

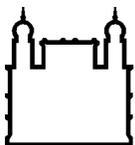
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical

**PARTICIPAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM GENES QUE
CODIFICAM TLRs, CITOCINAS E NOS2 COM A
SUSCEPTIBILIDADE À TOXOPLASMOSE OCULAR.**

MAÍRA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE MAGALHÃES

**Rio de Janeiro
2012**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

MAÍRA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE MAGALHÃES

Participação dos polimorfismos em genes que codificam TLRs, citocinas e NOS2 com a susceptibilidade à toxoplasmose ocular.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadores: Dra. Maria Regina Reis Amendoeira
Dra. Maria da Glória Bonecini Almeida

RIO DE JANEIRO
2012

M188

Magalhães, Maíra Cavalcanti de Albuquerque

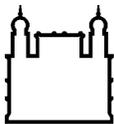
Participação dos poliformismos em genes que codificam TLRs, citocinas e NOS2 com a susceptibilidade à toxoplasmose ocular / Maíra Cavalcanti de Albuquerque Magalhães. – Rio de Janeiro, 2012.
xxi, 127 f.; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.

Bibliografia: f. 98-127

1. Poliformismos de um único nucleotídeo. 2. Toxoplasmose ocular. 3. Citocinas. 4. Óxido nítrico. I. Título.

CDD 616.936



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ **Pós-Graduação em Medicina Tropical**

MAIRA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE MAGALHÃES

PARTICIPAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM GENES QUE CODIFICAM TLRS,
CITOCINAS E NOS2 COM A SUSCEPTIBILIDADE À TOXOPLASMOSE OCULAR.

Orientadores: Dra. Maria Regina Reis Amendoeira
Dra. Maria da Glória Bonecini Almeida

Aprovada em: ____ / ____ / ____

EXAMINADORES:

Dr. Marcio Neves Bóia – Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Eliezer Israel Benchimol – Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Otilio Machado Pereira Bastos – Universidade Federal Fluminense

Dr. Alexandre Ribeiro Bello – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dra. Adriana Lima Vallochi – Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Martha Cecilia Suárez Mutis – Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Valmir Laurentino Silva – Fundação Oswaldo Cruz

*À minha Mae Lena por sempre
acreditar no meu potencial.*

*Ao Marcelo pelo apoio, carinho e
dedicação*

AGRADECIMENTOS

À Deus. Sem Ele minha vida não teria sentido e nenhuma conquista seria possível!

À Dra. Regina Amendoeira, em especial minha orientadora, pelo seu precioso apoio, incentivo, conselhos, amizade, dedicação e atenção durante todo o desenvolvimento desta tese. Obrigada por ter me acolhido como “filha”, acreditado no meu potencial e sempre lutado por mim.

À Dra. Glória Bonecini, minha segunda orientadora, pela sua amizade, dedicação, atenção e por estar sempre pronta a me ajudar a qualquer momento. Muito obrigada por tudo! Aprendi muito com o seu convívio.

À minha mãe Lena pelo apoio e amor incondicional, por lutar ao meu lado desde o meu nascimento, que já foi uma verdadeira guerra pela vida, pois nasci de 6 meses!!!

Ao Marcelo, meu marido, pelo apoio, carinho, dedicação e compreensão principalmente nos momentos de maior estresse! Com ele aprendi que não vale a pena se estressar, pois para tudo há uma solução! Obrigada por fazer parte da minha vida e por me mostrar que sonhos podem sim continuar e serem melhores ainda! Ganhei uma segunda família!

À todos os meus amigos e familiares que me ajudaram a nesses 4 anos principalmente nos momentos de estresse. Um ponto fundamental: meu cabelo resistiu bravamente....rsrsrsrs

Aos amigos especiais do LabToxo: Anselmo Gomes de Araujo, Eloiza de Freitas Trindade, José Leonardo Nicolau, Leandro Batista das Neves, Magyda Arabia

Aragi Darough. Obrigada por tudo! O que faríamos sem a estrondosa gargalhada da Elo??? Hein, Eloíza_gata??

À todos os outros integrantes fazem parte ou que fizeram pelo LabTOXO que de alguma forma participaram para nesta Tese ou para manter o astral bem alto no trabalho: Gisele, Paulo, Regiane, Tatiana, Thamires e todos os demais ex integrantes.

À Claudia Maria Antunes Uchoa Souto Maior, minha orientadora de monografia, que se tornou uma grande amiga, e ao Otilio Machado Pereira Bastos que me ensinaram muito sobre Parasitologia. Eles foram fundamentais para que eu trilhasse meu caminho. Tenho muitas saudades dos tempos da parasito na UFF e muitas estórias para relembrar.

À Isabel Frabregas Bonna pelo apoio e suporte dado na coleta de sangue em Santa Rita de Cassia durante o mestrado.

À todos os membros participantes do projeto de Santa Rita que contribuíram de forma singular para que este projeto fosse desenvolvido.

À Marcia Andrade da Rocha pelo apoio dado durante a Tese, sempre pronta para ajudar no que fosse preciso.

À Monique Ribeiro de Lima pelo imenso suporte dado na parte da estatística e principalmente no Prisma. Aprendi muito com você!

À Larissa Catarina Costa pelo apoio quando algo dava errado na biologia molecular. Longos papos dos porquês de não amplificar bandas....rsrs... sem falar nos desabafos!

À Dra. Elisabeth de Souza Neves pelo apoio dado durante a Tese.

À equipe do Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças infecciosas do Ipec/Fiocruz que ajudou para o andamento da Tese.

À Pós-Graduação em Medicina Tropical que sempre se disponibilizou a me ajudar quando necessário, principalmente ao apoio dado pela secretárias Michele e Ingrid. Foi um grande prazer fazer parte nesses 4 anos. Sempre me senti acolhida. Foi um ano de disciplinas e de imenso aprendizado. Era cansativo mas também gratificante.

Ao Dr Marcio Neves Bóia que esteve presente desde quando eu fiz a entrevista para o doutorado. Lembro-me que a primeira pergunta que fez antes que eu entrasse para a entrevista foi “você está nervosa?” E eu respondi que estava muito e então respondeu “não fique pois é só uma conversa”. E assim, ao longo do curso se tornou para mim uma pessoa que admiro e respeito muito.

Ao Laboratório de Imunofarmacologia do IOC/Fiocruz pelo apoio dado no uso da leitora de ELISA.

Ao Laboratório de Inflamação do IOC/Fiocruz pelo apoio dado no uso da leitora de ELISA.

Ao Laboratório de Hepatites Virais do Pavilhão Helio Peggy Pereira do IOC/Fiocruz pelo apoio dado na fotodocumentação dos géis de agarose.

*“Experiência não é o que acontece com um homem;
é o que um homem faz com o que lhe acontece.”*

Aldous Huxley

Lista de Abreviaturas

ARMS – Sistema de Amplificação de Mutação Refratária
CCR5 – Receptor tipo 5 de quimiocinas
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
GPI - Glicosilfosfatidilinositol
IFI – Imunofluorescência Indireta
IFN – Interferon
IgG – Imunoglobulina G
IL - Interleucina
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
MyD88 – Fator de Diferenciação Mielóide 88
NF- κ B – Fator de Transcrição Nuclear *kappa*-B
NO – Óxido Nítrico
NO₂⁻ - Nitrito
NO₃⁻ - Nitrato
NOS – Óxido Nítrico Sintase
NOx – Óxido Nítrico Total
PB – Pares de Base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP - Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição
SNP – Polimorfismos de Base Única
T. gondii – *Toxoplasma gondii*
TGF – Fator de Crescimento Transformante
TIR – Dominio Toll/Interleucina 1
TLR – Receptor tipo Toll
TNF – Fator de Necrose Tumoral
Th1 – Células T helper 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	HISTÓRICO	1
1.2	ETIOLOGIA	3
1.3	O <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	3
1.4	A TOXOPLASMOSE	7
1.4.1	<i>A Toxoplasmose Ocular</i>	10
1.5	A RESPOSTA IMUNE AO <i>T. GONDII</i>	12
1.5.1	<i>Polimorfismos em Genes envolvidos na Resposta Imune</i>	14
1.5.1.1	<i>Polimorfismos em Doenças Parasitárias - Ênfase na Toxoplasmose</i>	16
1.5.2	<i>O Papel dos Receptores Tipo Toll na Toxoplasmose</i>	17
1.5.3	<i>O Papel do TNF-α na Toxoplasmose</i>	20
1.5.4	<i>O Papel do Óxido Nítrico na Toxoplasmose</i>	23
1.5.5	<i>O Papel da Interleucina-10 na Toxoplasmose</i>	25
1.6	JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	27

2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVOS GERAIS	29
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	POPULAÇÃO E ASPÉCTOS ÉTICOS	30
3.2	DESENHO DO ESTUDO	34
3.2.1	<i>Critério de Inclusão</i>	34
3.2.2	<i>Critério de Exclusão</i>	35
3.3	METODOLOGIA	35
3.3.1	<i>Coleta e armazenamento das Amostras Biológicas</i>	35
3.3.2	<i>Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose</i>	35
3.3.3	<i>Extração de DNA Genômico</i>	36
3.3.4	<i>Análise dos Polimorfismos</i>	37
3.3.4.1	Polimorfismos para TLR4	38
3.3.4.1.1	Polimorfismo para TLR4 Asp299Gly A/G	38
3.3.4.2	Polimorfismo para TLR4 Thr399Ile C/T	41

3.3.5	<i>Polimorfismos para TNFA</i>	43
3.3.5.1	Polimorfismo para TNFA –238G/A	43
3.3.5.2	Polimorfismo para TNFA –308G/A	45
3.3.6	<i>Polimorfismo para NOS2A –954G/C</i>	47
3.3.7	<i>Polimorfismos para IL-10</i>	49
3.3.7.1	Polimorfismo para IL-10 –592C/A e –819C/T	49
3.3.7.2	Polimorfismo para IL-10 –1082G/A	51
3.3.8	<i>Quantificação de Nitrito (NO₂⁻) e Nitrato (NO₃⁻) séricos</i>	53
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA:	54
4	RESULTADOS	55
4.1	SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS SORORREAGENTES PARA <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .	55
4.2	ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA TLR4 (ASP299GLY A/G E THR399ILE C/T)	58
4.3	ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA TNFA (–238G/A E –308 G/A)	62
4.3.1	<i>Distribuições Genotípicas e Frequências Alélicas e Haplotípicas do Polimorfismo para TNFA –238G/A e –308G/A</i>	62
4.4	ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA NOS2A (–954G/C)	66

4.5	ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA IL-10	68
4.5.1	<i>Distribuições Genotípicas e Frequências Alélicas e Haplotípicas dos Polimorfismos para IL-10 –592C/A, –819C/T, –1082G/A</i>	68
4.5.1.1	Polimorfismo para IL-10 –592C/A	68
4.5.1.2	Polimorfismo para IL-10 –819C/T	69
4.5.1.3	Polimorfismo para IL-10 –1082G/A	70
4.6	DOSAGEM DE NITRITO (NO ₂ ⁻) E ÓXIDO NÍTRICO TOTAL (NO _x)	74
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÕES	89
7	ANEXOS	90
7.1	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	90
7.2	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	92
7.3	ARTIGO PUBLICADO NO MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ – ALBUQUERQUE ET AL. 2009	93
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 3.1 - LOCALIZAÇÃO VIA SATÉLITE DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA (SETA EM AMARELO), MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RIO DE JANEIRA, RJ, BRASIL. _____	32
FIGURA 3.2 - PLANTAÇÕES DE HORTALIÇAS NA COMUNIDADE DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. _____	33
FIGURA 3.3 – RESULTADO VISUALIZADO NO GEL DE AGAROSE NA ELETROFORESE A 2%, SOB LUZ ULTRAVIOLETA, DO POLIMORFISMO PARA TLR4 ASP299GLY A/G. _____	40
FIGURA 3.4 – RESULTADO VISUALIZADO NO GEL DE AGAROSE NA ELETROFORESE A 2%, SOB LUZ ULTRAVIOLETA, DO POLIMORFISMO PARA TLR4 THR399ILE C/T. _____	42
FIGURA 3.5 – ESQUEMA DO RESULTADO VISUALIZADO NO GEL DE ELETROFORESE A 2%, SOB LUZ ULTRAVIOLETA, DO POLIMORFISMO PARA <i>TNFA</i> NA POSIÇÃO –238G/A. _	44
FIGURA 3.6 – ESQUEMA DO RESULTADO VISUALIZADO NO GEL DE ELETROFORESE A 2%, SOB LUZ ULTRAVIOLETA, DO POLIMORFISMO PARA <i>TNFA</i> NA POSIÇÃO –308G/A. _	46
FIGURA 3.7 – ESQUEMA DO RESULTADO VISUALIZADO NO GEL DE ELETROFORESE A 3%, SOB LUZ ULTRAVIOLETA, DO POLIMORFISMO PARA <i>NOS2A</i> –954G/C. _____	48
FIGURA 3.8 – ESQUEMA DO RESULTADO VISUALIZADO NO GEL DE ELETROFORESE A 2%, SOB LUZ ULTRAVIOLETA, DOS POLIMORFISMOS PARA IL-10 NA POSIÇÃO –592C/A E –819C/T. _____	50

FIGURA 3.9 – ESQUEMA DO RESULTADO VISUALIZADO NO GEL DE ELETROFORESE A 2%,
SOB LUZ ULTRAVIOLETA, DO POLIMORFISMO PARA IL-10 NA POSIÇÃO –1082G/A. _ 52

FIGURA 4.1 – DOSAGEM DE NITRITO (NO_2^-) E ÓXIDO NÍTRICO TOTAL (NO_x) DOS GRUPOS
OCULAR E CONTROLE NA POPULAÇÃO RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA,
MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. _____ 74

FIGURA 4.2 - DOSAGEM DE NITRITO (NO_2^-) E ÓXIDO NÍTRICO TOTAL (NO_x) DOS GRUPOS
OCULAR E CONTROLE, EM RELAÇÃO AO PERCENTIL 50, NA POPULAÇÃO RURAL DO
BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. ___ 76

FIGURA 4.3 – DOSAGEM DE NITRITO (NO_2^-) E ÓXIDO NÍTRICO TOTAL (NO_x) DOS GRUPOS
OCULAR E CONTROLE ENTRE OS GENÓTIPOS DE NOS2A – 954G/C NA POPULAÇÃO
RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ,
BRASIL. _____ 78

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 3.1– PRIMERS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE IL-10 (-592C/A, -819 C/T, -1082 G/A), <i>TNFA</i> (-238G/A, -308G/A), <i>NOS2A</i> (-954G/C) E RECEPTOR TIPO TOLL 4 (ASP299GLY A/G, THR399ILE C/T) NA ANALISE DOS POLIMORFISMOS PELA PCR. _____	39
TABELA 4.1 – DADOS DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO OCULAR E DO GRUPO CONTROLE DA POPULAÇÃO RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. _____	56
TABELA 4.2 - DISTRIBUIÇÃO POR SEXO E IDADE, NOS INDIVÍDUOS COM TOXOPLASMOSE OCULAR PRESUMIDA (GRUPO OCULAR), NA POPULAÇÃO RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. _____	56
TABELA 4.3 - DISTRIBUIÇÃO POR SEXO E IDADE DOS INDIVÍDUOS SORO REAGENTES PARA <i>T. GONDII</i> DO GRUPO CONTROLE, PAREADOS POR SEXO E IDADE, DA POPULAÇÃO RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. _____	57
TABELA 4.4 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E DOS ALELOS NOS POLIMORFISMOS PARA ASP299GLY A/G E THR399ILE C/T DE <i>TLR4</i> ENTRE OS GRUPOS OCULAR E CONTROLE NA POPULAÇÃO RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. _____	60

TABELA 4.5- DISTRIBUIÇÕES HAPLOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS PARA ASP299GLY A/G E THR399ILE C/T DE *TLR4* ENTRE OS GRUPOS OCULAR E CONTROLE NA POPULAÇÃO RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. _____ 61

TABELA 4.6 - GENÓTIPOS E DISTRIBUIÇÕES DOS ALELOS A E G DOS POLIMORFISMOS PARA TNFA –238G/A E –308G/A ENTRE OS GRUPOS OCULAR E CONTROLE NA POPULAÇÃO RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. _____ 64

TABELA 4.7- DISTRIBUIÇÕES HAPLOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS PARA TNFA –238G/A E –308G/A ENTRE OS GRUPOS OCULAR E CONTROLE NA POPULAÇÃO RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. _____ 65

TABELA 4.8 - GENÓTIPOS E DISTRIBUIÇÕES DOS ALELOS G E C DO POLIMORFISMO PARA NOS2A –954G/C ENTRE OS GRUPOS OCULAR E CONTROLE NA POPULAÇÃO RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. 67

TABELA 4.9 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E ALELOS DO POLIMORFISMO PARA IL-10 – 592C/A, –819C/T E –1082G/A ENTRE OS GRUPOS OCULAR E CONTROLE NA POPULAÇÃO RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ, BRASIL. _____ 71

TABELA 4.10 - DISTRIBUIÇÕES HAPLOTÍPICAS DO POLIMORFISMO PARA IL-10 –592C/A, – 819C/T E –1082G/A ENTRE OS GRUPOS OCULAR E CONTROLE NA POPULAÇÃO

RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ,
BRASIL. _____ 72

TABELA 4.11 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS PARA *IL-10* –
592C/A, -819C/T E -1082G/A NOS GRUPOS OCULAR E CONTROLE NA POPULAÇÃO
RURAL DO BAIRRO DE SANTA RITA DE CÁSSIA, MUNICÍPIO DE BARRA MANSA, RJ,
BRASIL. _____ 73

Resumo

A toxoplasmose é uma zoonose com distribuição mundial e prevalência que pode variar de 15 a 85%. Na maioria dos casos a infecção é assintomática. A toxoplasmose ocular pode ocasionar perdas visuais relacionadas à uveítes. A resposta imune do hospedeiro tem um papel determinante no curso da infecção pelo *Toxoplasma gondii* e na evolução da doença onde, estão envolvidas citocinas como IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , além da expressão de radicais de óxido nítrico (NO). Modificações no padrão destes fatores regulatórios da resposta imune podem acarretar no desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro. Variações alélicas em regiões regulatórias de genes que codificam citocinas têm sido demonstradas afetando os níveis de expressão de algumas citocinas podendo assim influenciar no curso de infecções. Polimorfismos em genes que codificam citocinas têm sido associados com a susceptibilidade ou resistência a doenças infecciosas e parasitárias. O presente trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência de polimorfismos nos genes que codificam *IL-10* (-592C/A, -819C/T e -1082G/A), *TNFA* (-238G/A e -308G/A), *NOS2A* (-954G/C) e *TLR4* (Asp299Gly e Thr399Ile) em indivíduos com toxoplasmose ocular e em indivíduos sororreagentes para a infecção por *T. gondii* sem lesão ocular com a finalidade de tentar correlacioná-los com o desenvolvimento da lesão ocular toxoplásmica. A casuística incluída nesta proposta foi oriunda de uma população rural do Estado do Rio de Janeiro. Foram incluídos no estudo 34 indivíduos com lesão ocular (grupo ocular) e 134 indivíduos no grupo controle. Não foi observada diferença estatística significativa na distribuição genotípica e na frequência alélica ou haplotípica nos polimorfismos estudados. A média dos níveis séricos de nitrito e óxido nítrico foi similar entre os grupos ocular e controle, bem como quando separados pelos genótipos de *NOS2A* -954G/C. Desta forma, não evidenciamos na população estudada associações entre estes polimorfismos e a suscetibilidade à toxoplasmose ocular.

Palavras chaves:

1. Polimorfismo de Um Único Nucleotídeo, 2. Toxoplasmose ocular 3. Citocinas, 4. Óxido Nítrico

Abstract

Toxoplasmosis is a worldwide zoonosis which prevalence ranges from 15 to 85%. In most cases the infection is asymptomatic. Ocular toxoplasmosis can cause vision loss associated to uveitis. Host immune response plays an important role in the course of *Toxoplasma gondii* infection and in disease evolutions are involved cytokines such as IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , and nitric oxide (NO) radicals expression. Changes in the regulatory factors pattern of immune response can lead to a disequilibrium at host-parasite relationship. Allelic variations in regulatory regions of genes encoding cytokines have been shown to affect expression levels of some cytokines and may influence the course of infection. Polymorphisms in genes encoding cytokines have been associated with susceptibility or resistance to infectious and parasitic diseases. The aim of this study was to analyze the occurrence of polymorphisms in genes encoding *IL-10* (-592C/A,-819C/T and-1082G/A), *TNFA* (-238G/A and-308G/A), *NOS2A* (-954G/C) and *TLR4* (Asp299Gly and Thr399Ile) in individuals with ocular toxoplasmosis and IgG serum positive individuals to *T. gondii* infection without ocular lesions in order to try to correlate them with the development of toxoplasmic ocular lesions. All the participants were from a rural population of Rio de Janeiro State. The study included 34 individuals with ocular toxoplasmosis (ocular group) and 134 individuals in the control group. There was no statistically significant difference in genotype distribution or allele and haplotypes frequencies from all the polymorphisms studied. Mean serum levels of nitrite and nitric oxide were similar between ocular and control groups, and when separated by NOS2-954G/C genotypes. Thus, we do not evidentiate in this studied population association between these polymorphisms and susceptibility to ocular toxoplasmosis.

Key words: 1. Single nucleotide polymorphisms, 2. Ocular toxoplasmosis, 3. Cytokines, 4. Nitric Oxide

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Em julho de 1908, Splendore publicou uma nota preventiva na Revista da Sociedade Científica de São Paulo informando que havia identificado um microrganismo em coelhos de laboratório e no mesmo ano, em outubro na Tunísia, Nicolle e Manceaux identificaram o mesmo microrganismo no *Ctenodactylus gundi* (pequeno roedor africano). A prioridade da revelação, no entanto, coube a Nicolle e Manceaux uma vez que Splendore estava longe dos meios mais rápidos de comunicação. O microrganismo encontrado foi primeiramente denominado *Leishmania gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908, 1909, Splendore, 1908). Em 1909 foi constatado que o parasito não apresentava cinetoplasto (estrutura característica dos tripanossomatídeos), sendo assim, foi criado o gênero *Toxoplasma* por Nicolle & Manceaux, espécie *T. gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908, 1909).

Em 1923, Janku, descreveu em Praga, o caso de uma criança com hidrocefalia, microftalmia e retinocoroidite. No entanto, Janku não identificou a criança como tendo toxoplasmose congênita e identificou o parasito como Sporozoa. No Brasil, Torres (1927) detectou este parasito no cérebro e em outros órgãos de uma criança que morreu com apenas dois dias de vida e o denominou *Encephalitozon chagasi*, apesar das lesões serem parecidas com aquelas vistas na toxoplasmose experimental. Na revisão de Weiss e Dubey (2009), os autores mencionam que Levaditi (1928a,b) sugeriu que ambos os casos descritos anteriormente eram devido à infecção pelo *T. gondii*. Em 1937, Wolf e Cowen descreveram um parasito, denominado de *E. hominis*, no sistema nervoso central e retina de uma criança com meningoencefalite, sendo o mesmo indistinguível do *T. gondii* (Sabin, 1942). Em 1939, Wolf, Cowen e Page foram os primeiros a identificarem o *T. gondii* como agente etiológico da doença humana. Em 1940,

Pinkerton e Weinman descreveram o parasito em tecido de um adulto de 22 anos que faleceu e, no ano seguinte, em dois indivíduos que faleceram de pneumonia atípica (Pinkerton & Henderson, 1941). Hogan (1951) descreveu os primeiros detalhes clínicos da toxoplasmose ocular e Sim (1956) publicou a associação da linfadenopatia e a toxoplasmose adquirida.

A primeira técnica laboratorial que permitiu o diagnóstico sorológico da toxoplasmose foi a reação de neutralização, descrita por Sabin & Olitsky (1937), mas a técnica que permitiu estudos soroepidemiológicos foi desenvolvida em 1948 por Sabin e Feldman, sendo este teste também conhecido como teste do corante. Posteriormente foram desenvolvidos testes para detecção de anticorpos IgM em sangue de cordão umbilical (Remington et al. 1968, Dubey & Desmonts, 1987) e validado um teste sorológico utilizando o isolamento do parasito como padrão ouro (Dubey et al. 1995, Dubey, 1997). A partir da década de 90, foi desenvolvido a PCR (reação em cadeia da polimerase) para detectar o DNA de *T. gondii* usando sequências do gene B1 (Burg et al. 1989).

A evidenciação dos oocistos nas fezes do gato (Work & Hutchison, 1969) levou a descoberta do ciclo sexuado do *T. gondii* por Frenkel e colaboradores (1970) e Dubey e colaboradores (1970) que propuseram o ciclo de vida para o parasito baseado no papel dos felinos na infecção, ainda que com algum atraso pois o oocisto do protozoário durante certo tempo foi confundido com oocistos de *Isospora bigemina* (Hutchison et al. 1971).

Com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a toxoplasmose adquiriu grande importância, podendo causar, principalmente, cegueira, pneumonia e encefalite, sendo uma doença letal em 20% dos pacientes HIV positivos (Luft & Remington, 1992).

1.2 ETIOLOGIA

A classificação vigente proposta pelo Comitê de Sistemática e Evolução da Sociedade de Protozoologia (Levine, 1980) identifica o *T. gondii* como pertencente ao:

Reino Protista, Whittaker, 1977

Filo Apicomplexa Levine, 1970

Classe Sporozoa Leucart, 1879

Subclasse Coccidia Leucart, 1879

Ordem Eucoccidia Léger & Duboscq, 1910

Subordem Eimeriina Léger, 1911

Família Sarcocystidae Poche, 1913

Em 1993, Cavalier-Smith apresentou algumas alterações no Filo Apicomplexa Levine, 1970, criando o infra phylum Sporozoa Leucart, 1879, superclasse Coccidia Leucart, 1879 e Classe Eucoccidia Cavalier-Smith, 1993, na qual classificou o gênero *Toxoplasma* Nicolle & Manceaux, 1909. Vale ressaltar que o gênero *Toxoplasma* possui, até hoje, apenas uma espécie, o *Toxoplasma gondii*.

1.3 O *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* é um protozoário heteroxênico facultativo, intracelular obrigatório encontrado em tecidos e livres em líquidos orgânicos. Diversas espécies de vertebrados podem albergar o parasito, sendo também frequente no ser humano (Masur et al. 1978, Coutinho et al. 1983, Lynfield & Guerina, 1997, Amendoeira et al. 1999, Garcia et al. 1999, Montoya & Liesenfeld, 2004, Kravetz & Federman, 2005). A virulência do parasito, a base genética e o estado imunitário do hospedeiro são fatores que podem influenciar o curso da infecção em seres humanos (Montoya & Liesenfeld, 2004).

O parasito apresenta três formas evolutivas:

- a) Taquizoíta: Tem forma alongada, ligeiramente arqueada, com extremidade anterior mais afilada que a posterior. Mede de 2 a 4 μm de largura e 4 a 8 μm de comprimento. É a forma encontrada na fase aguda da infecção no interior de células nucleadas e livres em líquidos corporais (sangue, saliva, leite, entre outros). Possui preferência por células do sistema fagocítico mononuclear, leucócitos e células parenquimatosas. Pode sobreviver dentro de vacúolos parasitóforos de macrófagos. É considerada como forma proliferativa, pois apresenta multiplicação rápida por endogenia.

- b) Bradizoíta: Tem morfologia semelhante ao taquizoíta, multiplicando-se lentamente por endogenia em cistos teciduais, cujo tamanho varia em até 300 μm , dependendo do número de bradizoítas no seu interior. É encontrado na fase crônica da infecção. Localiza-se preferencialmente no tecido nervoso e musculaturas cardíaca e esquelética.

- c) Esporozoita – É encontrado no interior do oocisto, o qual apresenta formato arredondado e mede de 10 a 13 μm . O oocisto possui uma parede que confere resistência às condições ambientais, podendo ser classificado em: (1) oocisto imaturo que contém em seu interior uma massa embrionária e é liberado para o meio ambiente, junto com as fezes recém-emitidas pelos hospedeiros definitivos e (2) oocisto esporulado que após dois a três dias de sua eliminação para o meio ambiente, ocorre à esporulação, com formação de dois esporocistos, cada um deles com quatro esporozoítas, tornando-se assim infectante para o hospedeiro. Pode permanecer viável no solo por um longo período.

Os hospedeiros intermediários são representados por diversas espécies de vertebrados, incluindo mamíferos e aves, onde ocorre somente o processo de reprodução assexuada. O hospedeiro definitivo é representado, principalmente,

por felinos jovens não imunes e dos gêneros *Lynx* e *Felis*, nos quais ocorrem a reprodução sexuada. Esses hospedeiros eliminam os oocistos junto com as fezes, tendo um papel crucial na transmissão para o homem e outros animais (Work & Hutchison, 1969, Frenkel et al. 1970, Krick & Remington, 1978, Amendoeira et al. 1999, Garcia et al. 1999, Montoya & Liesenfeld, 2004, Sukthana, 2006).

O ciclo de vida do parasito divide-se em duas fases: a fase assexuada, também chamada de extra-intestinal, que ocorre nos hospedeiros intermediários e definitivos e a fase sexuada, ou entérica, que ocorre somente nos hospedeiros definitivos (Frenkel et al. 1970).

A fase assexuada inicia-se com a ingestão das formas infectantes do parasito (taquizoíta, bradizoíta ou esporozoíta) pelos hospedeiros intermediários ou definitivos. Estas formas atravessam o epitélio intestinal, penetram nas células, onde se multiplicam rapidamente por endogenia até que haja o rompimento das células parasitadas com a liberação dos taquizoítas contidos em seu interior, que invadirão outras células, repetindo todo o ciclo novamente (Jones, 1973, Hegab & Al-Mutawa, 2003).

A fase sexuada inicia-se com a ingestão das formas infectantes (taquizoíta, bradizoíta ou esporozoíta) pelos hospedeiros definitivos. Estas formas penetram ativamente pelo epitélio intestinal, reproduzem-se por endogenia e/ou esquizogonia, originando os merozoítas, que com o processo de multiplicação rompem a célula parasitada e invadem outras células para a formação dos gametocitos. Estes sofrem maturação e diferenciam-se em gameta masculino ou feminino, também denominados respectivamente de microgameta e macrogameta. Ocorrendo a fecundação e a formação do zigoto, este sintetiza uma parede cística, que irá conferir resistência às condições ambientais, originando desta forma o oocisto, que é liberado para a luz intestinal e eliminado juntamente com as fezes do gato. Este oocisto é denominado oocisto imaturo (Frenkel et al. 1970, Frenkel et al. 1972). Após alguns dias da liberação para o ambiente, o oocisto sofre esporulação havendo a formação de dois esporocistos com quatro esporozoítas em seu interior, sendo denominado, oocisto esporulado (Dubey et al. 1970).

Apesar da presença de um ciclo sexuado, o *T. gondii* mantém uma estrutura populacional clonal que reflete uma alta frequência de replicação assexuada. Uma combinação da análise estatística e filogenética indica que o *T. gondii* possui uma estrutura clonal consistindo de três linhagens. Todas as três linhagens foram encontradas numa grande variedade de hospedeiros em diversas áreas geográficas, localizadas inicialmente na América do Norte e Europa. Além disso, o parasito é único entre os organismos com uma estrutura de população clonal na qual mais de 95% dos parasitos isolados pertencem a uma das três linhagens e apesar da separação em linhagens distintas, a divergência genética entre as cepas do parasito é pequena, sendo menor que 1%, sugerindo que as linhagens sejam derivadas de um ancestral comum (Howe & Sibley, 1995, Maubon et al. 2008). As três linhagens são denominadas como Tipo 1, 2 e 3 sendo documentadas na América do Norte e Europa diferindo entre si nas taxas de crescimento, virulência no camundongo e habilidade de formar cisto (Howe & Sibley, 1995).

A linhagem tipo 1 é raramente isolada sendo encontrada nos casos de toxoplasmose congênita e na toxoplasmose ocular. É altamente virulenta para camundongos e a inoculação de menos de 10 taquizoítas pode levar à morte. *In vitro* apresenta alta taxa de multiplicação e interconversão taquizoíta-bradizoíta reduzida (Howe & Sibley, 1995, Sibley et al. 2002, Maubon et al. 2008).

A linhagem tipo 2 é encontrada com maior frequência na toxoplasmose humana e em outros animais com infecção crônica, utilizados no consumo. Não é virulento para os camundongos que apresentam infecção crônica com persistência de cistos teciduais (Grigg et al. 2001, Maubon et al. 2008). Além disso, estão associadas à reativação de infecções crônicas sendo encontrado em 65% dos casos de AIDS (Howe & Sibley, 1995). *In vitro* apresenta baixa taxa de multiplicação, formação de cistos e fácil interconversão taquizoíta-bradizoíta (Maubon et al. 2008).

