



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde**

GERALDO MAGELA DE FARIA JUNIOR

**Avaliação dos Polimorfismos CCR5 Δ 32 e
CCR5 59029 A/G na Toxoplasmose Ocular**

**São José do Rio Preto
2018**

GERALDO MAGELA DE FARIA JUNIOR

**Avaliação dos Polimorfismos CCR5 Δ 32 e
CCR5 59029 A/G na Toxoplasmose Ocular**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de São José do Rio
Preto para a obtenção do título do
Mestre no curso de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde. Eixo temático:
Medicina e Ciências Correlatas.**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

**São José do Rio Preto
2018**

Faria Junior, Geraldo Magela
Avaliação dos Polimorfismos CCR5 Δ 32 e CCR5 59029 A/G na
Toxoplasmose Ocular.
São José do Rio Preto, 2018.
40 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

1. Toxoplasmose Ocular; 2. *Toxoplasma gondii*; 3. Receptor de
quimiocina CCR5

GERALDO MAGELA DE FARIA JUNIOR

**Avaliação dos Polimorfismos CCR5 Δ 32 e
CCR5 59029 A/G na Toxoplasmose Ocular**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de
Mattos

2º Examinador: Profa. Dra. Ana Livia Silva Galbiatti
Dias

3º Examinador: Profa. Dra. Letícia de Azevedo Silva

1º Suplente: Profa. Dra. Christiane Maria Ayo

2º suplente: Profa. Dra. Júlia Gatti Ladeia Costa

São José do Rio Preto, 27 /09 / 2018

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1 Introdução.....	01
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	02
1.2 Ciclo de vida.....	04
1.3 Vias de transmissão.....	06
1.3.1 Infecção por cistos.....	07
1.3.1.1 Consumo de carnes.....	07
1.3.1.2 Infecção relacionada ao transplantes de órgãos sólidos.....	08
1.3.2 Infecção por oocisto.....	08
1.3.2.1 Contaminação por água.....	09
1.3.2.2 Contaminação do solo, vegetais e frutas.....	09
1.3.3 Infecção por taquizoíto.....	10
1.4 Infecção e manifestação clínica da toxoplasmose.....	10
1.5 Prevalência e importância da toxoplasmose no mundo.....	11
1.6 Processo de invasão e nicho intracelular.....	12
1.7 Resposta imune inata na toxoplasmose.....	12
1.8 Resposta imune adaptativa na toxoplasmose.....	13
1.9 Resposta imune humoral na toxoplasmose.....	13
1.10 Diagnóstico de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	14
1.11 Toxoplasmose ocular.....	15
1.12 Biomarcadores da resposta imunológica.....	16
1.13 Quimiocina CCR5, polimorfismos CCR5 Δ 32 (rs333) e CCR5 59029 A/G (rs1799987).....	17
2 Objetivos.....	19
3 Materiais e Métodos.....	19

4 Artigo.....	25
5 Conclusão.....	31
6 Referências bibliográficas.....	33

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Geraldo Magela e Irene Veiga, às minhas irmãs Tamara, Thayna e Thaissa e às minhas sobrinhas Ana Lívia e Valentina.

Muito Obrigado!

Agradecimentos

Aos meus sinceros agradecimentos:

A Deus pela força e perseverança.

À toda minha família pelo apoio nos momentos difíceis, em especial, às pequenas Valentina e Ana Livia pela alegria e união da família. A todos vocês meu muito, muito obrigado. Amo todos vocês.

Ao Fernando Murata, por todos os momentos tanto em território brasileiro quanto americano. Pelas risadas, paciência, companhia e pelos conselhos e ensinamentos. Você tem uma grande contribuição no meu crescimento pessoal e profissional! Prezo muito por sua amizade. Meu eterno muito obrigado.

Aos companheiros do Laboratório de Imunogenética da FAMERP: Márcio, Marcos, Ricardo, Francielly, Marina, Tatiane, Alessandro, Warlen, Cidinha, Natália e Valquíria pela amizade e respeito. E, em especial a Christiane, Regina, Isabela e Laurie pela ajuda diária, amizade, companheirismo e confiança.

À Camila Oliveira pelo companheirismo de todos esses anos. Obrigado pela força.

Ao Osvaldo Junior, por todos os ensinamentos, confiança, respeito e “puxões” de orelha. Você tem uma grande contribuição para meu crescimento profissional. Obrigado por me recepcionar tão bem. Torço muito pelo seu sucesso!

À Tamires Silva pelos conselhos, apoio, respeito e amizade. Obrigado pela descontração fora de hora e por me ensinar mais um pouco sobre nossa profissão.

À Marcela Pierre pela descontração, companherismo, amizades e risadas.

À Claudia Tozzo e Lilian Rubinho pelos anos de companherismo tanto na graduação quanto profissionalmente. Torço muito por vocês.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto por me fazer acreditar que sou capaz de vencer mesmo após os momentos difíceis. Por me proporcionar experiências de vida e me ensinar como lidar com elas,

Aos funcionários da Pós Graduação em Ciências da Saúde Fabiana, Luiz Henrique e José Antônio pelas orientações e suporte,

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida,

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos pela orientação, paciência e oportunidade,

À Profa. Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos pela credibilidade e confiança,

Aos pacientes desta pesquisa,

Aos membros da banca de tese e qualificação pelas considerações,

Enfim, a todos que contribuíram direta e indiretamente por mais essa conquista. A todos vocês meu muito obrigado.
Está aqui mais uma vitória.

Epígrafe

“Sabemos como é a vida: num dia dá tudo certo e no outro as coisas já não são tão perfeitas assim. Altos e baixos fazem parte da construção do nosso carácter. Afinal, cada momento, cada situação, que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor. Só depende de nós, das nossas escolhas... Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E, mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria e de saber que já não sou o mesmo de ontem me faz perceber que valeu a pena”.

Albert Einstein

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura do <i>Toxoplasma gondii</i> representando a forma “taquizoíto”	03
Figura 2. Estágios evolutivos do <i>Toxoplasma gondii</i>	04
Figura 3. Ciclo Biológico do <i>Toxoplasma gondii</i>	05
Figura 4. Vias de transmissão da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	07
Figura 5. Estrutura do Receptor de quimiocina CCR5.....	18
Figura 6. Perfil eletroforético de DNA genômico do polimorfismo CCR5 Δ 32.....	22
Figura 7. Perfil eletroforético de DNA genômico do polimorfismo CCR5 59029 A/G.....	23

Lista de Tabelas

Artigo

Characteristic and Frequencies of genotypes and alleles of the polymorphisms of the *CCR5* gene in individuals with ocular toxoplasmosis without ocular toxoplasmosis and controls.....

27

Lista de Abreviaturas e símbolos

A	Adenina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
AME	Ambulatório Médico de Especialidade
CAPES	Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCL3 (MIP-1 α)	<i>CC chemokine 3/ Macrophage Inflammatory Protein-1-alpha</i>
CCL4 (MIP-1 β)	<i>CC chemokine 4/ Macrophage Inflammatory Protein-1-beta</i>
CCL5 (RANTES)	<i>CC chemokine 5/ Regulated Upon Activation Normal T-cell Expressed and Presumably Secreted</i>
CCL8 (MCP-2)	<i>CC Chemokine ligand 8/ Monocyte Chemoattractant Protein-2</i>
CCR5	Chemokine (C-C motif) Receptor 5
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
DNA	Ácido Dexoxirribonucleíco
ELFA	Teste imunoenzimático (<i>Enzyme Linked fluorescent Assay</i>)
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
G	Guanina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IgM	Imunoglobulina de classe M
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgE	Imunoglobulina de classe E
IFN- γ	Interferon-gama (<i>Interferon-gamma</i>)
IL-12	Interleucina 12 (<i>Interleukin-12</i>)
IL-2	Interleucina 2 (<i>Interleukin-2</i>)
IL-4	Interleucina 4 (<i>Interleukin-4</i>)

IL-5	Interleucina 5 (<i>Interleukin-5</i>)
IL-10	Interleucina 10 (<i>Interleukin-10</i>)
IL-13	Interleucina 13 (<i>Interleukin-13</i>)
IL-17	Interleucina 17 (<i>Interleukin-17</i>)
M	Marcador de pares de base
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
mM	Milimolar
NK	Natural killer
ng	Nanograma
ng/μl	Nanograma/microlitro
pM	Picomolar
pb	Par de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	<i>Polymerase chain reaction-restriction fragmente lenght polymorphism</i>
PV	Vacúolo Parasitóforo
TO	Toxoplasmose Ocular
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>)
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador beta
Δ	Delta
°C	graus Celsius
μm	Micrômetro
%	Porcentagem

Resumo

Introdução: O receptor de quimiocinas C-C tipo 5 (CCR5) é um receptor de quimiocinas que influencia a resposta imune às doenças infecciosas e parasitárias. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo determinar se os polimorfismos CCR5 Δ 32 e CCR5 59029 A / G estão associados ao desenvolvimento da toxoplasmose ocular em humanos. **Métodos:** Pacientes com sorologia positiva para *Toxoplasma gondii* foram analisados e agrupados como "com toxoplasmose ocular" (G1: n = 160) ou "sem toxoplasmose ocular" (G2: n = 160). Um grupo controle (G3) consistiu de 160 indivíduos com sorologia negativa. A caracterização dos polimorfismos CCR5 Δ 32 e CCR5 59029 A / G foi por PCR e por PCR-RFLP, respectivamente. Para a análise estatística foi realizado teste qui-quadrado e exato de Fisher para as comparações e regressão logística multivariada. **Resultados:** A diferença entre os grupos em relação à idade média foi estatisticamente significativa (G1 vs. G2: p < 0,0001; t = 7,21; DF = 318; G1 vs. G3: p < 0,0001; t = 4,32; DF = 318; G2 vs G3: valor de p < 0,0001; t = 9,62; DF = 318). O valor de Nagelkerke r^2 foi de 0,040. Houve diferenças estatisticamente significantes para os genótipos CCR5 / CCR5 (p-valor = 0,008; OR = 0,261), AA (p-valor = 0,007; OR = 2,974) e AG (p-valor = 0,018; OR = 2,447) entre G1 e G2. **Conclusão:** Indivíduos com o genótipo CCR5 / CCR5 e simultaneamente com os genótipos CCR5-59029 AA ou AG têm maior risco de desenvolver toxoplasmose ocular (4% maior), o que pode estar associado a uma forte e persistente resposta inflamatória no tecido ocular.

