeitos da resposta imune pró-inflamatória associada à variante IL13 Gln144.

Não apenas em relação à microfilaremia, o *sowda* também está associada a manifestações clínicas distintas às aquelas da oncocercose clássica. Por isso, também foi levantada a questão se a presença da mutação IL13 Gln144 está associada à ao aparecimento manifestações clínicas. Para isso, alguns sintomas clínicos relatados pelos participantes do estudo, como dores articulares, dor de cabeça e dores no corpo foram utilizados como critérios para classificar os indivíduos como assintomáticos e sintomáticos. Dentre os indivíduos classificados com baixa microfilaremia (n=20), os que não relataram sintomas foram definidos como assintomáticos (n=4) e o que relataram todos os três sintomas, como sintomáticos (n=12) (4 indivíduos relataram entre um ou dois sintomas e não foram considerados na análise). Da mesma forma, dentre os indivíduos com alta microfilaremia (n=23), 4 foram definidos como assintomáticos e 13 como sintomáticos (4 indivíduos relataram entre um ou dois sintomas e não foram considerados na análise).

**Tabela 6** – Associação entre as frequências genotípica e alélica do SNP rs20541 e os sintomas clínicos relatados pelos indivíduos infectados por *Mansonella ozzardi* com baixa e alta microfilaremia

Genótipo	Mf(baixa)*			Mf(alta)		
	Assintomáticos (n=4)	Sintomáticos (n=12)	<i>P</i> **	Assintomáticos (n=4)	Sintomáticos (n=13)	<i>P</i> **
AA	75,00% (3)	83,34% (10)	0,61	25,00% (1)	46,15% (6)	1,0
AG	25,00% (1)	8,33% (1)		50,00% (2)	38,46% (5)	
GG	0% (0)	8,33% (1)		25,00% (1)	15,38% (2)	
AA	75,00% (3)	83,34% (10)	1,0	25,00% (1)	46,15% (6)	0,6
AG+GG	25,00% (1)	16,66% (2)		75,00% (3)	53,85% (7)	
AG	25,00% (1)	8,33% (1)	0,45	50,00% (2)	38,46% (5)	1,0

AA+GG	75,00% (3)	91,67% (11)		50,00% (2)	61,54 (8)	
GG	0% (0)	8,33% (1)	1,0	25,00% (1)	53,85% (2)	1,0
AA+AG	100% (4)	91,67% (11)		75,00% (3)	46,15% (11)	
<b>Alelo</b>						
A	87,50% (7/8)	87,50% (21/24)	1,0	50,00% (4/8)	65,38% (17/26)	0,68
G	12,50% (1/8)	12,50% (3/24)		50,00% (4/8)	34,61% (9/26)	

\*Mf(baixa): baixa microfilaremia / Mf(alta): alta microfilaremia

\*\*Teste exato de Fisher

O alelo A foi majoritariamente prevalente nos indivíduos sintomáticos com baixa (87,50%) e alta microfilaremia (65,38%) e nos indivíduos com baixa microfilaremia, não houve diferença nas frequências alélicas entre assintomáticos e sintomáticos. Contudo, não foi possível observar associação entre a mutação IL13 Gln144Arg e a manifestação clínica da infecção por *M. ozzardi* em indivíduos com baixa e alta microfilaremia. Até mesmo pelo fato de a sintomatologia associada à mansonelose ainda não ser bem definida, talvez o conjunto de sintomas considerados aqui (dor de cabeça, dores articulares e dores no corpo) não sejam os mais adequados e, por isso, não tenha sido possível detectar essa associação. Contudo, uma vez que há diferença na quantidade de microfilárias circulantes na corrente sanguínea entre indivíduos com mansonelose, isso provavelmente resulta em manifestações clínicas.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados aqui permitem inferir que:

– São Gabriel da Cachoeira, AM, apresenta uma população com composição genética particular, sendo a mutação IL13 Gln144Arg bastante comum, o que diverge significativamente do que já foi registrado no Brasil e em relação a áreas endêmicas para filarioses humanas na África, especialmente a mansonelose e a oncocercose;

– Indivíduos com e sem a mutação IL13 Gln144Arg são suscetíveis à infecção por *Mansonella ozzardi* e à co-infecção por *M. ozzardi* e *M. perstans*, não tendo sido possível observar que IL13 Gln144Arg confira proteção contra a mansonelose em São Gabriel da Cachoeira, AM;

- O perfil genético dos indivíduos para IL13 Gln144Arg está associado a infecções patententes por *Mansonella ozzardi*, sendo os indivíduos heterozigotos mais pré-dispostos a apresentarem carga parasitária mais elevada.