A linhagem tipo 3 é encontrada em animais domésticos com infecção crônica e em animais selvagens. Não é virulento para o camundongo embora possa ocorrer morte com sintomas neurológicos semanas após a inoculação

(Howe et al. 1997, Maubon et al. 2008) Podem também ser isolados genótipos recombinantes, exóticas ou atípicos com maior frequência em animais silvestres oriundos da América do Sul, África e Ásia (Maubon et al. 2008). Considera-se que as três linhagens não são espécies verdadeiras de modo que a presença de cepas recombinantes demonstra que houve recombinação sexual, embora não sendo frequente, entre as linhagens selvagens (Howe & Sibley, 1995, Maubon et al. 2008, Sullivan Jr & Jeffers 2011). Recentemente, Khan e colaboradores (2011) identificaram na América do Norte, uma nova linhagem com estrutura populacional clonal, a qual foi denominada tipo 12, sendo encontrada em animais selvagens e ocasionalmente em humanos. Esta linhagem é produto de uma recombinação entre a linhagem do tipo 2 e uma linhagem parental única (γ) oriunda de um *crossing over* do ancestral II.

Khan e colaboradores (2006), no Brasil, observaram que os isolados associados à toxoplasmose ocular não se enquadravam nas três linhagens clonais. Na América do Norte, em pacientes com retinocoroidite grave ou atípica, foram observados isolados do tipo 1 ou recombinantes (Grigg et al. 2001). No entanto, a linhagem do tipo 2 foi isolada em olhos oriundos de banco de olhos de São Paulo (Vallochi et al. 2005a). Neste mesmo Estado, em indivíduos com encefalite toxoplásmica foi observado, em sua maioria, a linhagem do tipo 1, mas também foram encontrados linhagens do tipo 3 e recombinantes (Ferreira et al. 2008). Esses estudos demonstram que no Brasil, os isolados encontrados divergem do padrão observado na América do Norte e Europa.

1.4 A TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose humana é uma zoonose com distribuição mundial e sua prevalência vai de 15 a 85%, podendo variar até dentro do mesmo país ou região de acordo com os hábitos socioculturais, fatores geográficos e fatores climáticos (Howe & Sibley, 1995, Amendoeira et al. 1999, Garcia et al. 1999, Sobral et al.

2005, Abu-Madi et al. 2008, Dubey & Jones 2008). Fatores envolvidos na severidade da doença ainda não são bem conhecidos. Alguns fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro têm sido sugeridos como importantes no desenvolvimento do curso da doença (Sibley et al. 2002).

Vários são os mecanismos de transmissão do *T. gondii*, alguns já bem definidos como a ingestão de carne crua ou mal cozida, que contenha cistos teciduais, bem como a ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados (Wong & Remington, 1994, Amendoeira, 1995, Amendoeira et al. 1999, Garcia et al. 1999, Mozzatto & Soibelman Procianoy, 2003). Além destes, a transmissão também pode ocorrer via transplacentária (Eichenwald 1948), pela transfusão de hemoderivados (Siegel et al. 1971, Nelson et al. 1989), transplante de órgãos (de Medeiros et al. 2001), leite não pasteurizado e seus derivados (Marana et al. 1995, Hiramoto et al. 2001), manipulação de carne crua por donas de casa e magarefes (Jamra, 1964, Ishizuka, 1978), consumo de ovos crus (Jacobs & Melton, 1966) e acidentes de laboratório (Amendoeira, 1995, Amendoeira et al. 1999, Garcia et al. 1999, Mozzatto & Soibelman Procianoy, 2003, Montoya & Liesenfeld, 2004).

Apesar do grande número de indivíduos infectados, a toxoplasmose é relativamente rara quando há resposta imunológica eficiente do hospedeiro. A doença pode apresentar-se de forma grave em duas situações: (1) em indivíduos imunocomprometidos, com infecção crônica que pode reativar ou que adquirem pela primeira vez o protozoário. Nestes, podem ocorrer alterações neurológicas e lesões oculares múltiplas (Derouin et al. 1992, Ambroise Thomas & Pelloux, 1993) e (2) em gestantes não imunes que adquirem primo-infecção, nas quais pode ocorrer sérias sequelas ao feto inclusive levar ao óbito (Jones et al. 2006).

A toxoplasmose pode ser denominada de acordo com o momento em que se deu a infecção: se a infecção ocorrer após o nascimento, dá-se o nome de toxoplasmose adquirida e se a infecção ocorrer durante a gestação, dá-se o nome de toxoplasmose congênita (Amato Neto et al. 1982, Amendoeira et al. 1999).

Na toxoplasmose adquirida, a maioria dos casos a infecção é assintomática ou oligosintomática em cerca de 90% dos indivíduos, tanto em crianças como em

adultos (Krick & Remington, 1978, Frenkel, 1988, Lynfield & Guerina, 1997, Montoya & Liesenfeld, 2004, Kravetz & Federman, 2005). Este fato é devido à imunidade protetora eficiente, a qual envolve a participação de anticorpos e de células T (Frenkel, 1988). Em casos com sintomatologia, a infecção pode durar por semanas ou meses e entre os sinais e sintomas sugestivos da infecção pelo *T. gondii*, o mais característico é a linfadenopatia (Krick & Remington, 1978, Masur et al. 1978, Montoya & Liesenfeld, 2004, Neves et al. 2009), também podendo ocorrer febre, mal-estar, cefaléia, mialgia/artralgia (Lynfield & Guerina, 1997, Neves et al. 2009) e mais raramente miocardite, hepatite, encefalite e pneumonia (Amendoeira et al. 1999, Montoya & Liesenfeld, 2004, Kravetz & Federman, 2005, Neves et al. 2009).

Geralmente, em indivíduos imunocompetentes, a infecção é benigna e autolimitada, embora a linfadenopatia possa persistir por meses (Lynfield & Guerina, 1997, Amendoeira et al. 1999). Raramente evolui para a forma grave e apenas em casos extremos leva à morte (Remington et al. 1960, Amendoeira et al. 1999). Em indivíduos imunodeficientes (transplantados, com infecções virais como o HIV, neoplasias, entre outros) podem ocorrer casos generalizados, principalmente encefalite, por vezes levando o indivíduo à morte já que o comprometimento do sistema imunológico permite a reativação de cistos latentes com intensa proliferação de taquizoítas (Derouin et al. 1992, Ambroise Thomas & Pelloux, 1993, Amendoeira et al. 1999).

O diagnóstico clínico da toxoplasmose adquirida é difícil uma vez que na maioria das vezes a infecção é subclínica e quando ocorre sintomatologia, esta pode ser facilmente confundida com outras infecções de etiologias diversas. O diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* pode ser realizado por meio da detecção de anticorpos IgG, utilizando testes sorológicos tais como: Sabin-Feldman, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), Reação de imunofluorescência indireta (IFI) e de aglutinação, e de anticorpos IgM através da ELISA e *Immunosorbent agglutination assay* (ISAGA).

A toxoplasmose congênita é decorrente da infecção *in utero* quando mulheres grávidas, não imunes, desenvolvem uma infecção primária (Amendoeira

et al. 1999, Garcia et al. 1999, Jones et al. 2003, Spalding et al. 2003, Kravetz & Federman, 2005, Amendoeira & Camillo-Coura, 2010). Pode também ocorrer pela reativação da infecção do parasito em mulheres grávidas imunossuprimidas transmitindo-se assim a infecção para o feto (Jones et al. 2003). Ao atingir o concepto, pode se disseminar causando danos que irão depender da cepa do parasito, da capacidade de proteção dos anticorpos maternos e do período gestacional. No feto podem ocorrer calcificações intracranianas, hidrocefalia, retinocoroidite e retardo mental (Coutinho et al. 1983, Lynfield & Guerina, 1997, Amendoeira et al. 1999, Kravetz & Federman, 2005). A frequência da transmissão é diretamente proporcional ao período gestacional, sendo de 25% no primeiro trimestre, 54% no segundo trimestre e 65% no terceiro trimestre. Já a severidade da doença é inversamente proporcional ao tempo de gestação, ou seja, quanto mais cedo ocorrer à infecção durante a gestação, maiores serão os danos ao feto (Delascio, 1954, Wong & Remington, 1994, Amendoeira et al. 1999, Jones et al. 2003, Mozzatto & Soibelman Procianoy, 2003, Montoya & Liesenfeld, 2004). Num estudo realizado com crianças expostas ao risco de toxoplasmose congênita durante a gestação, 34,5% apresentaram lesões oftalmológicas logo no primeiro ano de vida, sendo que destas, 60% estavam assintomáticas logo após o nascimento (Soares et al. 2011).

1.4.1 A Toxoplasmose Ocular

Até meados da década de 80, a toxoplasmose ocular em adultos era considerada como uma reativação periódica de cistos latentes associadas à infecção congênita (Grigg et al. 2001). A partir do final da década de 80, alguns autores observaram que a toxoplasmose ocular poderia também ser oriunda de uma infecção adquirida pós-nascimento (Melamed 1988, Silveira et al. 1988, Benchimol & Moreira, 1995, Grigg et al. 2001, Silveira et al. 2001, Holland, 2003).

Há poucos relatos sobre o número de indivíduos com lesões de toxoplasmose ocular na população em geral (Holland, 2003). No Brasil a

prevalência da toxoplasmose ocular tem-se mostrado bastante variável: 1,4% em Ijuí, Rio Grande do Sul (Zanetti & Pletsch, 2007), 5,81% em Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, Rio de Janeiro (Aleixo et al. 2009) e 11,2% em Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo (Abreu, 1998). Em Erechim, Estado do Rio Grande do Sul foi encontrado a maior prevalência da doença ocular de 17,7% (Glasner et al. 1992).

A infecção é, geralmente, subclínica em crianças e adultos sendo que os sintomas oculares variam de acordo com a idade do indivíduo, mas algumas complicações podem ocorrer como deficiência visual ou glaucoma. Em crianças pode ocorrer redução da acuidade visual e estrabismo e nos adultos, redução da visão, fotofobia, dor e hiperemia (Lynfield & Guerina, 1997, Bonfiolo & Orefice, 2005).

No olho, a retina é o local primário na infecção pelo *T. gondii*, mas a coróide, o vítreo e câmara anterior também podem ser afetados. A retinocoroidite é uma lesão ocular caracterizada por inflamação e necrose, considerada como principal consequência da toxoplasmose ocular (Lynfield & Guerina, 1997, Garcia et al. 1999, Montoya & Liesenfeld, 2004, Garweg & Candolfi, 2009). As recidivas são consideradas comuns embora não tenha sido estabelecido se a causa é devido a reações de hipersensibilidade ou ao rompimento de cistos que levariam à inflamação e necrose (Carvalho e Farhat, 1999).

Em indivíduos imunocomprometidos, as lesões oculares podem ser múltiplas com carga parasitária elevada, necrose em toda a área da retina e retinocoroidite extensa (Norose et al. 2005). Embora a conversão de bradizoítas em taquizoítas seja considerada como um evento crítico na patogênese da toxoplasmose ocular, seus mecanismos permanecem ainda desconhecidos (Norose et al. 2003).

Vallochi e colaboradores (2005a) sugeriram que linhagens do tipo 1 de *T. gondii* podem ser responsáveis por algumas infecções que levam ao desenvolvimento de lesões oculares no Brasil. No Sul do Brasil, a toxoplasmose ocular adquirida é comum (Melamed, 1988, Silveira et al. 1988, Garcia et al. 1999). Já as uveítes (inflamação da uvea composta por iris, corpo ciliar e coróide)

posteriores são freqüentes em todo o Brasil (Melamed, 1988). Alguns trabalhos têm relatado casos familiares de toxoplasmose ocular, encontrados em algumas zonas do estado do Rio Grande do Sul (Melamed, 1988, Silveira et al. 1988).

No diagnóstico da retinocoroidite é necessário que se faça o exame de fundoscopia (fundo de olho), cuja lesão característica tem o formato de um chumaço de algodão elevado de coloração amarelo esbraquiçada com margens não definidas, geralmente no polo posterior (Carvalho e Farhat, 1999).

1.5 A RESPOSTA IMUNE AO *T. gondii*

O IFN- γ possui um importante papel na imunidade adquirida durante a fase aguda e no controle da multiplicação do parasito em hospedeiros com infecção crônica (Suzuki et al. 1988; Suzuki et al. 1989). O mecanismo pelo qual o *T. gondii* dispara a produção de IFN- γ pelas células NK envolve a indução, pelo protozoário, da síntese de TNF- α e IL-12, que atuam sinergicamente para disparar a liberação de IFN- γ (Gazzinelli et al. 1993). Citocinas inflamatórias como o IFN- γ e o TNF- α são essenciais na indução da ativação de macrófagos e juntamente com outras citocinas e interleucinas, incluindo IL-12, propagam uma resposta de células Th1, permitindo assim a proteção do hospedeiro contra a rápida multiplicação das formas taquizoítas e suas conseqüentes lesões (Gazzinelli et al. 1993, Jones et al. 2006, Yap et al. 2006). Além disso, ocorre também a produção de outras interleucinas tais como IL-4 e IL-10 (Fatoohi et al. 2006). As células T CD4⁺ e CD8⁺ atuam na indução da imunidade protetora contra o parasito prevenindo a reativação da infecção por meio da produção de IFN- γ (Gazzinelli et al. 1994).

A migração de células T CD4⁺ e CD8⁺ para o globo ocular é uma característica da toxoplasmose ocular (Lu et al. 2004). A depleção dessas células resulta no aumento da formação das lesões e no número de cistos em modelos murinos para a forma adquirida (Gazzinelli et al. 1994). Além disso, as células T CD8⁺ e células B podem ter um papel importante limitando a proliferação intra-ocular de taquizoítas no olho (Lu et al. 2004).

Em camundongos, as infecções com linhagens de *T. gondii* do tipo 1 e 2 caracterizam-se pela indução da imunidade protetora com produção de células Th1. Nesta resposta, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos secretam IL-12 com produção subsequente de IFN- γ pelas células NK e linfócitos T (Mordue et al. 2001, Sibley et al. 2002, Dogruman-AI et al. 2011). O IFN- γ e o TNF- α induzem a formação de radicais de oxigênio e nitrogênio que levam a uma privação de nutrientes controlando assim a proliferação do parasito (Sibley et al. 2002).

A disseminação de *T. gondii*, após a ingestão oral, pode resultar em formação de cistos, que é regulada por mecanismos imunes envolvendo genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou mediada por linfócitos CD8⁺ (Brown & McLeod, 1990).

A inibição da replicação do *T. gondii* ou sua destruição pode ser resultado de vários mecanismos efetores: (1) mecanismos oxidativos; (2) mecanismos não oxidativos como a produção de óxido nítrico, por macrófagos ativados por IFN- γ , estando também envolvido na fase crônica através da inibição da replicação intracerebral do *T. gondii* e (3) mecanismos dependentes não oxigenados tais como a indução pelo IFN- γ da indoleamina 2,3-dioxigenase, a qual degrada o triptofano, necessário para o crescimento do parasito (Murray et al. 1979, Pfefferkorn et al. 1986, Adams et al. 1990, Schluter et al. 1999, Filiseti & Candolfi, 2004).

Fatoohi e colaboradores (2006) observaram que indivíduos com toxoplasmose ocular apresentavam níveis aumentados de IFN- γ , em resposta aos antígenos do *T. gondii*, quando comparados aos controles soronegativos para *T. gondii*. Yamamoto e colaboradores (2001) observaram que indivíduos com toxoplasmose ocular adquirida apresentavam um aumento da resposta de células T e secretavam altos níveis de IL-1, TNF- α e IL-10, ao estímulo de antígenos do *T. gondii*, em relação aos indivíduos sororreagentes assintomáticos, contribuindo assim para a patogênese das lesões.

Vallochi e colaboradores (2002) sugeriram que a resistência ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular humana, estaria associada à capacidade de produção de citocinas como IL-12 e IFN- γ contra antígenos do parasito. Por

outro lado, a susceptibilidade à toxoplasmose ocular, estaria relacionada à produção de citocinas como IL-1 e TNF- α , que contribuiriam para a resposta inflamatória que lesaria a retina e a coróide.

Linhagens de camundongos resistentes à infecção como o BALB/C desenvolvem infecção latente crônica similar aos dos indivíduos imunocompetentes, já as linhagens susceptíveis como o C57BL/6 desenvolvem, espontaneamente, toxoplasmose encefálica necrosante (Suzuki, 2002).

O resultado da infecção de *T. gondii* em linhagens isogênicas é variável, dependendo de fatores como o tamanho do inoculo (Liesenfeld, 1999), virulência da cepa (Su et al. 2002), gênero (Roberts et al. 1995) e o estado imunitário do hospedeiro. Fatores genéticos do hospedeiro e a linhagem do parasito podem ser críticos na determinação da susceptibilidade à toxoplasmose ocular, pelo menos em modelos murinos (Lu et al. 2005). Estes modelos sugerem que as lesões na retina estão associadas com a presença de células epiteliais daquela região. Além disso, foi observada ausência de resposta inflamatória em torno dos cistos de *T. gondii* e que as células mononucleares e células epiteliais da retina circundam os parasitos livres e os cistos em formação (Tedesco et al. 2004).

1.5.1 Polimorfismos em Genes envolvidos na Resposta Imune

Diversas doenças têm sido correlacionadas com fatores genéticos do hospedeiro, possibilitando o entendimento da heterogenicidade, em relação à mortalidade e morbidade em populações expostas aos mesmos riscos (Ndamba et al. 1997). Tal fato pode ser observado na talassemia quando há também a deficiência na glicose – 6 – fosfato desidrogenase (G6PD), que, assim, pode conferir proteção ao hospedeiro contra a malária, bem como a ausência do antígeno Duffy, na superfície de células vermelhas que pode prevenir a entrada do *Plasmodium vivax* nos eritrócitos (Welch et al. 1977, Segal & Hill, 2003). Estudos realizados com helmintos mostraram que a genética do hospedeiro é importante na variação da morbidade da infecção (Quinnell, 2003). A susceptibilidade a

doenças, em relação à severidade e à variação da virulência, pode ser atribuída a inúmeros fatores como a genética do hospedeiro e o genótipo do parasito.

Polimorfismo genético por definição é a “ocorrência simultânea, na população, de genomas que apresentam variações nos alelos de um mesmo locus, resultando em diferentes fenótipos, cada um com uma frequência determinada”. Os polimorfismos mais estudados são os *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) denominados como polimorfismos de um único nucleotídeo e os microssatélites. Os microssatélites são também chamados de repetições pequenas em “tandem” (*short tandem repeats*, STR) e são locus variáveis (polimorfismos) que consistem de um número variável de unidades repetitivas de 1 a 6 bases nitrogenadas podendo estar presentes em regiões promotoras ou regulatórias (Lio et al. 2002, Delaney et al. 2004).

Os SNPs consistem em variação de um único nucleotídeo na sequência codificante de DNA podendo também estar presentes na região promotora e são considerados como o tipo mais comum de polimorfismo genético. O SNP define dois alelos para os quais podem existir três genótipos entre indivíduos em uma população chamados de homocigotos ou heterocigotos (Hartl & Clark, 2010). Acredita-se que o genoma humano possua ao menos 10 milhões de SNPs, ou um a cada 300 pares de bases (Hartl & Clark, 2010). Estima-se que ocorra numa taxa de um por 250 – 1000 bp e é responsável por 90% das variações na sequência de DNA no genoma humano (Ye et al. 2001).

Polimorfismos em genes que codificam citocinas têm sido estudados com a finalidade de correlacioná-los com a susceptibilidade ou resistência a diversas doenças (Cabrera et al. 1995, Rodriguez-Pérez et al. 2005, Kamali-Sarvestani et al. 2006, Salhi et al. 2008, Calzada et al. 2009, Costa et al. 2009, Cruz-Robles et al. 2009, Torres et al. 2009, Frade et al, 2011, Pissetti et al. 2011). Além disso, podem determinar diferenças individuais. Geralmente, esses genes são altamente conservados nas sequências de éxons, mas mutações silenciosas podem alterar a produção da citocina (Martinez-Pomar et al. 2006). Variações alélicas em regiões regulatórias de genes que codificam citocinas têm sido demonstradas afetando os níveis de expressão de algumas citocinas *in vitro* (Reid et al. 2002). Devido ao fato

desses polimorfismos serem independentemente segregados, um indivíduo pode ter um padrão de expressão de citocinas um pouco diferente de outro indivíduo (Pyo et al. 2003). Indivíduos podem ser classificados como “alto produtores” ou como “baixo produtores”, em relação ao genótipo que possui da citocina, ou seja, poderá produzir uma citocina em grande ou pequena quantidade (Warle et al. 2003). As diferenças genéticas que afetam a expressão de citocinas poderiam predispor a desordens imunológicas e influenciar na duração da resposta imune (Delaney et al. 2004).

1.5.1.1 Polimorfismos em Doenças Parasitárias - Ênfase na Toxoplasmose

Diversos trabalhos associam polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro e a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças. Há associações entre polimorfismos em genes que codificam citocinas e a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças parasitárias. Na leishmaniose, há associações com polimorfismos para IFN- γ (Kamali-Sarvestani et al. 2006), IL-10 (Salhi et al. 2008), *TGFB1* (Frade et al, 2011) e TNF- α (Cabrera et al. 1995). Na doença de Chagas, há associações com polimorfismos para IL-1 (Cruz-Robles et al. 2009), IL-10 (Costa et al. 2009), MIF (fator de inibição de migração do macrófago) (Torres et al. 2009), *TGFB1* (Calzada et al. 2009) e TNF- α (Rodríguez-Pérez et al. 2005, Pissetti et al. 2011). Na esquistossomose, há associação com polimorfismo para IFN- γ (Chevillard et al. 2003) e na malária para o receptor de IFN- γ (Koch et al. 2002), IL-12 (Zhang et al. 2010) e TNF- α (Hananantachai et al. 2007).

Na toxoplasmose, existem trabalhos descrevendo os polimorfismos em genes envolvidos na resposta imune. Na toxoplasmose aguda adquirida não foi encontrada associação entre o polimorfismo para *IFNG* +874T/A e a duração da doença ou morbidade (artigo aceito para publicação – Neves et al, 2012). Contudo, na toxoplasmose congênita, foram observadas associações entre os

polimorfismos para *ABCA4* e *COL2A1* em relação ao acometimento ocular de crianças (Jamieson et al. 2008, Jamieson et al. 2009).

Em relação à retinocoroidite toxoplásmica foram encontradas associações entre os polimorfismos para *IFNG* +874T/A (Albuquerque et al. 2009), *IL-10* (-1082G/A) e *TLR9* (éxon 2) (Peixoto-Rangel et al. 2009). No entanto, não foram observadas associações entre os polimorfismos para o alelo *CCR5*Δ32 (Vallochi et al, 2008), *IL1A* -889 C/T e *IL1B* +3954C/T (Cordeiro et al. 2008), *P2RX7* (Jamieson et al. 2010), *TLR2* (Asn199Asn, Arg677Trp, Gln753Arg), *TLR4* (Gly299Asp, Ile399Thr), *TLR5* (intron 2 e Lys841Lys), *TLR9* (Pro545Pro) (Vallochi et al. 2008, Peixoto-Rangel et al. 2009) e *TNFA* -308G/A (Cordeiro et al. 2008).

Nosso grupo avaliou o polimorfismo para *IFNG* +874T/A e a sua relação com a susceptibilidade à retinocoroidite toxoplásmica numa população rural do bairro de Santa Rita de Cassia, Barra Mansa, RJ. A frequência do genótipo AA estava aumentada nos indivíduos com lesões oculares toxoplásmicas em relação aos controles (indivíduos IgG positivos para *T. gondii* sem lesões oculares) sugerindo assim a participação deste polimorfismo no acometimento ocular. É importante ressaltar que o genótipo AA está associado com a baixa produção de *IFN-γ*, fato que poderia contribuir para uma resposta imune deficiente e assim, para o desfecho da doença (Albuquerque et al. 2009 – Anexo 7.3).

1.5.2 O Papel dos Receptores Tipo Toll na Toxoplasmose

A resposta imune do hospedeiro possui um papel determinante na evolução da infecção pelo *T. gondii*. A detecção de microrganismos pelo sistema imune inato ocorre por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), os quais identificam componentes microbianos denominados “padrões moleculares associados ao patógeno” (PAMPs). Os PRRs parecem ser elementos centrais da imunidade inata devido ao envolvimento direto no controle de resposta imune adaptativa e a falha deste reconhecimento pode ser importante para a

sobrevivência do parasito. Dentre os PRRs podemos citar os receptores tipo *Toll* (TLRs) (Iwasaki e Medzhitov, 2004, Akira et al. 2006)

A via de ativação induzida por TLRs foi inicialmente descrita em *Drosophila melanogaster* (Lemaitre, 1996). As principais células sentinelas do sistema imune inato, tais como as células fagocíticas e dendríticas expressam diferentes combinações de PRRs e TLRs (Ulevitch, 1999, Trinchieri e Sher, 2007). A família de TLRs em mamíferos é composta por receptores transmembrana caracterizados por um domínio externo com segmentos ricos em leucina e um domínio citoplasmático receptor Toll/interleucina-1 (TIR) (Akira, 2006). Atualmente são descritos 11 receptores em células humanas e 13 em camundongos e cada TLR detecta PAMPs distintos (Egan et al. 2009).

Após o reconhecimento, recrutam um conjunto específico de moléculas adaptadoras que ancoram o domínio TIR (domínio intracelular homólogo ao do Toll/receptor de IL-1) denominadas MyD88 e TRIF e iniciam uma série de eventos sinalizadores que levam à expressão de genes pró-inflamatórios e possuem um papel central na geração da resposta imune inata (Schwartz e Cook, 2005, Kawai & Akira, 2010). A interação do ligante com os TLRs leva à formação de homodímeros ou heterodímeros. O TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão localizados na superfície da célula e reconhecem componentes da membrana microbiana enquanto o TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos dentro de vesículas intracelulares e reconhecem ácidos nucléicos (Blasius & Bleuter, 2010). O TLR11 é expresso em compartimentos intracelulares, e em humanos apresenta um códon de parada e a proteína não é expressa (Pifer et al. 2011), e o TLR13 em vesículas intracelulares (Blasius & Bleuter, 2010).

A ativação destes receptores inicia uma série de cascatas de sinalização que estimulam a defesa do hospedeiro pela indução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1, por meio de ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B. Além disso, o TLR pode iniciar a resposta imune adaptativa pela indução da produção de interleucinas pró-inflamatórias, como a interleucina-12 (IL-12) e regulação da expressão de moléculas co-estimulatórias (Werling & Jungi, 2003). A ativação do TLR induz

células dendríticas a produzirem IL-12, IL-23 e IL-27 (Dabbagh e Lewis, 2003). A IL-12 induzida por esta ativação poderá contribuir para a diferenciação de células T em células Th1, na qual a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ é predominante (Dabbagh e Lewis, 2003, Werling e Jungi, 2003).

O *T. gondii* apresenta em sua superfície proteínas com âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Black & Boothroyd, 2000) e a biosíntese de GPI é essencial para a sobrevivência do parasito (Wichroski & Ward, 2003). Debierre-Grockiego e colaboradores (2007) demonstraram que GPIs altamente purificados de taquizoitos de *T. gondii* induziam a produção TNF- α em macrófagos através da ativação de NF- κ B.

Mun e colaboradores (2003) observaram que camundongos deficientes de TLR2 não sobreviveram ao desafio com altas doses do parasito pela via intra-peritoneal. Outro fator importante foi a não detecção de óxido nítrico (NO) derivado de macrófagos peritoneais. O TLR4 tem um papel ainda controverso visto que camundongos deficientes neste receptor, inoculados via intra-peritoneal, resistiram à infecção do mesmo modo que os camundongos controle. Em outro experimento, camundongos deficientes TLR4 foram susceptíveis à infecção pela via oral, associado à diminuição significativa da produção de IFN- γ e IL-12 (Furuta et al. 2006).

Camundongos deficientes de MyD88 mostraram-se altamente susceptíveis à infecção pelo *T. gondii* com a cepa ME49, cuja característica principal é a de apresentar baixa virulência, após inoculação intraperitoneal ou oral (Sukhumavasi et al. 2008). Em outro estudo, camundongos deficientes de MyD88 apresentaram replicação incontrolável do parasito e redução dos níveis de IL-12 o plasma (Scanga et al. 2002). No entanto, apesar da MyD88 ser requerida para o controle da infecção pelo *T. gondii*, o parasito é capaz de disparar a resposta imune adaptativa sem a necessidade desta molécula adaptadora (Sukhumavasi et al. 2008). Debierre-Grockiego e colaboradores (2007) observaram que camundongos deficientes de ambos TLR2 e TLR4 eram mais susceptíveis à infecção pelo *T. gondii* e apresentavam um número maior de cistos no cérebro. Além disso, a resposta do TNF- α à GPI estava completamente anulada em macrófagos de

camundongos deficientes de ambos os TLR2 e TLR4 sugerindo que ambos os receptores atuam na defesa do hospedeiro contra o *T. gondii*.

O sequenciamento do TLR4 humano revelou que a maior parte das variações em polimorfismos não sinônimos está localizado no terceiro éxon codificado para o domínio TRR. A frequência desses polimorfismos não sinônimos (que modifica o aminoácido) é menos de 1% na população humana. A exceção está em dois polimorfismos não sinônimos que foram descritos na população com uma frequência maior que 5%. O primeiro é a transição A/G causando a substituição do ácido aspártico pela glicina (Asp299Gly), no quarto éxon, que possivelmente altera o domínio extracelular deste receptor (Schmitt et al. 2002) e o segundo é a transição C/T causando uma substituição da treonina pela isoleucina (Thr399Ile) (Arbour et al. 2000, Ferwerda et al. 2008). Ambos os polimorfismos têm sido associados a variabilidade da resposta das vias aéreas ao LPS inalado (Schmitt et al. 2002).

No polimorfismo para TLR9 foi encontrada associação com a retinocoroidite toxoplásmica (Peixoto-Rangel et al. 2009). No entanto, não foram observadas associações entre os polimorfismos TLR2 (Asn199Asn, Arg677Trp, Gln753Arg), TLR4 (Gly299Asp, Ile399Thr), TLR5 (intron 2 e Lys841Lys), TLR9 (Pro545Pro) (Vallochi et al. 2008, Peixoto-Rangel et al. 2009).

1.5.3 O Papel do TNF- α na Toxoplasmose

Na toxoplasmose, o TNF- α é produzido principalmente por monócitos ativados, macrófagos e linfócitos T (Pelloux et al. 1993, Filisetti & Candolfi, 2004). Possui um papel importante no controle da toxoplasmose, exercendo um efeito protetor pelo aumento da capacidade microbicida dos macrófagos, sendo sua produção induzida pela secreção de IFN- γ (Suzuki et al. 2000, Filisetti & Candolfi, 2004). O TNF- α parece ser essencial para a ativação do macrófago e inibição da replicação do parasito, porém sua ação só pode ser exercida em sinergia com o

IFN- γ (Filiseti & Candolfi, 2004). Está envolvido também na proteção contra a infecção intra-ocular e na resistência à toxoplasmose durante a fase aguda e crônica da infecção pelo *T. gondii* (Sibley et al. 2002). Além disso, possui papel crucial na prevenção da reativação da toxoplasmose crônica provavelmente devido a sua atuação na indução produção de óxido nítrico, o qual atua no controle da proliferação do parasito (Gazzinelli et al. 1993).

Estudos com modelos animais apontam para o importante papel do TNF- α no controle da infecção pelo *T. gondii*. Camundongos deficientes de TNF- α , após infecção oral, sucumbiram por encefalite necrosante enquanto camundongos controle sobreviveram (Schluter et al. 2003). Silva e colaboradores (2009) observaram que camundongos deficientes do receptor p55 de TNF- α apresentaram reações inflamatórias significantes e parasitismo tecidual aumentado e mais severo no sistema nervoso central quando comparado aos controles. Deckert-Schluter e colaboradores (1998) observaram que camundongos deficientes de ambos os receptores p55 e p75 ou deficientes do receptor p55 sucumbiram entre 17 e 27 dias respectivamente, ao passo que camundongos controle ou deficientes apenas do receptor p75 foram igualmente resistentes à toxoplasmose aguda. Do mesmo modo, camundongos deficientes de ambos os receptores p55 e p75 sucumbiram entre 3 a 4 semanas de encefalite necrosante fulminante e apresentaram um grande número de cistos e aumento da multiplicação de taquizoítos no cérebro. Os autores sugerem que embora a sinalização do receptor não seja requerida para o controle inicial da multiplicação do parasito, esta é necessária para a prevenção da encefalite toxoplásmica (Yap et al. 1998).

Na toxoplasmose ocular, Gazzinelli e colaboradores (1994) observaram que camundongos C57BL/6 tratados com anticorpos neutralizantes de IFN- γ e TNF- α apresentaram uma exacerbação da inflamação ocular e aumento da formação da lesão associada com o aumento do número de taquizoítas. Calabrese e colaboradores (2008) observaram que os níveis séricos de TNF- α , em camundongos infectados com *T. gondii* por via intraperitoneal e seus controles, no soro permaneciam quase indetectáveis enquanto os níveis desta citocina

presentes no humor aquoso podiam ser detectados, embora não houvesse diferença entre os grupos. Os autores apontam que o estudo do padrão de citocinas, isoladamente, em camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*, não foi suficiente para determinar a suscetibilidade ou resistência, uma vez que os camundongos não apresentaram um padrão de resposta Th1 ou Th2.