Palavras-chaves: Toxoplasmose ocular, *Toxoplasma gondii*, Receptor de quimiocina CCR5

Abstract

Introduction: C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) is a chemokine receptor that influences the immune response to infectious and parasitic diseases.

Objective: This study aimed to determine whether the *CCR5*Δ32 and *CCR5* 59029 A/G polymorphisms are associated with the development of ocular toxoplasmosis in humans.

Methods: Patients with positive serology for *Toxoplasma gondii* were analyzed and grouped as "with ocular toxoplasmosis" (G1: n = 160) or "without ocular toxoplasmosis" (G2: n = 160). A control group (G3) consisted of 160 individuals with negative serology. The characterization of the *CCR5*Δ32 and *CCR5* 59029 A/G polymorphisms was by PCR and by PCR-RFLP, respectively. For the statistical analysis, chi-square and Fisher's exact test were performed for comparisons and multivariate logistic regression.

Results: The difference between groups in respect to the mean age was statistically significant (G1 vs.G2: p-value <0.0001; t = 7.21; DF = 318; G1 vs.G3: p-value <0.0001; t = 4.32; DF = 318; G2 vs. G3: p-value <0.0001; t = 9.62; DF = 318). The Nagelkerke r^2 value was 0.040. There were statistically significant differences for the *CCR5*/*CCR5* (p-value = 0.008; OR = 0.261), AA (p-value = 0.007; OR = 2.974) and AG genotypes (p-value = 0.018; OR = 2.447) between G1 and G2. **Conclusion:** Individuals with the *CCR5*/*CCR5* genotype and simultaneously with the *CCR5*- 59029 AA or AG genotypes have a greater risk of developing ocular toxoplasmosis (4% greater), which may be associated with a strong and persistent inflammatory response in ocular tissue.

Keywords: Ocular Toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, Chemokine Receptor *CCR5*.

INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, parasita intracelular obrigatório,¹ pertencente ao filo Apicomplexa² e caracterizado como cosmopolita por ser encontrado em todos os continentes e em vários climas³. Possui capacidade de parasitar vários tipos de células e infectar quaisquer animais de sangue quente incluindo mamíferos e aves^{4,5}.

Foi inicialmente descrito, em 1908, na Tunísia por Nicolle e Manceaux nos tecidos de *Ctenodactylus gundi*, um roedor norte-africano. No mesmo ano, Splendore, no Brasil, relatou esse organismo nos tecidos de coelhos doentes ou mortos “naturalmente” em laboratório. Em 1909, Nicolle e Manceaux classificaram o parasito e criaram o gênero *Toxoplasma* por sua forma de arco (do grego: Toxo = arco; plasma = criatura) e a espécie *T. gondii*⁵⁻⁹. Outras formas do *Toxoplasma*, incluindo cistos teciduais, foram reconhecidas por vários pesquisadores como Frenkel e Friedlander, em 1951, mas foi somente, em 1960 e 1970, que o parasito *Toxoplasma gondii* foi identificado como um coccídeo⁷.

T. gondii é um organismo eucarionte com arranjo complexo de organelas celular na extremidade apical¹⁰. Possui as várias estruturas intracelulares mostradas na Figura 1.

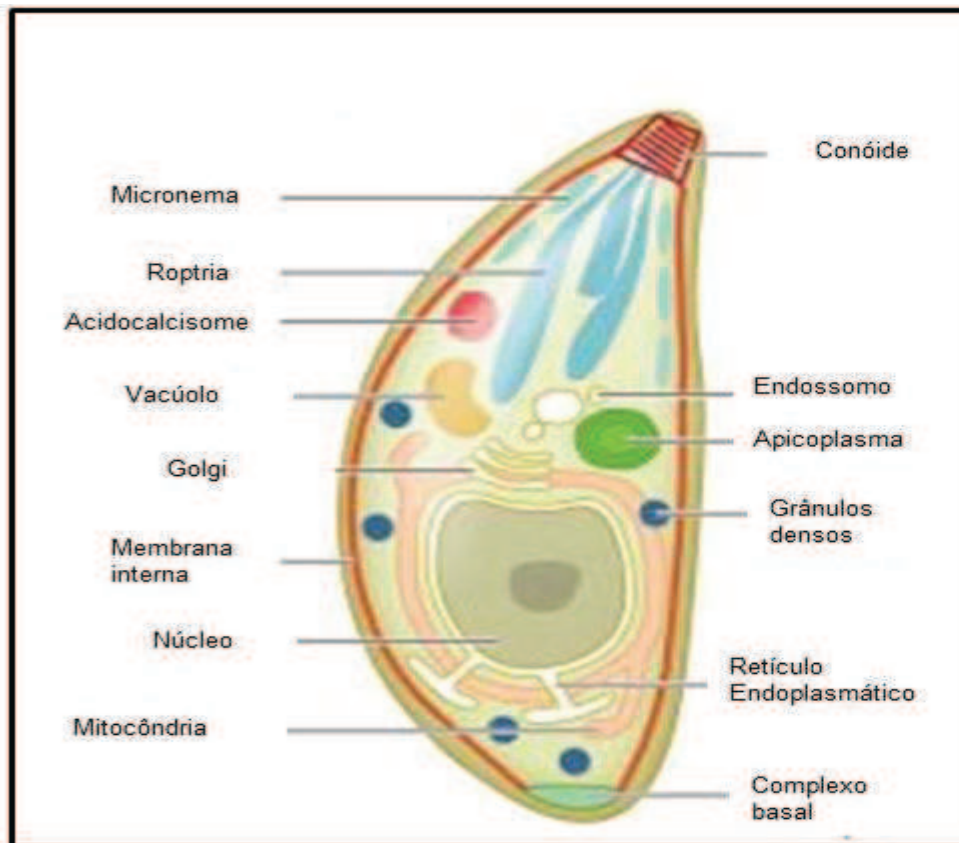


Figura 1: Estrutura do *T. gondii*, representando a forma “taquizoítio”. Adaptado de Blader e colaboradores (2015)¹⁰.

Esse parasito apresenta três estágios evolutivos como formas infectantes para o homem: oocisto esporulado, taquizoítio e cisto de bradizoítio⁴.

Os taquizoítos medem aproximadamente seis μm de diâmetro. É o estágio evolutivo móvel que se multiplica rapidamente em qualquer célula do hospedeiro intermediário e em células epiteliais não intestinais do hospedeiro definitivo. São capazes de invadir todos os tipos de células de vertebrados, onde se multiplicam em vacúolos parasitóforos. Apresentam forma de arco, sendo pontiagudos na região anterior e arredondados na região posterior (Figura 2A)^{4,11}.

Os bradizoítos são encontrados dentro dos cistos teciduais. Reproduzem-se lentamente por endodigenia e diferem estruturalmente dos taquizoítos quanto à posição do núcleo, sendo que nos taquizoítos, este está localizado na posição

final posterior, enquanto que nos bradizoítos, o núcleo encontra-se na porção central (Figura 2B)¹¹.

Os oocistos são encontrados no meio ambiente, apresentam morfologia elipsóide; possuem aproximadamente 13 μm de diâmetro e cada oocisto contém em seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos, após a esporulação (Figura 2C). Sua parede é constituída por uma estrutura de multicamadas extremamente robusta que protege o parasita contra danos físicos e químicos. Além disso, permite que o parasita sobreviva por longos períodos de tempo, até mais um ano, em um ambiente úmido^{4,11}.

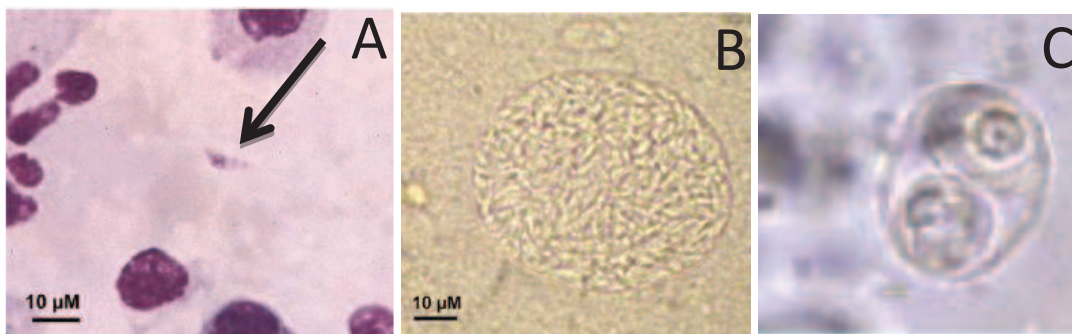


Figura 2: Estágios evolutivos do *Toxoplasma gondii*. A letra A corresponde ao estágio taquizoíto; a letra B ao estágio bradizoíto e a letra C estágio de oocisto. Adaptado de Robert-Gangneux e Dardé, 2012⁴.

1.2 Ciclo de vida.

T. gondii apresenta o ciclo biológico heteroxeno, ou seja, é capaz de se reproduzir tanto de forma sexuada quanto assexuada. É o único do grupo coccídeo que não é transmitido somente entre hospedeiros intermediários e definitivos (ciclo sexual), mas também entre hospedeiros intermediários por meio de carnivorismo (ciclo assexuado) ou entre hospedeiros definitivos (Figura 3)^{4,12}.