Com isso, confirma-se a hipótese de que a mutação IL13 Gln144Arg tenha implicação sobre o desenvolvimento clínico da mansonelose, assim como visto na oncocercose e sugere-se que o papel da citocina IL13 na imunidade humana se estenda para as filarioses humanas em geral, indo além do que tem sido relatado. Dessa forma, este é o primeiro trabalho a demonstrar a ocorrência da mutação IL13 Gln144Arg no Norte do Brasil, e sua associação com o desenvolvimento clínico da mansonelose em São Gabriel da Cachoeira, AM, inclusive sendo presente entre os casos de co-infecção *M. ozzardi*-*M. perstans*.

## 7. MATERIAL SUPLEMENTAR

### 7.1. ANEXO 1 – Análise da consistência das frequências genotípica e alélicas do SNP rs20541 em São Gabriel da Cachoeira com o princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

**Tabela 7** – Frequências genotípicas do SNP rs20541 em São Gabriel da Cachoeira, AM e sua consistência com o princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg entre indivíduos com baixa e com alta microfilaremia.

<b>Genótipo</b>	<b>Mf(baixa)* (n=20)</b>	<b><i>p</i>*</b>	<b>Mf(alta) (n=23)</b>	<b><i>p</i>*</b>
AA	75,00% (15)	0,2397	43,48% (10)	0,8206
AG	10,00% (2)		39,13% (9)	
GG	15,00% (3)		17,39% (4)	

\*Teste Exato de Fisher

## 8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES (2017/2019)

TRIMESTRES/ ATIVIDADE	2017				2018				2019	
	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2° <sup>‡</sup>
<i>Obtenção de créditos obrigatórios</i>	■	■	■	■						
<i>Padronização dos testes moleculares</i>		■	■	■	■					
<i>Exame de qualificação</i>					■					
<i>Diagnóstico molecular de infecção por M. ozzardi</i>				■	■					
<i>Sequenciamento genético do gene de IL13</i>					■	■	■	■	■	
<i>Análise dos dados genéticos (genotipagem)</i>						■	■	■	■	
<i>Redação final da dissertação</i>										■
<i>Exame de defesa de dissertação</i>										■
<i>Apresentação dos resultados em congresso científico</i>										■

<sup>‡</sup>Período de prorrogação do prazo de agendamento do exame de defesa de dissertação

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALASANDAGUTTI, M. L. et al. Role of IL-13 Genetic Variants in Signalling of Asthma. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 566–577, 1 abr. 2017.
- ALHASSAN, A. et al. Expanding the MDx toolbox for filarial diagnosis and surveillance. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 391–400, 1 ago. 2015.
- AL-KUBATI, A.-S. et al. Onchocerciasis in Yemen: moving forward towards an elimination program. **International Health**, v. 10, n. suppl\_1, p. i89–i96, 1 mar. 2018.
- ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, C.; ROMAGNANI, S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 3, p. 626–635, 2015.
- AYBAR, C. A. V.; DANTUR JURI, M. J.; ZAIDENBERG, M. O. Mansonella ozzardi in Neotropical region of Argentina: Prevalence through time (1986-2010). **Acta Tropica**, v. 153, p. 1–6, jan. 2016.
- BABU, S.; NUTMAN, T. B. Immunology of lymphatic filariasis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 338–346, 1 ago. 2014.
- BAL, M. et al. Maternal Filarial Infection Influences the Development of Regulatory T Cells in Children from Infancy to Early Childhood. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005144, 18 nov. 2016.
- BARTOLONI, A. et al. Mansonella ozzardi infection in Bolivia: prevalence and clinical associations in the Chaco region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 830–833, 1 nov. 1999.
- BOUCHERY, T. et al. The symbiotic role of Wolbachia in Onchocercidae and its impact on filariasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 2, p. 131–140, 1 fev. 2013.
- CHEN, M.-L. et al. Single nucleotide polymorphisms of IL-13 and CD14 genes in allergic rhinitis: a meta-analysis. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 275, n. 6, p. 1491–1500, 1 jun. 2018.
- CRAINEY, J. L. et al. Onchocerciasis. In: **Arthropod Borne Diseases**. [s.l.] Springer, 2017. p. 383–403.
- DIAS, C. S. et al. Desigualdades demográficas e socioeconômicas entre brancos e indígenas no Brasil. **Redes (Santa Cruz do Sul. Online)**, v. 15, n. 2, p. 50–65, 19 maio 2010.
- FAWDRY, A. L. Onchocerciasis in South Arabia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 3, p. 253–256, maio 1957.
- GATLIN, M. R. et al. Association of the Gene Polymorphisms IFN- $\gamma$  +874, IL-13 –1055 and IL-4 –590 with Patterns of Reinfection with Schistosoma mansoni. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, p. e375, 10 fev. 2009.
- GOUR, N.; WILLS-KARP, M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. **Cytokine, IL 4/IL 13 family**. v. 75, n. 1, p. 68–78, 1 set. 2015.