Matowicka-Karna e colaboradores (2009) não observaram diferenças significativas em relação aos níveis de TNF- α produzidos frente à infecção pelo *T. gondii* em relação aos indivíduos sem toxoplasmose. O mesmo foi observado na toxoplasmose ocular adquirida quando comparados aos indivíduos com lesão ocular congênita, IgG positivos sem toxoplasmose ocular ou aqueles IgG negativos para *T. gondii* (Yamamoto et al. 2001). No entanto, foi encontrado níveis aumentados de TNF- α tanto em indivíduos infectados pelo *T. gondii* e usuários de drogas intravenosas quanto àqueles infectados pelo *T. gondii* e co-infectados com o HIV quando comparados aos indivíduos IgG negativos para *T. gondii* (Li et al. 2010). Os autores sugerem que os níveis aumentados de TNF- α poderiam ser devido às transcrições de mediadores inflamatórios aumentadas durante à infecção crônica pelo *T. gondii*.

O gene para TNF- α está localizado no cromossomo 6 (6p21.3) dentro do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe III. Os polimorfismos na região promotora para *TNFA* nas posições -238G/A e -308G/A envolvem a substituição da guanina (G) pela adenosina (A) nos alelos mutantes (Wilson et al. 1997). O alelo raro (A) está associado com a alta produção de TNF- α (Wilson et al. 1997, Pissetti et al. 2011).

Contudo, o SNP *TNFA* -308G/A não influencia na suscetibilidade a toxoplasmose ocular (Cordeiro et al. 2008a). A nosso conhecimento não foram publicadas associações ao SNP *TNFA* nas posições -238G/A e a toxoplasmose ocular.

1.5.4 O Papel do Óxido Nítrico na Toxoplasmose

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples, altamente tóxica devido à presença de um radical livre que a torna um agente químico altamente reativo. Várias células são capazes de sintetizar o NO por meio de hemeoproteínas da família citocromo P450 chamadas de NO sintases (NOS). Foram isoladas três isoenzimas, sendo duas constitutivas e uma induzível. São denominadas: neuronal (nNOS, isoforma 1), induzível (iNOS, isoforma 2) e endotelial (eNOS, isoforma 3). As três são semelhantes estruturalmente, porém são reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7, 12 e 17 respectivamente (Wang & Mardsen, 1995, Filho & Zilberstein, 2000). A iNOS, também denominada de NOS2, tem sua expressão induzida nos macrófagos e em outras células por lipopolisacarídeos bacterianos ou citocinas, sendo capaz de produzir NO por longo período de tempo. No entanto, altos níveis de NO produzido, que é tóxico para microrganismos ou para células tumorais, podem também lesar células saudáveis, sendo este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes (Filho & Zilberstein, 2000).

Apesar de ser possível medir o NO de forma direta e indireta como pela espectrofotometria de massa, cromatografia líquida, entre outros, a curta meia vida e as baixas concentrações de NO *in vivo* reduzem a praticidade dessas metodologias para uso a partir de amostras biológicas. A detecção a partir de metabolitos estáveis como o nitrito e nitrato permite a quantificação indireta do NO produzido de forma simples (Filho & Zilberstein, 2000, Miranda et al. 2001). O nitrito é o único produto final estável, em solução aquosa, da auto-oxidação de NO (Awad et al. 1993, Ignarro et al. 1993) e o nitrato é formado pela reação do NO com a superóxido ou oxi-hemoglobina (Koppenol et al. 1992). Logo, a medição desses dois compostos permite a estimativa quantitativa e fidedigna dos níveis de NO *in vivo* (Miranda et al. 2001).

A NOS2 está envolvida na resposta imune inicial e é induzida por citocinas e interleucinas como o IFN- γ , IL-1, TNF- α ou endotoxinas como lipopolissacarídeos. Durante a resposta imunológica frente à infecção pelo *T.*

gondii, IFN- γ e TNF- α podem induzir a produção de NO, o qual restringe a gravidade da toxoplasmose ocular, incluindo a inflamação da retina, coróide e humor vítreo (Roberts et al. 2000). A produção de NO é um dos mecanismos utilizados pelos macrófagos para destruir o *T. gondii*. A formação de espécies reativas de oxigênio, NO e indução da degradação do triptofano podem estar envolvidos nos mecanismos antiparasitários induzidos pelo IFN- γ (Murray et al. 1979, Adams et al. 1990).

Em camundongos deficientes de TNF- α , macrófagos peritoneais produziram níveis reduzidos de NO, logo no início da infecção pelo *T. gondii*, demonstrando assim a importância desta citocina para a indução da produção de NO (Schluter et al. 2003). Foi observado que a administração de aminoguanidina (inibidor seletivo da NOS2) em camundongos C57BL/6 resultou na maior gravidade da toxoplasmose ocular (Hayashi et al. 1996). Camundongos C57BL/6 infectados com o *T. gondii* apresentaram níveis aumentados de RNAm para NOS2 nos olhos em relação aos camundongos não infectados. Em outro trabalho, camundongos deficientes de NOS2 apresentaram reações inflamatórias significantes e parasitismo tecidual aumentado e mais severo no sistema nervoso central quando comparado aos controles (Silva et al. 2009). Além disso, camundongos deficientes de NOS2 sucumbiram à infecção demonstrando a importância do NO nas infecções com altas doses do *T. gondii* (Mun et al. 2003).

A NOS2 é codificada por um gene polimórfico denominado NOS2A no cromossomo 17q11.2-q12. O polimorfismo para NOS2A -954G/C envolve a substituição da guanina (G) pela citosina (C) (Hobbs et al. 2002). O alelo raro (C) está associado com altos níveis da atividade da enzima NOS (Coia et al. 2005). Até o momento, não foram publicadas associações ao SNP NOS2A na posição -954G/C e a toxoplasmose ocular.

1.5.5 O Papel da Interleucina-10 na Toxoplasmose

A IL-10 é produzida por linfócitos T CD4⁺, macrófagos, células dendríticas e alguns tipos de linfócitos B. Sua função é a inibição da proliferação de células Th1, podendo também inibir a produção de derivados oxigenados e nitrato bem como a produção de citocinas pro-inflamatórias. A cascata de sinalização da IL-10 é o principal mecanismo envolvido no controle de citocinas pro-inflamatórias como IL-12 e TNF- α (Deckert-Schlüter et al. 1997). A inibição das células *natural killer*, levará a uma redução da produção de citocinas que são requisitadas para a produção do IFN- γ tais como IL-1, TNF- α e IL-12, contribuindo assim para uma menor liberação de óxido nítrico (Moore et al. 2001, Filiseti & Candolfi, 2004). Apesar da secreção de IL-10 pelas células dendríticas não ser o principal mecanismo responsável pela diminuição da produção de IL-12, o balanço entre a produção de IL-12 e IL-10 parece ser essencial para o controle da toxoplasmose (Aldebert et al. 2007). A imunodepressão de células T dependentes exercida pela IL-10 parece evitar a inflamação que eventualmente leva à morte do hospedeiro (Gazzinelli et al. 1996, Neyer et al. 1997). Além disso, a IL-10 pode diminuir a ativação de macrófagos pelo decréscimo da atividade anti-toxoplasmica exercida pelo IFN- γ facilitando assim a sobrevivência do parasito (Neyer et al. 1997). Logo, a imunossupressão induzida pela IL-10, após a infecção pelo *T. gondii*, pode ser benéfica tanto para o parasito quanto para o hospedeiro favorecendo assim um balanço nesta relação parasito-hospedeiro.

Camundongos deficientes de IL-10, infectados com *T. gondii*, desenvolveram uma resposta inflamatória letal no cérebro caracterizado por um número aumentado de células T CD4⁺ e macrófagos e elevada produção IL-6, IL-17, TNF- α e NO (Wilson et al. 2005). Camundongos, *Mus domesticus domesticus*, infectados via intraperitoneal, com a cepa RH, apresentaram níveis aumentados de IL-10 em relação aos controles (Dogruman-AI et al. 2011). Camundongos deficientes de IL-10, infectados via intraperitoneal, tiveram 100% de mortalidade após 13 dias da infecção enquanto camundongos controle sobreviveram à infecção aguda. Além disso, camundongos *SCID* (imunodeficiência combinada

severa) e deficientes de IL-10, infectados com *T. gondii*, sobrevivem por mais tempo em relação aos camundongos deficientes de IL-10 e aos camundongos *SCID*, indicando assim que os linfócitos contribuíram para a morte mais rápida dos camundongos e que na presença de deficiência de linfócitos, a IL-10 endógena estaria associada tanto com a proteção quanto com a susceptibilidade ao *T. gondii* e que a falta de IL-10 não altera a supressão induzida das células T e as funções das células NK (Neyer et al. 1997). Hayashi e colaboradores (1996) observaram alta mortalidade entre os camundongos deficientes em IL-10, associada à hiperprodução de citocinas pró-inflamatórias. Esses trabalhos apontam para o papel da IL-10 frente à infecção pelo *T. gondii* que apesar desta citocina ser capaz de induzir resposta Th2 e limitar a diferenciação de células T para resposta Th1, a produção deficiente pode levar ao acometimento de complicações mais graves como a encefalite, demonstrando seu importante papel no controle da infecção pelo *T. gondii*.

Matowicka-Karna e colaboradores (2009) observaram níveis superiores de IL-10 nos indivíduos infectados por *T. gondii* em relação aos controles saudáveis. Li e colaboradores (2010) observaram níveis de IL-10 aumentados em indivíduos infectados pelo *T. gondii* e usuários de drogas intravenosas em relação aos controles saudáveis. Yamamoto e colaboradores (2001) observaram que a produção de IL-10, em resposta ao antígeno solúvel de *T. gondii*, estava ligeiramente aumentada em indivíduos com toxoplasmose ocular adquirida em relação aos indivíduos com toxoplasmose ocular congênita, sororreagentes ou saudáveis. Fatoohi e colaboradores (2006) observaram que a produção de IL-10 não estava associada ao modo de infecção (adquirida, congênita ou indeterminada) ou à natureza das lesões oculares (ativa ou inativa) ou ao estado sorológico dos indivíduos infectados.

O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1 no 1q31- q32 e é composto por quatro introns e 5 éxons (Eskdale et al. 1997). Há três SNPs que podem influenciar a transcrição e expressão de IL-10, sendo eles: -592A/C que envolve a troca da adenina (A) pela citosina (C), -819T/C que envolve a troca da

timina (T) pela citosina (C) e -1082A/G que envolve a troca da adenina (A) pela guanina (G). O haplótipo GCC (SNPs nas posições -1082, -819 e -592 respectivamente) está associado com altos níveis de produção de IL-10 enquanto o haplotipo ATA está associado com baixos níveis (Moura et al. 2009).

1.6 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A detecção de *T. gondii* pelas células do sistema imunológico é o marco inicial da resposta imune. Receptores de reconhecimento padrão como os TLRs ao se ligarem aos antígenos de patógenos iniciam uma série de cascatas de sinalização intracelular que irão liberar mediadores envolvidos na inflamação, como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio visando o controle dos patógenos.

Na resposta imunológica ao *T. gondii* estão envolvidas citocinas e interleucinas como IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , além da expressão de NO e modificações no padrão destes fatores regulatórios da resposta imune podem acarretar o desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro. Polimorfismos em genes que codificam citocinas têm sido estudados com a finalidade de correlacioná-los com a susceptibilidade a diversas doenças infecciosas. Além disso, tem sido observada uma associação entre a presença destes polimorfismos com a produção de citocinas.

Dos indivíduos com toxoplasmose, apenas uma pequena parcela desenvolve a toxoplasmose ocular. Logo, para uma melhor compreensão sobre os fatores que levam ao comprometimento ocular, foi proposto um estudo multigênico para avaliar se polimorfismos em genes que codificam *TLR4*, *TNFA*, *IL-10*, e *NOS2* contribuiriam para o desenvolvimento de lesões oculares. Além disso, nosso grupo demonstrou que o polimorfismo no gene que codifica o *IFNG*, na posição +874 (T/A), estava associado com a suscetibilidade ao desenvolvimento da toxoplasmose ocular. O estudo de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica poderá contribuir para a compreensão dos fatores genéticos

do hospedeiro, que podem influenciar o curso da infecção por *T. gondii*. Tais fatores ocasionam desde uma resposta protetora contra o parasito até um agravamento da agressão, como o aparecimento de lesões oculares e encefalite.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a ocorrência de polimorfismos nos genes que codificam as citocinas TNF- α e IL-10, a enzima óxido nítrico sintase (NOS2A) e o receptor TLR4, envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro humano com toxoplasmose ocular.

Verificar os polimorfismos que estariam relacionados a uma possível susceptibilidade ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular numa população rural do Estado do Rio de Janeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1- Investigar a ocorrência de polimorfismos nos genes que codificam:

TNFA (posição -238 G/A e -308 G/A), *IL-10* (posição -592 A/C, -819 C/T e -1082 G/A), *NOS2A* (posição -954 G/C) e *TLR4* (Asp299Gly, Thr399Ile).

2 – Quantificar os níveis séricos de nitrito e nitrato em indivíduos com toxoplasmose ocular e seus controles e correlacioná-los com os genótipos de NOS2A-954 G/C.

3- Verificar se há associação entre os SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) para os referidos genes e toxoplasmose ocular humana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO E ASPÉCTOS ÉTICOS

O presente estudo foi realizado numa população rural residente no Bairro de Santa Rita de Cássia no Município de Barra Mansa, Rio de Janeiro (Figura 3.1). O município de Barra Mansa está localizado às margens do Rio Paraíba do Sul, na região fluminense do Médio Vale do Paraíba, entre a Serra do Mar e a Serra da Mantiqueira, a 110 km do Rio de Janeiro. Em 2010, a população de Barra Mansa foi estimada em 177 mil habitantes para uma área total de 547 km² (IBGE, 2012). O Bairro de Santa Rita de Cássia está localizado entre os Municípios de Barra Mansa e Volta Redonda, tendo como vizinhos os Bairros de Vila Nova, Nossa Senhora do Amparo (Barra Mansa) e Açude (Volta Redonda). Santa Rita de Cássia começou a se formar com a chegada de algumas famílias oriundas de Minas Gerais, que se instalaram na região formando uma colônia, que segundo relatos de membros da comunidade, se constituiu na “Fazenda Santa Rita de Cássia”, com somente onze casas. O comércio mais próximo era o de Barra Mansa, não existiam estradas e nem meios de comunicação. A instalação da rede elétrica ocorreu em 1973 e atualmente, a comunidade dispõe de telefone, rádio, televisão e linha de ônibus (dados fornecidos pelo Posto de Saúde de Santa Rita de Cássia). Suas coordenadas geográficas são 22°32'25,19" S e 44°10'35,33" O, referentes ao prédio da Prefeitura e está situada numa altitude de 381 m. O clima é mesotérmico, com verões quentes e chuvosos e inverno seco. A umidade relativa do ar fica em torno de 77 %, a temperatura média mínima é de 16°C e a média é em torno de 28°C.

Devido às características sócio-econômicas e culturais da comunidade, com o aparecimento de casos de toxoplasmose aguda, diagnosticada por médicos locais do Programa Municipal de Saúde da Família (PSF) e a confirmação de dois casos de retinocoroidite, após um breve rastreamento clínico de alguns membros da comunidade, fez-se um inquérito epidemiológico visando detectar as possíveis

fontes de infecção, além do rastreamento clínico e sorológico. Um projeto principal foi elaborado a partir da confirmação da suspeita clínica de médicos locais que procuraram a Fiocruz, com o apoio da comunidade, para resolver o problema. Houve o envolvimento de pesquisadores, médicos, enfermeiras, veterinários, agrônomos e alunos.

O presente estudo é uma continuação do projeto intitulado “Estudo dos polimorfismos genéticos na infecção por *Toxoplasma gondii* em pacientes com toxoplasmose ocular – em população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ”. A primeira fase desse projeto foi realizada durante a dissertação de mestrado em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, no período de Março de 2005 a Março de 2007, intitulada “Estudo do polimorfismo para IFN- γ (+874) na infecção por *Toxoplasma gondii* em pacientes com toxoplasmose ocular – em população rural, do bairro Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ”. Na dissertação de Mestrado foi possível verificar que os indivíduos com lesão ocular apresentavam uma frequência aumentada do genótipo AA quando comparado aos controles (indivíduos IgG positivos para *T. gondii* sem lesões oculares) sendo este dado estatisticamente significativo. Logo, este polimorfismo foi associado à susceptibilidade ao desenvolvimento da toxoplasmose ocular. Esses resultados foram publicados em 2009 no *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, volume 104, fascículo 3, páginas 451 a 455 (Anexo 7.3). A partir deste resultado, foram incluídos outros polimorfismos em genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro frente ao *T. gondii* para avaliar se estes polimorfismos estariam contribuindo para o desenvolvimento da forma ocular da doença sendo este projeto desenvolvido nesta Tese de Doutorado.



Figura 3.1 - Localização via satélite do bairro de Santa Rita de Cássia (seta em amarelo), Município de Barra Mansa, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Fonte: google maps.

A comunidade do bairro de Santa Rita de Cássia possui cerca de 327 famílias e aproximadamente 1.300 indivíduos (dados estimados pela Secretaria de Saúde de Barra Mansa, RJ, em 2004). O abastecimento de água é proveniente, principalmente de poços e nascentes. A maioria das casas é constituída por alvenaria, possuindo sistema de esgoto e coleta de lixo públicos. A Figura 3.2 ilustra o aspecto rural da comunidade estudada.



Figura 3.2 - Plantações de hortaliças na Comunidade do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana do IPEC-FIOCRUZ sob protocolo número CEP: 2240.0.000.009-08 (22 de Setembro de 2008 – Anexo 7.1).

Os participantes foram informados dos objetivos do estudo e ao aceitarem participar do presente estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 7.2)

3.2 DESENHO DO ESTUDO

Este trabalho é um estudo caso-controle. Para a seleção da casuística foram utilizados critérios de inclusão e exclusão.

3.2.1 Critério de Inclusão

Indivíduos com Lesão Ocular Toxoplásmica: Foram incluídos indivíduos que apresentaram sorologia compatível para infecção pelo *T. gondii* (ver item 3.3.2) e quadro de lesão ocular toxoplásmica após exame de fundoscopia realizado pela oftalmologista Dra Ana Luisa Aleixo do IPEC/FIOCRUZ. Aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Indivíduos Controles: Foram incluídos indivíduos que não apresentavam sinal de lesão ocular toxoplásmica, porém com sorologia compatível para infecção pelo *T. gondii* (ver item 3.3.2). Para a seleção amostral dos indivíduos participantes do grupo controle, foi utilizado um banco de dados, no qual para cada indivíduo era designado um número. Para o sorteio dos indivíduos que iriam formar o grupo controle, foi utilizada uma tabela de números aleatórios permitindo assim a extração de uma amostra aleatória.

3.2.2 Critério de Exclusão:

Indivíduos com Lesão Ocular Toxoplásmica e Indivíduos Controles: Nos dois grupos foram excluídos aqueles indivíduos que: (1) apresentaram consanguinidade entre si, independentes de sexo e idade, (2) não aceitaram participar do estudo, (3) não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e (4) os indivíduos com sorologia negativa para toxoplasmose.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Coleta e armazenamento das Amostras Biológicas

As amostras de soro e sangue total dos 168 indivíduos já haviam sido coletadas durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado. As amostras foram coletadas no período de Julho a Outubro de 2006. Os soros foram armazenados em freezer -70°C e o sangue total em -20°C .

3.3.2 Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose

A detecção de anticorpos anti-*T. gondii* foram realizadas por meio das técnicas: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) segundo Uchôa e colaboradores (1999) e Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) segundo Camargo (1964). O soro foi considerado positivo na RIFI com titulação $\geq 1/16$ e na ELISA para valores maiores que o *cut-off* multiplicado por 1.4.

3.3.3 Extração de DNA Genômico

Utilizou-se um *kit* comercial para a extração de DNA genômico (QIAmp DNA blood mini kit - Qiagen). A metodologia utilizada seguiu o protocolo descrito pelo fabricante e os reagentes faziam parte do *kit*. 20 µL da proteinase Qiagen foi adicionada a um tubo de 1,5 mL tipo *ependorf*, previamente rotulado com o número da amostra. Adicionou-se a estes tubos, 200 µL de cada amostra de sangue, seguido de 200 µL do tampão A. Os tubos foram homogenizados em vortex por 15 segundos. A amostra foi incubada a 56°C por 10 minutos e centrifugada até que fosse atingida a marca de 10.000 rotações por minuto (Centra CL2, Thermo IEC). O processo foi repetido por 3 vezes. Adicionou-se 200 µL de etanol (96 a 100%, Merck) e o conteúdo dos tubos foi homogenizados no vortex por 15 segundos. A amostra foi novamente centrifugada a 10.000 rpm, como anteriormente descrito. A seguir, a amostra foi cuidadosamente transferida para a coluna QIAmp e centrifugada a 6.000 g por 1 minuto. A coluna QIAmp foi novamente transferida para outro tubo de 2 mL (incluso no kit) e o filtrado descartado. Adicionou-se 500 µL do tampão AW1 e centrifugou-se a 6.000 g por 1 minuto. A coluna QIAmp foi transferida para outro tubo de 2 mL (incluso no kit) e o filtrado descartado. Adicionou-se 500 µL do tampão AW2 e centrifugou-se a 20.000 g por 3 minutos. A coluna QIAmp foi transferida para um *ependorf* de 1,5 mL sem tampa e o filtrado descartado. Adicionou-se 100 µL do tampão AE, incubando-se a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto e então centrifugou-se a 6.000g por 1 minuto. A coluna QIAmp foi descartada. O filtrado foi transferido para um *ependorf* de 0,5 mL e o DNA genômico foi acondicionado em freezer -20 °C.

Para confirmar o sucesso da extração do DNA genômico foi realizada uma eletroforese em gel de agarose. Dez µL de cada amostra de DNA genômico foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1%, em tampão TBE 1X, a 60 V, a fim de verificar a presença de banda única no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O DNA genômico foi

corado com *Blue green loading die 1* (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP).

3.3.4 Análise dos Polimorfismos

A análise de cada polimorfismo foi realizada de acordo com os protocolos descritos em artigos utilizando as adaptações da reação em cadeia da polimerase (PCR) tais como ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*) - PCR ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) – PCR.

A técnica de RFLP-PCR utiliza enzimas de restrição, na qual fragmentos de DNA, de um tamanho específico, podem ser produzidos por meio dessas enzimas. O DNA de dupla fita é cortado onde exista uma sequência curta, particular de nucleotídeo chamada de sítio de enzima de restrição (Hartl & Clark, 2010).

A técnica de PCR ARMS (sistema de amplificação de mutação refratária) é uma adaptação da PCR que permite o diagnóstico de qualquer mutação conhecida no DNA genômico. Para a realização desta técnica é necessário o desenho de três *primers*, um específico para o alelo mutante, o outro específico para o alelo selvagem e o terceiro específico da região flanqueadora (conservada) do éxon e que será o *primer* que vai encaminhar a amplificação da fita no sentido direto. O desenho é feito de maneira que o *primer* específico para o alelo mutante termina com a base mutada na extremidade 3' e o *primer* específico para o alelo selvagem termina com a base normal em sua extremidade 3', funcionando como uma sonda alelo específica. A técnica é baseada no princípio de que a enzima Taq DNA polimerase não apresenta atividade 3'-5' exonuclease, de modo que o mau pareamento entre a extremidade 3' do *primer* e o DNA molde (*template*) resulta na impossibilidade de amplificação (Newton et al. 1989).

3.3.4.1 Polimorfismos para TLR4

3.3.4.1.1 Polimorfismo para TLR4 Asp299Gly A/G

Para a análise do polimorfismo para TLR4 Asp299Gly, seguiu-se protocolo descrito por Mathenson e colaboradores (2006). Foi realizado o Tetra *primer* ARMS-PCR. Para esta técnica é necessária a preparação de um mix contendo todos reagentes utilizados. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 3.1.

Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes no preparo do mix: 1 μ L de TLR4 A (10 pmol/ μ L, Invitrogen), 1 μ L TLR4 G (10 pmol/ μ L, Invitrogen), 1 μ L de TLR4 *Forward* (10 pmol/ μ L, Invitrogen), 1 μ L de TLR4 *Reverse* (10 pmol/ μ L, Invitrogen), 4 μ L de dNTP (2 mM, GE *Healthcare*), 2 μ L de MgCl₂ (25 mM, Invitrogen), 2 μ L de Tampão (10X, Invitrogen), 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L, Invitrogen), 5,8 μ L de H₂O MiliQ estéril. O volume final do mix foi de 18 μ L sendo adicionado 2 μ L DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 20 μ L. A PCR foi realizada no Termociclador (TC-3000, Techne). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 95°C (5 minutos), 30 ciclos de 94°C (45 segundos), 58°C (45 segundos) e 72°C (45 segundos), 72°C (7 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 2%, utilizando TBE 1X (Invitrogen), a 60 V, a fim de verificar a presença de banda no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O produto do PCR foi corado com *Blue green loading die 1* (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP). A Figura 3.3 ilustra o resultado visualizado no gel de eletroforese.

Tabela 3.1– Primers utilizados na amplificação de IL-10 (-592C/A, -819 C/T, -1082 G/A), TNFA (-238G/A, -308G/A), NOS2A (-954G/C) e Receptor Tipo Toll 4 (Asp299Gly A/G, Thr399Ile C/T) na análise dos polimorfismos pela PCR.

Gene	Sequência do <i>Primer</i>	Produto do PCR (bp)
IL-10 (-592/-819)		
Antisenso IL-10 (-592/-819)	5'-AGGATGTGTTCCAGGCTCCT	233
Senso IL-10 (-592/-819) C	5'-CCCTTGTACAGGTGATGTAAC	
Senso IL-10 (-592/-819) T	5'-ACCCTTGTACAGGTGATGTAAT	
IL-10 (-1082G/A)		
Antisenso IL-10 (-1082)	5'-CAGTGCCAACTGAGAATTTGG	258
Senso IL-10 (-1082) G	5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG	
Senso IL-10 (-1082) A	5'- ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA	
Controles Internos (IL-10)		
Controle Interno 1	5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA	429
Controle Interno 2	5'-TCACGGATTCTGTTGTGTTTC	429
TNFA (-238G/A)		
Antisenso	5'-CCGGATCATGCTTTTCAGTGC-3'	460
Senso G	5'-AAGACCCCCCTCGGAATCA – 3'	
Senso A	5'-AGACCCCCCTCGGAATCG- 3'	
Controle Interno 1	5'-CCAAAGATTCAGGTTTACTCACG-3'	266
Controle Interno 2	5'-ACTTAACTATCTTGGGCTGTGAC-3'	266
TNFA (-308G/A)		
Forward inner primer G	5'-TGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCAGGA-3'	154
Reverse inner primer A	5'-TAGGACCCTGGAGGCTGAACCCCGTACC-3'	224
Forward outer primer	5'-ACCCAAACACACGCCTCAGGACTCAACA-3'	323
Reverse outer primer	5'-AGTTGGGGACACGCAAGCATGAAGGATA-3'	323
NOS2A (-954G/C)		
Forward primer	5'-CATATGTATGGGAATACTGTATTTTCAG-3'	573
Reverse primer	5'-TCTGAACTAGTCACTTGAGG-3'	573
TLR4 Asp299Gly		
TLR4 Forward	5'-CCTGAACCCTATGAACTTTATCC-3'	385
TLR4 Reverse	5'-GTTA ACTAATTCTAAATGTTGCCATC-3'	385
TLR 4 A	5'-GCATACTTAGACTACTACCTCGAAGA-3'	147
TLR4 G	5'-GTCAAACAATTAATAAGTCAATAAAAC-3'	292
TLR4 Thr399Ile		
TLR4 Forward	5'-GACTACTACCTCGATGATATTATTG-3'	459
TLR4 Reverse	5'-GTCAAGGTAAATGAGGTTTCTGAGTG-3'	459
TLR4 C	5'-TCAGATCTAAATACTTTAGGCTGG-3'	319
TLR4 T	5'-TCAGATCTAAATACTTTAGGCTGA-3'	319

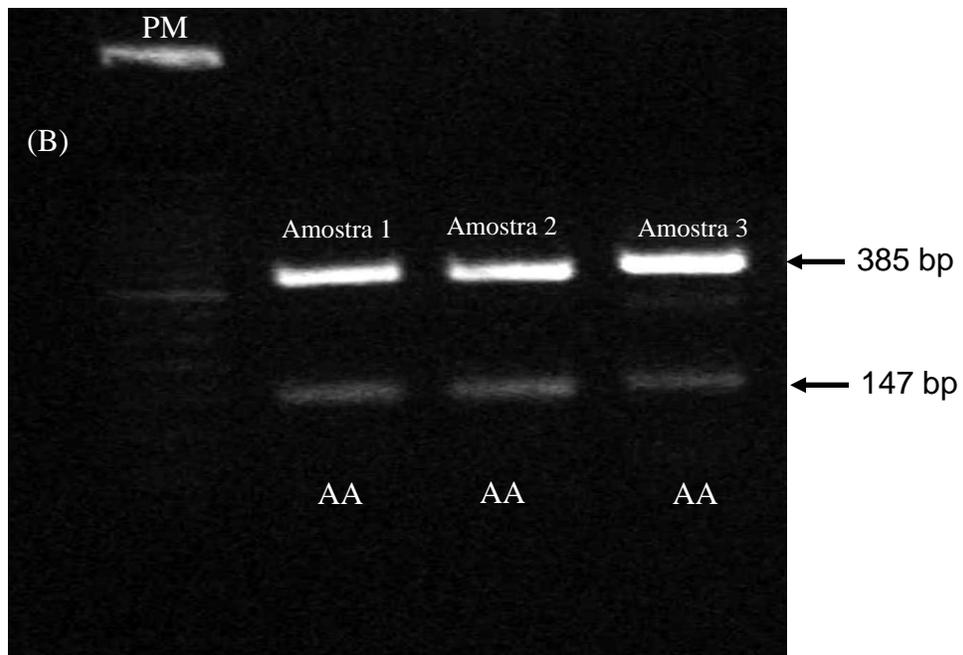
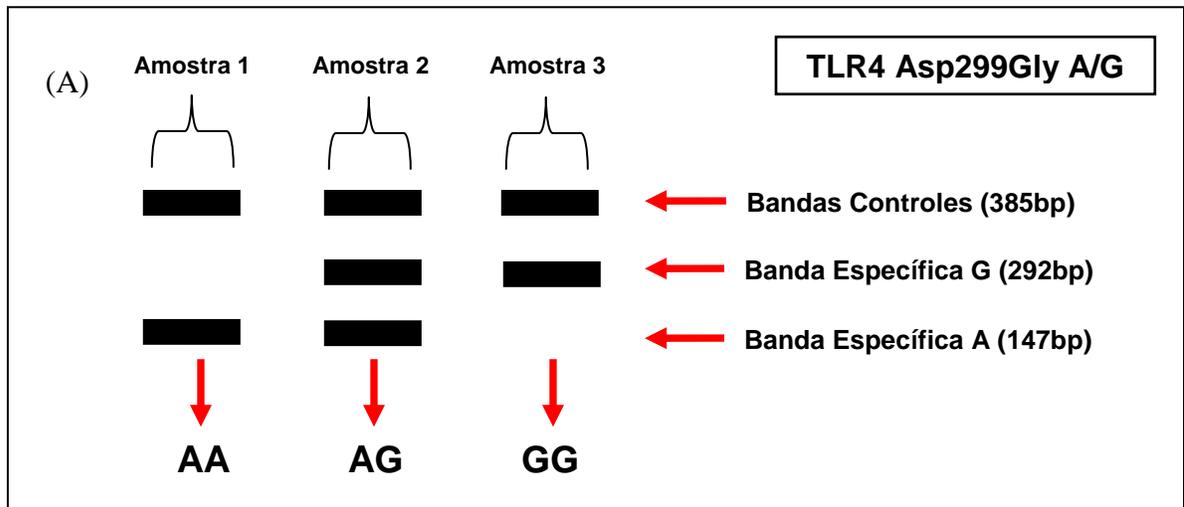


Figura 3.3 – Resultado visualizado no gel de agarose na eletroforese a 2%, sob luz ultravioleta, do polimorfismo para TLR4 Asp299Gly A/G.

A- Esquema ilustrativo do resultado visualizado no gel de agarose quando há a presença dos 3 genótipo – AA, AG e GG. **B-** Foto do gel de agarose com amostra de três indivíduos, todos com o genótipo AA. PM – peso molecular de 50 bp; bp – pares de base.

3.3.4.2 Polimorfismo para TLR4 Thr399Ile C/T

Para a análise do polimorfismo para TLR4 Thr399Ile, seguiu-se protocolo descrito por Mathenson e colaboradores (2006). Foi realizado o ARMS-PCR. Para esta técnica é necessária a preparação de um *mix* contendo todos reagentes utilizados. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 3.1.

Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes no preparo do *mix*: 2 μL de TLR4 *Forward* (10 pmol/ μL , Invitrogen), 1 μL de TLR4 *Reverse* (10 pmol/ μL , Invitrogen), 2 μL de TLR4 C ou T (10 pmol/ μL , Invitrogen), 4 μL de dNTP (2 mM, GE *Healthcare*), 1 μL de MgCl_2 (50 mM, Invitrogen), 2 μL de Tampão (10X, Invitrogen), 0,2 μL de Taq DNA polimerase (5U/ μL , Invitrogen), 6,8 μL de H_2O MiliQ estéril. O volume final do *mix* foi de 18 μL sendo adicionado 2 μL DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 20 μL . A PCR foi realizada no Termociclador (TC-3000, Techne). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 95°C (5 minutos), 30 ciclos de 94°C (45 segundos), 62°C (45 segundos) e 72°C (45 segundos), 72°C (7 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 2%, utilizando TBE 1X (Invitrogen), a 60 V, a fim de verificar a presença de banda no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O produto do PCR foi corado com *Blue green loading die 1* (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP). A Figura 3.4 ilustra o resultado visualizado no gel de eletroforese.

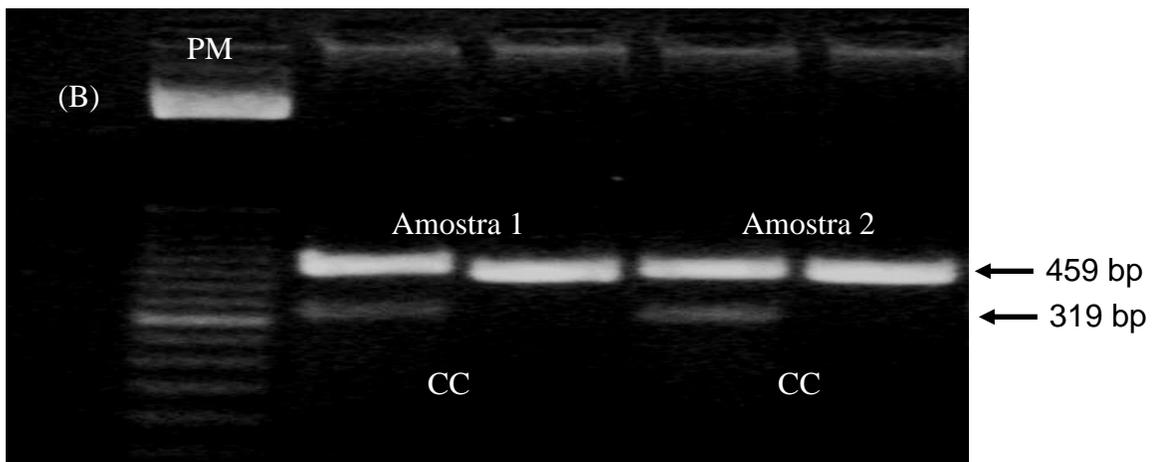
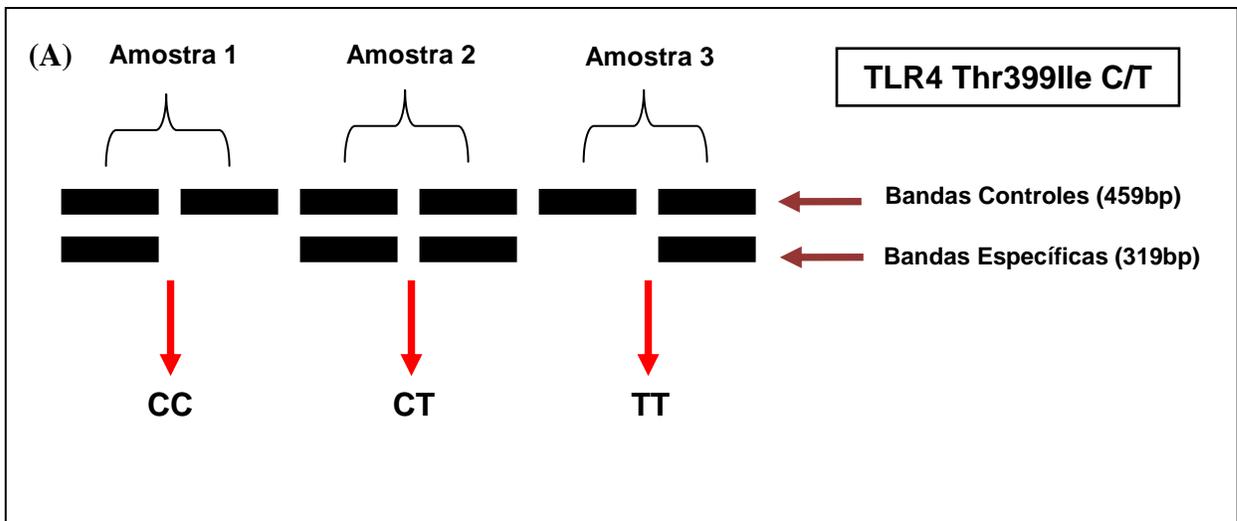


Figura 3.4 – Resultado visualizado no gel de agarose na eletroforese a 2%, sob luz ultravioleta, do polimorfismo para TLR4 Thr399Ile C/T.

A- Esquema ilustrativo do resultado visualizado no gel de agarose quando há a presença dos 3 genótipos – CC, CT e TT. B- Foto do gel de agarose com amostra de dois indivíduos ambos com o genótipo CC. PM – peso molecular de 50 bp; bp – pares de base.

3.3.5 Polimorfismos para *TNFA*

3.3.5.1 Polimorfismo para *TNFA* –238G/A

Para a análise do polimorfismo para *TNFA* na posição –238G/A, seguiu-se protocolo descrito por McGuire e colaboradores (1999). Foi realizado o ARMS-PCR. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 3.1. Sequências do gene β_2 -microglobulina foram utilizados como controles internos.

Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes no preparo do *mix*: 0,6 μ L de antisenso (100 pmol/ μ L, Invitrogen), 0,6 μ L de senso A ou G (100 pmol/ μ L, Invitrogen), 0,5 μ L de controle interno 1 (10 pmol/ μ L, Invitrogen), 0,5 μ L de controle interno 2 (10 pmol/ μ L, Invitrogen), 2,5 μ L de dNTP (1 mM, GE Healthcare), 2,5 μ L de $MgCl_2$ (25 mM, Invitrogen), 8,4 μ L de Tampão (10X, Invitrogen), 0,1 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L, Invitrogen), 7,3 μ L de H_2O MiliQ estéril. O volume final do *mix* foi de 23 μ L sendo adicionado 2 μ L DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 25 μ L. A PCR foi realizada no Termociclador (TC-3000, Techne). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 95°C (10 minutos), 5 ciclos de 95°C (1 minuto), 67°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto) seguidos por 25 ciclos de 95°C (1 minuto), 56°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto), 72°C (10 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 2%, utilizando TBE 1X (Invitrogen), a 60 V, a fim de verificar a presença de banda única no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O produto do PCR foi corado com *Blue green loading die 1* (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP). A Figura 3.5 ilustra o resultado visualizado no gel de eletroforese.

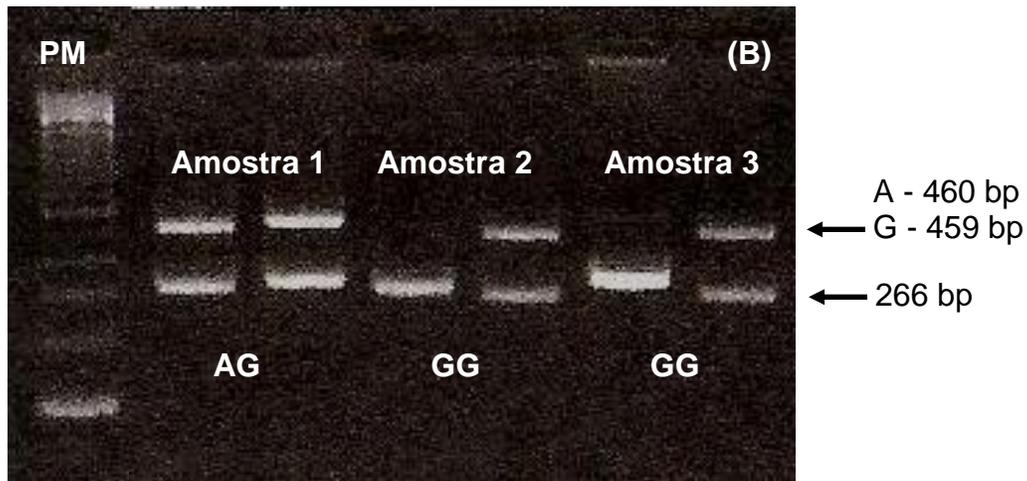
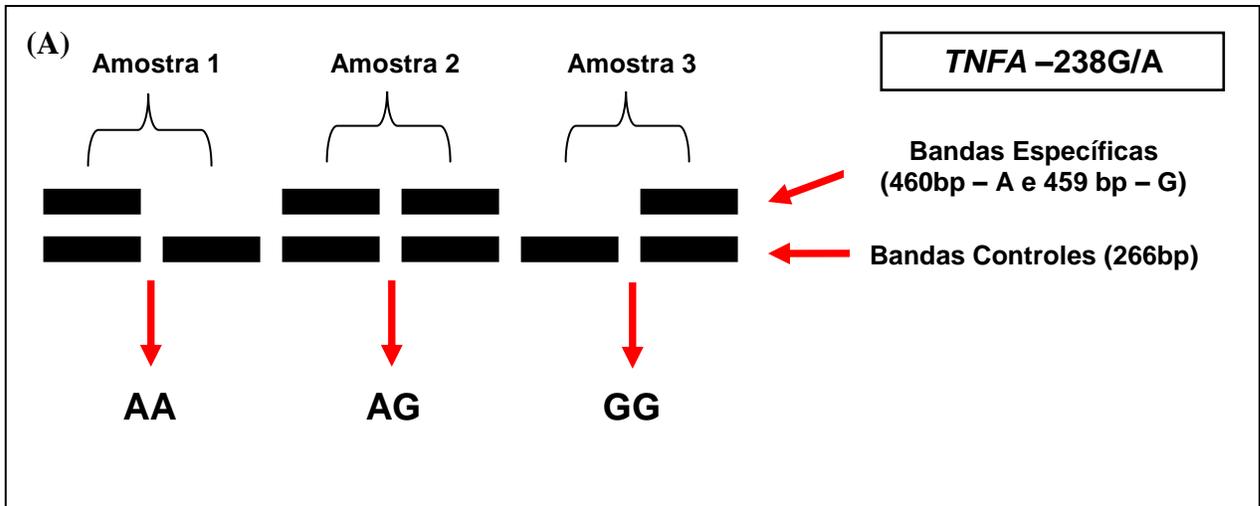


Figura 3.5 – Esquema do resultado visualizado no gel de eletroforese a 2%, sob luz ultravioleta, do polimorfismo para *TNFA* na posição -238G/A.

A- Esquema ilustrativo do resultado visualizado no gel de agarose quando há a presença dos 3 genótipos – AA, AG e GG. B- Foto do gel de agarose com amostra de três indivíduos com os genótipos AG e GG. PM – peso molecular de 100 bp; bp – pares de base.

3.3.5.2 Polimorfismo para TNFA –308G/A

Para a análise do polimorfismo para TNFA na posição –308G/A, seguiu-se protocolo descrito por Mathenson e colaboradores (2006). Foi realizado o Tetra primer ARMS-PCR. As sequências dos primers utilizados encontram-se na Tabela 3.1.

Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes no preparo do *mix*: 1 µL de *Forward Inner primer G* (10 pmol/µL, Invitrogen), 1 µL *Reverse Inner primer A* (10 pmol/µL, Invitrogen), 1 µL de *Forward outer primer 1* (10 pmol/µL, Invitrogen), 1 µL de *Reverse outer primer 2* (10 pmol/µL, Invitrogen), 5 µL de dNTP (1 mM, GE Healthcare), 2 µL de MgCl₂ (25 mM, Invitrogen), 2 µL de Tampão (10X, Invitrogen), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL, Invitrogen), 4,8 µL de H₂O MiliQ estéril. O volume final do *mix* foi de 18 µL sendo adicionado 2 µL DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 20 µL. A PCR foi realizada no Termociclador (TC-3000, Techne). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 95°C (10 minutos), 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 70°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto), 72°C (10 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 2%, utilizando TBE 1X (Invitrogen), a 60 V, a fim de verificar a presença de banda no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O produto do PCR foi corado com *Blue green loading die 1* (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP). A Figura 3.6 ilustra o resultado visualizado no gel de eletroforese.

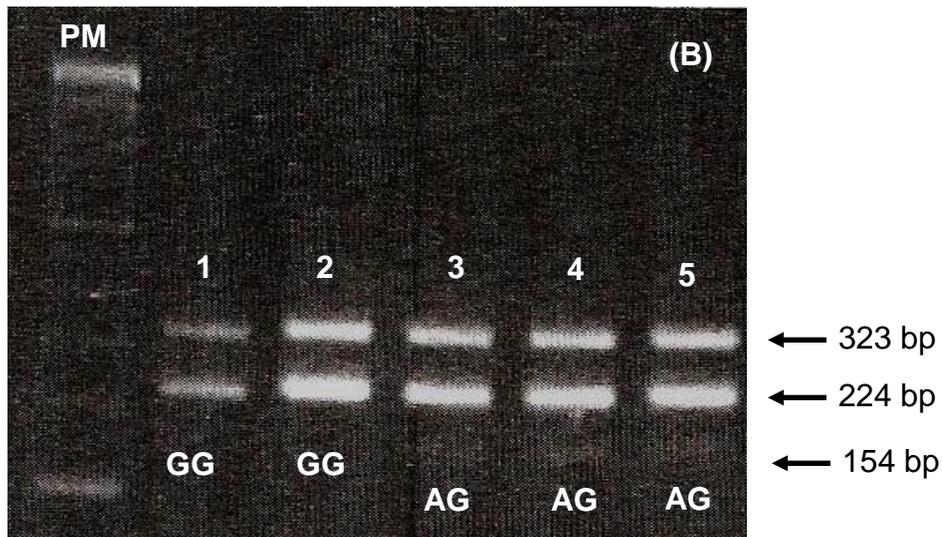
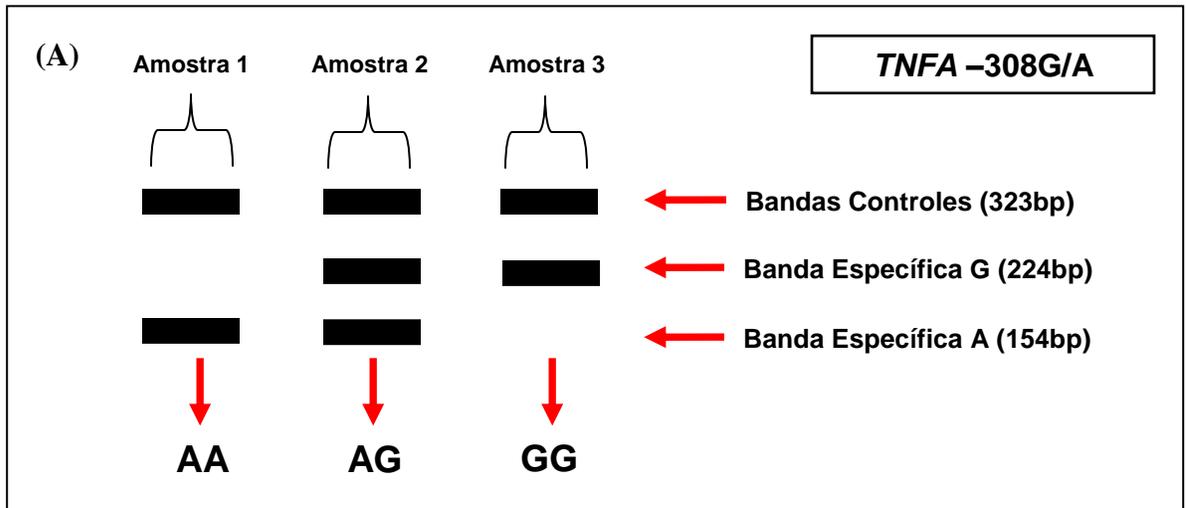


Figura 3.6 – Esquema do resultado visualizado no gel de eletroforese a 2%, sob luz ultravioleta, do polimorfismo para *TNFA* na posição -308G/A.

A- Esquema ilustrativo do resultado visualizado no gel de agarose quando há a presença dos 3 genótipos – AA, AG e GG. **B-** Foto do gel de agarose com amostra de cinco indivíduos (1,2,3,4,5) com os genótipos AG e GG. Observar banda fraca correspondendo a 154bp PM – peso molecular de 100 bp; bp – pares de base.

3.3.6 Polimorfismo para *NOS2A* –954G/C

Para a análise do polimorfismo para *NOS2A* na posição –954G/C, seguiu-se protocolo descrito por Kun e colaboradores (2001). Foi realizado o RFLP-PCR. Para esta técnica é necessária a preparação de um mix contendo todos reagentes utilizados. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 3.1.

Para o PCR de amostra, foram utilizados os seguintes reagentes no preparo do *mix*: 0,2 µL do *Forward primer* (100 pmol/µL, Invitrogen), 0,2 µL do *Reverse primer* (100 pmol/µL, Invitrogen), 4 µL de dNTP (2 mM, GE *Healthcare*), 3,2 µL de MgCl₂ (25 mM, Invitrogen), 5 µL de Tampão (10X, Invitrogen), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL, Invitrogen), 5,1 µL de H₂O MiliQ estéril. O volume final do *mix* foi de 18 µL sendo adicionado 2 µL DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 20 µL. A PCR foi realizada no Termociclador (TC-3000, Techne). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 92°C (3 minutos), 40 ciclos de 92°C (30 segundos), 60°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto), 72°C (7 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 1%, utilizando TBE 1X (Invitrogen), a 60 V, a fim de verificar a presença de banda única no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O produto do PCR foi corado com *Blue green loading die 1* (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP).

Após a verificação da amplificação do PCR, foi realizada a digestão enzimática com Bsal (New England BioLabs), seguindo o seguinte protocolo na preparação do Mix: 3,5µL do tampão 10X (NE *Buffer 3*), 0,5µL da enzima Bsal e 6µL de H₂O MiliQ estéril. O volume final do Mix foi de 10µL. Ao Mix foi adicionado 10µL do produto de PCR. A digestão foi realizada no Termociclador (TC-3000, Techne). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 50°C (60 minutos), 65°C (20 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 3%, utilizando TBE 1X (Invitrogen), a 60 V, a fim de

verificar a presença de banda no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O produto da digestão foi corado com *Blue green loading die 1* (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP). A Figura 3.7 ilustra o resultado da digestão visualizada no gel de eletroforese.

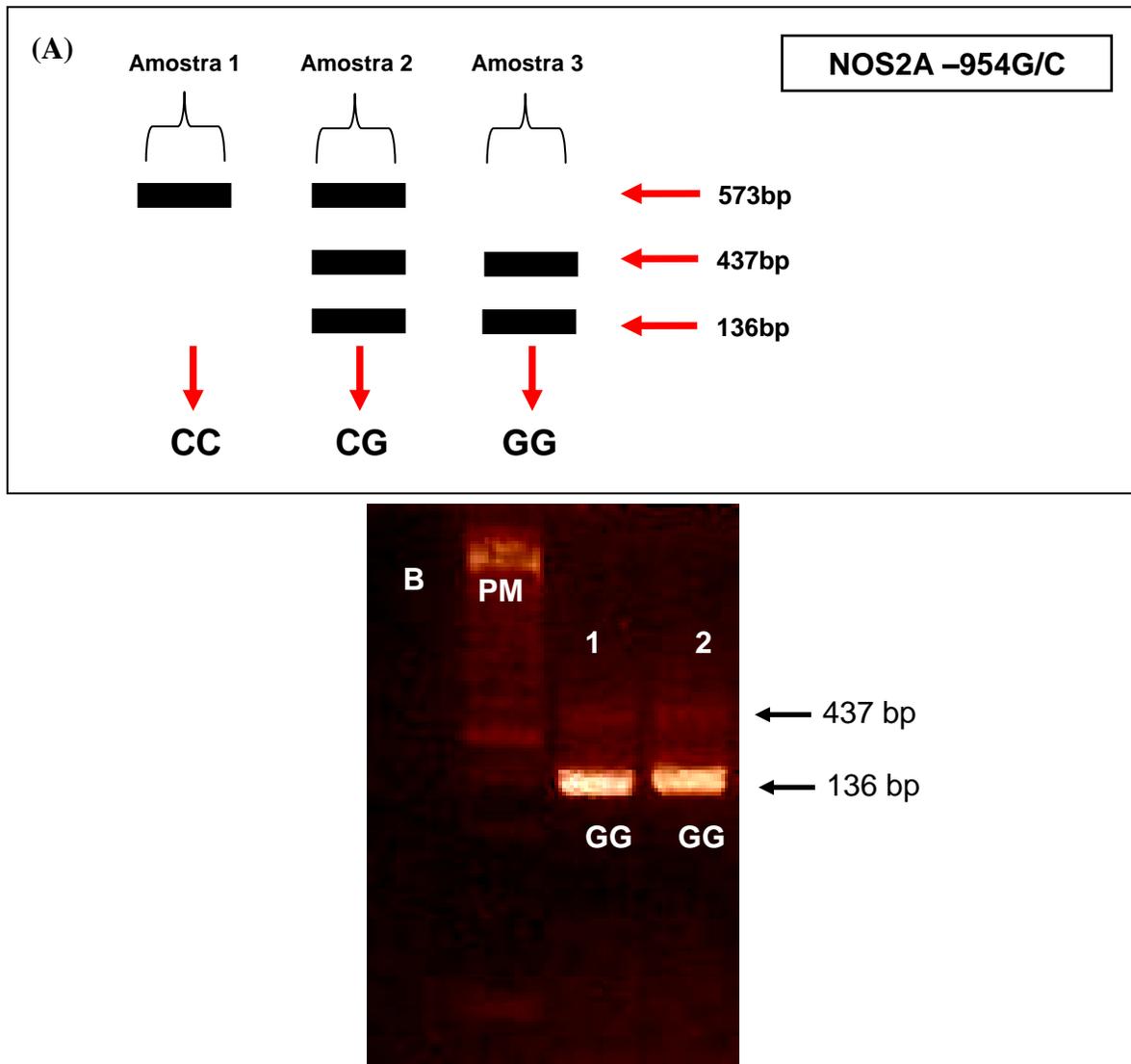


Figura 3.7 – Esquema do resultado visualizado no gel de eletroforese a 3%, sob luz ultravioleta, do polimorfismo para NOS2A -954G/C.

A- Esquema ilustrativo do resultado visualizado no gel de agarose quando há a presença dos 3 genótipos – CC, CG e GG. **B-** Foto do gel de agarose com amostra de dois indivíduos (1,2) ambos com os genótipos GG. Observar banda fraca correspondendo a 437 bp. PM – peso molecular de 100 bp; bp – pares de base.

3.3.7 Polimorfismos para IL-10

3.3.7.1 Polimorfismo para IL-10 –592C/A e –819C/T

Para a análise do polimorfismo para IL-10 nas posições –592C/A e –819C/T seguiu-se protocolo descrito por Perrey e colaboradores (1999). Foi realizada a metodologia de ARMS-PCR. As sequências dos primers utilizados encontram-se na Tabela 3.1. Sequências do gene β_2 -microglobulina foram utilizados como controles internos. A genotipagem dos dois polimorfismos foi realizada de uma única vez, pois o polimorfismo para IL-10 –592C/A está em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo para IL-10 –819C/T. O alelo C da posição –592C/A está presente na mesma posição do alelo C da posição –819C/T, enquanto o alelo A da posição –592C/A está presente na mesma posição do alelo T da posição –819C/T.

Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes no preparo do *mix*: 0,5 μ L de Antisenso IL-10 (100 pmol/ μ L, Invitrogen), 0,5 μ L de Senso IL-10 C ou T, 1 μ L de controle interno 1 (10 pmol/ μ L, Invitrogen), 1 μ L de controle interno 2 (10 pmol/ μ L, Invitrogen), 1 μ L de dNTP (2 mM, GE *Healthcare*), 0,6 μ L de MgCl₂ (25 mM, Invitrogen), 1 μ L de Tampão (10X, Invitrogen), 0,1 μ L de Taq DNA polimerase (5 U/ μ L, Invitrogen), 3,3 μ L de H₂O MiliQ estéril. O volume final do *mix* foi de 9 μ L sendo adicionado 1 μ L DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 10 μ L. A PCR foi realizada no Termociclador (TC-3000, Techne). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 95°C (10 minutos), 10 ciclos de 95°C (15 segundos), 65°C (50 segundos) e 72°C (40 segundos) seguidos por 20 ciclos de 95°C (20 segundos), 59°C (50 segundos) e 72°C (50 segundos), 72°C (7 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 2%, utilizando TBE 1X (Invitrogen), a 60 V, a fim de verificar a presença de banda no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O produto do PCR foi corado com *Blue green loading die 1* (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP). A Figura 3.8 ilustra o resultado visualizado no gel de eletroforese.

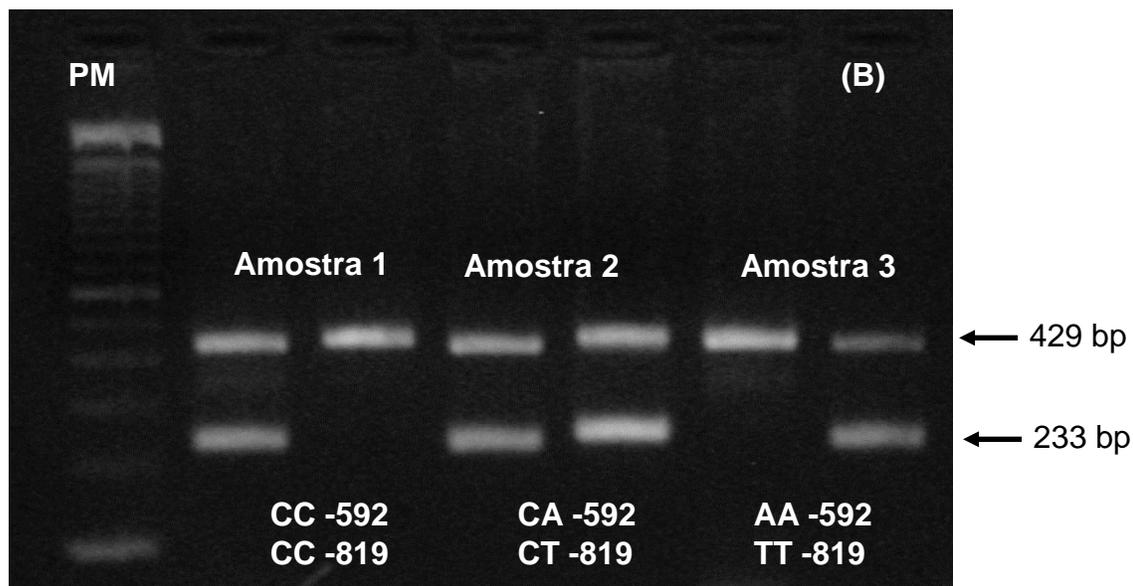
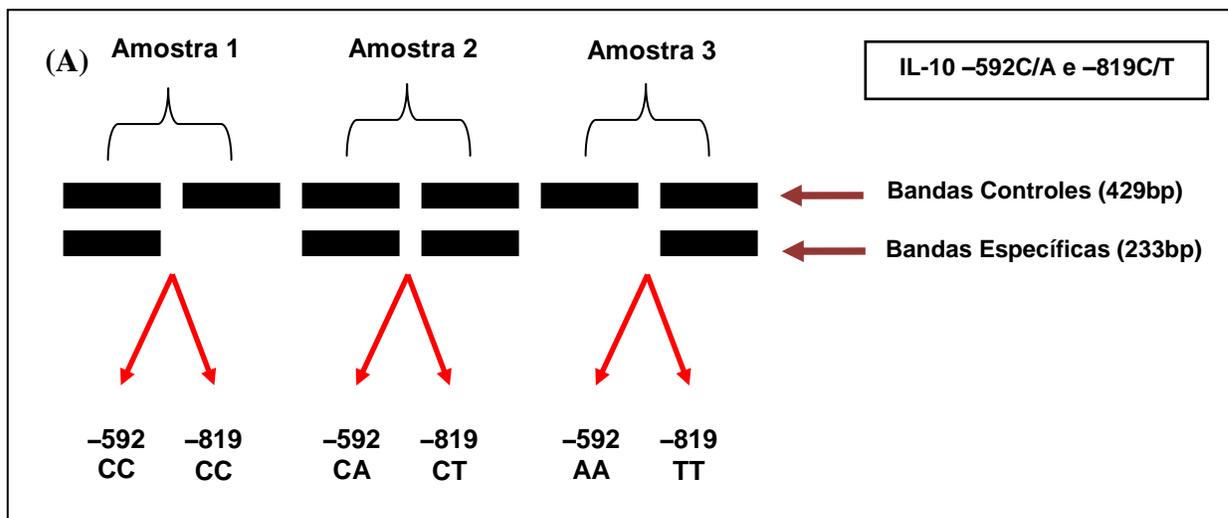


Figura 3.8 – Esquema do resultado visualizado no gel de eletroforese a 2%, sob luz ultravioleta, dos polimorfismos para IL-10 na posição -592C/A e -819C/T.

A- Esquema ilustrativo do resultado visualizado no gel de agarose quando há a presença dos 3 genótipos – CC, CA e AA (posição -592) e CC, CT, TT (posição -819). **B-** Foto do gel de agarose com amostra de três indivíduos todos os genótipos possíveis para as duas posições. PM – peso molecular de 100 bp; bp – pares de base.

3.3.7.2 Polimorfismo para IL-10 –1082G/A

Para a análise do polimorfismo para IL-10 na posição –1082G/A, seguiu-se protocolo descrito por Perrey e colaboradores (1999). Foi realizado o ARMS-PCR. Para esta técnica é necessária a preparação de um mix contendo todos reagentes utilizados. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 3.1. Sequências do gene β_2 -microglobulina foram utilizados como controles internos.

Para cada amostra foram utilizados os seguintes reagentes no preparo do *mix*: 0,5 μ L de Antisense IL-10 (100 pmol/ μ L, Invitrogen), 0,5 μ L de Senso IL-10 A ou G (100 pmol/ μ L, Invitrogen), 1 μ L de controle interno 1 (10 pmol/ μ L, Invitrogen), 1 μ L de controle interno 2 (10 pmol/ μ L, Invitrogen), 1 μ L de dNTP (2 mM, GE Healthcare), 0,6 μ L de $MgCl_2$ (25 mM, Invitrogen), 1 μ L de Tampão (10X, Invitrogen), 0,1 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L, Invitrogen), 2,3 μ L de H_2O MiliQ estéril. O volume final do *mix* foi de 8 μ L sendo adicionado 2 μ L DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 10 μ L. A PCR foi realizada no Termociclador (TC-3000, Techne). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 95°C (10 minutos), 10 ciclos de 95°C (15 segundos), 65°C (50 segundos) e 72°C (40 segundos) seguidos por 20 ciclos de 95°C (20 segundos), 59°C (50 segundos) e 72°C (50 segundos), 72°C (7 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 2%, utilizando TBE 1X (Invitrogen), a 60 V, a fim de verificar a presença de banda única no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O produto do PCR foi corado com *Blue green loading die* 1 (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP). A Figura 3.9 ilustra o resultado visualizado no gel de eletroforese.