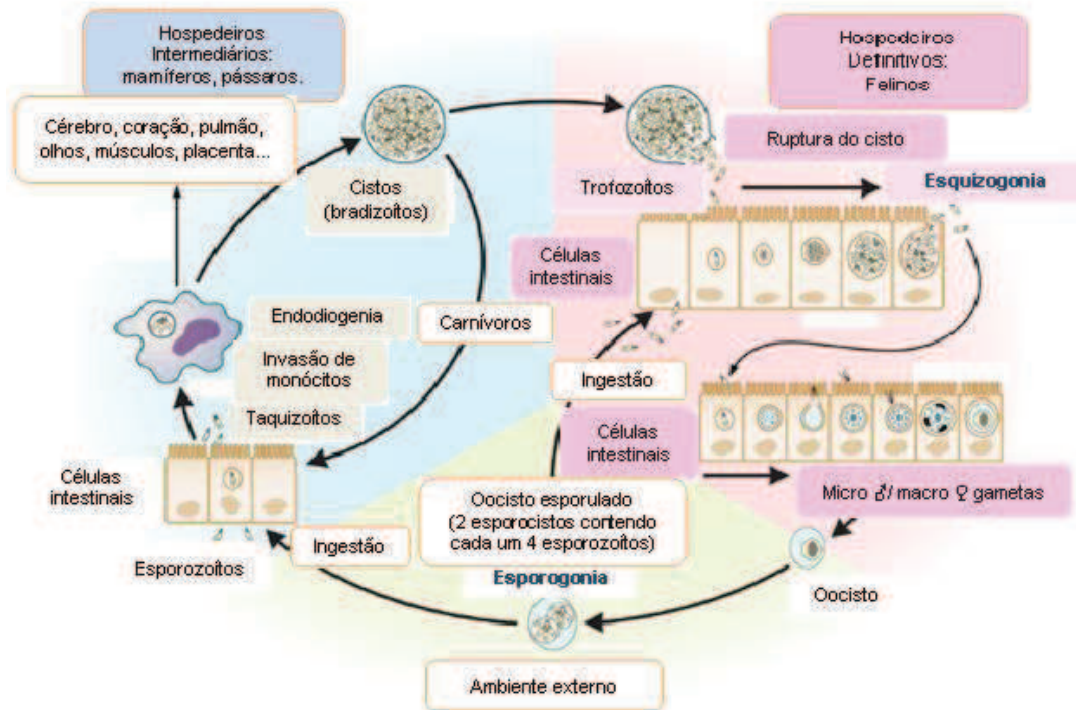


Figura 3: Ciclo biológico do *T. gondii*. Adaptado de Robert-Gangneux&Dardé, 2012⁴.

A reprodução sexuada ocorre apenas nos felinos, por ingestão de cistos de bradizoítos presentes nos tecidos dos hospedeiros intermediários, não exclusivamente, mas especialmente roedores^{4,13}. Após a contaminação, os bradizoítos invadem o intestino e se instalam dentro dos enterócitos onde sofrem multiplicações assexuadas para formar os merozoítos, os quais se diferenciam em gametas masculino e feminino (gametogonia)^{4,14}. Após a fertilização, os oocistos formados dentro dos enterócitos são liberados pelo rompimento das células e excretados como forma não esporulada (bradizoítos) nas fezes dos felinos. O processo de esporogonia ocorre, após alguns dias no meio ambiente. Esse processo implica em redução meiótica e alterações morfológicas que levam à formação de oocistos esporulados, com dois esporocistos; cada um, contendo quatro esporozoítos haplóides. A eliminação dos oocistos inicia-se entre três a sete dias, após a ingestão de cistos teciduais, e pode continuar por até 20 dias^{4,15}.

Nos hospedeiros intermediários ocorre apenas o desenvolvimento do ciclo assexuado. Após a ingestão dos oocistos esporulados, os esporozoítos liberados penetram no epitélio intestinal onde se diferenciam em taquizoítos. Após rápida multiplicação, os taquizoítos rompem as células hospedeiras e se disseminam por todo organismo. O desenvolvimento da resposta imunológica coincide com a diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos, formando cistos teciduais entre sete a dez dias, após a infecção. Podem permanecer ao longo da vida dos hospedeiros, predominantemente, no cérebro e músculo⁴.

Com a ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, pelos hospedeiros intermediários, os cistos são rompidos à medida que passam pelo trato digestivo, levando à liberação de bradizoítos. Estes infectam o epitélio intestinal do novo hospedeiro e se diferenciam novamente em taquizoíto, por meio de divisão rápida, e se disseminam para o todo o corpo⁴.

1.3 Vias de transmissão

A transmissão de *T. gondii* para o ser humano ocorre, essencialmente, por duas vias: pós-natal e vertical. A transmissão pós-natal se dá pela ingestão de cistos teciduais presentes em carne crua ou mal cozida, pelo contato com solo, água contaminada ou alimentos contendo oocistos esporulados oriundos do ambiente ou menos frequente, por contato com fezes dos felinos^{4,17,18}. A transmissão vertical resulta na infecção primária adquirida no período gestacional. Nestes casos, os taquizoítos podem colonizar os tecidos placentários durante o processo de disseminação e, a partir daí, gerarem malformações fetais (Figura 4)^{4,19}.

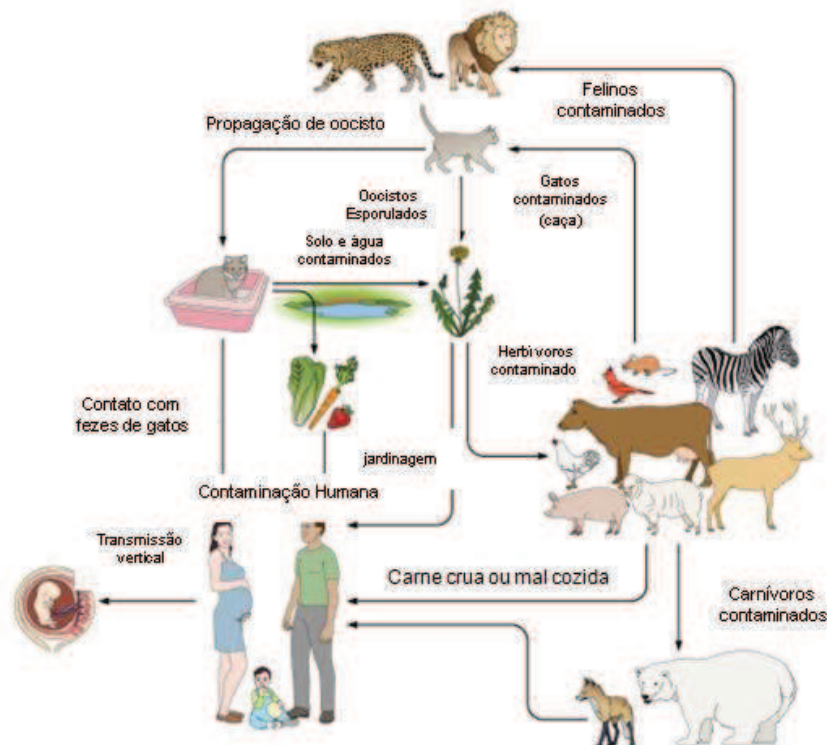


Figura 4: Vias de transmissão da infecção de *T. gondii*. Adaptado Robert-Gangneux&Dardé, 2012.⁴

1.3.1 – Infecção por cistos

Os cistos teciduais podem permanecer ativos em carnes refrigeradas (1 °C a 6 °C) por até três semanas. Mantém-se viáveis por tempo superior a 11 dias, em temperatura de -7 °C. Entretanto, o congelamento da carne a -12 °C por pelo menos três dias, é geralmente eficaz para matar os cistos, embora isso dependa da espessura do pedaço da carne²⁰.

1.3.1.1- Consumo de carnes

Qualquer carne de animais de sangue quente ou aves tem sido considerada uma fonte importante para infecção por *T. gondii* nos países ocidentais²¹. Os cistos geralmente são mortos de imediato, após o aquecimento a temperaturas em torno de 67 °C. Contudo, em temperaturas inferiores, a morte dos cistos depende do tempo de cozimento. Nos casos de carnes cozidas em forno micro-ondas, alguns cistos poderão permanecer infecciosos devido ao aquecimento irregular na carne. Um estudo de caso-controle realizado nos Estados Unidos por

Jones e colaboradores (2009)¹⁷ revelou que o cozimento da carne em microondas foi associado ao risco reduzido de infecção recente por *T. gondii*. Os autores explicam que o cozimento da carne em micro-ondas está frequentemente associado ao reaquecimento de carne previamente cozida ou ao descongelamento ou cozimento de carne congelada.

Em caso de processos de conservação de carnes como o salgamento ou a defumação, o tempo de sobrevida dos cistos teciduais varia muito e é influenciado pela concentração da solução salina utilizada bem como o tempo de armazenamento. Experimentos realizados em laboratório revelaram que soluções contendo 2 % de cloreto de sódio ou 1,4 % de cloreto de potássio, são efetivas para matar cistos teciduais presentes em lombos de porcos, quando o tempo de infusão é de oito horas^{4,22}.

1.3.1.2- Infecção relacionada ao transplante de órgãos sólidos.

Da mesma forma que os taquizoítos podem invadir todas as células nucleadas, os cistos podem ser encontrados em quaisquer órgãos. Em casos de transplantes de órgãos sólidos, a infecção por *T. gondii* pode se dar por meio de um órgão de doador contendo cistos, resultantes de infecção adquirida no passado, para um receptor não imunizado. Certos órgãos são mais propensos a abrigar cistos, como por exemplo, os músculos. Desta forma, pacientes submetidos a transplantes cardíacos apresentam maior risco de adquirir infecção por *T. gondii* relacionado ao órgão transplantado, do que aqueles que realizaram transplante de fígado, pulmão ou rins⁴.

1.3.2 – Infecção por oocisto

Condições ambientais são importantes para a sobrevivência dos oocistos. O clima úmido pode aumentar o tempo de sobrevida dos oocistos durante longos períodos de calor. Esta constatação alinha-se à alta prevalência de infecção por *T. gondii* em países tropicais da América do Sul e da África. Os relatos de Gomez-Marin e colaboradores (2011)²³, na Colômbia, mostraram correlação

positiva entre a quantidade média de chuva e a incidência de Toxoplasmose congênita²³.

Outro estudo realizado na França por Affonso e colaboradores em 2010¹², revelou que mesmo em um país de clima temperado, o risco de infecção em gatos aumentou quando o clima era quente e úmido. Estas observações corroboram com as proposições de que condições climáticas podem influenciam a sobre a sobrevivência dos oocistos¹².