- HEINZMANN, A. et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 4, p. 549–559, 1 mar. 2000.
- HOERAUF, A. et al. The variant Arg110Gln of human IL-13 is associated with an immunologically hyper-reactive form of onchocerciasis (sowda). **Microbes and Infection**, v. 4, n. 1, p. 37–42, jan. 2002.
- KATAWA, G. et al. Hyperreactive Onchocerciasis is Characterized by a Combination of Th17-Th2 Immune Responses and Reduced Regulatory T Cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3414, 8 jan. 2015.
- KNOPP, S. et al. Nematode Infections: Filariases. **Infectious Disease Clinics of North America**, Tropical Diseases. v. 26, n. 2, p. 359–381, 1 jun. 2012.
- KWARTENG, A.; AHUNO, S. T. Immunity in Filarial Infections: Lessons from Animal Models and Human Studies. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 85, n. 4, p. 251–257, abr. 2017.
- LANE, R. P.; CROSSKEY, R. W. Diptera. In: **Medical Insects and Arachnids**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.
- LIMA, N. F. et al. *Mansonella ozzardi*: a neglected New World filarial nematode. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 3, p. 97–107, 2 abr. 2016.
- LOK, J. B.; WALKER, E. D.; SCOLES, G. A. Filariasis. In: **Medical Entomology**. [s.l.] Springer, Dordrecht, 2000. p. 299–375.
- MAO, Y.-M. et al. Interleukin-13: A promising therapeutic target for autoimmune disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Special Issue: Cytokine Modulation of Autoimmune and Inflammatory Disorders. v. 45, p. 9–23, 1 fev. 2019.
- MARCOS, L. A. et al. Genetic Characterization of Atypical *Mansonella* (*Mansonella*) *ozzardi* Microfilariae in Human Blood Samples from Northeastern Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, p. 491–494, 5 set. 2012.
- MARTINS, M. et al. *Mansonella ozzardi* in Amazonas, Brazil: prevalence and distribution in the municipality of Coari, in the middle Solimões River. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 246–253, maio 2010.
- MEDEIROS, J. F. et al. Epidemiological studies of *Mansonella ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) in indigenous communities of Pauini municipality, Amazonas, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 241–246, 2007.
- MEDEIROS, J. F. et al. Current profile of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in communities along the Ituxi river, Lábrea municipality, Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 409–411, jun. 2008.
- MEDEIROS, J. F. et al. *Mansonella ozzardi* in Brazil: prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 74–80, fev. 2009a.

- MEDEIROS, J. F. et al. Occurrence of *Mansonella ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) in riverine communities of the Purus river, Boca do Acre municipality, Amazonas State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 6, p. 1421–1426, jun. 2009b.
- MEDEIROS, J. F. et al. A field trial of a PCR-based *Mansonella ozzardi* diagnosis assay detects high-levels of submicroscopic *M. ozzardi* infections in both venous blood samples and FTA® card dried blood spots. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 280, 20 maio 2015.
- MEDEIROS, J. F. et al. Mansonelliasis. In: **Arthropod Borne Diseases**. [s.l.] Springer, Cham, 2017. p. 405–426.
- MEDEIROS, J. F.; PESSOA, F. A. C.; CAMARGO, L. M. A. Mansonelliasis: A Brazilian Neglected Disease. **Rev Patol Trop**, v. 43, n. 1, p. 1–6, 2014.
- MEDEIROS, J. F.; PY-DANIEL, V.; BARBOSA, U. C. Prevalence of *Mansonella ozzardi* among riverine communities in the municipality of Lábrea, State of Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 186–190, abr. 2011.
- MOLYNEUX, D. H. et al. Filaria zoogeography in Africa: ecology, competitive exclusion, and public health relevance. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 163–169, 1 abr. 2014.
- NEWCOMB, D. C. et al. Human TH17 cells express a functional IL-13 receptor and IL-13 attenuates IL-17A production. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 4, p. 1006–1013.e4, abr. 2011.
- NOOKALA, S. et al. Impairment of Tetanus-Specific Cellular and Humoral Responses following Tetanus Vaccination in Human Lymphatic Filariasis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2598–2604, 5 jan. 2004.
- OLIVEIRA, L. C. DE et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms of some immune response genes in a population sample from São Paulo, Brazil. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 3, p. 359–366, set. 2011.
- ORIHTEL, T. C.; EBERHARD, M. L.; LOWRIE, J. R. *Mansonella ozzardi*: the course of patency in experimentally-infected patas monkeys. **Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)**, v. 44, n. 1, p. 49–54, mar. 1993.
- PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, v. 1, n. 1, p. 104, dez. 2010.
- POST, R. J. et al. The morphological discrimination of microfilariae of *Onchocerca volvulus* from *Mansonella ozzardi*. **Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 21–27, jul. 2003.
- RACCURT, C. P. et al. Epidemiologic survey of *Mansonella ozzardi* in Corail, Haiti. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 1167–1169, jun. 2014.
- RACCURT, C. P. *Mansonella ozzardi* and its vectors in the New World: an update with emphasis on the current situation in Haiti. **Journal of Helminthology**, p. 1–7, 25 out. 2017.
- RITTER, M. et al. *Mansonella perstans* microfilaremic individuals are characterized by enhanced type 2 helper T and regulatory T and B cell subsets and dampened systemic innate