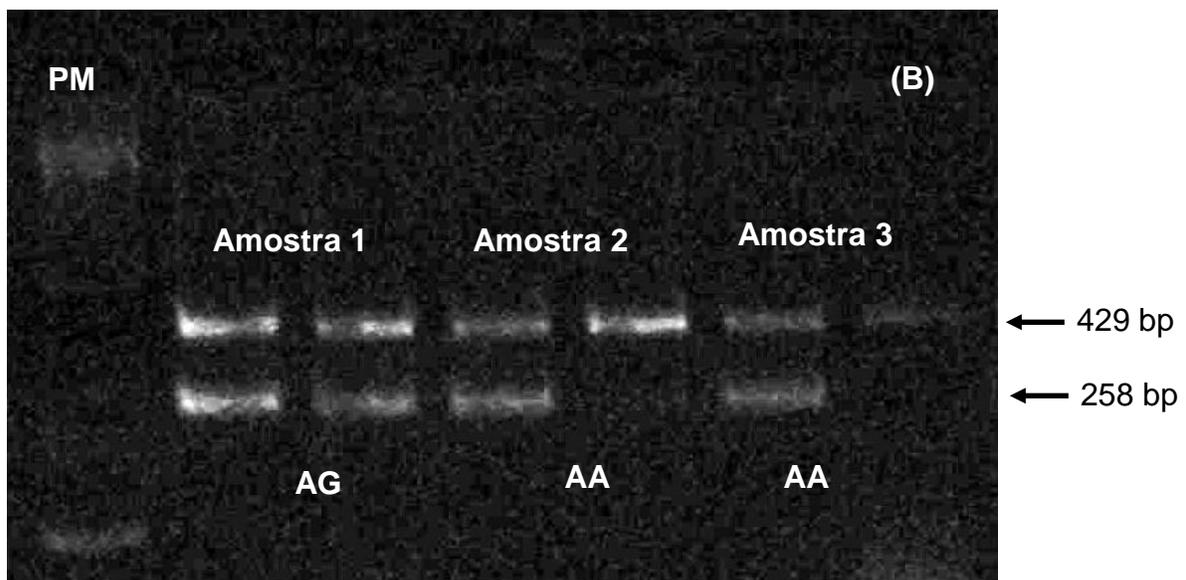
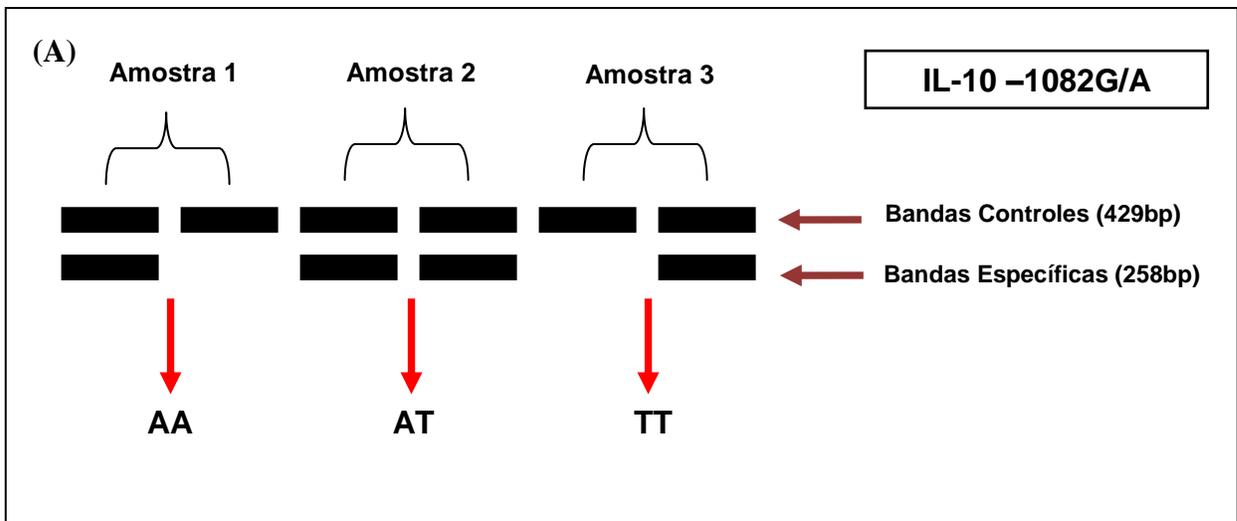


Figura 3.9 – Esquema do resultado visualizado no gel de eletroforese a 2%, sob luz ultravioleta, do polimorfismo para IL-10 na posição -1082G/A.

A- Esquema ilustrativo do resultado visualizado no gel de agarose quando há a presença dos 3 genótipos – AA, AG E GG. B- Foto do gel de agarose com amostra de três indivíduos com os genótipos AA e AG. PM – peso molecular de 100 bp; bp – pares de base.

3.3.8 Quantificação de Nitrito (NO_2^-) e Nitrato (NO_3^-) séricos

A dosagem de nitrito (NO_2^-) e nitrito + nitrato (NO_3^-) ou óxido nítrico total, denominado NO_x , foi realizada em duas etapas: a primeira determinou a quantidade de nitrito (NO_2^-) e a segunda permitiu, a partir da redução do nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) pelo uso de cloreto de Vanádio III (VCl_3). Assim, a primeira etapa quantifica os níveis de nitrito (NO_2^-) e a segunda os níveis totais de óxido nítrico (NO_x).

Na primeira etapa, a dosagem sérica de nitrito (NO_2^-) foi realizada por meio de um kit comercial, o *Griess Reagent System* (Promega). Este kit baseia-se numa reação química, o qual usa a sulfanilamida e a N-1-naftiletlenodiamina dihidroclorato (NED) sob condições ácidas (ácido fosfórico). O protocolo foi fornecido pelo fabricante. Para assegurar uma quantidade fidedigna de nitrito foi preparada uma curva padrão de referência para cada placa de 96 poços de fundo chato utilizada com o mesmo tampão PBS utilizado para as amostras de soro.

Para a curva padrão de referência, foram designadas 3 colunas (24 poços – linhas A até G) da placa de 96 poços. Preparou-se 1mL de solução de nitrito (NO_2^-) a 100 μM , a partir da solução padrão de 0,1M (fornecido pelo kit) diluída em PBS, na proporção de 1:1.000. Adicionou-se 100 μL da solução de nitrito NO_2^- nos 3 poços da linha A. Colocou-se 50 μL de PBS dentro dos poços da linha B até H. Realizou-se 6 diluições seriadas 1:2 (50 μL /poço) em triplicata para gerar a curva padrão de referência descartando os 50 μL restantes da linha G. Para gerar o branco, não foi adicionada a solução de nitrito (NO_2^-) nos poços da linha H. O limite de detecção do kit para nitrito é de 2.5 μM .

Apos a preparação da curva padrão de referência, adicionou-se aos poços, 50 μL de cada amostra de soro em duplicata. Em seguida, foi adicionado 50 μL da sulfamilamida em todas as amostras e poços contendo as diluições seriadas da curva padrão de referência. Incubou-se a placa de 96 poços por 5 a 10 minutos protegido da luz. Adicionou-se 50 μL de NED em todos os poços da placa. Incubou-se a placa de 96 poços por 5 a 10 minutos protegido da luz. Dosou-se a

absorbância dentro de 30 minutos no leitor da placa com filtro de 520nm (Molecular Devices).

A segunda etapa foi realizada seguindo protocolo proposto por Miranda e colaboradores (2001). Após a leitura da placa para dosar a absorbância com filtro de 520nm, preparou-se uma solução de Cloreto de Vanádio III (VCl_3) contendo 0,4g de Vanádio (III) e 50mL de ácido clorídrico (HCL) a 0,1N. Adicionou-se 150 μ L da solução de cloreto de vanádio III (VCl_3) nos poços contendo as amostras em duplicatas. Incubou-se a placa por 90 minutos a 37°C. Dosou-se a absorbância no leitor da placa com filtro de 540nm. Cada placa de 96 poços permitiu a quantificação de 36 amostras. Todo o processo foi repetido para cada nova placa. Amostras com diferenças maiores que 20% entre as médias dos valores de nitrito e NOx foram analisadas novamente. Os resultados foram analisados com o programa da leitora de ELISA SoftMax Pro.

3.4 Análise Estatística:

As frequências alélicas foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando o teste do qui-quadrado. As frequências genóticas e alélicas foram comparadas entre indivíduos dos grupos ocular e controle utilizando o Teste de Pearson ou Teste exato de Fisher para valores menores que 5. O *odds Ratio* (OR) foi calculado como medida para associação entre os genótipos e os alelos. Foi utilizado o intervalo de confiança de 95%. As distribuições genóticas e frequências alélicas e haplotípicas foram calculadas utilizando o programa SNPStats (disponível em: <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) ou o Epilnfo para Windows versão 3.5.3. Foi considerada diferença estatística significativa quando p -valor < 0.05.

Na comparação das médias dos níveis de nitrito e NOx entre os grupos ocular e controle foi utilizado o Teste de Mann Whitney. Para a comparação do percentil 50 entre os grupos ocular e controle foi utilizado o Teste t não pareado. O programa utilizado para os gráficos e análise estatística foi o *GraphPad Prism* versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS SORORREAGENTES PARA *Toxoplasma gondii*.

A partir de um inquérito epidemiológico para o *T. gondii* realizado em 2004 no bairro de Santa Rita de Cassia, Barra Mansa, Rio de Janeiro foi evidenciado que das 1.071 pessoas testadas, 706 (65,9%) eram soro reagentes para *T. gondii*, nenhum participante foi IgM positivo para o *T. gondii*. Após exame de fundo de olho, 41 (5,8%) indivíduos apresentaram lesões compatíveis com toxoplasmose ocular presumida (Aleixo et al. 2009).

No presente estudo, no grupo de casos, foram incluídos 34 (82,9%) dos 41 indivíduos com toxoplasmose ocular. Os motivos da exclusão de 7 participantes foram: (1) quatro indivíduos foram excluídos por critérios de consanguinidade. Nas quatro famílias que ocorreram casos de consanguinidade (cada uma com dois indivíduos com toxoplasmose ocular), foi sorteado um membro de cada uma delas, sendo o outro excluído do estudo, (2) dois indivíduos não foram localizados por terem se mudado da Comunidade e (3) um indivíduo não aceitou participar do estudo.

Os participantes foram separados em dois grupos: (1) O grupo de casos foi denominado Grupo Ocular e (2) Grupo Controle.

No Grupo Ocular foram incluídos 34 indivíduos (indivíduos IgG positivos para *T. gondii* com lesão ocular toxoplásmica presumida), sendo, 10 (29,4%) homens e 24 (70,6%) mulheres. As idades variaram de 16 a 88 anos ($44 \pm 20,9$), como pode ser observado na Tabela 4.1. Dentre as mulheres 7 (29,2%) são maiores de 60 anos e 6 (25%) têm entre 31 a 40 anos. Dentre os homens 40% têm de 21 a 30 anos (Tabela 4.2). Podemos observar que este grupo apresenta uma população basicamente de adultos, tanto do sexo feminino como os do sexo masculino e que o total de mulheres representa aproximadamente dois terços do total de homens.

Tabela 4.1 – Dados dos indivíduos do grupo ocular e do grupo controle da população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

Variáveis	Grupo Ocular	Grupo Controle
Número amostral (n=)	34	134
Sexo (M / F)	10 / 24	40 / 94
Idade (anos) ± SD	44 ± 20.9	43 ± 18.9

M= masculino, F= feminino, SD = desvio padrão

Tabela 4.2 - Distribuição por sexo e idade, nos indivíduos com toxoplasmose ocular presumida (grupo ocular), na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

Faixa Etária (anos)	Sexo Feminino	Sexo Masculino
11 a 20	2 (8,3%)	1 (10%)
21 a 30	4 (16,7%)	4 (40%)
31 a 40	6 (25%)	1 (10%)
41 a 50	4 (16,7%)	1 (10%)
51 a 60	1 (4,1%)	1 (10%)
Maior que 60	7 (29,2%)	2 (20%)
Total	24 (100%)	10 (100%)

O Grupo Controle foi composto de 134 indivíduos (indivíduos IgG positivos para *T. gondii* sem lesão ocular toxoplásmica presumida), sendo este número quatro vezes maior que o total dos participantes do grupo de casos, pareados por faixa etária e sexo com o grupo ocular (Tabela 4.3). Desta forma, 40 homens e 94 mulheres foram incluídos com idade variando de 11 a 94 anos ($43 \pm 18,89$), como demonstrado na Tabela 4.1.

Tabela 4.3 - Distribuição por sexo e idade dos indivíduos soro reagentes para *T. gondii* do grupo controle, pareados por sexo e idade, da população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

Faixa Etária	Sexo Feminino	Sexo Masculino
11 a 20	8 (8,5%)	4 (10%)
21 a 30	16 (17%)	16 (40%)
31 a 40	24 (25,5%)	4 (10%)
41 a 50	16 (17%)	4 (10%)
51 a 60	4 (4,3%)	4 (10%)
Maior que 60	26 (27,7%)	8 (20%)
Total	94 (100%)	40 (100%)

4.2 ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA TLR4 (Asp299Gly A/G e Thr399Ile C/T)

Amostras dos 168 indivíduos foram submetidas ao Tetra *primer* PCR para TLR4 Asp299Gly A/G. Dessas, 158 (94%) apresentaram o genótipo AA e 10 (6%) o genótipo AG. Não foram observados indivíduos carreadores do genótipo GG. Os grupos ocular e controle estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p -valor=0,85 e p -valor=0,72, respectivamente).

Dos indivíduos do grupo ocular, 32 (94%) apresentaram o genótipo AA e 2 (6%) o genótipo AG. No grupo controle, 126 (94%) apresentaram o genótipo AA e 8 (6%) o genótipo AG. Não foram observados indivíduos carreadores do genótipo GG em ambos os grupos. Não foi observada diferença estatística significativa (p -valor=0,98), como observado na Tabela 4.4. Não foi observada diferença estatística significativa quando ajustado para sexo e faixa etária.

A frequência da distribuição do alelo G no grupo ocular foi de 66/68 (97%) e do alelo C em 2/68 (3%) enquanto no grupo controle foi de 255/268 (95%) e 13/268 (5%) respectivamente, não sendo estes resultados estatisticamente significativos (p -valor=0,38), como observado na Tabela 4.4.

Amostras dos 168 indivíduos foram submetidas ao ARMS PCR para TLR4 Thr399Ile C/T. Dessas, 164 (97,6%) apresentaram o genótipo CC e 4 (2,4%) o genótipo CT. Não foram observados indivíduos carreadores do genótipo TT. O grupo controle estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p -valor =0,86). Não foi

possível avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg do grupo ocular uma vez que não foram observados indivíduos carreadores dos genótipos CT e TT.

Dos indivíduos do grupo ocular, 34 (100%) apresentaram o genótipo CC. Não foram observados indivíduos carreadores dos genótipos CT e TT no grupo ocular. No grupo controle, 130 (97%) apresentaram o genótipo CC e 4 (3%) o genótipo CT. Não foram observados indivíduos carreadores do genótipo TT no grupo controle. Não foi observada diferença estatística significativa (p -valor=0,18), como observado na Tabela 4.4. Não foi observada diferença estatística significativa quando ajustado para sexo e faixa etária.

A frequência da distribuição do alelo C no grupo ocular foi de 68/68 (100%). Não houve indivíduos carreadores do alelo T no grupo ocular. No grupo controle, a distribuição do alelo C foi de 264/268 (98,5%) e do alelo T em 4/268 (1,5). Não foi encontrada diferença estatística significativa (p -valor=0,40), como observado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Distribuição dos genótipos e dos alelos nos polimorfismos para Asp299Gly A/G e Thr399Ile C/T de *TLR4* entre os grupos ocular e controle na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

	Grupo Ocular n=34 (%)	Grupo Controle n=134 (%)	Odds Ratio	p- valor
<i>TLR4</i> Asp299Gly				
Genótipos				
AA	32 (94,0)	126 (94,0)	1,00	0,98
AG	2 (6,0)	8 (6,0)	1,02 (0,21-5,02)	
GG	0	0	NA	
Alelos				
A	66 (97,0)	260 (97,0)	1,00	0,67
G	2 (3,0)	8 (3,0)	1,02 (0,19-7,10)	
<i>TLR4</i> Thr399Ile				
Genótipos				
CC	34 (100,0)	130 (97,0)	1,00	0,18
CT	0 (0,0)	4 (3,0)	NA	
TT	0	0	NA	
Alelos				
C	68 (100,0)	264 (98,5)	1,00	0,40
T	0 (0,0)	4 (1,5)	NA	

NA – não avaliado

Em relação às distribuições haplotípicas dos polimorfismos para Asp299Gly A/G e Thr399Ile C/T de *TLR4* entre os grupos ocular e controle não observamos diferenças estatísticas, como observado na Tabela 4.5. O haplótipo 299A/399C estava presente na maioria dos casos e controles (f=0,97 e 0,96 respectivamente).

Tabela 4.5- Distribuições haplotípicas dos polimorfismos para Asp299Gly A/G e Thr399Ile C/T de *TLR4* entre os grupos ocular e controle na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

	Grupo Ocular (f)	Grupo Control (f)	Total (f)	Odds Ratio	p-valor
Haplótipo*					
299A 399C	0,97	0,96	0,96	1,00	--
299G 399C	0,03	0,03	0,03	1,05 (0,21-5,18)	0,95
299A 399T	0	0,01	0,01	224140440,82 (224140440,75- 224140440,90)	<0,0001

*p-valor= 0,4

4.3 ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA TNFA (-238G/A e -308 G/A)

4.3.1 Distribuições Genóticas e Frequências Alélicas e Haplotípicas do Polimorfismo para TNFA -238G/A e -308G/A

Amostras dos 168 indivíduos foram submetidas ao ARMS-PCR para TNFA -238G/A. Dessas, 135 (80,3%) apresentaram o genótipo GG, 29 (17,3%) o genótipo AG e 4 (2,4%) o genótipo AA. O grupo controle estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p -valor=0,69), porém o mesmo não foi observado no grupo ocular (p -valor=0,01).

Dos indivíduos do grupo ocular, 28 (82,3%) apresentaram o genótipo GG, 4 (11,8%) o genótipo AG e 2 (5,9%) o AA. No grupo controle, 107 (79,8%) apresentaram o genótipo GG, 25 (18,7%) o genótipo AG e 2 (1,5%) o genótipo AA. Não foi observada diferença estatística significativa quando o modelo co-dominante (p -valor=0,27), dominante (p -valor=0,74) e recessivo (p -valor =0,18) foram utilizados (Tabela 4.6). Não foi observada diferença estatística significativa quando ajustado para sexo e faixa etária.

A frequência da distribuição do alelo G no grupo ocular foi de 60/68 (88,2%) e do alelo A em 8/68 (11,8%) enquanto no grupo foi de 239/268 (89,2%) e 29/268 (10,8%) respectivamente, não sendo estes resultados estatisticamente significativos (p -valor =0,82), como observado na Tabela 4.6.

Amostras dos 168 indivíduos foram submetidas ao Tetra *primer* ARMS-PCR para TNFA -308G/A. Dessas, 143 (85,1%) apresentaram o genótipo GG e 25 (14,9%) o genótipo AG. Não foram observados indivíduos carreadores do genótipo

AA. Os grupos ocular e controle estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p -valor=0,57 e p -valor=0,37, respectivamente).

Dos indivíduos do grupo ocular, 28 (82,3%) apresentaram o genótipo GG e 6 (17,6%) o genótipo AG. Não foram observados indivíduos carreadores do genótipo AA. No grupo controle, 115 (85,8%) apresentaram o genótipo GG, 19 (14,2%) o genótipo AG. Não foram observados indivíduos carreadores do genótipo AA em ambos os grupos. Não foi observada diferença estatística significativa (p -valor=0,62), como observado na Tabela 4.6. Não foi observada diferença estatística significativa quando ajustado para sexo e faixa etária.

A frequência da distribuição do alelo G, no grupo ocular, foi de 62/68 (91,2%) e do alelo A em 6 (8,8%) enquanto no grupo controle foi de 249/268 (92,9%) e 19/268 (7,1%) indivíduos respectivamente, não sendo estes resultados estatisticamente significativos ($p=0,62$), como observado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Genótipos e distribuições dos alelos A e G dos polimorfismos para TNFA -238G/A e -308G/A entre os grupos ocular e controle na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

	Grupo Ocular n=34 (%)	Grupo Controle n=134 (%)	Odds Ratio	p- valor
TNFA -238 G/A				
Genótipos				
GG	28 (82,3)	107 (79,8)	1,00	0,27
AG	4 (11,8)	25 (18,7)	1,64 (0,53-5,09)	
AA	2 (5,9)	2 (1,5)	0,26 (0,04-1,94)	
	2 (5,9)	2 (1,5)	1,00	0,18
AA vs AG + GG	32 (94,1)	132 (98,5)	4,13 (0,40-43,05)	
	28 (82,3)	107 (79,8)	1,00	0,74
GG vs AG + AA	6 (17,6)	27 (20,1)	1,18 (0,44-3,13)	
Alelos				
G	60 (88,2)	239 (89,2)	1,00	0,82
A	8 (11,8)	29 (10,8)	0,91 (0,37-2,29)	
TNFA -308 G/A				
Genótipos				
GG	28 (82,3)	115 (85,8)	1,00	0,62
GA	6 (17,6)	19 (14,2)	0,77 (0,28-2,11)	
Alelos				
G	62 (91,2)	249 (92,9)	1,00	0,62
A	6 (8,8)	19 (7,1)	0,79 (0,28-2,31)	

A frequência dos haplótipos para *TNFA* -238G/A e -308G/A entre os grupos ocular e controle não apresentou diferença estatística significativa em nenhum dos 4 haplótipos possíveis (p-valor global=0.43) (Tabela 4.7).

Tabela 4.7- Distribuições haplotípicas dos polimorfismos para *TNFA* -238G/A e -308G/A entre os grupos ocular e controle na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

	Grupo Ocular (<i>n</i>)	Grupo Controle (<i>n</i>)	Total (<i>n</i>)	Odds Ratio	p-valor
Haplótipo*					
-238G-308G	0,81	0,82	0,82	1,00	--
-238A-308G	0,10	0,11	0,106	1,19 (0,48-2,94)	0,7
-238G-308A	0,07	0,07	0,07	0,96 (0,32-2,82)	0,93
-238A-308A	0,02	0	0,004	--	1

*p-valor global= 0,43

4.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA NOS2A (-954G/C)

Amostras dos 168 indivíduos foram submetidas ao RFLP-PCR para NOS2A -954G/C. Dessas, 143 (85,2%) apresentaram o genótipo GG, 25 (14,8%) o genótipo GC. Não foram observados indivíduos carreadores do genótipo CC. Os grupos ocular e controle estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (p -valor = 85 e p -valor=0,55, respectivamente).

Dos indivíduos do grupo ocular, 32 (94,1%) apresentaram o genótipo GG e 2 (5,9%) o genótipo GC. No grupo controle, 121 (90,3%) apresentaram o genótipo GG e 13 (9,7%) o genótipo GC. Não foram observados indivíduos carreadores do genótipo CC em ambos os grupos. Não foi observada diferença estatística significativa (p -valor=0,47), como observado na Tabela 4.8. Não foi observada diferença estatística significativa quando ajustado para sexo e faixa etária.

A frequência da distribuição do alelo G no grupo ocular foi de 66/68 (97,1%) e do alelo C em 2/68 (2,9%) indivíduos enquanto no grupo controle foi de 255/268 (95,2%) e 13/268 (4,8%) respectivamente, não sendo estes resultados estatisticamente significativos (p -valor = 0,38), como observado na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Genótipos e distribuições dos alelos G e C do polimorfismo para NOS2A -954G/C entre os grupos ocular e controle na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

	Grupo Ocular n=34 (%)	Grupo Controle n=134 (%)	Odds Ratio	p- valor
NOS2A -954G/C				
Genótipos				
GG	32 (94,1)	121 (90,3)	1,00	0,47
GC	2 (5,9)	13 (9,7)	1,72 (0,37-8,01)	
Alelos				
G	66 (97,1)	255 (95,2)	1,00	0,38
C	2 (2,9)	13 (4,8)	1,68 (0,35-11,08)	

4.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA IL-10

4.5.1 Distribuições Genóticas e Frequências Alélicas e Haplotípicas dos Polimorfismos para IL-10 –592C/A, –819C/T, –1082G/A

Os genótipos dos SNPs de *IL-10* estavam em equilíbrio de *Hardy Weinberg* (E-HW) para as posições –592C/A para casos (p-valor=0,99) e controles (p-valor=0,73) e –819C/T para casos (p-valor=0,99) e controles (p-valor=0,73) e –1082G/A para casos (p-valor=0,76). Contudo, a posição –1082G/A estava em desequilíbrio para os controles (p-valor=0,045). Desta forma, selecionamos da casuística seis indivíduos controles IgG-positivos que foram genotipados e após a inclusão destes indivíduos o equilíbrio foi observado (p-valor=0,05). Logo, foram analisados, para o polimorfismo de IL-10 nas três posições, 34 indivíduos do grupo ocular e 140 indivíduos do grupo controle.

4.5.1.1 Polimorfismo para IL-10 –592C/A

Amostras dos 174 indivíduos foram submetidas ao ARMS-PCR para IL-10 –592C/A. Dessas, 53 (30,4%) apresentaram o genótipo CC, 84 (48,3%) o genótipo CA e 37 (21,3%) o genótipo AA.

Dos indivíduos do grupo ocular, 8 (23,5%) apresentaram o genótipo CC, 17 (50,0%) o genótipo CA e 9 (26,5%) o AA. No grupo controle, 45 (32,1%) apresentaram o genótipo CC, 67 (47,9%) o genótipo CA e 28 (20,0%) o genótipo AA. Não foi observada diferença estatística significativa (p=0,54) entre casos e

controles quando modelo de co-dominância foi utilizado. Da mesma forma os modelos de dominância e recessivo (AA vs AG+GG ou GG vs AA+AG) não mostraram significância (p -valor=0,32 e p -valor=0,74 respectivamente), como observado na Tabela 4.9. Não foi encontrada diferença estatística significativa quando as amostras foram ajustadas para sexo e faixa etária.

A frequência da distribuição do alelo C no grupo ocular foi 33/68 (48,5%) e do alelo A de 35/68 (51,5%) enquanto no grupo controle ocorreu em 157/280 (56,1%) e 123 (43,9%) respectivamente, não sendo estes resultados estatisticamente significativos (p -valor=0,26), como observado na Tabela 4.9.

4.5.1.2 Polimorfismo para IL-10 –819C/T

Amostras dos 174 indivíduos foram submetidas ao ARMS-PCR para IL-10 – 819C/T. Dessas, 53 (30,4%) apresentaram o genótipo CC, 84 (48,3%) o genótipo CT e 37 (21,3%) o genótipo TT. Dos indivíduos do grupo ocular, 8 (23,5%) apresentaram o genótipo CC, 17 (50,0%) o genótipo CT e 9 (26,5%) o TT. No grupo controle, 45 (32,1%) apresentaram o genótipo CC, 67 (47,9%) o genótipo CT e 28 (20,0%) o genótipo TT. Não foi observada diferença estatística significativa no modelo de co-dominância (p -valor=0,54), dominância (p -valor=0,32) e recessivo (p -valor=0,74), como observado na Tabela 4.9. Não foi encontrada diferença estatística significativa quando ajustado para sexo e faixa etária.

A frequência da distribuição do alelo C no grupo ocular foi de 33/68 (48,5%) e do alelo T foi de 35/68 (51,5%); no grupo controle ocorreu em 157/280 (56,1%) e 123/280 (43,9%) respectivamente, não sendo estes resultados estatisticamente significativos (p -valor=0,26), como observado na Tabela 4.9.

4.5.1.3 Polimorfismo para IL-10 –1082G/A

Amostras dos 174 indivíduos foram submetidas ao ARMS-PCR para IL-10 – 1082G/A. Dessas, 76 (43,7%) apresentaram o genótipo AA, 85 (48,8%) o genótipo AG e 13 (7,5%) o genótipo GG. Dos indivíduos do grupo ocular, 18 (52,9%) apresentaram o genótipo AA, 13 (38,2%) o genótipo AG e 3 (8,8%) o GG. No grupo controle, 58 (41,4%) apresentaram o genótipo AA, 72 (51,4%) o genótipo AG e 10 (7,1%) o genótipo GG. Não foi observada diferença estatística significativa para o modelo de co-dominância (p -valor=0,38), dominância (p -valor=0,23) e recessivo (p -valor=0,48), como observado na Tabela 4.9. Não foi observada diferença estatística significativa quando ajustado para sexo e faixa etária.

A frequência da distribuição do alelo A no grupo ocular foi de 49/68 (72,1%) e do alelo G foi de 19/68 (27,9%) enquanto no grupo controle foi de 188/280 (67,2%) e 92/280 (32,8%) respectivamente, não sendo estes resultados estatisticamente significativos (p =0,43), como observado na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo para *IL-10* – 592C/A, –819C/T e –1082G/A entre os grupos ocular e controle na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

	Grupo Ocular n=34 (%)	Grupo Controle n=140 (%)	Odds Ratio	p- valor
<i>IL-10 – 592C/A</i>				
Genótipos				
CC	8 (23,5)	45 (32,1)	1,00	0,54
CA	17 (50,0)	67 (47,9)	0,70 (0,28-1,76)	
AA	9 (26,5)	28 (20,0)	0,55 (0,19-1,60)	
CC vs CA + AA	8 (23,5) 26 (76,5)	45 (32,1) 95 (67,9)	1,00 0,65 (0,27-1,55)	0,32
AA vs CC + CA	9 (26,5) 25 (73,5)	28 (20,0) 112 (80,0)	1,00 1,44 (0,55-3,69)	0,74
Alelos				
C	33 (48,5)	157 (56,1)	1,00	0,26
A	35 (51,5)	123 (43,9)	0,74 (0,42-1,30)	
<i>IL-10 – 819C/T</i>				
Genótipos				
CC	8 (23,5)	45 (32,1)	1,00	0,54
CT	17 (50,0)	67 (47,9)	0,70 (0,28-1,76)	
TT	9 (26,5)	28 (20,0)	0,55 (0,19-1,60)	
CC vs CT + TT	8 (23,5) 26 (76,5)	45 (32,1) 95 (67,9)	1,00 0,65 (0,27-1,55)	0,32
TT vs CC + CT	9 (26,5) 25 (73,5)	28 (20,0) 112 (80,0)	1,00 1,44 (0,55-3,69)	0,74
Alelos				
C	33 (48,5)	157 (56,1)	1,00	0,26
T	35 (51,5)	123 (43,9)	0,74 (0,42-1,30)	
<i>IL-10 – 1082G/A</i>				
Genótipos				
AA	18 (52,9)	58 (41,4)	1,00	0,38
AG	13 (38,2)	72 (51,4)	1,72 (0,78-3,80)	
GG	3 (8,9)	10 (7,2)	1,03 (0,26-4,17)	
AA vs AG + GG	18 (52,9) 16 (47,1)	58 (41,4) 82 (58,6)	1,00 1,59 (0,75-3,38)	0,23
GG vs AA + AG	3 (8,8) 31 (91,2)	10 (7,1) 130 (92,9)	1,00 1,26 (0,26-5,40)	0,48
Alelos				
A	49 (72,1)	188 (67,2)	1,00	0,43
G	19 (27,9)	92 (32,8)	1,26 (0,68-2,37)	

A frequência dos haplótipos para *IL-10* -592C/A, -819C/T e -1082G/A entre os grupos ocular e controle não apresentou diferença estatística significativa (p-valor global= 0,26) (Tabela 4.10). O haplótipo -592A-819T-1082A foi o mais frequente tanto nos casos como nos controles (frequência= 0,43 e 0,41 respectivamente).

Tabela 4.10 - Distribuições haplotípicas do polimorfismo para *IL-10* -592C/A, - 819C/T e -1082G/A entre os grupos ocular e controle na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

	Grupo Ocular (f)	Grupo Controle (f)	Total (f)	Odds Ratio	p- valor
Haplótipo*					
-592A-819T-1082A	0,43	0,41	0,41	1,00	--
-592C-819C-1082G	0,19	0,30	0,28	1,55 (0,74-3,24)	0,25
-592C-819C-1082A	0,29	0,26	0,27	0,90 (0,44-1,85)	0,78
-592A-819T-1082G	0,09	0,03	0,04	0,36 (0,08-1,62)	0,18

*p-valor global= 0,26

A análise do desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos para *IL-10* – 592C/A, –819C/T e –1082G/A não apresentou diferença estatística significativa quando analisados os grupos, como observado na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 - Desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos para *IL-10* – 592C/A, –819C/T e –1082G/A nos grupos ocular e controle na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

Grupo Ocular			
	–592C/A	–819C/T	–1082G/A
–592C/A	-	0,99 (0)	0,39 (0,03)
–819C/T	ND	-	0,39 (0,03)
–1082G/A	ND	ND	-
Grupo Controle			
	–592C/A	–819C/T	–1082G/A
–592C/A	-	0,99 (0)	0,79 (0)
–819C/T	ND	-	0,79 (0)
–1082G/A	ND	ND	ND

Valores de p estão explicitados. ND= desequilíbrio de ligação não calculado por motivos de tamanho amostral.

4.6 DOSAGEM DE NITRITO (NO_2^-) E ÓXIDO NÍTRICO TOTAL (NO_x)

A dosagem de nitrito (NO_2^-) e NO_x (óxido nítrico total) foi realizada em 26 indivíduos do grupo ocular e 127 indivíduos do grupo controle. A média da produção de nitrito (NO_2^-) do grupo ocular foi de $27,19 \mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 18,45$) e do grupo controle de $49,87 \mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 21,82$). A média da produção de NO_x do grupo ocular foi de $36,72 \mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 41,00$) e do grupo controle de $56,21 \mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 39,56$). Esses resultados não foram estatisticamente significativos, como observado na Figura 4.1.