Apesar da eliminação de oocistos por gatos ser de curta duração, a carga desta forma infectante de *T. gondii* no ambiente por ser alta^{4,12,24}. Um único gato é capaz de eliminar mais de 100 milhões de oocistos não esporulados. Para se tornarem infectante para outros hospedeiros, é necessário o tempo de um a cinco dias. Isto explica o fato que o contato direto com os gatos não é considerado um grande risco de infecção humana^{4,17}. Os oocistos uma vez esporulados, permanecem viáveis em um ambiente úmido por mais de um ano e são resistentes às condições ambientais adversas²⁵.

1.3.2.1 – Contaminação por água.

Os oocistos podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo na água e podem resistir a temperaturas de congelamento, bem como, a temperaturas moderadamente altas. Não são mortos com os tratamentos físicos e químicos aplicados nas estações de tratamento de água²⁶. Surtos associados à contaminação de reservatórios de água, envolvendo grande número de pacientes foram relatados em Coimbatore, na Índia²⁷ e em Santa Isabel do Itaipu, estado do Paraná, no Brasil²⁸.

1.3.2.2 – Contaminação do solo, vegetais e frutas.

O solo contaminado pode atuar como importante veículo de transferência de oocisto para vegetais e frutas. Cook e colaboradores (2000)²¹, em um estudo multicêntrico realizado na Europa, revelaram que entre 6 a 17 % das infecções primárias por *T. gondii*, em humanos, são atribuídas ao contato com o solo²¹. Em

2011, nosso grupo de pesquisa revelou que o contato com o solo constitui um importante fator de risco para infecção por *T. gondii*, na região noroeste do estado de São Paulo²⁹.

1.3.3 Infecção por taquizoíto

A infecção congênita por taquizoíto é relevante do ponto de vista epidemiológico. Quando a infecção primária é adquirida por gestante, os taquizoítos podem colonizar o tecido placentário durante o processo de disseminação, e a partir daí, atingir o feto. A frequência de transmissão vertical aumenta com a idade gestacional. Desta forma, no início da gravidez a passagem placentária de taquizoítos é menor, mas as consequências para o feto são graves^{4,19}.

1.4 Infecção e manifestação clínica da toxoplasmose.

Após a ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, de bradizoítos ou alimentos e água contaminados com o parasito na forma de oocisto, o parasito se converte em uma forma de replicação rápida, conhecida como taquizoíto, que resulta na disseminação sistêmica. Em circunstâncias normais, a infecção sistêmica é controlada pela resposta imune do hospedeiro^{7,18}.

Os taquizoítos convertem-se em uma forma de replicação lenta conhecida como bradizoítos, que persiste nos cistos teciduais neurológicos e musculares durante toda a vida do hospedeiro. Caso o indivíduo torne-se imunocomprometido, esses cistos teciduais servem como reservatório, dos quais podem ocorrer reativação seguida de infecções disseminadas ou locais⁷.

A infecção em humanos pode variar de assintomático a grave parece depender da cepa do parasito e do sistema imunológico do hospedeiro. A taxa de infecção pode chegar a 70%^{18,30} em algumas áreas e, a maioria dos casos em humanos, é assintomática. Em contraste, a infecção congênita pode resultar em vários defeitos congênitos como hidrocefalia, coriorretinite, calcificações intracerebrais e abortos espontâneos^{18,31}.

A toxoplasmose é grave em pacientes com deficiências primárias ou adquiridas nas funções das células T, especialmente nos portadores de AIDS, de Síndrome Hyper IgM, bem como naqueles em tratamento de câncer, em transplantados, e em uso de medicamentos imunossupressoras^{7,18,32-37}. Nesses pacientes a toxoplasmose frequentemente resulta de uma reativação da infecção latente e, não pela doença recentemente adquirida⁷. Embora raro, a toxoplasmose em pacientes imunocompetentes pode resultar de infecção por cepas de *T. gondii* altamente virulentas, doença ocular e morte^{18,38,39}.

Estudos publicados nas últimas décadas, fundamentados essencialmente em análises sorológicas e comportamento animal, sugeriram que a infecção crônica por *T. gondii* pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de esquizofrenia e outros transtornos comportamentais em humanos^{7,40}.

O *T. gondii* é uma das causas de uveítes mais frequentemente identificadas. As lesões coriorretinianas ocorrem devido à infecção congênita ou adquirida, após o nascimento. A coriorretinite aguda pode produzir sintomas de visão turva, dor, fotofobia ou perda da visão central. No exame oftalmológico, a coriorretinite toxoplásmica caracteriza por apresentar lesões focais esbranquiçadas, com uma reação inflamatória vítrea intensa, que com a cicatrização, ocorre atrofia e desenvolve o pigmento escuro. As lesões observadas na coriorretinite toxoplásmica aguda originadas tanto de infecção congênita quanto da pós natal, são morfológicamente indistinguíveis⁷.

1.5 Prevalência e importância da toxoplasmose no mundo.

A infecção por *T. gondii* é amplamente distribuída e acredita-se que aproximadamente 25 a 30% da população mundial são infectadas por este parasito⁴¹. Entretanto, a prevalência de infecção pode variar entre os países (de 10 a 80 %), dentro de um determinado país ou entre diferentes comunidades da mesma região³⁰. Baixas prevalência de infecção por *T. gondii* foram observadas na América do Norte, Sudeste Asiático e Norte da Europa. Prevalências

moderadas foram encontradas em países da Europa Central e do Sul; as altas prevalências são encontradas na América Latina e países tropicais africanos⁴.

No Brasil, um estudo epidemiológico realizado na região metropolitana de São Paulo identificou anticorpos de classe IgG anti-*T. gondii* em mulheres em período gestacional, com frequência variando de 59 a 65 %⁴². Outro estudo, realizado no período de 2009 a 2010 na região noroeste do estado de São Paulo, revelou que a soroprevalência da infecção por *T. gondii* é igual a 74,5 % em pacientes com doenças oculares e a incidência de toxoplasmose ocular, de 20,3%⁴³. Na cidade de Erechim, no estado do Rio Grande do Sul, a soroprevalência observada foi de 88%, com incidência de toxoplasmose ocular (TO) igual a 18%⁴⁴.

1.6. Processo de invasão e nicho intracelular

Três organelas denominadas de micronemas, grânulos densos e roptrias secretam proteínas do parasita durante a invasão da célula hospedeira^{18,45}. Estas proteínas podem alterar a função das células hospedeiras e inibir a resposta imune dirigida ao parasita. Elas também servem para modificar a membrana lipídica em torno do parasita, formando uma organela especializada chamada de vacúolo parasitóforo (PV). O PV permite o transporte de nutrientes essenciais da célula hospedeira para o parasita, evitando a fusão lisossômica, o que causaria a morte do parasita^{18,46}.

1.7. Resposta imune inata na toxoplasmose

Uma das funções mais críticas da resposta imune inata ao *T. gondii* é a capacidade de detectar o patógeno e de produzir a citocina IL-12, a qual estimula as células Natural Killer (NK) e as células CD4 T_H1 a produzir *interferon-gamma* (*IFN-γ*)¹⁸. Tanto a IL-12 quanto o *IFN-γ* são necessários para o desenvolvimento da proteção celular, mediando a resposta imune contra o parasita⁴⁷. O *IFN-γ* é o principal mediador da resistência ao *T. gondii* e responsável por promover múltiplos mecanismos intracelulares para matar o parasita e inibir sua replicação¹⁸. Estes mecanismos intracelulares incluem a produção de Espécies

Reativas de Oxigênio, os quais são produtos do metabolismo do ácido araquidônico pela via da enzima 5-lipoxigenase e a degradação de triptofano intracelular do parasita⁴⁸. Estudos experimentais em camundongos verificaram que os animais infectados com *T. gondii* e deficientes de IL-12 e *IFN-γ* apresentaram incapacidade de controlar a carga parasitária^{18,49}.

1.8 – Resposta imune adaptativa na toxoplasmose

A resposta imune celular é mediada por células T, atuando como mecanismo de defesa contra micro-organismos que sobrevivem dentro de fagócitos ou células não-fagocíticas. Em resposta a patógenos, os linfócitos CD4 TH1 liberaram citocinas a fim de estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos e macrófagos⁴⁸.

Os linfócitos T auxiliares são divididos em TH1 e TH2 e são diferenciados de acordo com a produção de citocinas. Os linfócitos TH1 secretam preferencialmente IL-2 e *IFN-γ* e contribuem na resistência a patógenos intracelulares^{48,50}. A IL-2 induz as células NK e células T CD8+, as quais são citotóxicas para as células-alvo infectadas com *T. gondii*. O *IFN-γ* estimula a atividade microbicida dos macrófagos^{48,51}.

Os linfócitos TH2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13; estão associados à baixa da regulação da resposta imune celular. Na infecção causada pelo *T. gondii* as citocinas de perfil Th2 podem favorecer a multiplicação parasitária; entretanto, elas também podem ser utilizadas para controlar a resposta imune pró-inflamatória prejudicial⁴⁸.

1.9 – Resposta imune humoral na toxoplasmose

Por ser um parasita intracelular obrigatório, a resposta imune mediada por células é a principal defesa do hospedeiro contra infecção por *T. gondii*. Assim, a infecção estimula a produção de anticorpos IgM, IgG, IgA e IgE. Estes além de contribuírem no diagnóstico da infecção pelo parasita contribuem como uma importante linha de defesa contra infecção^{48,49,51,52}. Os anticorpos IgM e IgA são

as primeiras imunoglobulinas produzidas na infecção por *T. gondii*. Os anticorpos IgM são responsáveis pela ativação do sistema complemento e possuem a característica de serem ótimos aglutinadores, o que permite a sua utilização no diagnóstico^{53,54}. Os anticorpos de classe IgA são produzidos pela mucosa digestiva, um sítio natural de infecção por *T. gondii*, e desempenham o papel de proteção contra infecção. Os anticorpos IgG, altamente específicos e com elevado índice de avidéz para os antígenos do *T. gondii*, estão envolvidos na proteção contra as formas extracelulares do parasito e na patogênese da doença^{54,55}.

1.10 – Diagnóstico de infecção por *Toxoplasma gondii*

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* pode ser realizado por métodos indiretos e diretos. O primeiro baseia-se na detecção de anticorpos específicos^{4,56,57}. Este método permite determinar o processo infeccioso e inferir as fases da doença (aguda e crônica). Usualmente, utiliza-se a imunoglobulina de classe IgM como marcador de infecção aguda/recente e IgG para infecção crônica^{48,56,57}.