and adaptive immune responses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006184, 11 jan. 2018.

SILVA, L. B. T. **Mansonelose no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 20 abr. 2016.

SILVA, L. B. T. et al. Molecular Verification of New World *Mansonella perstans* Parasitemias. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 545–547, mar. 2017.

SIMONSEN, P. E. et al. The Filariases. In: FARRAR, J. et al. (Eds.). . **Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-Third Edition)**. London: W.B. Saunders, 2014. p. 737-765.e5.

SIMONSEN, P. E.; ONAPA, A. W.; ASIO, S. M. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. **Acta Tropica**, The Diagnostics and Control of Neglected Tropical Helminth Diseases. v. 120, n. Supplement 1, p. S109–S120, 1 set. 2011.

SMOLKOVA, B. et al. Impact of interleukin 13 (IL13) genetic polymorphism Arg130Gln on total serum immunoglobulin (IgE) levels and interferon (IFN)- $\gamma$  gene expression. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 188, n. 1, p. 45–52, 2017.

SUZUKI, A. et al. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 79–88, set. 2015.

TAMAROZZI, F. et al. Onchocerciasis: the Role of *Wolbachia* Bacterial Endosymbionts in Parasite Biology, Disease Pathogenesis, and Treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 459–468, 1 jul. 2011.

TANG, T.-H. T. et al. Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 823–828, 2010.

TA-TANG, T. H. et al. Mansonellosis: current perspectives. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 9, p. 9–24, 2018.

TAYLOR, M. J.; HOERAUF, A.; BOCKARIE, M. Lymphatic filariasis and onchocerciasis. **The Lancet**, v. 376, n. 9747, p. 1175–1185, 2 out. 2010.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM et al. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, out. 2015.

UTSUMI, Y. et al. Association of IL-13 gene polymorphisms with airway hyperresponsiveness in a Japanese adult asthmatic population. **Respiratory Investigation**, v. 51, n. 3, p. 147–152, set. 2013.

WANG, M. et al. Association of IL-13 rs20541 polymorphism and risk of allergic rhinitis: evidence from a meta-analysis. v. 9, n. 8, p. 15914–15920, 30 ago. 2016.

WANG, R. et al. Association of interleukin 13 gene polymorphisms and plasma IL 13 level with risk of systemic lupus erythematosus. **Cytokine**, v. 104, p. 92–97, 1 abr. 2018.

WANJI, S. et al. Cross-Reactivity of Filariasis ICT Cards in Areas of Contrasting Endemicity of *Loa loa* and *Mansonella perstans* in Cameroon: Implications for Shrinking of the Lymphatic

Filariasis Map in the Central African Region. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, p. e0004184, 6 nov. 2015.

YASUDA, K.; TAKEUCHI, Y.; HIROTA, K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. **Seminars in Immunopathology**, v. 41, n. 3, p. 283–297, 1 maio 2019.

YING, X.-J. et al. Association of interleukin-13 SNP rs20541 with allergic rhinitis risk: A meta-analysis. **Gene**, v. 521, n. 2, p. 222–226, jun. 2013.

ZHU, J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. **Cytokine, IL 4/IL 13 family**. v. 75, n. 1, p. 14–24, 1 set. 2015.