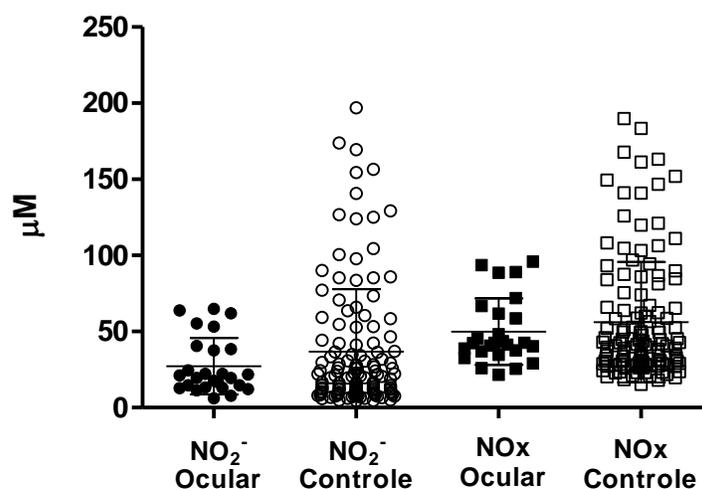


Figura 4.1 – Dosagem de nitrito (NO_2^-) e óxido nítrico total (NO_x) dos grupos ocular e controle na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

Os valores das médias de nitrito (NO_2^-) no grupo ocular variaram de $6,1\mu\text{M}$ a $64,99\mu\text{M}$ e no grupo controle de $4,43\mu\text{M}$ a $197,0\mu\text{M}$. Já para o NOx , o grupo ocular variou de $21,56\mu\text{M}$ a $95,94\mu\text{M}$ e o grupo controle de $15,31\mu\text{M}$ a $189,94\mu\text{M}$. O percentil 50, que é calculado pela mediana, foi utilizado para separar os 50% menores e 50% maiores valores de médias dos produtores de nitrito (NO_2^-) e NOx de ambos os grupos ocular e controle. O valor da mediana para o nitrito (NO_2^-) no grupo ocular foi de $20,28\mu\text{M}$ e para o controle foi de $20,56\mu\text{M}$ e para o NOx foi de $42,48\mu\text{M}$ e $40,72\mu\text{M}$, respectivamente (Figura 4.2 A).

Para os 50% menores valores, a média da produção de nitrito (NO_2^-) do grupo ocular foi de $13,79\mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 4,02$) e do grupo controle de $11,27\mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 4,22$) enquanto a média da produção de NOx foi de $34,45\mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 6,91$) e $29,66\mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 6,22$), respectivamente. Ao serem comparadas as médias de nitrito (NO_2^-) em ambos os grupos, não foi observada diferença estatística significativa (p -valor=0,052) enquanto as médias de NOx apresentaram diferença estatística significativa (p -valor=0,015). Esse último resultado sugere que indivíduos com lesão ocular apresentam níveis basais de óxido nítrico maiores que os indivíduos sem lesão ocular (Figura 4.2 B).

Para os 50% maiores valores, a média da produção de nitrito (NO_2^-) do grupo ocular foi de $40,59\mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 17,44$) e do grupo controle de $62,57\mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 45,28$) enquanto a média da produção de NOx foi de $65,30\mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 20,69$) e $83,17\mu\text{M}$ (desvio padrão de $\pm 40,91$), respectivamente. Ao serem comparadas as médias de nitrito (NO_2^-) e de NOx em ambos os grupos, não foi observada diferença estatística significativa (p -valor=0,09 e p -valor=0,13, respectivamente). Esses dados sugerem que apesar dos indivíduos produzirem altos níveis de nitrito ou NOx , esses altos valores não contribuem para o desenvolvimento de lesões oculares (Figura 4.2 C).

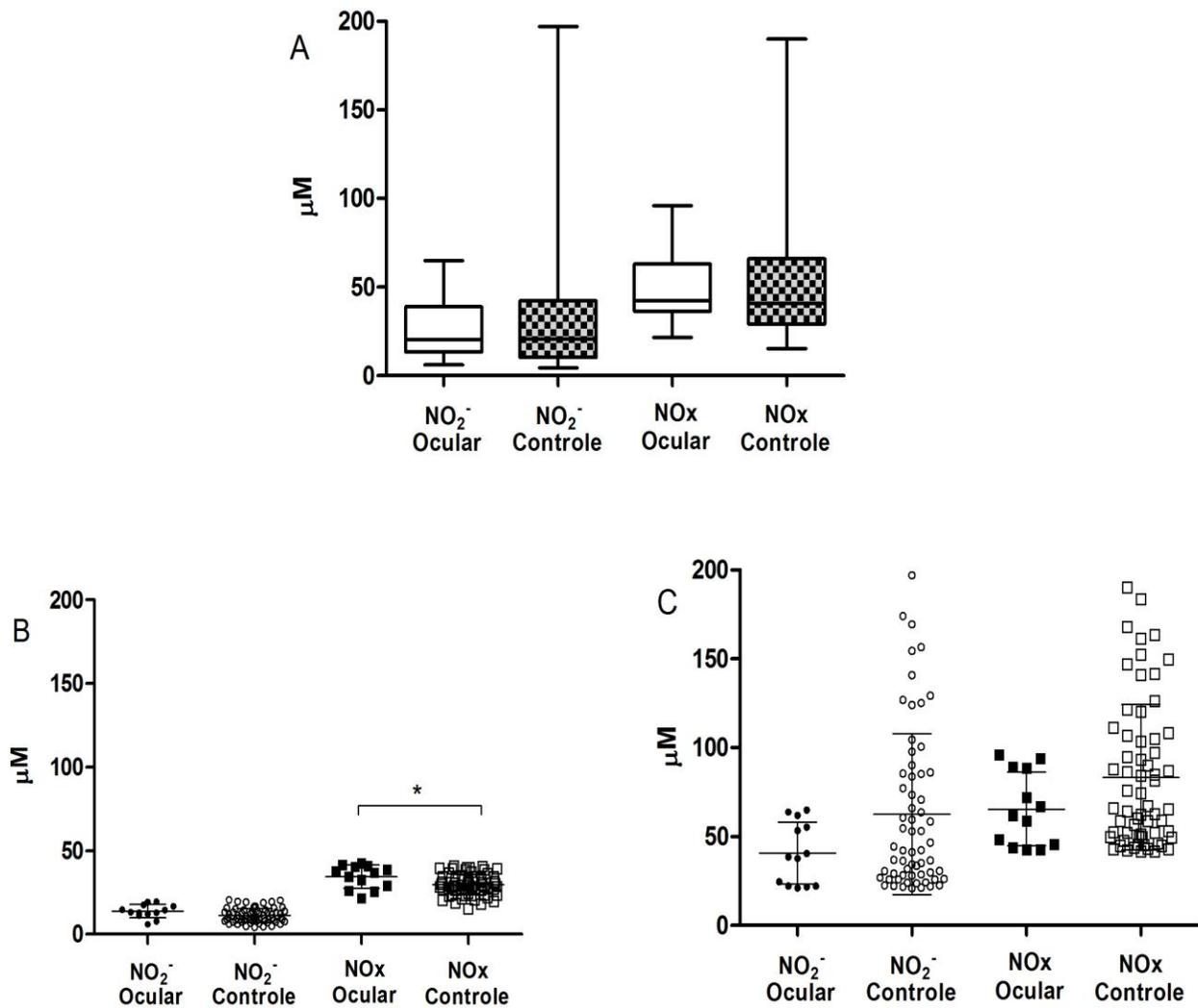


Figura 4.0.2 - Dosagem de nitrito (NO_2^-) e óxido nítrico total (NOx) dos grupos ocular e controle, em relação ao Percentil 50, na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

Box plot das médias de nitrito (NO_2^-) e óxido nítrico total (NOx) demonstrando o valor mínimo, 1°, 2° e 3° quartis e valor máximo dos grupos ocular controle (A). Valores das médias de nitrito (NO_2^-) e óxido nítrico (NOx) dos 50% menores produtores entre os grupos ocular e controle (B). Valores das médias de nitrito (NO_2^-) e óxido nítrico total (NOx) dos 50% maiores produtores entre os grupos ocular e controle (C) * - p -valor $< 0,05$.

Como descrito, a produção de radicais intermediários de nitrogênio pode estar associada aos genótipos de *NOS2A* –954G/C. Desta forma, classificamos os indivíduos de acordo com seu genótipo em GG e GC para avaliarmos a média de produção de nitrito (NO_2^-) e NO_x entre os grupos ocular e controles. A média da produção de NO_2^- com o genótipo GG do grupo ocular foi de 27.96 μM (desvio padrão de ± 18.40) e do grupo controle de 36.08 μM (desvio padrão de ± 41.53). Enquanto a média da produção de NO_x com o genótipo GG do grupo ocular foi de 50.85 μM (desvio padrão de ± 21.68) e do grupo controle de 55.47 μM (desvio padrão de ± 40.00). A média da produção de NO_2^- com o genótipo GC do grupo ocular foi de 7.86 μM (desvio padrão de ± 0.0) e do grupo controle de 42.26 μM (desvio padrão de ± 36.96). A média da produção de NO_x com o genótipo GC do grupo ocular foi de 25.48 μM (desvio padrão de ± 0.0) e do grupo controle de 62.67 μM (desvio padrão de ± 36.24). Não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 4.3). Esses resultados demonstram que não há diferença nos níveis de produção de óxido nítrico em relação aos genótipos de *NOS2A* –954G/C quando comparados os grupos ocular e controle.

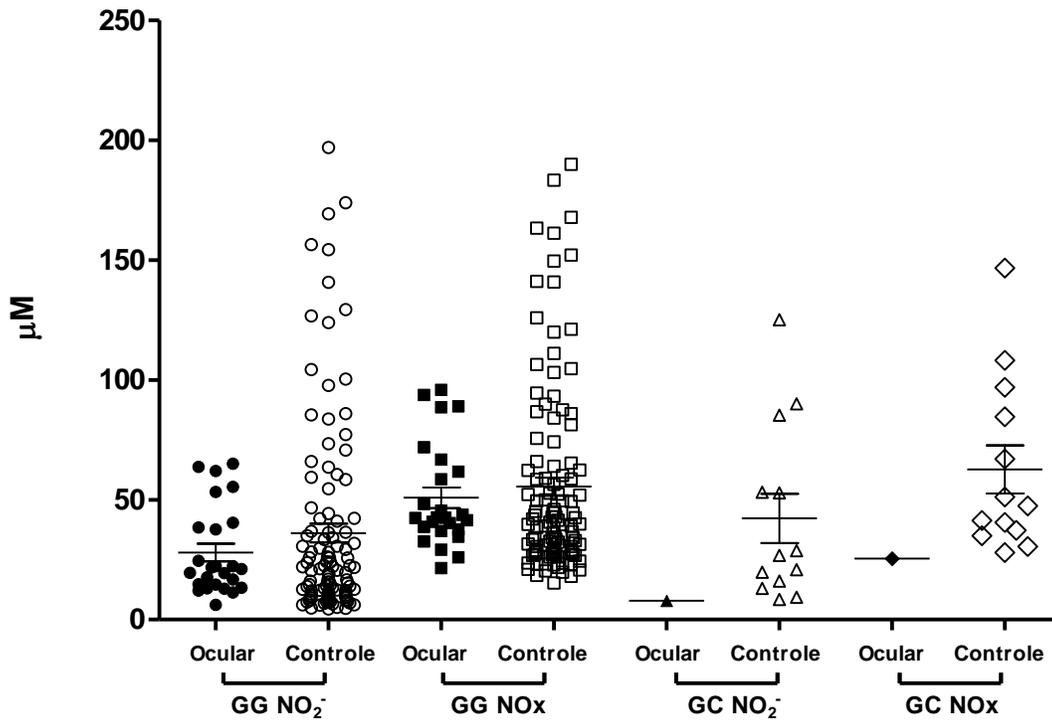


Figura 4.3 – Dosagem de nitrito (NO_2^-) e óxido nítrico total (NOx) dos grupos ocular e controle entre os genótipos de *NOS2A* – 954G/C na população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ, Brasil.

Genótipos de NOS2A – 954G/C: GG ou GC.

5 DISCUSSÃO

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura que fazem menção a ocorrência da toxoplasmose ocular na população brasileira. Sabe-se que fatores tais como hábitos alimentares, clima, a cepa do parasito e a genética do hospedeiro podem estar relacionados ao desenvolvimento desta forma da doença (Sibley et al. 2002, Montoya & Liesenfeld, 2004).

Nossa casuística, relacionada aos indivíduos com lesões oculares, deteve-se ao número amostral de 41 indivíduos com toxoplasmose ocular do bairro de Santa Rita de Cássia encontrada no trabalho de nosso grupo realizado anteriormente (Aleixo et al. 2009). Esse número amostral ainda sofreu perdas (7 indivíduos) pelos motivos descritos na metodologia. Com isso, não foi possível aumentar o número de casos de toxoplasmose ocular, fato que pode ter levado a limitação de resultados estatisticamente significativos. Para tentar diminuir este viés, o número de participantes do grupo controle foi de 4 vezes o número de participantes do grupo ocular. Ainda assim, esta medida não permitiu que encontrássemos associações entre os polimorfismos estudados e a toxoplasmose ocular. Com um número amostral pequeno, apenas as associações fortes podem ser observadas, outro tipo de associação poderia ser detectada com o aumento do número amostral.

O *T. gondii* induz uma potente resposta do tipo Th1 que envolve a produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-12, além da indução de NO. Estudos relacionados à resposta imunológica do hospedeiro são importantes, pois inúmeros questionamentos ainda não foram esclarecidos.

Os receptores tipo *Toll* reconhecem "padrões moleculares associados ao patógeno" funcionando como elementos centrais da imunidade inata devido ao envolvimento direto no controle de resposta imune adaptativa e a falha deste reconhecimento pode ser importante para a sobrevivência do parasito (Iwasaki e Medzhitov, 2004, Akira et al. 2006). Na resposta imune induzida durante a infecção pelo *T. gondii*, os TLRs iniciam uma série de cascatas de sinalização que

envolvem a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de iniciarem a resposta imune adaptativa (Werling e Jungi, 2003).

No presente estudo, não foram encontradas associações entre as distribuições genóticas ou frequências alélicas, quando comparados os grupos ocular e controle, dos polimorfismos para *TLR4* Asp299Gly e Thr399Ile e a susceptibilidade à toxoplasmose ocular. Esses resultados estão em concordância com os artigos publicados em toxoplasmose na população brasileira por: (1) Peixoto-Rangel e colaboradores (2009) que avaliaram o papel dos polimorfismos para *TLR4* Asp299Gly e Thr399Ile, (2) Vallochi e colaboradores (2008) que avaliaram apenas o polimorfismo para *TLR4* Asp299Gly e (3) a dissertação de Mestrado de Falcai (2006) que estudou o envolvimento do polimorfismo para *TLR4* Asp299Gly. Estes trabalhos mencionam a não associação destes polimorfismos com a toxoplasmose ocular na população brasileira e, até o momento, não existem artigos em outras populações. Vallochi e colaboradores (2008) não informam maiores detalhes sobre o número de indivíduos participantes, bem como a distribuição genotípica e frequência alélica encontrada em seu trabalho. Peixoto-Rangel e colaboradores (2009) apresentam em sua casuística 160 indivíduos de 60 famílias oriundos do Rio de Janeiro e não apresentam resultados sobre distribuição genotípica e frequência alélica. Falcai (2006) avaliou grupos de indivíduos com lesão ocular, IgG positivos sem lesão ocular e soronegativos para toxoplasmose.

A distribuição genotípica dos indivíduos com lesão no presente estudo concorda com o observado por Falcai (2006), mas diverge em relação aos indivíduos sororreagentes para *T. gondii* e com e sem lesão ocular. Já as frequências alélicas, em ambos os grupos do presente estudo, estão em concordância com o observado por Falcai (2006). Em nossa casuística, não foram detectados indivíduos carreadores do genótipo Gly299Gly (GG) em ambos os grupos ocular e controle, no polimorfismo para *TLR4* Asp299Gly, o que está de acordo com os resultados encontrados por Falcai (2006), sugerindo o encontro de uma frequência rara para este genótipo.

As distribuições dos haplótipos, entre os grupos ocular e controle, dos polimorfismos para *TLR4* Asp299Gly e Thr399Ile não apresentaram resultados significativos, quando comparados os grupos ocular e controle, sugerindo que a presença ou ausência das mutações não implica na susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões oculares. Ainda não foi descrito na literatura, pelo menos o que é de nosso conhecimento, o envolvimento do *TLR4* e a susceptibilidade ou resistência à toxoplasmose ocular.

No polimorfismo para *TLR4* Asp299Gly, a distribuição dos genótipos (AA, AG ou GG) neste estudo, quando considerados o total de indivíduos participantes, não está em concordância com a literatura, onde foram estudados outras doenças na população brasileira. No entanto, ainda são poucos os trabalhos publicados referentes a esses dois polimorfismos. Essa diferença foi observada em indivíduos portadores de diabetes tipo 2 (Bagarolli et al. 2010) e hipertensão (Sales et al. 2010), ambos em São Paulo. Vale ressaltar que não foram encontrados, no presente estudo, indivíduos carreadores do genótipo Gly299Gly (GG) em ambos os grupos ocular e controle, dado que também foi observado por Bagarolli e colaboradores (2010) no grupo de casos de diabetes tipo 2, sendo encontrado em apenas 1% dos indivíduos do grupo controle, confirmando a frequência rara deste genótipo na população brasileira.

Neste trabalho, o polimorfismo para *TLR4* Thr399Ile, a distribuição dos genótipos (CC, CT ou TT) no presente estudo, quando considerados o total de indivíduos participantes, não está de acordo aos encontrados por outros autores em diferentes agravos na população brasileira. Essa diferença foi observada em trabalhos com diabetes tipo 2 em São Paulo (Bagarolli et al. 2010). Não foram encontrados, no presente estudo, indivíduos carreadores do genótipo Thr399Ile (CT) no grupo ocular e Ile399Ile (TT) em ambos os grupos: ocular e controle. Bagarolli e colaboradores (2010) encontraram indivíduos carreadores do genótipo Ile299Ile (TT) no grupo controle (0,5%), mas não no de casos de diabetes tipo 2, além de baixa frequência para o genótipo Thr399Ile (CT) no grupo de casos (5,2%) e controle (10%) apontando a baixa frequência do alelo T na população brasileira em concordância com os dados encontrados no presente estudo.

Na população estudada, não foram encontradas associações entre as distribuições genótípicas e frequências alélicas do polimorfismo para *TNFA* – 238G/A e a susceptibilidade à toxoplasmose ocular. Este resultado concorda com o encontrado na dissertação de Mestrado de Falcai (2006).

Não foram encontrados trabalhos anteriores publicados em toxoplasmose com o polimorfismo para *TNFA* –238G/A, pelo menos que seja de nosso conhecimento. Há apenas uma dissertação de Mestrado que avaliou este polimorfismo e também na posição –308G/A com os mesmos grupos citados anteriormente (Falcai, 2006). As frequências genótípicas encontradas no presente estudo nos grupos ocular e controle divergem das encontradas por aquela autora. Nosso trabalho encontrou uma frequência pequena para o genótipo AA em ambos os grupos ocular e controle o que foi observado também por Falcai (2006) no grupo de indivíduos com lesão ocular. No entanto, a mesma autora não encontrou indivíduos carreadores do genótipo AA no grupo de indivíduos sororreagentes para *T. gondii* sem lesão ocular, dado que discorda com o encontrado no presente estudo. Porém, aponta para o encontro de uma baixa frequência deste genótipo em indivíduos com toxoplasmose.

No polimorfismo para *TNFA* –238G/A, quando comparados com outras doenças, a distribuição dos genótipos (AA, AG ou GG) no presente estudo, ao serem considerados o total de indivíduos participantes, foi similar ao observado por Oliveira e colaboradores (2004) na tuberculose. No entanto, outros autores apresentam resultados discordantes aos do presente estudo, com doença de Chagas em Minas Gerais (Pissetti et al. 2011), psoríase grave (Magalhães et al. 2010) em São Paulo e tuberculose (Oliveira et al. 2004) no Rio de Janeiro e hanseníase (Santos et al. 2002) no Rio de Janeiro.

Nossos resultados não encontraram associação entre a toxoplasmose ocular e o polimorfismo para *TNFA* –308G/A, em concordância com estudo previamente publicado por Cordeiro e colaboradores (2008a) na população brasileira em indivíduos oriundos de Minas Gerais e na dissertação de Mestrado (Falcai, 2006) em indivíduos oriundos de Erechim, RS. Ambos os trabalhos divergem dos resultados encontrados, no presente estudo, em relação à distribuição dos

genótipos (GG, AG ou AA) nos grupos ocular e controle. No presente estudo não foram encontrados indivíduos carreadores do genótipo AA em ambos os grupos ocular e controle. No entanto, esse resultado discorda dos encontrados por Cordeiro e colaboradores (2008a) que observaram baixa frequência deste genótipo em ambos os grupos (com lesão e sem lesão ocular) e Falcai (2006) nos indivíduos com toxoplasmose (com lesão e sem lesão ocular). Esses resultados apontam para a baixa frequência deste genótipo entre os indivíduos com toxoplasmose.

No polimorfismo para *TNFA* -308G/A, quando comparados a outras patologias, a distribuição dos genótipos (AA, AG ou GG) no presente estudo, considerando o total de indivíduos participantes, foi similar ao observado por Magalhães e colaboradores (2010) em São Paulo e Macedo e colaboradores (2010) no Paraná. Vale ressaltar que no presente estudo não foram encontrados indivíduos carreadores do genótipo AA, dados que concordam com Visentinner e colaboradores (2008) no Paraná e em São Paulo, Magalhães e colaboradores (2010) em São Paulo e Macedo e colaboradores (2010) no Paraná. No entanto, resultados discordantes, aos encontrados no presente estudo, foram observados na hanseníase (Santos et al. 2002, Cardoso et al. 2011) no Rio de Janeiro, hepatite B (Ribeiro et al. 2007) no Paraná, pneumopatias não relacionadas à tuberculose (Oliveira et al. 2004) no Rio de Janeiro e em São Paulo, abscesso dental (de Sá et al. 2007) e doença de chagas (Pissetti et al. 2011), ambos em Minas Gerais, gastrite devido à *Helicobacter pylori* (Melo Barbosa et al. 2009) no Pará e psoríase (Magalhães et al. 2010) em São Paulo.

No presente estudo, as distribuições dos haplótipos dos polimorfismos para *TNFA* -238G/A e -308G/A não apresentaram resultados significativos, quando comparados os grupos ocular e controle, sugerindo que a presença ou ausência da mutação não implicaria na susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões oculares. No entanto, este é o primeiro estudo que aborda a distribuição desses haplótipos na toxoplasmose ocular.

Apesar de não encontrarmos associação entre os polimorfismos para *TNFA* -238G/A e -308G/A e a suscetibilidade à toxoplasmose ocular, esses resultados

não diminuem o importante papel do TNF- α frente à infecção pelo *T. gondii*. Dados na literatura apontam o envolvimento na proteção da lesão ocular, no controle do parasito e na reativação da infecção crônica (Gazzinelli et al. 1993, Sibley et al. 2002). Estudos incluindo outras posições ou com um número amostral maior devem ser realizados para avaliar o papel destes polimorfismos na toxoplasmose.

Não foram encontradas associações entre as distribuições genotípicas ou frequências alélicas do polimorfismo para *NOS2A* -954G/C e a suscetibilidade à toxoplasmose ocular. Não há outros relatos descrevendo este SNP envolvendo a toxoplasmose ou a lesão ocular toxoplásmica, contudo, há apenas uma única publicação descrevendo este SNP na população brasileira (Jorge et al. 2010). Estes autores observaram distribuições genotípicas diferentes aos aqui apresentados numa população de São Paulo. Vale ressaltar que não encontramos indivíduos carreadores do genotipo CC em ambos os grupos enquanto Jorge e colaboradores (2010) encontraram em 6.5%. Esta diferença encontrada em relação às frequências genotípicas na mesma “população” brasileira pode estar relacionada à colonização do Brasil por povos de diversas partes do mundo, como portugueses, espanhóis, italianos, alemães, índios, africanos e japoneses.

Não foram observadas diferenças entre os níveis séricos de nitrito (NO_2^-) e NO_x ao serem comparadas as médias destes compostos entre os grupos ocular e controle, nem em relação aos genótipos (GG ou GC) de *NOS2A* -954G/C dos grupos (ocular e controle). Poucos são os estudos que avaliam os níveis de nitrito (NO_2^-) ou NO_x em indivíduos com toxoplasmose. Karaman e colaboradores (2008) avaliaram os níveis de NO_x , numa população da Turquia, em indivíduos IgG positivos para *T. gondii* (sem sintomas ou lesões oculares toxoplásmicas) e controles (IgM e IgG negativos para *T. gondii*) e observaram que os indivíduos com toxoplasmose apresentaram as médias dos níveis de NO_x aumentados em relação aos controles, sendo esses resultados estatisticamente significativos. Contudo, em um estudo com indivíduos com AIDS e com quadro de encefalite toxoplásmica, Torre e colaboradores (1999) observaram médias similares de níveis de nitrito/nitrato séricos no soro e no fluido cérebro espinhal quando comparados aos indivíduos controles (IgM e IgG soro-negativos para HIV-1 e para

T. gondii), não sendo estes resultados significativos. Indivíduos HIV positivos possuem diminuição do número de células T CD4 que auxiliam os macrófagos a ativarem a NOS2 com posterior secreção de radicais de nitrogênio, pela liberação de IFN- γ , contribuindo assim para o controle do parasito e evitando o aparecimento de patologias mais graves como a encefalite toxoplásmica. Em nosso estudo, não observamos diferença entre as médias de nitrito ou NOx quando comparados os grupos ocular e controle.

O percentil 50 foi calculado para que pudéssemos ter uma avaliação mais clara e assim compararmos os indivíduos com menor e maior produção de ambos os compostos. Observamos que ambos os grupos apresentam uma grande diferença entre os valores mínimo e máximo de médias. Entre os indivíduos considerados como baixo produtores, aqueles do grupo ocular apresentavam as médias maiores que os do grupo controle em ambos os compostos e houve diferença estatística significativa quando comparada as médias de NOx do grupo ocular em relação aos controles. Esse resultado aponta que indivíduos com toxoplasmose ocular apresentam níveis basais de NOx maiores que aqueles sem lesão ocular. No entanto, não se sabe quais níveis séricos de NO são capazes de levar ao desenvolvimento de uma lesão ocular. Entre os indivíduos considerados como alto produtores destes compostos, observamos que os do grupo ocular apresentavam médias inferiores quando comparados aos do grupo controle, embora não tenhamos encontrado diferença estatisticamente significativa. Apesar disso, podemos constatar que indivíduos com lesão ocular podem apresentar altos níveis de nitrito (NO₂⁻) ou NOx assim como os indivíduos sem lesão ocular, o que não impede que futuramente esses possam desenvolver algum tipo de lesão ocular.

Em nosso estudo não foi encontrada associação entre os níveis de nitrito (NO₂⁻) ou NOx produzidos e a suscetibilidade à toxoplasmose ocular. Sabe-se que o NO está envolvido tanto na severidade da toxoplasmose ocular quanto no controle do parasito (Hayashi et al. 1996, Roberts et al. 2000, Silva et al. 2009). Radicais de nitrogênio são importantes para o controle intracelular do *T. gondii*, mas os níveis séricos destes radicais parece não interferir no aparecimento das

lesões oculares. Fatores que podem ter contribuído para uma quantificação menos fidedigna de nitrato ou NOx produzidos dificultando a quantificação real destes compostos produzidos na infecção pelo *T. gondii* seriam: (1) a presença indivíduos com infecção crônica de toxoplasmose, não tendo como mensurar o tempo de infecção para sabermos se é recente ou antiga; (2) a ausência de indivíduos com lesões oculares toxoplásmicas em atividade e (3) a falta de estímulo das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) com antígenos solúveis do *T. gondii* em cultura de células, sendo utilizado para a quantificação o soro propriamente dito sem qualquer estímulo anterior.

Sabe-se que o IFN- γ possui um papel crucial no controle do *T. gondii* contribuindo para a resposta imune do tipo Th1 (Suzuki et al. 1988; Suzuki et al. 1989). A IL-10 tem como função é a inibição da proliferação de células Th1, podendo também inibir a produção de derivados oxigenados e nitrato bem como a produção de citocinas pro-inflamatórias (Deckert-Schlüter et al. 1997). No entanto, a produção ineficiente desta citocina pode levar ao agravamento da encefalite toxoplásmica em modelos murinos (Wilson et al. 2005) e ainda não se sabe claramente o seu papel na toxoplasmose humana tendo sendo a maioria das publicações com dosagens de níveis séricos desta citocina (Yamamoto et al, 2001, Matowicka-Karna et al. 2009, Li et al. 2010).

Não foram encontradas nas bases consultadas, até o momento não existem citados na literatura trabalhos que descrevam a associação entre a toxoplasmose, em relação aos polimorfismos para *IL-10* nas posições -592C/A e -819C/T. Somente um único trabalho descreve o polimorfismo de *IL-10* (-1082G/A) e a toxoplasmose ocular (Cordeiro et al. 2008c) em Minas Gerais no qual foram analisados 100 indivíduos com toxoplasmose ocular e 100 controles (indivíduos IgG positivos para *T. gondii* sem lesão ocular) e os autores observaram diferença estatística significativa na distribuição genotípica entre os grupos, indicando que o genótipo AG poderia estar relacionado com a ocorrência da toxoplasmose ocular. Nosso estudo não encontrou associação entre este polimorfismo e a suscetibilidade ao desenvolvimento de lesão ocular toxoplásmica. Além disso, Cordeiro e colaboradores (2008c) observaram que indivíduos com toxoplasmose

ocular carregavam o alelo A com uma frequência maior que os do grupo controle, demonstrando assim uma associação deste alelo com a toxoplasmose ocular, o que também não foi observado em nosso estudo.

No nosso estudo, não foram encontradas associações entre as distribuições genotípicas, frequências alélicas e distribuições dos haplotipos dos polimorfismos para IL-10 -592C/A, -819C/T e -1082G/A e a suscetibilidade à toxoplasmose ocular. No entanto, este é o primeiro trabalho, pelo menos que é do nosso conhecimento, que aborda a distribuição dos haplotipos na toxoplasmose ocular.

No polimorfismo para IL-10 -592C/A e -819C/T, quando comparados a outras doenças, a distribuição dos genótipos (CC, CA ou AA e CC, CT ou TT, respectivamente) no presente estudo, considerando o total de indivíduos participantes, foi similar ao observado por Plothow e colaboradores (2003) no Paraná, RS em ambos os polimorfismos e por Gadelha e colaboradores (2008) na Bahia para o polimorfismo para IL-10 -592C/A. No entanto, frequências discordantes foram observadas na periodontite crônica em São Paulo (Scarel-Caminaga et al. 2004), hepatite B (Macedo et al. 2010) no Paraná e linfoma de Hodgkin em indivíduos soro reagentes para o vírus Epstein-Barr em São Paulo (da Silva et al. 2007), todos os trabalhos avaliando os dois polimorfismos e somente para o polimorfismo para IL-10 -592C/A na periodontite crônica em São Paulo (Claudino et al. 2008). Além disso, dados diferentes também foram encontrados numa avaliação com voluntários saudáveis no Paraná e São Paulo (Visentainer et al. 2008).

No polimorfismo para IL-10 -1082G/A, quando comparados a outros agravos, a distribuição dos genótipos (AA, AG ou GG) no presente estudo, considerando o total de indivíduos participantes, foi similar ao observado em Minas Gerais (Costa et al. 2009), Pará (Medina et al. 2011), Rio de Janeiro (Moraes et al. 2003), São Paulo (da Silva et al. 2007) e Rio Grande do Sul (Plothow et al. 2003). No entanto, frequências discordantes foram observadas na doença inflamatória muco cutânea crônica (líquen plano) (Xavier et al. 2007), em Minas Gerais, hepatite B (Macedo et al. 2010) no Paraná, abscesso dental sintomático (de Sá et al. 2007), doença do enxerto contra o hospedeiro (Resende et al. 2010) e toxoplasmose ocular

(Cordeiro et al. 2008c), todos em Minas Gerais. Além disso, dados discordantes também foram encontrados numa avaliação com voluntários saudáveis no Paraná e São Paulo (Visentainer et al. 2008). É importante ressaltar que apesar do encontro de frequências diferentes, não foram observadas grandes variações entre elas. Em todos os trabalhos analisados os indivíduos eram carreadores de todos os genótipos.

O fato de não terem sido encontradas associações entre a lesão ocular e os polimorfismos estudados pode ser devido ao pequeno número amostral de indivíduos com este tipo clínica. Como foi utilizada uma população fechada, não havia a possibilidade de aumentarmos o número de casos de indivíduos com toxoplasmose ocular oriundos de outras localidades. No entanto, o número de indivíduos encontrados com toxoplasmose ocular está de acordo com o percentual esperado na população brasileira. Sendo assim, esses resultados não invalidam a grande importância destes mediadores imunológicos no controle da infecção pelo *T. gondii*. Vale ressaltar que foi realizado um estudo com polimorfismos, no curso desta tese, ainda não publicados, para IL10 -592C/A e -819C/T, o *TNFA* -238G/A e *NOS2A* -954G/C.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Não foi possível associar os polimorfismos estudados *TNFA* (posição –238 G/A e –308 G/A), IL-10 (posição –592 A/C, –819 C/T e –1082 G/A), *NOS2A* (posição –954 G/C) e TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) com a susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento de lesões oculares toxoplásmicas. As distribuições dos genótipos e dos alelos nos polimorfismos investigados apresentaram frequências similares quando comparados os indivíduos com toxoplasmose ocular e os controles.

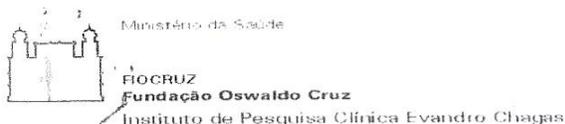
- ✓ Não foi possível associar a distribuição dos haplótipos - *TNFA* (posição – 238 G/A e –308 G/A), IL-10 (posição –592 A/C, –819 C/T e –1082 G/A) e TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) - com a susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular.