Embora os métodos indiretos tenham várias vantagens, alguns fatores como a sensibilidade, a permanência de IgM por longos períodos na circulação e o estado imunológico do hospedeiro, podem influenciar nos resultados^{4,48,57-61}. Diante disso, os métodos diretos, os quais baseiam-se na identificação do parasito ou de seu material genético, vêm sendo utilizados para determinarem, com mais precisão e rapidez, os estágios recentes da infecção^{62,63}. Os métodos moleculares são amplamente empregados para auxiliar na detecção da fase recente de infecção^{64,65}. Estudos relatam que estes métodos são capazes de detectar o *T. gondii* em sangue periférico antes da circulação dos anticorpos^{62,66,67}. Isso demonstra a sua elevada sensibilidade quando comparada aos métodos sorológicos.

1.11 – Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose ocular (TO) é a manifestação clínica mais comum da toxoplasmose e caracterizada por um processo inflamatório intraocular⁶⁸. As lesões podem ser originadas tanto de infecção congênita quanto adquirida após o nascimento^{69,70}. Pode atingir a mácula e a demais camadas da retina e a coroide, resultando em retinocoroidite, a causa mais frequente de uveíte posterior em pacientes imunocompetentes⁶⁸. As manifestações clínicas ocorrem de forma precoce ou tardia, com manifestação clínica primária ou recorrente⁷¹. Apresenta diferentes graus de comprometimento ocular que podem variar de acordo com o estado imunológico do indivíduo e a virulência do parasito^{68,72}. Durante a inflamação, o indivíduo queixa-se de perda ou turvação da visão e visualização de partículas flutuantes^{54,73}. Após o processo inflamatório inicial, o tecido afetado cicatriza, resultando em uma lesão que, quando apresenta morfologia clássica, assemelha-se a uma roda de carroça^{54,74}.

A resposta imune intraocular é suprimida em circunstâncias normais; o que diminui a chance de destruição tecidual⁷⁵. As respostas intraoculares baseiam-se num desvio de ativação de células T CD8+ e células CD4+ (TH2). Esse desvio parece resultar da ação do ligante Fas (CD95); um membro da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF), o qual compromete a ativação de células T oculares. Este fenômeno resulta da apoptose de células do parênquima ocular nas quais o ligante Fas está expresso⁵¹. Além disso, a citocina *transforming growth factor beta* (*TGF-β*), que possui propriedades imunossupressoras, e que reduz a expressão de moléculas de MHC de classe I,^{52,76} pode comprometer as respostas citotóxicas mediadas pelos linfócitos CD8+. Níveis reduzidos de *TGF-β* foram encontrados em fluidos oculares em indivíduos portadores de uveítes⁷⁷. Também foi demonstrado que o *T. gondii* é capaz de estimular a expressão e modificar a forma ativa do *TGF-β*, favorecendo a sua replicação no hospedeiro⁷⁸.

Há evidências de que a infecção por *T. gondii* promove a produção de fatores que anulam o privilégio imune ocular, como *IFN-γ*, que desempenha um papel crucial na resistência à infecção por *T. gondii*. Além de ser um potente

antagonista de $TGF-\beta$, o $IFN-\gamma$ aumenta a expressão de moléculas de MHC de classe I e II^{51,79}. Em modelos murinos foi demonstrado que a resposta imune ocular contra *T. gondii* envolve fatores semelhantes à resposta que ocorre nos demais tecidos, podendo levar ao aumento da intensidade das lesões oculares caracterizada pela necrose ou inflamação acentuada da retina e da coróide^{49,80,81}.

1.12 – Biomarcadores de resposta imunológica

As citocinas são moléculas utilizadas como biomarcadores de várias doenças, de caráter infeccioso ou não, incluindo manifestações alérgicas, câncer, doenças auto-imunes parasitoses, dentre outras⁵⁴. Entretanto, estas citocinas podem causar lesão tecidual nos casos de resposta imune exagerada do hospedeiro⁸².

Na infecção por *T. gondii* esses potenciais biomarcadores extracelulares podem ser produzidos por uma grande quantidade de células. São responsáveis por desencadear eventos imunológicos essenciais como adesão e quimiotaxia de leucócitos, maturação e ativação celular e, ainda, regulação e intensidade das respostas específicas contra patógenos^{54,83}.

Em resumo, dentre as citocinas importantes na toxoplasmose podemos citar: IL-2, na ativação de células natural Killer (NK) e proliferação de células T CD4+ e CD8+, para que ambas produzam o $IFN-\gamma$ ^{54,84,85}; IL-12, responsável pelo desenvolvimento de uma resposta imune pró-minflamatória efetora contra o parasito⁵⁴; $IFN-\gamma$, fundamental para o controle da infecção aguda e crônica por *T. gondii*,^{54,86} IL-10, IL-4 e IL-5 que desempenham uma papel crítico na regulação da resposta inflamatória à infecção por *T. gondii*^{49,54}; $TGF-\beta$ está envolvida no controle da doença intestinal causada após a ingestão oral do parasito^{54,87} e IL17A a qual está associada com a imunopatologia apresentada pelo hospedeiro durante a infecção pelo parasito⁵⁴.

As quimiocinas constituem uma grande família de pequenas citocinas e geralmente possuem baixo peso molecular⁸⁸. As quimiocinas e seus receptores são responsáveis pela movimentação dos leucócitos, incluindo sua migração para os locais de inflamação tecidual a partir do sangue, contribuindo na resposta

imune adaptativa e/ou patogênese de várias doenças^{89,90}. Algumas quimiocinas são consideradas pró-inflamatórias e sua liberação pode ser induzida durante uma resposta imune em um local de infecção. Outras são homeostáticas e, estão envolvidas no controle da migração de células durante o desenvolvimento ou manutenção do tecido⁸⁸.

Além das funções pró-inflamatórias, homeostáticas e de quimiotaxia, as quimiocinas também apresentam participação na angiogênese, hematopoiese, desenvolvimento embrionários e metástase⁹¹. A ação das quimiocinas ocorre por meio de receptores específicos pertencentes à família de receptores com sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G^{92,93}. Os receptores de quimiocinas são expressos em leucócitos, com maior número de receptores em linfócitos T, sendo que, as expressões de tais receptores podem definir subtipos de linfócitos T. Além disso, linfócitos T maduros periféricos expressam diferentes receptores de quimiocinas dependendo do seu fenótipo funcional⁹².

1.13 – Quimiocina CCR5, polimorfismos CCR5 Δ 32 (rs333) e CCR5 59029 A/G (rs1799987)

O receptor de quimiocina CCR5 possui 332 aminoácidos e é codificado pelo gene *CCR5*, possui o peso molecular de 40,6 kDa⁹⁶ e está localizado no cromossomo 3p21, o qual apresenta quatro éxons e dois íntrons, sendo que entre os éxons dois e três não há íntron^{94,95}. Este gene apresenta duas regiões promotoras e padrões de *splicing* alternativo podem originar dois transcritos denominados CCR5A e CCR5B, que codificam a mesma proteína⁹⁵.

CCR5 é correceptor para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1)^{97,98}. Os ligantes deste receptor são quimiocinas CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) e CCL8 (MCP-2) que atraem monócitos, macrófagos, células T ativadas e de memória, que expressam CCR5^{93,96}. Este receptor possui um seguimento extracelular N-terminal e uma cauda citoplasmática C-terminal, expresso em células T helper 1 auxiliando no início da resposta imune⁸⁹ (Figura 5).

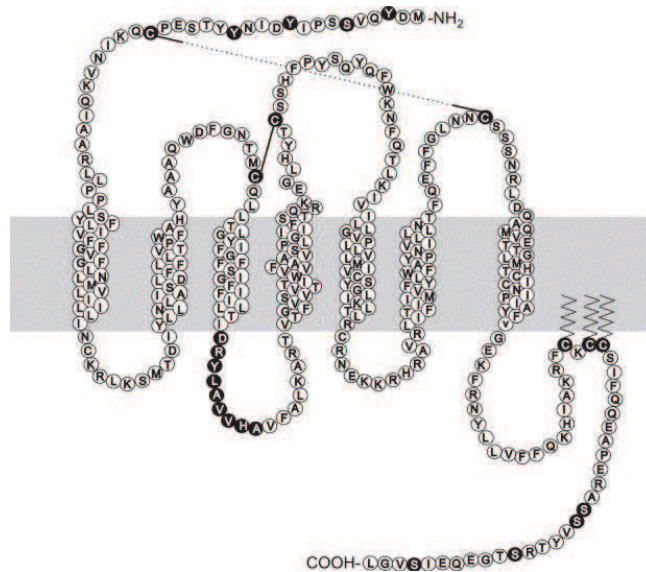


Figura 5: Receptor de quimiocina CCR5 apresentando a cauda extracelular N-terminal e sua cauda citoplasmática C-terminal. Extraído de Opermann, 2004⁹¹.

A deleção de 32 pares de base na região codificante do gene *CCR5* (*CCR5* Δ 32) resulta na geração de uma proteína truncada, ausente na superfície celular⁹⁹. Níveis reduzidos de expressão deste receptor ocorrem nos indivíduos heterozigotos (*CCR5/CCR5* Δ 32)⁹⁴. O polimorfismo localizado na região promotora do gene *CCR5* (*CCR5* 59029 A/G) afeta o nível de expressão do receptor na superfície celular. Como a maior atividade promotora *in vitro* é resultante do alelo A, então o genótipo homozigoto AA resulta no nível máximo de expressão do receptor *CCR5* na superfície celular¹⁰⁰.

1.14 - *CCR5* na Toxoplasmose

Estudos avaliando essa interação do gene *CCR5* e microorganismos estão bem descritos na literatura. Entretanto, análises de *CCR5* e *T. gondii* estão descritos em modelos animais (murinos)^{8,83,101}, no entanto, até o momento não há relatos dessa interação ou dos polimorfismos do gene *CCR5* e a toxoplasmose ocular em humanos.