- ✓ Não foram encontradas diferenças entre a quantificação das médias de níveis séricos de nitrito (NO_2^-) ou óxido nítrico total (NOx) quando comparados ambos os grupos ocular e controle.

- ✓ Indivíduos com lesão ocular, considerados como baixo produtores de nitrito (NO_2^-) e NOx, apresentam médias dos níveis séricos de NOx aumentadas em relação aos controles.

7 ANEXOS

7.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 049/2008

Protocolo 2240.0.000.009-08

1. Identificação:

Título do Projeto: “Participação dos polimorfismos em genes que codificam TLRs, citocinas e NOS2 com a susceptibilidade à toxoplasmose ocular”.

Pesquisador Responsável: Maria Regina Reis Amendoeira (IOC).

Doutoranda: Maira Cavalcanti de Albuquerque (IOC).

Instituição Responsável: Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 09/07/2008.

2. Sumário:

Visa a analisar a ocorrência de polimorfismos nos genes que codificam TLRs, citocinas e NOS2, envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro humano com toxoplasmose ocular, oriundos de duas populações e verificar os polimorfismos que estariam relacionados a uma possível susceptibilidade ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular em duas populações, correlacionado este fato a quantificação da produção de citocinas. Este estudo é uma continuação do projeto intitulado “Estudo dos polimorfismos genéticos na infecção por *Toxoplasma gondii* em pacientes com toxoplasmose ocular – em população rural do bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ”, aprovado por este Comitê em 07/07/2006. A primeira fase desse projeto foi realizada na dissertação de mestrado em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz realizada pela mesma aluna, intitulada “Estudo do polimorfismo para IFN- γ (+874) na infecção por *Toxoplasma gondii* em pacientes com toxoplasmose ocular – em população rural, do bairro Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, RJ”. O presente estudo tem por meta complementar os objetivos propostos no projeto aprovado pelo CEP do IPEC, já citado anteriormente. Para tanto, serão inseridos novos polimorfismos de relevância para a infecção por *T. gondii* na população do bairro de Santa Rita de Cássia, sendo que o estudo será ampliado para uma outra população, oriunda do Centro de Referência em Infecções Oftalmológicas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)/Fiocruz. Somente serão incluídos neste projeto indivíduos soro reagentes para *T. gondii* sendo estes indivíduos divididos em dois grupos: Grupo I – sem lesões oculares presumíveis, que servirão de controle e Grupo II – aqueles com lesões oculares presumíveis. Serão utilizadas 168 amostras de indivíduos oriundos da população do bairro de Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, RJ. Na população do Centro de Referência em Infecções Oftalmológicas (CRIO) do IPEC foi estimada uma amostra de 300 indivíduos, que serão incluídos num dos grupos (I ou II).

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado em linguagem acessível ao sujeito da pesquisa. As fontes de fomento deste projeto serão o CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e o Tesouro Nacional (PA do Laboratório de Toxoplasmose do IOC).

"Participação dos polimorfismos em genes que codificam TLRs, citocinas e NOS2 com a susceptibilidade à toxoplasmose ocular".

4. Diligências:

Sim. Foram satisfeitas.

5. Parecer: APROVADO.

Data: 22 de setembro de 2008.

Assinatura do Coordenador:



Dr.^a Léa Camillo-Couro
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: "Participação dos polimorfismos em genes que codificam TLRs, citocinas e NOS2 com a susceptibilidade à toxoplasmose ocular".

Coordenadoras do Projeto: Dra. Maria Regina Reis Amendoeira e Dra. Maria da Glória Bonecini Almeida

Oftalmologista: Dra. Ana Luisa Quintella do Couto Aleixo

Contato: Dra. Ana Luiza Aleixo – (21) 3865 – 9525 ou Dra. Regina Amendoeira, (21) 2598-4251

Eu, _____
fui informado(a) que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre a toxoplasmose.

A minha participação será para retirar sangue para extração de DNA, análise de polimorfismos para IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-10, IL-12, NOS2, TLR2 e TLR4 com amplificação por PCR e visualização em gel agarose além de quantificação das citocinas estudadas, com a finalidade de se obter maiores conhecimentos sobre a toxoplasmose e a susceptibilidade do hospedeiro ao desenvolvimento da forma ocular.

Os resultados deste estudo me beneficiarão diretamente, assim como, no futuro poderão beneficiar outras pessoas que venham adquirir a infecção por *Toxoplasma gondii*.

O procedimento será o seguinte: será coletado um volume de cinco a dez mL de sangue por punção da veia do antebraço, podendo em algum outro momento da pesquisa ser solicitada uma nova coleta de material.

Possíveis riscos e desconforto, se ocorrerem, relacionados à coleta de sangue, serão aqueles como dor local e/ou hematoma (roxidão no local de punção), podendo apresentar duração de três a cinco dias.

Todos os cuidados apropriados serão tomados, dentro das normas de biossegurança, como uso de seringas e agulhas estéreis e descartáveis, gaze descartável e álcool para assepsia local, entre outros.

A retirada de sangue poderá ser feita por um (a) médico (a), um (a) enfermeiro (a) ou técnico (a) habilitado (a) para este tipo de trabalho, da Fundação Oswaldo Cruz.

Os resultados deste estudo serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos serem divulgados na forma de comunicação científica, entretanto, não será permitido a identificação, garantindo a minha privacidade.

O material biológico coletado, após os exames, será estocado, podendo ser usado posteriormente, em outras pesquisas com fins semelhantes, somente após a concessão de uma nova assinatura para autorização do uso do material em novos projetos bem como também somente após a avaliação pela Comissão de Ética em Pesquisa. Quando não for possível um novo contato para que eu dê permissão para utilização do material biológico em um novo projeto, por meio de assinatura em um outro Termo de Consentimento, a equipe poderá utilizá-lo após justificativa perante o Comitê de Ética Humana.

O médico (a) ou pesquisador (a) responsável esclareceu todas as informações aqui citadas, estando à disposição para atender minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contatar os demais professores envolvidos neste estudo.

A minha participação neste projeto é inteiramente voluntária, e sou livre para recusar a participação, ou retirar-me em qualquer fase da pesquisa, sem que isto possa afetar ou prejudicar o cuidado médico a que devo receber.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pelo presente, consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

Assinatura: _____ RG: _____

Testemunha: _____ RG: _____

Pesquisador assinante: _____

Data: ___/___/___

7.3 ARTIGO PUBLICADO NO MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ – ALBUQUERQUE ET AL. 2009

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(3): 451-455, May 2009 451

The IFN- γ +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility

Maíra Cavalcanti de Albuquerque¹, Ana Luisa Quintella do Couto Aleixo²,
Eliezer Israel Benchimol², Ana Cristina Câmara S Leandro³, Leandro Batista das Neves¹,
Regiane Trigueiro Vicente¹, Maria da Glória Bonecini-Almeida^{3/*}, Maria Regina Reis Amendoeira¹

¹Laboratório de Toxoplasmose, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil ²Centro de Referências em Infecções Oculares Otológicas ³Laboratório de Imunologia e Imunogenética, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Toxoplasmosis is a worldwide zoonosis that generally produces an asymptomatic infection. In some cases, however, toxoplasmosis infection can lead to ocular damage. The immune system has a crucial role in both the course of the infection and in the evolution of toxoplasmosis disease. In particular, IFN- γ plays an important role in resistance to toxoplasmosis. Polymorphisms in genes encoding cytokines have been shown to have an association with susceptibility to parasitic diseases. The aim of this work was to analyse the occurrence of polymorphisms in the gene encoding IFN- γ (+874T/A) among Toxoplasma gondii seropositive individuals, including those with ocular lesions caused by the parasite, from a rural population of Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, state of Rio de Janeiro, Brazil. Further, we verified which of these polymorphisms could be related to susceptibility to the development of ocular toxoplasmosis. This study included 34 individuals with ocular toxoplasmosis (ocular group) and 134 without ocular lesions (control group). The differences between A and T allele distributions were not statistically significant between the two groups. However, we observed that a higher frequency of individuals from the ocular group possessed the A/A genotype, when compared with the control group, suggesting that homozygosity for the A allele could enhance susceptibility to ocular toxoplasmosis in T. gondii infection.

Key words: toxoplasmosis - interferon-gamma - chorioretinitis - single nucleotide polymorphism

Toxoplasmosis is a worldwide zoonosis caused by *Toxoplasma gondii*, an intracellular protozoan. The prevalence of this infection ranges from 15-85%, depending on social habits, geographic and weather distribution (Amendoeira et al. 1999, Garcia et al. 1999, Sobral et al. 2005). Cats and other felids from the genera *Lynx* and *Felis* are the definitive hosts of the parasite and warm-blooded animals, including humans, are intermediate hosts (Krick & Remington 1978, Amendoeira 1995, Garcia et al. 1999). *T. gondii* is a lifelong persistence parasite and almost 90% of infected individuals are asymptomatic. In some cases, however, infection can cause destructive inflammation that targets multiple organs, including the brain and eyes. Ocular toxoplasmosis can originate from acquired or congenital toxoplasmosis, causing necrotizing retinitis or retinochoroiditis (Lynfield & Guerina 1997, Garcia et al. 1999, Montoya & Liesenfeld 2004). Although most cases of human eye infection are believed to be congenital in origin, acquired acute toxoplasmic retinochoroiditis may be more prevalent than has been recognised (estimates of prevalence range from 0.6-17.7%) (Smith & Ganley

1972, Melamed 1988, 2009, Glasner et al. 1992, Abreu et al. 1998, Holland 2009).

Immune mechanisms against *T. gondii* ocular infection have not yet been fully clarified. However, it has been suggested that a strong T helper 1 response, with gamma interferon secretion, is crucial for protection in a murine model (Gazzinelli et al. 1994) and for controlling parasite growth in chronically infected hosts (Suzuki et al. 1989). Norose et al. (2005) observed that IFN- γ knockout mice showed mild inflammation and sludging of blood in the retina and choroid, demonstrating the role of this cytokine in controlling ocular disease. In addition, the relationships between polymorphisms in genes encoding cytokines and resistance or susceptibility to several diseases have been studied (Barret et al. 2003, Mac Lean et al. 2004, Rodriguez-Pérez et al. 2005, Spriewald et al. 2005, El-Shabrawi et al. 2006, Martinez-Pomar et al. 2006). These studies suggest that these polymorphisms may influence the course of a parasitic disease. In toxoplasmosis infection, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *IL10* -1082G/A (*124092 INTERLEUKIN 10; *IL10*), *TNF* -308G/A (*191160 TUMOUR NECROSIS FACTOR, ALPHA; *TNF*), *IL1A* -889C/T (*147760 INTERLEUKIN 1-ALPHA; *IL1A*) and *IL1B* +3954C/T (*147720 INTERLEUKIN 1-BETA; *IL1B*) have been previously described in retinochoroiditis (Cordeiro et al. 2008a-c). However, there is no data in the literature regarding the role of the IFN- γ +874T/A SNP in either toxoplasmosis infection or ocular outcome. We conducted a population case-control study to investigate the role of the (*147570 interferon, gamma; IFN- γ) IFN- γ +874T/A SNP in retinochoroiditis susceptibility.

Financial support: IOC, IPEC/Fiocruz, MCA fellowship from IOC/Fiocruz

+ Corresponding author: gloria.bonecini@ipecc.fiocruz.br

Received 12 August 2008

Accepted 3 March 2009

online | memorias.ioc.fiocruz.br

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Study population - This study was performed in a rural area called Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, located 176 miles from city of Rio de Janeiro, state of Rio de Janeiro (RJ), Brazil. Several cases of visual impairment had been reported by the local Health Service as suspected ocular toxoplasmosis. Serological anti-*T. gondii* tests and fundoscopy were performed on 1,071 individuals, comprising about 82.4% of community population of Santa Rita de Cássia. Among these, 706 (65.9%) were seropositive for *T. gondii*. Ocular lesions were defined by the presence of IgG antibodies against *T. gondii* and retinochoroiditis with active or cicatrized lesions. *T. gondii* seropositive community controls (n = 134) were recruited and matched by sex and age. *T. gondii* seropositive individuals were excluded if they were related to either toxoplasmosis ocular cases or controls. Written informed consent was obtained from all subjects and the study was approved by the Human Research Ethics Committee of Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas-Fiocruz, RJ, Brazil, on 07/07/2006 (CEP: 0039.0.011.099-06).

Toxoplasmosis diagnosis - Indirect immunofluorescence (IIF) and Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) were performed as described by Coutinho et al. (1970) and Uchôa et al. (1999), respectively. Serum was considered positive if it showed titer $\geq 1/16$ (IIF) or an ELISA score of 1.4-fold higher than the ELISA cut-off.

Genomic DNA extraction - Five milliliter of blood was collected in EDTA tubes for genomic DNA extraction, using a DNA blood mini kit (QIAGEN), following the protocol described by the manufacturer. All genomic DNA extractions were subjected to 2% agarose gel electrophoresis, visualised with ethidium bromide and observed on an ultraviolet transilluminator to confirm their integrity.

IFN- γ polymorphism - The IFN- γ T/A polymorphism typed in this study was a SNP at the +874 position. The SNP typing protocol was described by Pravica et al. (2000). The T and A polymorphism sequences were identified using a specific single stranded oligonucleotide, synthesised to cover a 24-bp region for each allele. An amplification refractory mutation system by polymerase chain reaction (ARMS-PCR) was performed in a total volume of 20 μ L containing 1 μ L of generic primer (100 pmol/ μ L; 5' -TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA -3'), 1 μ L of specific A primer (100 pmol/ μ L, 5' - TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA -3') or 1 μ L of specific T primer (100 pmol/ μ L, 5' - TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT -3'), 1 μ L of internal control 1 (10 pmol/ μ L, 5' - GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA -3'), 1 μ L of internal control 2 (10 pmol/ μ L, 5' - TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT -3'), 4 μ L of dNTP (2 mM), 2.4 μ L of MgCl₂ (25 mM), 3 μ L of buffer (10X), 0.5 μ L of Taq DNA polymerase (5 U/ μ L), 4.1 μ L of sterile MilliQ H₂O and 2 μ L of genomic DNA. ARMS-PCR was performed in a thermocycler (Applied Biosystems) with the cycles: 95°C (3 min), 10 cycles of 95°C (15 s), 65°C (50 s) and 72°C (40 s), followed by 20 cycles of 95°C

(20 s), 55°C (50 s) and 72°C (50 s), 72°C (7 min) and 4°C (hold temperature). ARMS-PCR amplified products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualised on an ultraviolet transilluminator.

Statistical analysis - Genotypes and allele frequencies were compared between cases and controls by Chi Square analysis for a 3 x 2 contingency table, using the Epi Info 2000 software (CDC, Atlanta, GA, USA); p values were corrected for multiple comparisons (age and sex). A corrected p < 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

We identified 41 (5.8%) individuals with ocular lesions caused by *T. gondii* infection from all *T. gondii* seropositive individuals (n = 706). Seven individuals were excluded from the study. Of these, four were related, two had moved to another city and one refused to participate in the study. Among the remaining ocular group, 10 (29.4%) were male and 24 (70.6%) were female and ages ranged from 16-88 (44 \pm 20.9 SD) years. We included 134 control individuals from the *T. gondii* IgG positive individuals, matched by sex and age, for a case:controls ratio of 1:4 (Table I).

All 168 individuals were tested by ARMS-PCR at the *IFNG* +874T/A polymorphic site. Forty six (27.3%) showed A/A homozygosity, 107 (63.7%) were A/T heterozygous and 15 (9%) were T/T homozygous.

Genotype frequency analysis of the control group showed that A/T heterozygotes (68% of 134 genotypes) were the largest group. However, the ocular group showed a similar frequency of A/A and A/T genotypes. The T/T genotype was present in the same frequency among case and control groups. No statistically significant difference was observed (p = 0.054) (Table II) between the cases and controls. However, A/A homozygous individuals showed a 1.62-fold higher risk than other genotypes of developing retinochoroiditis during *T. gondii* infection (p = 0.014; df = 1) (Table II). The distribution of alleles did not differ between the ocular and control groups (p = 0.113) (Table II); however, the presence of a T allele in heterozygous individuals was sufficient to confer protection against retinochoroiditis when the A/T heterozygous individuals were compared with the A/A homozygous subjects (p = 0.01, df = 1; uncorrected X² = 6.21, OR = 0.36; 0.15-0.88).

Since the frequency of retinochoroiditis during *T. gondii* infection was higher in female (n = 24; 71%) than male (n = 10; 29%) individuals in our community case-control study, we adjusted the p value by gender. The effect remains invariable, since the odds ratio was not affected; thus, the p values remain the same.

DISCUSSION

Ocular toxoplasmosis can cause visual alterations, retinochoroiditis and, in some cases, blindness. *T. gondii* infection induces a response by T helper 1 cells, which produce IFN- γ , a cytokine that is involved in resistance to toxoplasmosis (Suzuki et al. 1989, Schariton-Kersten

TABLE I

Data information of ocular and control groups in toxoplasmic infection among *Toxoplasma gondii* seropositive individuals from a rural population at Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, state of Rio de Janeiro, Brazil

Variables	Ocular group	Control group
Sample size	34	134
Gender (male/female)	10/24	40/94
Age (years) ± SD	44 ± 20.9	43 ± 18.9

TABLE II

IFNG +874T/A genotypes and allele frequencies of ocular and control groups in toxoplasmic infection among *Toxoplasma gondii* seropositive individuals from a rural population at Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, state of Rio de Janeiro, Brazil

Genotypes	Control group (n = 134)		Ocular group (n = 34)		OR (95% CI)	p
	n	(f)	n	(f)		
A/A	31	(0.23)	15	(0.44)	1	0.054 ^a
A/T	91	(0.68)	16	(0.47)	0.7 (0.18-2.77)	
T/T	12	(0.09)	3	(0.09)	1.94 (0.47-7.91)	
A/A	31	(0.23)	15	(0.44)	1	0.014 ^b
A/T + T/T	103	(0.87)	19	(0.56)	2.62 (1.1-6.19)	
T/T	12	(0.09)	3	(0.09)	1	0.59 ^c
A/T + A/A	122	(99.1)	31	(99.1)	0.9 (0.19-3.76)	
Alleles						
A	153	0.57	46	0.68	1.57 (0.87-2.87)	0.113
T	115	0.43	22	0.32	0.64 (0.35-1.16)	

a: frequencies of genotypes among cases and controls were compared using chi square test for 3 x 2 contingency tables (2df, uncorrected); b: frequencies of genotypes between cases and controls were compared using a 2 x 2 contingency table (uncorrected) in order to analyze the both A/A and T/T carries in respect to A/T + T/T and A/T + A/A, respectively; f: frequencies; OR: odds ratio; τ: Fisher exact 1-tailed p-value was used when sample size was less than 5.

et al. 1996). Resistance to ocular toxoplasmosis is associated with the ability to produce IL-12 and IFN-γ against parasitic antigens (Vallochi et al. 2002). High levels of IFN-γ have been described in both asymptomatic and symptomatic *T. gondii* seropositive individuals, compared to negative controls (Fatoochi et al. 2006). However, only a slight increase was reported in *T. gondii* asymptomatic individuals compared with individuals afflicted with acquired ocular toxoplasmosis (Yamamoto et al. 2000).

Polymorphisms in the genes encoding cytokines, including pro-inflammatory cytokines such as TNF-α, IL-6, IL-12 e IFN-γ and anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF-β, have previously been shown to be associated with several diseases (Barret et al. 2003, MacLean et al. 2004, Spriewald et al. 2005, El-Shabrawi et al. 2006, Martinez-Pomar et al. 2006). Some studies have demonstrated an association between

IFN-γ production levels and the polymorphism at the IFN-γ +874T/A position. The T/T genotype associates with high levels of IFN-γ production, A/T with medium levels and A/A with lower levels (López-Maderuelo et al. 2003, Dai et al. 2006, Henao et al. 2006). Recently, Cordeiro et al. (2008a-c) described an association between the *IL10* -1082A allele and retinochoroiditis. This study also found that the *TNF* -308G/C, *IL1A* -889C/T and *IL1B* +3954C/T alleles did not show any association with retinochoroiditis. To our knowledge, the +874T/A polymorphism in the gene encoding IFN-γ has not previously been described in toxoplasmosis. The overall distribution of this SNP has previously been described in Brazilian populations. Our results were proportionally similar to those described by Laguila Visentainer et al. 2005. They observed 30.3% of the population possessed the A/A genotype, 55% possessed the A/T genotype and 14.7% with the T/T genotype. Similarly, Matos et al. (2007) reported a 38.4%, 45% and 16.6% genotype distribution and Visentainer et al. (2008) identified a profile of 31.8%, 54% and 14.2% of each genotype. Interestingly, Amim et al. (2008) described a different profile of genotype distribution in their population (45%, 32% and 23%).

The polymorphism in IFN-γ at the +874T/A position has been previously described to associate with several diseases. The A/A genotype has been shown to be associated with hepatitis B in China, Yu et al. 2006, *Helicobacter pylori* gastritis in Italy, Zambon et al. 2005, tuberculosis in Spain (López-Maderuelo et al. 2003, type 2 diabetes mellitus in Greece (Tsiavou et al. 2005 and Wegener's granulomatosis in Germany (Spriewald et al. 2005). The A/T and T/T genotypes have been shown to associate with breast cancer in Iran (Kamali-Sarvestani et al. 2005, hepatitis C in Taiwan (Dai et al. 2006) and Hashimoto's disease in Japan (Ito et al. 2006).

Our results showed that the A/T genotype is the most frequently in both the control and ocular groups (47% of individuals in the ocular group and 67.9% in the control group). We observed a statistically significant difference in the frequencies of the A/T and A/A genotypes. This result suggests that homozygosity for the A allele is associated with susceptibility to development of ocular toxoplasmosis. It is know that the resistance to development to ocular toxoplasmosis involves the production of IL-12 and IFN-γ against parasitic antigens (Vallochi et al. 2002). Individuals with the A/A genotype produce less IFN-γ than individuals with other genotypes. Together, these facts suggest a possible mechanism that could explain the relationship between the A/A genotype and susceptibility to ocular damage leading to retinochoroiditis.

We conclude that the A/A genotype can be associated with susceptibility to ocular toxoplasmosis. Further studies involving polymorphisms in other cytokines should be performed to understand the role of the immune system in the course of *T. gondii* infection.

REFERENCES

Abreu MT, Belfort Jr R, Garcia AR, Muccioli C, Soriano E, Nussenblat R, Silveira C 1998. Toxoplasmose ocular em Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil. *Arg Bras Oftalmol* 61: 540-545.

- Amendoeira MRR. 1995. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. *An Acad Nac Med Nac* 155: 224-225.
- Amendoeira MRR, Costa T, Spalding SM. 1999. *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a toxoplasmose. *Rev Sousa Marques* 1: 15-35.
- Amim LH, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loredo CS, Rabahi MF, Melo MH, Ribeiro FC, Mello FC, Oliveira MM, Lapa E Silva JR, Ottenhoff TH, Kritski AL, Santos AR. 2008. Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep* 35: 563-566.
- Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. 2003. Polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 71: 212-218.
- Cordeiro CA, Moreira PR, Andrade MS, Dutra WO, Campos WR, Oréfice F, Teixeira AL. 2008a. Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 1979-1982.
- Cordeiro CA, Moreira PR, Costa GC, Dutra WO, Campos WR, Oréfice F, Teixeira AL. 2008b. TNF-alpha gene polymorphism (-308G/A) and toxoplasmic retinochoroiditis. *Br J Ophthalmol* 92: 986-988.
- Cordeiro CA, Moreira PR, Costa GC, Dutra WO, Campos WR, Oréfice F, Teixeira AL. 2008c. Interleukin-1 gene polymorphisms and toxoplasmic retinochoroiditis. *Mol Vis* 14: 1845-1849.
- Coutinho SG, Andrade CM, Malvar GS, Ferreira LF. 1970. Análise comparativa entre a sensibilidade da reação indireta de anticorpos fluorescentes e da reação de Sabin-Feldman na pesquisa de anticorpos séricos para a toxoplasmose. *Rev Soc Bras Med Trop* 4: 315-325.
- Dai CY, Chuang WL, Hsieh MY, Lee LP, Hou NJ, Chen SC, Lin ZY, Hsieh MY, Wang LY, Tsai JF, Chang WY, Yu ML. 2006. Polymorphism of interferon-gamma gene at position +874 and clinical characteristics of chronic hepatitis C. *Transl Res* 148: 128-133.
- El-Shabrawi Y, Wegscheider BJ, Weger M, Renner W, Posch U, Ulrich S, Ardjomand N, Hermann J. 2006. Polymorphisms within tumor necrosis factor- α promoter region in patients with HLA-B27-associated uveitis. *Ophthalmology* 113: 695-700.
- Fatoochi F, Cozon GJN, Wallon M, Kodjikian L, Peyron F. 2006. Systemic T cell response to *Toxoplasma gondii* antigen in patients with ocular toxoplasmosis. *Jpn J Ophthalmol* 50: 103-110.
- Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC, Kobilka E. 1999. Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 6: 157-163.
- Gazzinelli RT, Brézin A, Li Q, Nussenblatt RB, Chan CC. 1994. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- α and IFN- γ . *Exp Parasitol* 78: 217-229.
- Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Júnior M, Silveira S, Camargo ME, Nussenblatt RB, Kaslow RA, Belfort Júnior R. 1992. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 114: 136-144.
- Henaó MI, Montes C, Paris SC, Garcia LF. 2006. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis* 86: 11-19.
- Holland GN. 2009. Ocular toxoplasmosis: the influence of patient age. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 351-357.
- Ito C, Watanabe M, Okuda N, Watanabe C, Iwatani Y. 2006. Association between the severity of Hashimoto's disease and the functional +874A/T polymorphism in the interferon-gamma gene. *Endocr J* 53: 473-478.
- Kamali-Sarvestani E, Merat A, Talei AR. 2005. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-alpha and TNF-beta) and gamma interferon (IFN-gamma) among Iranian women with breast cancer. *Cancer Lett* 223: 113-119.
- Krick JA, Remington JS. 1978. Toxoplasmosis in the adult - an overview. *N Engl J Med* 298: 550-553.
- Laguila Visentainer JE, Lieber SR, Lopes Persoli LB, Dutra Marques SB, Vigorito AC, Penteado Aranha FJ, de Brito Eid KA, Oliveira GB, Martins Miranda EC, Bragotto L, de Souza CA. 2005. Relationship between cytokine gene polymorphisms and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in a Brazilian population. *Cytokine* 32: 171-177.
- López-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, González A, Codoceo R, Madero R, Vázquez JJ, Montiel C. 2003. Interferon- γ and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 970-975.
- Lynfield R, Guerina NG. 1997. Toxoplasmosis. *Pediatr Rev* 18: 75-83.
- Maclean L, Chisi JE, Odiit M, Gibson WC, Ferris V, Picozzi K, Sternberg JM. 2004. Severity of human african trypanosomiasis in East Africa is associated with geographic location, parasite genotype and host inflammatory cytokine response profile. *Infect Immun* 72: 7040-7044.
- Martinez-Pomar N, Raga S, Ferrer J, Pons J, Munoz-Saa I, Julia M-R, de Gracia J, Matamoros N. 2006. Elevated serum interleukin (IL)-12p40 levels in common variable immunodeficiency disease and decreased peripheral blood dendritic cells: analysis of IL-12p40 and interferon- γ gene. *Clin Exp Immunol* 144: 233-238.
- Matos GI, Covas CJ, Bittar RC, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, Amato VS, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Pirmez C, Sampaio EP, Moraes MO, Da-Cruz AM. 2007. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis* 7: 33.
- Melamed J. 1988. Peculiaridades da toxoplasmose ocular no Rio Grande do Sul. *Arq Bras Oftalmol* 51: 197-200.
- Melamed J. 2009. Contributions to the history of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 358-363.
- Montoya JD, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965-1976.
- Norose K, Aosai F, Mizota A, Yamamoto S, Mun HS, Yano A. 2005. Deterioration of visual function as examined by electroretinograms in *Toxoplasma gondii*-infected IFN-gamma-knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 317-321.
- Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee J-H, Hutchinson IV. 2000. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. *Hum Immunol* 61: 863-866.
- Rodríguez-Pérez JM, Cruz-Robles D, Hernández-Pacheco G, Pérez-Hernández N, Murguía LE, Granados J, Reyes PA, Vargas-Alarcón G. 2005. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chaga's disease. *Immunol Lett* 98: 97-102.
- Scharton-Kersten TM, Wynn TA, Denkers EY, Bala S, Grunwald E, Hieny S, Gazzinelli RT, Sher A. 1996. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J Immunol* 157: 4045-4054.
- Smith RE, Ganley JP. 1972. Presumed ocular histoplasmosis I, histoplasmin skin test sensitivity in cases identified during a community survey. *Arch Ophthalmol* 87: 245-250.
- Sobral CA, Amendoeira MR, Teva A, Patel BN, Klein CH. 2005. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. *Am J Trop Med Hyg* 72: 37-41.

- Spriewald BM, Witzke O, Wassmuth R, Wenzel RR, Arnold ML, Philipp T, Kalden JR 2005. Distinct tumor necrosis factor alpha, interferon gamma, interleukin 10 and cytotoxic T cell antigen 4 gene polymorphisms in disease occurrence and end stage renal disease in Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 64: 457-461.
- Suzuki Y, Conley FK, Remington JS 1989. Importance of endogenous IFN- γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol* 143: 2045-2050.
- Tsiavou A, Hatzigelaki E, Chaidaroglou A, Koniavitou K, Degiannis D, Raptis AS 2005. Correlation between intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) production by CD4+ and CD8+ lymphocytes and IFN-gamma gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes of adults (LADA). *Cytokine* 31: 135-141.
- Uchôa CMA, Duarte R, Laurentino-Silva V, Alexandre GMC, Ferreira HG, Amendoeira MRR 1999. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 661-669.
- Vallochi AL, Nakamura MV, Schlesinger D, Martins MC, Silveira C, Belfort Jr R, Rizzo LV 2002. Ocular toxoplasmosis: more than just what meets the eye. *Scand J Immunol* 55: 324-328.
- Visentainer JE, Sell AM, Silva GC, Cavichioli ADG, Franceschi DSA, Lieber SR, Souza CA 2008. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphism in South and Southeast Brazil. *Int J Immunogenet* 35: 287-293.
- Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, Filho JK, Nussenblatt RB, Cunha-Neto E, Gazzinelli RT, Belfort R Jr, Rizzo LV 2000. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *J Infect Dis* 181: 2018-2022.
- Yu H, Zhu QR, Gu SQ, Fei LE 2006. Relationship between IFN- γ gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. *World J Gastroenterol* 12: 2928-2931.
- Zambon CF, Basso D, Navaglia F, Belluco C, Falda A, Fogar P, Greco E, Gallo N, Rugge M, Di Mario F, Plebani M 2005. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. *Cytokine* 29: 141-152.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu MT, Belfort JrR, Garcia AR, Muccioli C, Soriano E, Nussenblat R, Silveira C 1998. Toxoplasmose ocular em Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil. *Arq Bras Oftal* 61:540-545.

Abu-Madi MA, Al-Molawi N, Behnke JM 2008. Seroprevalence and epidemiological correlates of *Toxoplasma gondii* infections among patients referred for hospital-based serological testing in Doha, Qatar. *Parasit Vectors* 1:39

Adams L, Hibbs J, Taintor R, Krahenbuhl J 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 144:2725-2729.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.

Albuquerque MC, Aleixo AL, Benchimol EI, Leandro AC, das Neves LB, Vicente RT, Bonecini-Almeida Mda G, Amendoeira MR 2009. The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:451-5.

Aldebert D, Durand F, Mercier C, Brenier-Pinchart M, Cesbron- Delauw MF, Pelloux H 2007. *Toxoplasma gondii* triggers secretion of interleukin-12 but low level of interleukin-10 from the THP-1 human monocyte cell line. *Cytokine* 37: 206-211.

Aleixo AL, Benchimol EI, Neves Ede S, Silva CS, Coura LC, Amendoeira MR 2009. Frequency of lesions suggestive of ocular toxoplasmosis among a rural population in the State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 42:165-169.

Amato Neto V, Campos R, Barazzi RG, Duarte MIS 1982. Toxoplasmose. São Paulo: Ed. Savier.

Ambroise-Thomas P, Pelloux H 1993. Toxoplasmosis – congenital and in immunocompromised patients: A parallel. *Parasitol Today* 9:61-63.

Amendoeira MRR 1995. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. *An Acad Nac Med Nac* 155: 224-225.

Amendoeira MRR, Camillo-Coura LF 2010. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. *Scientia Medica* 20.

Amendoeira MRR, Costa T, Spalding SM 1999. *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (apicomplexa: sarcocystidae) e a toxoplasmose. *Rev Sousa Marques* 1: 15-35.

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporeponsiveness in humans. *Nat Genet* 25:187-91.

Awad HH, Stanbury DM 1993. Autoxidation of NO in aqueous solution. *Int J Chem Kinet* 25:375–381.