Bonfá e colaboradores, (2014)⁸ em seu estudo experimental com animais selvagens (controles) e com ausência do gene *CCR5*, os quais foram infectados via oral com dose sub letal do parasita *Toxoplasma gondii*. Os autores observaram que os camundongos com *CCR5*^{-/-} apresentaram uma maior carga

parasitária e conseqüentemente uma maior mortalidade quando comparada com os animais selvagens. Além disso, neste mesmo estudo foi observado, que houve aumento no número de parasitas no intestino delgado e fígado dos animais com ausência de CCR5 em comparação aos controles. Em conclusão, os autores revelaram que o CCR5 é uma molécula essencial na manutenção da homeostasia do hospedeiro durante a infecção por *T. gondii*.

Outro estudo experimental realizado por Khan e colaboradores (2006)¹⁰¹, o qual os autores verificaram a resposta imune ao *T. gondii* de animais deficientes do receptor de CCR5. Os camundongos com ausência do receptor apresentaram uma resposta inflamatória diminuída, levando a uma maior parasitemia e mortalidade, devido a diminuição de células natural killer (NK) para o local de inflamação.

A infecção por *T. gondii* em animais prenhas pode causar morte embrionária, aborto e morte fetal. No estudo experimental realizado por Nishimura e colaboradores, (2017)¹⁰² em que objetivou investigar a relação entre o receptor de quimiocina CCR5 e o aborto causado pela toxoplasmose e utilizou animais selvagens e com ausência do CCR5. Este estudo revelou que os animais controles apresentaram uma maior perda e um menor desenvolvimento embrionário do que os animais knockout e, também, foi observado uma maior carga parasitária e maiores níveis de expressão de CCR5 nos locais de implantação nos animais selvagens do que os controles.

No estudo de Kikumura e colaboradores, (2012)⁸³ que avaliou a cinética de citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas e expressão de moléculas de adesão na retina de camundongos selvagens (controles) e knockout. Após inoculação de *T. gondii* ambos os grupos de animais apresentaram sinais sistêmicos da doença como diarreia, perda de peso e alterações nos pêlos, entretanto nos animais controles os sinais aumentaram na fase aguda e sobreviveram pelo menos até 56 dias de infecção. Nos camundongos knockouts os sinais continuaram aumentando e todos morreram no 10º dia de infecção. Nas retinas e no cérebro dos camundongos controles infectados com *T. gondii* os níveis de IFN- γ , CCL3 / MIP-1 α , CCL4 / MIP-1 β , CCL5 / RANTES e CCR5 tiveram níveis cada vez mais altos, enquanto que nos animais knock-outs os níveis destas mesmas citocinas apresentaram em níveis basais.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos gerais identificar o polimorfismo do gene *CCR5* na toxoplasmose ocular em humanos, bem como, relacionar os polimorfismos com o quadro clínico apresentado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Aspecto ético e seleção dos pacientes.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP (parecer #1980/2009). Foram selecionados 320 paciente imunocompetentes com sorologia positiva para toxoplasmose (anticorpo IgG anti-*T. gondii*), independentes de gênero, que se encontravam em tratamento no Ambulatório de Retinopatia do Hospital de Base de São José do Rio Preto (FUNFARME) e do Ambulatório Médico de Especialidade (AME) de São José do Rio Preto – SP. Os paciente foram agrupados em “com toxoplasmose ocular” (G1; n= 160) ou “ sem toxoplasmose ocular” (G2; n= 160). Os paciente do G2 apresentaram outras doenças oculares e não tinham evidência de toxoplasmose ocular. Com o intuito de estudar a distribuição de alelos na população estudada, foi acrescentado o grupo controle (G3) o qual foi constituído por 160 indivíduos saudáveis doadores voluntários de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto, os quais apresentaram sorologia negativa para a toxoplasmose.

Análise laboratorial

A identificação dos anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgG e IgM foi realizada com o uso de teste imunoenzimático ELFA (*Enzyme Linked fluorescent Assay; BioMerieux, França*).

O DNA genômico foi extraído a partir do sangue periférico colhido com EDTA e com o uso de coluna de sílica QIAmp mini blood Kit (Quiagen); e quantificado (ng/ul) em espectrofotômetro (Biotek, Epoch Instruments).

A genotipagem do gene CCR5 para identificação do polimorfismo CCR5 Δ 32 foi realizada por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com o uso dos oligoiniciadores CCR5c (5' – CAA AAA GAA GGT CTT CAT TAC ACC- 3') e CCR5D (5'- CCT GTG CCT CTT CTT CTC ATT TCG-3'), que detectam a deleção de 32 pares de base (pb). (Huang et al., 1996).

O polimorfismo da região promotora do gene CCR5 (CCR5-59029 A/G) foi identificado por restrição enzimática pelo método PCR-RFLP com o uso da enzima BSP 1286I (Fermentas, Thermo Scientific) e após amplificação, com o uso dos oligoiniciadores sense (5'- CCC GTG AGC CCA TAG TTA AAA CTC-3') e antisense (5'- TCA CAG GGC TTT TCA ACA GTA AGG- 3'), segundo o protocolo de Mc Dermott e colaboradores (1988). As reações de PCR foram preparadas a partir de 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Dream Taq-Themoscientific), dNTPs (Desoxiribonucleitideos Tri-fosfatados) a 2,8 mM, *primer* (*sense* e *antisense*) à 20 pM, 100 ng de DNA *template*. A ciclagem para a amplificação da região CCR5 Δ 32 em termociclador Veriti (*Applied Systems*) foi de um minuto à 94° C, um minuto à 55° C, um minuto e meio minutos à 72° C seguido de cinco ciclos e, após 30 segundos à 94 ° C, 30 segundos à 61° C, 45 segundos à 72° C seguido de 35 vezes. A amplificação da região CCR5 59029 A/G, a ciclagem foi de cinco minutos à 94° C seguida de 35 ciclos de um minuto à 95° C, um minuto à 54° C, um minuto à 72° C (a extensão final foi de 10 minutos à 72° C).

Os fragmentos amplificados foram separados e revelados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% e 2% (correspondentes aos fragmentos CCR5 Δ 32 e CCR5 59029 A/G, respectivamente) e corados com oito μ l syber safe (*Invitrogen – Life Technologies*). Para cada amostra foram aplicados no gel cinco μ l do amplificado. Foram utilizados três μ l *DNA Ladder* 100 pb (*Gene Ruler Thermo Scientific*) como marcador de tamanho molecular. A corrida foi de 120 V por 120 minutos para CCR5 Δ 32 e 30 minutos para CCR5 59029 A/G, sendo o gel visualizado em transluminador UV, como apresentado na Figura 6.

A digestão enzimática do fragmento CCR5 59029 A/G por PCR-RFLP (*Random Fragment Length Polimorfism*) foi realizada com a enzima SDU I isoesquizômero da enzima Bsp1286I (Thermo Scientific), de acordo com as normas do fabricantes. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose a 2%, como segue na Figura 7.

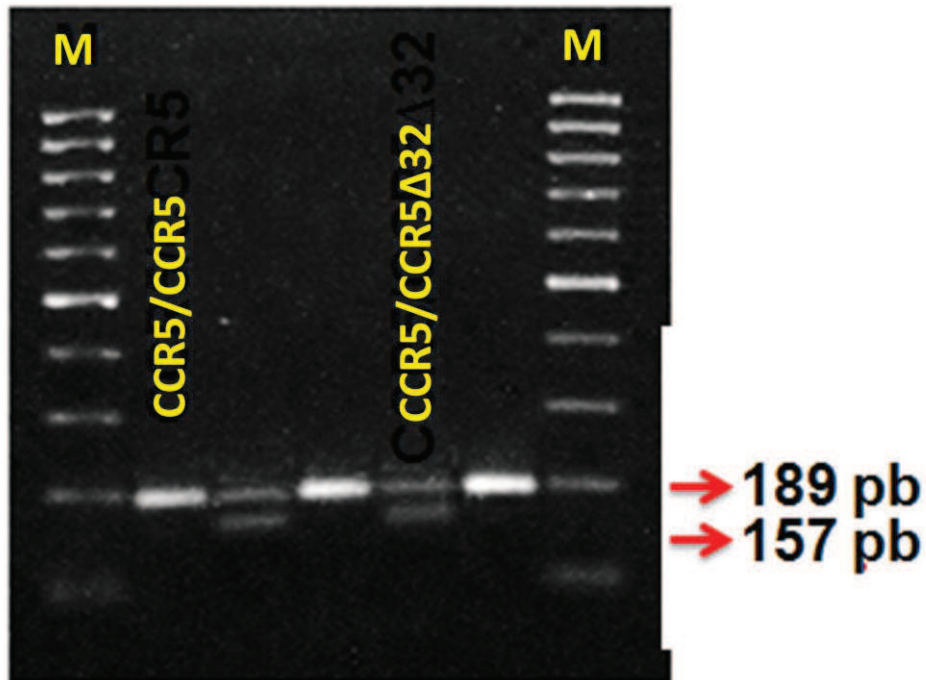


Figura 6: Perfil eletroforético do fragmento de 189 pb do polimorfismo *CCR5*Δ32, avaliado por eletroforese em gel de agarose a 1,2 %. M indica o marcador de 100 pares de bases (pb). As amostras 1, 3 e 5 representam o genótipo de um indivíduo homocigoto para o polimorfismo *CCR5* às amostras 2 e 4 são de indivíduos heterocigotos apresentando genótipo *CCR5/CCR5* Δ32.

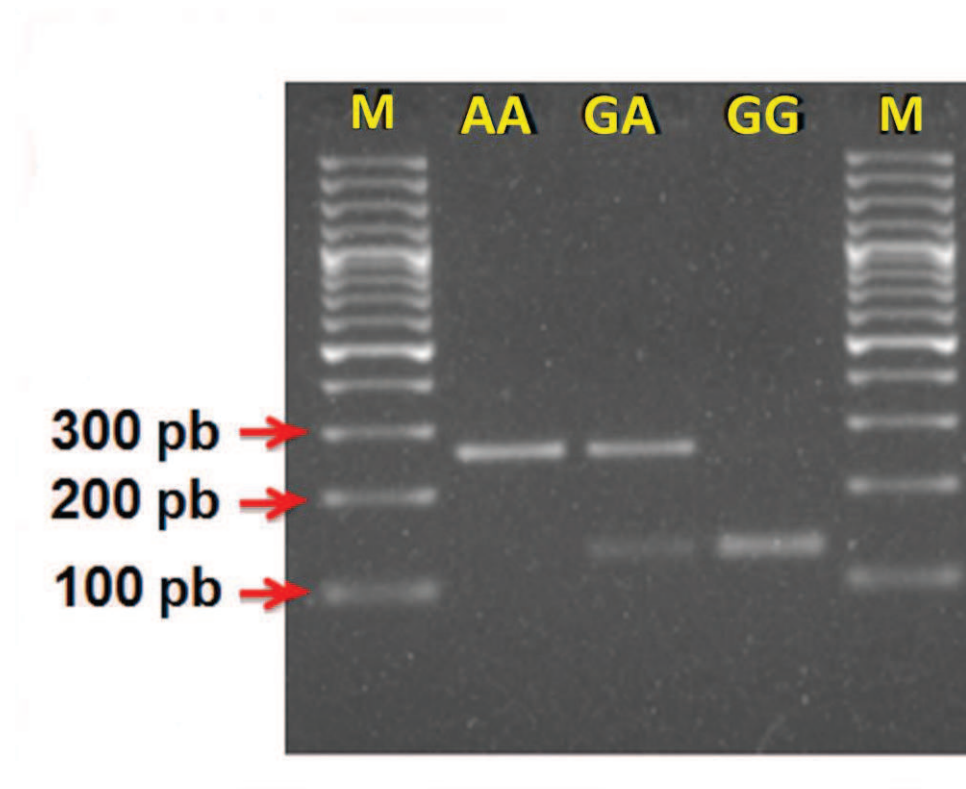
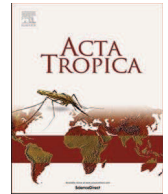


Figura 7: Perfil eletroforético do fragmento de 258 pb do polimorfismo *CCR5* 59029 A/G, clivado com a enzima SDU I e avaliado por eletroforese em gel de agarose a 2,0 %. M indica o marcador de 100 pares de bases (pb), a amostra 1 é do genótipo AA, a amostra 2 o genótipo GA e as amostras 3 o genótipo GG.



CCR5 chemokine receptor gene polymorphisms in ocular toxoplasmosis

Geraldo M. de Faria Junior^{a,c}, Christiane M. Ayo^{a,c}, Amanda P. de Oliveira^a,
Alessandro G. Lopes^d, Fábio B. Frederico^{a,b,c,e}, Aparecida P. Silveira-Carvalho^a,
Mariana Previato^{a,c}, Amanda P. Barbosa^{b,c}, Fernando H.A. Murata^{a,c},
Gildásio Castello de Almeida Junior^{b,c}, Rubens Camargo Siqueira^c, Luiz C. de Mattos^{a,c},
Cinara C. Brandão de Mattos^{a,c,*}

^a Immunogenetics Laboratory, Molecular Biology Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brazil

^b Ophthalmology Outpatient Clinic of Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (HB–FUNFARME), São José do Rio Preto, SP, Brazil

^c Toxoplasma Research Group, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brazil

^d Biology Department, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil

^e Medical Specialties Outpatient Clinic of Hospital Estadual “João Paulo II” (AME), São José do Rio Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Toxoplasma gondii
Ocular toxoplasmosis
CCR5 receptor
Genetic polymorphism
Chemokines

ABSTRACT

C–C chemokine receptor type 5 (CCR5) is a chemokine receptor that influences the immune response to infectious and parasitic diseases. This study aimed to determine whether the CCR5Δ32 and CCR5 59029 A/G polymorphisms are associated with the development of ocular toxoplasmosis in humans. Patients with positive serology for *Toxoplasma gondii* were analyzed and grouped as ‘with ocular toxoplasmosis’ (G1: n = 160) or ‘without ocular toxoplasmosis’ (G2: n = 160). A control group (G3) consisted of 160 individuals with negative serology. The characterization of the CCR5Δ32 and CCR5 59029 A/G polymorphisms was by PCR and by PCR-RFLP, respectively. The difference between the groups with respect to the mean age (G1: mean age: 47.3, SD ± 19.3, median: 46 [range: 18–95]; G2: mean age: 61.3, SD ± 13.7, median: 61 [range: 21–87]; G3: mean age: 38.8, SD ± 17.9, median: 34 [range: 18–80]) was statistically significant (G1 vs.G2: p-value < 0.0001; t = 7.21; DF = 318; G1 vs.G3: p-value < 0.0001; t = 4.32; DF = 318; G2 vs. G3: p-value < 0.0001; t = 9.62; DF = 318). The Nagelkerke r² value was 0.040. There were statistically significant differences for the CCR5/CCR5 (p-value = 0.008; OR = 0.261), AA (p-value = 0.007; OR = 2.974) and AG genotypes (p-value = 0.018; OR = 2.447) between G1 and G2. Individuals with the CCR5/CCR5 genotype and simultaneously the CCR5-59029 AA or AG genotypes have a greater risk of developing ocular toxoplasmosis (4% greater), which may be associated with a strong and persistent inflammatory response in ocular tissue.

1. Introduction

Ocular toxoplasmosis (OT) is the most common cause of posterior uveitis. Its severity may vary according to the immune system of each patient and the reactivation of latent parasites within the retina triggering necrotizing retinopathy and leading to visual impairment (de-la-Torre et al., 2014). The lesions usually heal within two to four months in immunocompetent patients leaving a hyper-pigmented scar. In more than 70% of cases of patients seeking an ophthalmologist, OT lesions that have healed are associated with other injuries (Maenz et al., 2014). Some years ago, we demonstrated that OT represents 27% of ocular

diseases among patients from the northwestern region of São Paulo State, Brazil (Ferreira et al., 2014).

CCR5 is a chemokine receptor expressed on several cells with immune function whose role consists in the recruitment and mobilization of cells to sites of inflammation (Silva-Carvalho et al., 2016). The CCR5Δ32 polymorphism, characterized by a deletion of 32 nucleotides, results in a low expression of a non-functional protein on the cell surface (Gupta and Padh, 2015; Silva-Carvalho et al., 2016). Studies have demonstrated that CCR5-deficient murine animals have increased susceptibility to *T. gondii* infection as well as an increase in the number of parasites in the liver and intestine (Bonfá et al., 2014). Individuals with

* Corresponding author at: Laboratório de Imunogenética – Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 - 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

E-mail addresses: Cinara.Brandao@famerp.br, Cinara.Brandao@live.com (C.C. Brandão de Mattos).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.012>

Received 9 July 2017; Received in revised form 21 November 2017; Accepted 4 December 2017

Available online 06 December 2017

0001-706X/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Characteristics and Frequencies of genotypes and alleles of the polymorphisms of the CCR5 gene in individuals with ocular toxoplasmosis without ocular toxoplasmosis and controls.

	OT (G1) (n = 160)		Without OT (G2) (n = 160)		Controls (G3) (n = 160)		p
Mean age (± SD)	47.3 ± 19.3 ^{a,b}		61.3 ± 13.7 ^{a,c}		38.8 ± 17.9 ^{b,c}		p-value < 0.0001 ^c
Min/Max	18–95		21–87		18–80		
Median	46		61		34		
	n	%	n	%	n	%	
Genotypes							
CCR5/CCR5	141	88.1	148	92.5	144	90.0	
CCR5/CCR5Δ32	19	11.9	12	7.5	16	10.0	
Alleles							
CCR5	301	94.1	308	96.2	304	95.0	
CCR5Δ32	19	5.9	12	3.8	16	5.0	
Genotypes							
CCR559029 A/A	48	30.0	39	24.4	47	29.4	
CCR559029 A/G	81	50.6	80	50.0	81	50.6	
CCR559029 G/G	31	19.4	41	25.6	32	20.0	
Alleles							
CCR559029 A	177	55.3	158	49.4	175	54.7	
CCR559029 G	143	44.7	162	50.6	145	45.3	

OT = Ocular toxoplasmosis.

a = G1xG2.; b = G1xG3; c = G2xG3.

* G1xG2; G1xG3; G2xG3 p-value < 0.0001.

the AA genotype, which relates to the CCR5 promoter polymorphism 59029, show higher CCR5 expression on the leukocyte surface when compared to the other genotypes (Oliveira et al., 2015).

These polymorphisms have been correlated with susceptibility to various infectious diseases including HIV and inflammatory diseases such as osteomyelitis, preeclampsia, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus (Rao et al., 2014; Silva-Carvalho et al., 2016; Gupta and Padh, 2015; Souza et al., 2015). The aim of this study was to investigate possible associations of the CCR5Δ32 (rs333) and CCR5 59029 A/G (rs1799987) polymorphisms with the development of OT in humans.

2. Materials and methods

2.1. Ethics information

All individuals, who agreed to participate in this research, were informed about the nature of the study and were required to sign an informed consent form authorizing the use of their samples. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Medicine School in São José do Rio Preto (case #1980/2009).

2.2. Sample selection and clinical diagnosis

This study enrolled 320 immunocompetent patients with serologically diagnosed toxoplasmosis (IgG anti-*T. gondii* antibodies) matched by gender, being treated in the Retinopathy Outpatient Service of Hospital de Base of the Medicine School in São José do Rio Preto (FUNFARME) and in the Medical Services Outpatient Clinic (AME) in São José do Rio Preto. Patients were grouped as ‘with OT’ (G1; n = 160) or ‘without OT’ (G2; n = 160). Patients ‘without OT’ had other ocular diseases without any evidence of OT. In order to verify the frequency of the alleles in the study population, a control group (G3) was formed of 160 healthy volunteer blood donors from the blood bank of São José do Rio Preto, whose serology results for antibodies against toxoplasmosis were negative.

The clinical evaluation of subjects was conducted by two experienced physicians using an indirect binocular ophthalmoscope (Binocular Ophthalmoscope ID10, Topcon Corporation, USA), and all were classified according to the ETDRS criteria (ETDRS, 1985).