Bagarolli RA, Saad MJ, Saad ST 2010. Toll-like receptor 4 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms are associated with Type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 24:192-198.

Benchimol, E, Moreira, RB. Toxoplasmose Ocular 1995. *An Acad Nac Med* 155: 226-228.

Black MW, Boothroyd JC 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:607-623.

Bonfioli AA, Orefice F 2005. Toxoplasmosis. *Semin Ophthalmol* 20:129-141.

Brown CR, Mcleod R 1990. Class I MHC and CD8+ cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 145: 3438-3441.

Burg JL, Grover, CM, Pouletty P, Boothroyd JC 1989. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain-reaction. *J Clin Microbiol* 27:1787–1792.

Cabrera M, Shaw M, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blacwell JM 1995. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 182:1259-1264.

Calabrese KS, Tedesco RC, Zaverucha do Valle T, Barbosa HS 2008. Serum and aqueous humour cytokine response and histopathological alterations during ocular *Toxoplasma gondii* infection in C57BL/6 mice. *Micron* 39:1335-1341

Calzada JE, Beraún Y, González CI, Martín J 2009. Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine* 45:149-153.

Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SM, Ribeiro-Alves M, Nery JA, Francio ÂS, Vanderborght PR, Parelli FP, Alter A, Salgado JL, Sampaio EP, Santos AR, Oliveira ML, Sarno EN, Schurr E, Mira MT, Pacheco AG, Moraes MO 2011. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis* 204:1256-1263.

Carvalho CMCN, Farhat CK 1999. Toxoplasmose adquirida. *J Pediatr* 75: S63-S67.

Cavalier-Smith T 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Ver* 57:953-994.

Chevillard C, Moukoko CE, Elwali N-EMA, Bream JH, Kouriba B, Argiro L, Rahoud A, Mergani A, Henri S, Gaudart J, Mohamed-Ali Q, Young HA, Dessein AJ 2003. IFN- γ polymorphisms (IFN- γ +2109 and IFN- γ +3810) are associated with severe hepatic fibrosis in human hepatic schistosomiasis (*Schistosoma mansoni*). *J Immunol* 171:5596-5601.

Claudino M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB Jr, Martins W Jr, Assis GF, Santos CF, Trevilatto PC, Campanelli AP, Silva JS, Garlet GP 2008. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol* 84:1565-73.

Coia V, Jülinger S, Mordmüller B, Kreidenweis A, Stroh AL, Ortega C, Vindigni A, Dengjel J, Lukyanov DV, Destro-Bisol G, Fedorov A, Podgornaya OI, Kun JF 2005. Analysis of polymorphic sites in the promoter of the nitric oxide synthase 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 335:1123-1131.

Cordeiro CA, Moreira PR, Costa GC, Dutra WO, Campos WR, Oréfice F, Teixeira AL 2008a. TNF-alpha gene polymorphism (-308G/A) and toxoplasmic retinochoroiditis. *Br J Ophthalmol* 92:986-988.

Cordeiro CA, Moreira PR, Costa GC, Dutra WO, Campos WR, Oréfice F, Teixeira AL 2008b. Interleukin-1 gene polymorphisms and toxoplasmic retinochoroiditis. *Mol Vis* 14:1845-1849.

Cordeiro CA, Moreira PR, Andrade MS, Dutra WO, Campos WR, Oréfice F, Teixeira AL 2008c. Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1979-1982.

Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, Dutra WO 2009. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis* 199:451-454.

Coutinho SG, Garcia AP, Amendoeira MRR, Assumpção MR, Albano N 1983. Detection of newborn infants for congenital toxoplasmosis in Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 25: 25-30.

Cruz-Robles D, Chávez-González JP, Cavazos-Quero MM, Pérez-Méndez O, Reyes PA, Vargas-Alarcón G 2009. Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility. *Immunol Invest* 38:231-239.

da Silva GN, Bacchi MM, Rainho CA, de Oliveira DE 2007. Epstein-Barr virus infection and single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin 10 gene in patients with Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 131:1691-1696.

Dabbagh K, Lewis DB 2003. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Curr Opin Infect Dis* 16:199-204.

de Medeiros BC, de Medeiros CR, Werner B, Loddo G, Pasquini R, Bleggi-Torres LF 2001. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. *Transpl Infect Dis* 3:24-28.

de Sá AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, Gomez RS 2007. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *Int Endod J* 40:563-572.

Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, Mansur DS, Weingart R, Schmidt RR, Golenbock DT, Gazzinelli RT, Schwarz RT

2007. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 179:1129-1137.

Deckert-Schlüter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H, Schlüter D 1998. Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *J Immunol* 160:3427-3436.

Deckert-Schlüter M, Buck C, Weiner D, Kaefer N, Rang A, Hof H, Wiestler OD, Schlüter D 1997. Interleukin-10 downregulates the intracerebral immune response in chronic *Toxoplasma* encephalitis. *J Neuroimmunol* 76: 167-176.

Delaney NL, Esquenazi V, Lucas DP, Zachary AA, Leffel MS. TNF- α , TGF- β , IL-10 and INF- γ alleles among Africans Americans and Cuban Americans 2004. Report of the ASHI minority workshops: part IV. *Hum Immunol* 65:1413-1419.

Delascio D 1954. Toxoplasmose congenital (aspectos clínicos, obstétricos e experimentais). *Mat e Inf* 15:179-532.

Derouin F, Devergie A, Auber P, Gluckman E, Beauvais B, Garin YJF, Larivieri M 1992. Toxoplasmosis in bone marrow – transplant recipients: Report of seven cases and review. *Clin Infect Dis* 15:267-270.

Dogruman-AI F, Fidan I, Celebi B, Yesilyurt E, Erdal B, Babur C, Kustimur S 2011. Cytokine profile in murine toxoplasmosis. *Asian Pac J Trop Med* 4:16-19.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK 1970. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc* 157:1767-1770.

Dubey JP & Desmonts G 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet. J* 19:337–339.

Dubey JP, Thulliez P, Weigel RM, Andrews, CD, Lind P, Powell, EC 1995. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am J Vet Res* 56:1030–1036.

Dubey JP 1997. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. *Vet. Parasitol* 71:307–310.

Dubey JP, Jones JL 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol* 38:1257-1278.

Egan CE, Sukhumavasi W, Butcher BA, Denkers EY 2009. Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. *Clin Exp Immunol* 156:17-24.

Eichenwald HF 1948. Experimental toxoplasmosis. I- Transmission of the infection in utero and through the milk of lactating female mice. *Am J Dis Child* 76: 307-335.

Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G 1997. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 46:120-128.

Falcai A 2006. Associação entre polimorfismos em genes da resposta imune e o desenvolvimento da toxoplasmose ocular [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo.

Fatoochi F, Cozon GJN, Wallon M, Kodjikian L, Peyron F 2006. Systemic T cell response to *Toxoplasma gondii* antigen in patients with ocular toxoplasmosis. *Jpn J Ophthalmol* 50: 103-110.

Ferreira IM, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, Penalva de Oliveira AC, Pereira-Chiocola VL 2008. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from

Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol* 118:221-227.

Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, Van der Meer JW, Netea MG 2008. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med* 14:346-352.

Filho R, Zilberstein B 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev Ass Med Brasil* 46: 265-271.

Filisetti D, Candolfi E 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita* 40:71-80.

Frade AF, Oliveira LC, Costa DL, Costa CH, Aquino D, Van Weyenbergh J, Barral-Netto M, Barral A, Kalil J, Goldberg AC 2011. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Genet Evol* 11:912-916.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167:893-896.

Frenkel JK, Dubey JP 1972. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J Infect Dis* 126:664 - 673.

Furuta T, Kikuchi T, Akira S, Watanabe N, Yoshikawa Y 2006. Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4 – mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis. *Int Immunol* 18:1655-1662.

Gadelha SR, Junior Alcântara LC, Costa GC, Acosta AX, Rios D, Kashima S, Covas DT, Galvão-Castro B 2008. Correlation between polymorphisms at interleukin-6 but not at interleukin-10 promoter and the risk of human T

lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazilian individuals. *J Med Virol* 80:2141-6.

Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC, Kobilka E 1999. Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 6:157-163.

Garweg JG 2005. Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol* 27:61-68.

Gazzinelli RT, Denkers EY, Sher A 1993. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: a model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. *Infect Agents Dis* 2:139–149.

Gazzinelli RT, Brézin A, Li Q, Nussenblatt RB, Chan CC 1994. *Toxoplasma gondii*: Acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF- α and IFN- γ . *Exp Parasitol* 78:217-229.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A 1996. 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 . *J Immunol* 157:798–805

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Júnior M, Silveira S, Camargo ME, Nussenblatt RB, Kaslow RA, Belfort Júnior R 1992. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 114: 136-144.

Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP 2001. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *JID* 184:633-639.

Hayashi S, Chan CC, Gazzinelli RT, Pham NT, Cheung MK, Roberge FG 1996. Protective role of nitric oxide in ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 80:644-648.

Hananantachai H, Patarapotikul J, Ohashi J, Naka I, Krudsood S, Looareesuwan S, Tokunaga K 2007. Significant association between TNF-alpha (TNF) promoter allele (-1031C, -863C, and -857C) and cerebral malaria in Thailand. *Tissue Antigens* 69:277-280.

Hartl DL, Clark AG 2010. *Principios de genética de populações*. Vol. Único, Artmed, Porto Alegre, 660p.

Hegab SM, Al-Mutawa SA 2003. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clin Exp Med* 3:84-105.

Hiramoto RM, Mayrbauri-Borges M, Galisteo AJ Jr, Meireles LR, Macre MS, Andrade HF Jr 2001. Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. *Rev Saude Publica* 35:113-118.

Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, Booth J, Roberts JM, Tkachuk AN, Pole A, Coon H, Kariuki S, Nahlen BL, Mwaikambo ED, Lal AL, Granger DL, Anstey NM, Weinberg JB 2002. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* 360:1468-1475.

Hogan MJ 1951. *Ocular Toxoplasmosis*. Columbia University Press, New York.

Holland GN 2003. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol* 136:973-988.

Howe DK, Sibley LD 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172:1561-1566.

Howe DK 1997, Honoré S, Derouin F, Sibley D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35:411– 414.

Hutchison WM, Dunachie JF, Work K, Siim JC 1971. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65:380–399.

IBGE 2012. Retirado de <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em 03.01.2012.

Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not to nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8103–8107.

Ishizuka MM 1978. Avaliação da frequência de reagentes ao *Toxoplasma gondii*, pela prova de imunofluorescência indireta (anti-IgG), em magarefes. *Rev Fac Med Vet Zootec Univ São Paulo* 15:155-158.

Iwasaki A, Medzhitov R 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-995,.

Jacobs L, Melton ML 1966. Toxoplasmosis in chickens. *J Parasitol* 52:1158-1162.

Jamieson SE, de Roubaix LA, Cortina-Borja M, Tan HK, Mui EJ, Cordell HJ, Kirisits MJ, Miller EN, Peacock CS, Hargrave AC, Coyne JJ, Boyer K, Bessieres MH, Buffolano W, Ferret N, Franck J, Kieffer F, Meier P, Nowakowska DE, Paul M,

Peyron F, Stray-Pedersen B, Prusa AR, Thulliez P, Wallon M, Petersen E, McLeod R, Gilbert RE, Blackwell JM 2008. Genetic and epigenetic factors at COL2A1 and ABCA4 influence clinical outcome in congenital toxoplasmosis. *PLoS One* 3:e2285.

Jamieson SE, Cordell H, Petersen E, McLeod R, Gilbert RE, Blackwell JM. Host genetic and epigenetic factors in toxoplasmosis 2009. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:162-169.

Jamieson SE, Peixoto-Rangel AL, Hargrave AC, Roubaix LA, Mui EJ, Boulter NR, Miller EN, Fuller SJ, Wiley JS, Castellucci L, Boyer K, Peixe RG, Kirisits MJ, Elias Lde S, Coyne JJ, Correa-Oliveira R, Sautter M, Smith NC, Lees MP, Swisher CN, Heydemann P, Noble AG, Patel D, Bardo D, Burrowes D, McLone D, Roizen N, Withers S, Bahia-Oliveira LM, McLeod R, Blackwell JM 2010. Evidence for associations between the purinergic receptor P2X(7) (P2RX7) and toxoplasmosis. *Genes Immun* 11:374-383.

Jamra LMF 1964. Contribuição para epidemiologia da toxoplasmose: inquérito em 100 famílias de uma área da cidade de São Paulo. São Paulo. Tese (Doutorado em Medicina), Faculdade de Medicina de São Paulo, São Paulo.

Janku J, 1923. Pathogenesa a pathologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolombu zřluté skvrny voku normálné velikem a microphthalmickém snalezem parazitu v sítnici. Časopis lékařů český [Pathogenesis and pathologic anatomy of the “congenital coloboma” of the macula lutea in an eye of normal size , with microscopic detection of parasites in the retina] 62, 1021–1027, 1052–1059, 1081–1085, 1111–1115, 1138–1143 (Versão em Inglês em: Janku J, 1959. *Cesk Parasitol* 6:9–58).

Jones SR 1973. Toxoplasmosis: a review. *J Am Vet Med Ass* 163:1038–1042.

Jones J, Lopez A, Wilson M 2003. Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Physician* 67:2131–2138.

Jones IA, Alexander J, Roberts W 2006. Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. *Parasite Immunol* 28:635–642.

Jorge YC, Duarte MC, Silva AE 2010. Gastric cancer is associated with NOS2 - 954G/C polymorphism and environmental factors in a Brazilian population. *BMC Gastroenterol* 10:64.

Kamali-Sarvestani E, Rasouli M, Mortazavi H, Gharezi-Fard B 2006. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. *Cytokine* 35:159-165.

Karaman U, Çelik T, Kiran TR, Colak C, Daldal NU 2008. Malondialdehyde, Glutathione, and Nitric Oxide Levels in *Toxoplasma gondii* Seropositive Patients. *Korean J Parasitol* 46:293-295.

Kawai T and Akira S 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373–384.

Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort R Jr, Vitor RW, Silveira C, Sibley LD 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 12:942-949.

Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol* 41:645-55.

Koch O, Awomoyi A, Usen S, JAllow M, Richardson A, Hull J, Pinder M, Newport M, Kwiatkowski D 2002. IFNGR1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to cerebral malaria. *J Infect Dis* 185:1684-1687.

Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5:834–842.

Kravetz JD, Federman DG 2005. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med* 118: 212-216.

Krick JA, Remington JS 1978. Toxoplasmosis in the adult – an overview. *N Engl J Med* 298:550-553.

Kun JF, Mordmüller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg JB, Kremsner PG 2001. Nitric oxide synthase 2(Lambaréné) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis* 184:330-336.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973–983.

Levaditi C, 1928a. Au sjet de certaines protozooses hereditaires humaines a localizations oculaires et nerveuses. *CR Soc Biol* 98:297–299.

Levaditi C, Schoen R, Sanchis Bayarri V 1928b. L'encéphalo-myélite toxoplasmique chronique du lapin et de la souris. *CR Soc Biol* 99:37–40.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V,

Vavra J, Wallace FG 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 27:37-58.

Li JR, Gong RY, Li YP, Bai Y, You F, Deng S 2010. Research on HIV/*Toxoplasma gondii* co-infection and cytokine levels among intravenous drug users. *Parasite Immunol* 32:161-164.

Liesenfeld O 1999. Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology* 201:229-239.

Lio D, Marino V, Serauto A, Gioia V, Scola L, Crivello A, Forte GI, Colonna-Romano G, Candore G, Caruso C 2002. Genotype frequencies of the +874TA single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- γ gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur J Immunogenet* 29:371-374.

Luft BJ, Remington JS 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clinical Infectious Disease* 15:211-222.

Lynfield R, Guerina, NG 1997. Toxoplasmosis. *Pediatr Rev* 18:75-83.

Macedo LC, Isolani AP, Visentainer JE, Moliterno RA 2010. Association of cytokine genetic polymorphisms with the humoral immune response to recombinant vaccine against HBV in infants. *J Med Virol* 82:929-933.

Magalhães RF, Biral AC, Pancoto JA, Donadi EA, Mendes CT Jr, Magna LA, Kraemer MH 2010. Human leukocyte antigen (HLA) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) tumor necrosis factor (TNF)-alpha -238 and -308 as genetic markers of susceptibility to psoriasis and severity of the disease in a long-term follow-up Brazilian study. *Int J Dermatol* 49:1133-1140.

Marana ERM, Venturini ACH, Freire RL, Vidotto O, Navarro IT 1995. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em rebanhos de bovinos de leite do norte do Paraná – Brasil. *Semina: Ciências Agrárias* 16:40-42.

Martinez-Pomar N, Raga S, Ferrer J, Pons J, Munoz-Saa I, Julia M-R, de Gracia J, Matamoros N 2006. Elevated serum interleukin (IL)-12p40 levels in common variable immunodeficiency disease and decreased peripheral blood dendritic cells: analysis of IL-12p40 and interferon- γ gene. *Clin Exp Immunol* 144:233-238.

Masur H, Jones TC, Lempert JA, Cherubini TD 1978. Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinichoroiditis. *Am J Med* 64:396 – 402.

Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH, Abramson MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF-alpha polymorphisms and airway disease 2006. *J Hum Genet* 51:196-203.

Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Kemonia H 2009. Does *Toxoplasma gondii* infection affect the levels of IgE and cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha)? *Clin Dev Immunol* 2009:374696.

Maubon D, Ajzenberg D, Brenier-Pinchart MP, Dardé ML, Pelloux H 2008. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol* 24:299-303.

McGuire W, Knight JC, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D 1999. Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *J Infect Dis* 179:287-290.

Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, Vallinoto AC, Póvoa MM, Silva JS, Cunha MG 2011. Increased interleukin-10 and interferon-

γ levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar J* 10:264.

Melamed J 1988. Peculiaridades da toxoplasmose ocular no Rio Grande do Sul. *Arq Bras Oftal* 51:197-200.

Melo Barbosa HP, Martins LC, Dos Santos SE, Demachki S, Assumpção MB, Aragão CD, de Oliveira Corvelo TC 2009. Interleukin-1 and TNF-alpha polymorphisms and *Helicobacter pylori* in a Brazilian Amazon population. *World J Gastroenterol* 15:1465-1471.

Miranda KM, Espey MG, Wink DA 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5:62-71.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.

Montoya JD, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet* 363:1965-1976.

Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Ottenhoff TH, Moraes ME, Moraes JR, Sampaio EP, Sarno EN, Huizinga TW 2003. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. *Immunogenetics* 54:896-899.

Mordue DG, Monroy F, Regina M, Dinarello CA, Sibley LD 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol* 167:4574-4584.

Moura E, Mattar R, de Souza E, Torloni MR, Gonçalves-Primo A, Daher S 2009. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. *J Reprod Immunol* 80:115-121.

Mozzatto L, Soibelman Procianov R 2003. Incidence of congenital toxoplasmosis in Southern Brazil: a prospective study. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 45: 147:151.

Mun HS, Aosai F, Norose K, Chen M, Piao LX, Takeuchi O, Akira S, Ishikura H, Yano A 2003. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int Immunol* 15:1081-1087.

Murray HW, Cohn ZA 1979. Macrophage oxygen-dependent anti microbial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. *J Exp Med* 150:938-949.

Ndamba J, Gomo E, Nyazema N, Makaza N, Kaondera KC 1997. Schistosomiasis infection in relation to the ABO blood groups among school children in Zimbabwe. *Acta Trop* 65:181-190.

Nelson JC, Kauffmann DJ, Ciavarella D, Senisi WJ 1989. Acquired toxoplasmic retinochoroiditis after platelet transfusions. *Ann Ophthalmol* 21:253-254.

Neves ES, Bicudo LN, Curi AL, Carregal E, Bueno WF, Ferreira RG, Amendoeira MR, Benchimol E, Fernandes O 2009. Acute acquired toxoplasmosis: clinical-laboratorial aspects and ophthalmologic evaluation in a cohort of immunocompetent patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:393-396

Neves ES, Curi ALL, Albuquerque MC, Palhano-Silva CS, Silva IB, Bueno WF, Amendoeira MRR, Bonecini-Almeida MG, Fernandes-Filho O. Genetic polymorphism for INFG (+874) in patients with acute toxoplasmosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. *Aceito para publicação em 2012*.

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17:2503-2516.

Neyer LE, Grunig G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA 1997. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 65:1675-1682.

Nicolle C, Manceaux L 1908. Sur un protozoaire nouveau du gondii. *C R Acad Sci (Paris)* 147:763–766.

Nicolle C, Manceaux L 1909. Sur un infection à corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. *C R Seances Acad Sci* 147:763– 766.

Norose K, Mun HS, Aosai F, Chen M, Piao LX, Kobayashi M, Iwakura Y, Yano A 2003. IFN- γ -regulated *Toxoplasma gondii* distribution and load in the murine eye. *IOVS* 44:4375-4381.

Norose K, Aosai F, Mizota A, Yamamoto S, Mun HS, Yano A 2005. Deterioration of visual function as examined by eletroretinograms in *Toxoplasma gondii*-infected IFN- γ -knockout mice. *IOVS* 46:317-321.

Oliveira MM, Silva JCS, Costa JF, Amim LH, Loredó CCS, Melo H, Queiroz LF, Mello FCQ, Lapa e Silva JR, Kritski AL, Santos AR 2004. Distribuição de Polimorfismos de Base única (SNPs) no gene de TNF- α (-238/-308) entre pacientes com TB e outras pneumopatias: marcadores genéticos de susceptibilidade a ocorrência de TB? *J Bras Pneumol* 30:371-377.

.

Peixoto-Rangel AL, Miller EN, Castellucci L, Jamieson SE, Peixe RG, Elias Lde S, Correa-Oliveira R, Bahia-Oliveira LM, Blackwell JM 2009. Candidate gene analysis

of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:1187-1190.

Pelloux H, Chumpitazi BF, Santoro F, Polack B, Vuillez JP, Ambroise-Thomas P 1992. Sera of patients with high titers of immunoglobulin G against *Toxoplasma gondii* induce secretion of tumor necrosis factor alpha by human monocytes. *Infect Immun* 60:2672-2676.

Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV 1998. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol* 6:193-197.

Pfefferkorn ER, Rebhun S, Eckel M 1986. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma- interferon in cultured human fibroblasts. *J Interferon Res* 6:267-279.

Pifer R, Benson A, Sturge CR, Yarovinsky F 2011. UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 286:3307-3314.

Pinkerton H & Weinman D 1940. *Toxoplasma* infection in man. *Arch Pathol* 30:374–392.

Pinkerton H, Henderson RG 1941. Adult toxoplasmosis: a previously unrecognized disease entity simulating the Typhus-spotted fever group. *JAMA* 116: 807–814.

Pissetti CW, Correia D, de Oliveira RF, Llaguno MM, Balarin MA, Silva-Grecco RL, Rodrigues V Jr 2011. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e976.

Plothow A, Benvenuto R, Contieri FL, Bicalho MG 2003. Frequencies at three polymorphic sites of interleukin-10 gene promoter in Brazilian renal recipients. *Transplant Proc* 35:2908-2910.

Pyo C-W, Hur S-S, Kim Y-K, Choi H-B, Hong Y-S, Kim D-W, Kim C-C, Kim H-K, Kim T-G 2003. Polymorphisms of IL-1B, IL-1RN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IFN- γ genes in the Korean population. *Hum Immunol* 64:979-989.

Quinnell RJ 2003. Genetics of susceptibility to human helminth infection. *Int J Parasitol* 33:1219-1231.

Reid CL, Perrey C, Pravica V, Hutchinson IV, Campbell IT 2002. Genetic variation in proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 30:2216-2221.

Remington JS, Melton ML, Jacobs L 1960. Chronic *Toxoplasma* infection in the uterus. *J Lab Clin Med* 56:879-883.

Remington JS, Miller MJ, Brownlee IE 1968. IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II. Prevalence and significance in acquired cases. *J Lab Clin Med* 71:855-866.

Resende RG, Correia-Silva Jde F, Arão TC, Silva TA, Abreu MH, Bittencourt H, Gomez RS 2010. Investigation of functional IL-10 gene polymorphism and IL-10 levels in acute graft-versus-host disease. *J Clin Immunol* 30:465-473.

Ribeiro CS, Visentainer JE, Moliterno RA 2007. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:435-440.

Roberts C, Cruickshank S, Alexander J 1995. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infect Immun* 63:2549-2555.

Roberts F, Roberts CW, Ferguson DJ, McLeod R 2000. Inhibition of nitric oxide production exacerbates chronic ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol* 22:1-5.

Rodríguez-Pérez JM, Cruz-Robles D, Hernández-Pacheco G, Pérez-Hernández N, Murguía LE, Granados J, Reyes PA, Vargas-Alarcón G 2005. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett* 98:97-102.

Sabin AB & Olitsky PK 1937. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science* 85:336–338.

Sabin AB 1942. Toxoplasmosis: a recently recognized disease of human beings. *Adv Pediatr* 1:1–53.

Sabin AB & Feldman HA 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108:660–663.

Sales ML, Schreiber R, Ferreira-Sae MC, Fernandes MN, Piveta C, Cipolli JA, Calixto A, Matos-Souza JR, Geloneze B, Franchini KG, Nadruz W Jr 2010. The functional Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with lower left ventricular mass in hypertensive women. *Clin Chim Acta* 411:744-748.

Salhi A, Rodrigues V Jr, Santoro F, Dessein H, Romano A, Castellano LR, Sertorio M, Rafati S, Chevillard C, Prata A, Alcaïs A, Argiro L, Dessein A 2008. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* 180:6139-6148.

Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN 2002. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 186:1687-1691.

Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, Medzhitov R, Sher A 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol* 168:5997-6001.

Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR 2004. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 31:443-448.

Schluter D, Deckert-Schluter M, Lorenz E, Meyer T, Rollinghoff M, Bogdan C 1999. Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. *J Immunol* 162:3512-3518.

Schlüter D, Kwok LY, Lütjen S, Soltek S, Hoffmann S, Körner H, Deckert M 2003. Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *J Immunol* 170:6172-6182.

Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A 2002. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem* 48:1661-1667.

Schwartz DA, Cook DN 2005. Polymorphisms of the Toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis* 41:S403-407.

Segal S, Hill AVS 2003. Genetic susceptibility to infectious disease. *Trends Microbiol* 11:445-448.

Sibley LD, Mordue DG, Su C, Robben PM, Howe DK 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Phil Trans R Soc Lond B* 357:81-88.

Siegel SE, Lunde MN, Gelderman AH, Halterman RH, Brown JA, Levine AS, Graw RG Jr 1971. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood* 37:388-394.

Silva NM, Vieira JC, Carneiro CM, Tafuri WL 2009. *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. *Exp Parasitol* 123:65-72.

Silveira C, Belfort Jr R, Muccioli C, Abreu MT, Martins MC, Victoria C, Nussenblatt RB, Holland GN 2001. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 131:351–354.

Silveira C, Belfort R, Burnier M, Nussenblatt R 1988. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. *Am J Ophthalmol* 106:362-364.

Sim JC 1956. Toxoplasmosis acquisita lymphonodosa; clinical and pathological aspects. *Ann NY Acad Sci* 64:185–206.

Soares JA, Násser LS, Carvalho SF, Caldeira AP 2011. Ocular findings in children with congenital toxoplasmosis. *Arq Bras Oftalmol* 74:255-257.

Sobral CA, Amendoeira MR, Teva A, Patel BN, Klein CH 2005. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. *Am J Trop Med Hyg* 72:37-41.

Spalding SM, Amendoeira MRR, Ribeiro LC, Silveira C, Garcia AP, Camillo-Coura L 2003. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 36:483-491.

Splendore, A. 1908. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. Incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Scient São Paulo* 3:109–112.

Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley LD 2002. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10753-10758.

Sukhumavasi W, Egan CE, Warren AL, Taylor GA, Fox BA, Bzik DJ, Denkers EY 2008. TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral *toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. *J Immunol* 181:3464-3473.

Sukthana Y 2006. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends Parasitol* 22:137-142.

Sullivan WJ Jr, Jeffers V 2011. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev*.

Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240:516-518.

Suzuki Y, Conley FK, Remington JS 1989. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol* 143:2045-2050.

Suzuki Y, Kang H, Parmley S, Lim S, Park D 2000. Induction of tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase fails to prevent toxoplasmic encephalitis in the absence of interferon-gamma in genetically resistant BALB/c mice. *Microbes Infect* 2:455-462.

Suzuki Y 2002. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. *J Infect Dis* 186: 234-240.

Tedesco RC, Smith RL, Corte-Real S, Calabrese KS 2004. Ocular toxoplasmosis: the role of retinal pigment epithelium migration in infection. *Parasitol Res* 92:467-472.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217-1258.

Torre D, Zeroli C, Ferrario G, Pugliese A, Speranza F, Orani A, Casari S, Bassi P, Poggio A, Carosi GP, Fiori GP 1999. Levels of nitric oxide, gamma interferon and interleukin-12 in AIDS patients with toxoplasmic encephalitis. *Infection* 27: 218.

Torres CM 1927. Morphologie d'un nouveau parasite de l'homme, Encephalitozoon chagasi, N. sp., observe dans un cas de meningo-encephalo-myelite congenitale avec myosite et myocardite. *CR Soc Biol* 97:1787-1790.

Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González CI, González A, Martín J 2009. Association of the macrophage migration inhibitory factor -173G/C polymorphism with Chagas disease. *Hum Immunol* 70:543-546.

Trinchieri G, Sher A 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.

Uchôa CMA, Duarte R, Laurentino-Silva V, Alexandre GMC, Ferreira HG, Amendoeira MRR 1999. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. *Rev Soc Bras Med Trop* 32:661-669.

Vallochi AL, Nakamura MV, Schlesinger D, Martins MC, Silveira C, Belfort Jr R, Rizzo LV 2002. Ocular toxoplasmosis: more than just what meets the eye. *Scand J Immunol* 55:324-328.

Vallochi AL, Muccioli C, Martins MC, Silveira C, Belfort Jr R, Rizzo LV 2005a. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am J Ophthalmol* 139:350-351.

Vallochi AL, da Silva Rios L, Nakamura MV, Silveira C, Muccioli C, Martins MC, Belfort R Jr, Rizzo LV 2005b. The involvement of autoimmunity against retinal antigens in determining disease severity in toxoplasmosis. *J Autoimmun* 24:25-32.

Vallochi AL, Goldberg AC, Falcai A, Ramasawmy R, Kalil J, Silveira C, Belfort R, Rizzo LV 2008. Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and guest behaving badly. *Clin Ophthalmol* 2:837-848.

Visentainer JE, Sell AM, da Silva GC, Cavichioli AD, Franceschi DS, Lieber SR, de Souza CA 2008. TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil. *Int J Immunogenet* 35:287-293.

Wang Y, Mardsen PA 1995. Nitric oxide synthases: Biochemical and molecular regulation. *Curr Opin Nephrol Hypert* 4: 12-22.

Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WCJ, Perrey C, Zondervan PE, Kap M, Kwekkeboom J, Ijzermans JNM, Tilanus HW, Pravica V, Hutchinson IV, Bouma GJ 2003. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl* 9:170-181.

Weiss LM, Dubey JP 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 39:895-901.

Welch SG, McGregor IA, Williams K. The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West Africans. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977;71(4):295-6.

Werling D, Jungi TW 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 91:1-12.

Wichroski MJ, Ward GE 2003. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol is essential to the survival of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* 2:1132-1136.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW 1997. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3195-3199.

Wilson EH, Wille-Reece U, Dzierszynski F 2005. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol* 165:63-74.

Wolf A, Cowen D 1937. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. *Bull Neur Inst NY* 6:306–371.

Wolf A, Cowen D, Paige, B, 1939a. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science* 89:226–227.

Wolf A, Cowen D, Paige BH 1939b. Toxoplasmic encephalomyelitis. III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. *Am J Pathol* 15:657–694.

Wong S, Remington, JS 1994. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis* 18: 853-862.

Work K, Hutchison WM 1969. A new cysts form of *Toxoplasma gondii*. *Acta Path Microbiol Scand* 221:51.

Xavier GM, de Sá AR, Guimarães AL, da Silva TA, Gomez RS 2007. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 36:476-481.

Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, Filho JK, Nussenblatt RB, Cunha-Neto E, Gazzinelli RT, Belfort R Jr, Rizzo LV 2000. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *J Infect Dis* 181:2018-2022

Yap GS, Scharon-Kersten T, Charest H, Sher A 1998. Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *J Immunol* 160:1340-1345.

Yap GS, Shaw MH, Ling Y, Sher A 2006. Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect* 8:1174-1178.

Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29:E88-8.

Zanetti L, Pletsch UM 2007. Prevalência de toxoplasmose ocular em um consultório oftalmológico do Município de Ijuí-RS. *Revista Contexto & Saúde* 7:15-20.

Zhang L, Prather D, Vanden Eng J, Crawford S, Kariuki S, ter Kuile F, Terlouw D, Nahlen B, Lal AA, Slutsker L, Udhayakumar V, Shi YP 2010. Polymorphisms in genes of interleukin 12 and its receptors and their association with protection against severe malarial anaemia in children in western Kenya. *Malar J* 9:87.