2.3. Inclusion/exclusion criteria

The inclusion criteria of the patient groups were positive laboratory diagnosis of toxoplasmosis, the presence of ocular scars/lesions (G1) or without ocular scars/lesions due to toxoplasmosis (G2), and being a resident in a municipality in the northwestern region of the state of Sao Paulo. The inclusion criteria for the control group (G3) were negative laboratory diagnosis for toxoplasmosis and living in the same geographical region as the patients.

The exclusion criteria for all groups were other infectious and parasitic diseases, blood dyscrasia, and the use of oral anticoagulants.

2.4. Laboratory analysis

IgG anti-*T. gondii* antibodies were confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer’s instructions, performed in duplicate (ETI-TOXO-G PLUS; DiaSorin S.p.A. Italy).

Genomic DNA was attained from peripheral blood using a commercial kit for silica column extraction (QIAamp1DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, the Netherlands) following the manufacturer’s instructions.

Identification of the deletion of 32 base pairs of the CCR5 gene (CCR5Δ32) was achieved using the polymerase chain reaction (PCR) technique. The methodology used to identify the CCR5 59029 A/G polymorphism in the promoter region of the CCR5 gene was polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The A/G alleles were identified by the presence of a restriction site for the Bsp1286I enzyme (FastDigest, Fermentas-Thermo Scientific). The PCR conditions were previously described in detail (de Oliveira et al., 2015).

2.5. Statistical analysis

Genotype and allelic frequencies were obtained by direct counting. Statistical calculations were performed using GraphPad InStat software (version 3.06). The chi-square test was used to compare proportions between groups, adopting a level of significance of 5%. The mean ages were compared using the *t*-test. The Hardy–Weinberg equilibrium was verified using the ARLEQUIN program version 3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>). A binary logistic regression test (stepwise method) was performed using the SPSS program (IBM, version 23)

to verify the risk factors associated with the development of OT.

3. Results

Four hundred and eighty subjects were analyzed. Table 1 shows the characteristics of individuals with toxoplasmosis and control subjects. The differences between groups in respect to the mean age were statistically significant (G1 vs. G2: p -value < 0.0001; $t = 7.21$; $DF = 318$; G1 vs. G3: p -value < 0.0001; $t = 4.32$; $DF = 318$; G2 vs. G3: p -value < 0.0001; $t = 9.62$; $DF = 318$).

In all groups, the distribution of the genotypes of the CCR5 Δ 32 and CCR5 59029 A/G polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium (p -value ≥ 0.05). No statistical difference was found both for alleles and for genotypes of the CCR5 gene (homozygotes and heterozygotes) between individuals with OT and controls.

Statistical analysis of the risk factors for the CCR5 polymorphisms identified statistically significant differences for the CCR5/CCR5 (p -value = 0.008; OR = 0.261), AA (p -value = 0.007; OR = 2447) and AG (p -value = 0.018; OR = 2.477) genotypes between G1 and G2. The Nagelkerke r^2 value was 0.040. Multivariate logistic regression analysis showed that individuals in G1 and G2 who presented the CCR5/CCR5 genotypes and simultaneously AA or AG had a higher risk of developing OT (equivalent to 0.04 times or 4% greater). There was no statistically significant differences in the distribution between genders within the groups.

4. Discussion

This study tested the hypothesis that the CCR5 Δ 32 and CCR5 59029A/G polymorphisms of the CCR5 gene are associated with the development of eye damage due to toxoplasmosis. Two groups of patients, both of which had clinical and serologic diagnoses of the disease, were selected in order to investigate the potential effect of the association of these polymorphisms on the presence and absence of ocular disease. A group of individuals without infection (G3) was also selected to measure the frequency of these polymorphisms in a healthy population. To our knowledge, this is the first study that analyzed the frequencies of these two polymorphisms of the CCR5 gene in the development of OT in humans.

At first glance, data from this study seem to indicate that both polymorphisms are not associated with the development of OT. The differences in frequencies of both the analyzed polymorphisms between the groups of patients and controls were not statistically significant. However, after the multivariate logistic regression analysis we observed that the individuals of G1 and G2 who presented the CCR5/CCR5 genotypes and simultaneously the CCR5-59029 AA or AG genotypes have a higher risk of developing OT (equivalent to 0.04 times or 4% greater).

Bonfá et al. (2014), using a murine model, observed that homozygous mice for the CCR5 gene ($^{-/-}$) showed marked susceptibility to infection, presenting 100% mortality in up to 16 days after inoculation of *T. gondii*, while 70% of the wild-type animals (controls) survived until the 30th day after infection. In addition, histological tests of the liver and small intestine showed that a greater amount of DNA of the parasite was identified in CCR5 $^{-/-}$ animals compared to control animals.

The CCR5 gene encodes the receptor of the same name, which, in addition to being expressed in different cell types, allows the binding of the CCL3, CCL4 or CCL5 chemokines (Blanco and Ochoa-Callejero, 2012; Carpenter et al., 2014; Ortiz-Alegría et al., 2010). There is evidence that binding of these chemokines to CCR5 is crucial to trigger the immune response against different microorganisms (Blanco and Ochoa-Callejero, 2012; Gupta and Padh, 2015; Kikumura et al., 2012; Oliveira et al., 2014; Wong and Fish, 2003). A fundamental role in protecting against intracellular and extracellular parasites has been attributed to CCR5, because it modulates the initial immune response against the

parasite.

Experimental studies show that CCR5 plays an important role in controlling natural killer (NK) cell activity in tissues infected by *T. gondii*. There is evidence that animals with CCR5 deficiency have decreased inflammatory response with higher parasitemia and consequently higher death rates (Khan et al., 2001, 2006; Kikumura et al., 2012). According to Kikumura et al. (2012), CCR5 is one of the main molecules in the retina of animals during *T. gondii* infection; this is justified as the levels of CCR5 expression have reached a peak in the retina and brain of the murine animals by the 28th day of infection.

Activation of the immune response against parasites involves the recruitment of a variety of cells including neutrophils, T lymphocytes, macrophages, dendritic cells and inflammatory monocytes. The CCR5 receptor may be expressed by resident cells or by those that migrate to the tissue after stimulation by pro-inflammatory cytokines such as interleukin-12 (IL-12), IFN- γ and TNF, or when in contact with the pathogenic agent (Moser and Loetscher, 2001). Thus, the mechanisms that control replication of the parasite and the subsequent inflammation can indeed be partly due to the cells recruited by CCR5.

Neutrophils, Macrophages and dendritic cells are essential in the initial phase of immune response because they are IL-12 secreting cells; this cytokine is essential for resistance against infection (Denkers et al., 2003; Scott and Hunter, 2002). IL-12 stimulates NK cells to produce IFN- γ and to promote the development of Th1 cells that produce IFN- γ (Gazzinelli et al., 1994). The interaction of parasite antigens with the CCR5 chemokine receptor induces IL-12 synthesis in mature dendritic cells, with this being a major pathway of IFN- γ -dependent resistance to infections (Aliberti et al., 2000). Intraocular immune response is suppressed under normal circumstances, but there is experimental evidence that *T. gondii* infection promotes the production of factors such as IFN- γ that suppress the immune privilege of this organ. Thus, factors similar to the response that occurs in other tissues are involved in the development of eye injuries (Gazzinelli et al., 1994; Kijlstra and Petersen, 2014; Maenz et al., 2014; Roberts and McLeod, 1999).

Human studies reveal that a mutant allele of the CCR5 gene, with a 32 base pair deletion, results in reduced cell surface expression of CCR5, decreasing the efficiency of the immune response in these individuals (Blanpain et al., 2000; Vallochi et al., 2008). We observed that individuals who had this deletion of 32 base pairs in heterozygosity did not have an increased risk of developing ocular toxoplasmosis, since this alteration appears to protect ocular tissue by the reduced expression of the CCR5 chemokine and consequently lower immune and inflammatory response. Additionally, Vallochi et al. (2008) did not observe any association between the CCR5 Δ 32 allele and ocular toxoplasmosis in Brazilian patients, as this is a rare variant, thereby corroborating the results found in this study.

Machado et al. (2014) reported that the immune response may partially promote the development of ocular lesions resulting from *T. gondii* infection and the mechanisms involved may be associated with the pathogenesis and protective effects that control tissue damage. The increased frequency of circulating NK cells and proinflammatory monocytes in children infected with *T. gondii*, especially those who have active ocular lesions, are indicative of an intense and persistent proinflammatory response.

Clinical diagnosis of OT is suspected based on the results of the dilated fundus examination which is used to verify the presence of exudative lesions and scars characteristic of this disease (Pleyer et al., 2014; Vasconcelos-Santos, 2012). However, the analysis of serum to detect the presence of IgG anti-*T. gondii* antibodies indirectly ensures that all patients in G1 and G2, that is, with and without OT, were exposed to the parasite (Dhakal et al., 2015; Martins et al., 2015).

Although studies reported that the clinical diagnosis alone leads to a considerable number of false positive results as confirmed by biological ocular fluid tests (de-la-Torre et al., 2007, 2009; Vasconcelos-Santos 2012; Ozgonul and Besirli, 2017), in this study all the patients with clinical diagnoses by two ophthalmologists, were also submitted to

serology tests using the ELFA technique.

The average age of the seropositive patients (G1 and G2) was higher than the mean age of the individuals with negative serology (G3). This finding is easy to understand because the greater the host's age, the greater is the chance of exposure to this infection. In addition, the average age of the patients with OT (G1) was lower than the mean age of those without evidence of the disease (G2). This observation is consistent with previously published data (Ayo et al., 2016; Ayo et al., 2015; Ferreira et al., 2014; Hofhuis et al., 2011). Infection with *T. gondii* occurs at any time in life but a significant number of patients are infected congenitally (Kijlstra and Petersen, 2013; Pfaff et al., 2014). However, there are no diagnostic tests that reliably define at what time the infection occurred. The disease can also manifest in childhood and the resulting scars tend to be persistent. Therefore, it is not unusual to find population analyzes reporting the presence of this disease in young age groups (Gonzalez Fernandez et al., 2016; Arantes et al., 2015; Dubey et al., 2012; Maenz et al., 2014; Nogareda et al., 2014; Hofhuis et al., 2011).

Individuals with the CCR5/CCR5 genotype and simultaneously the CCR5-59029 AA or AG genotypes have a greater risk of developing ocular toxoplasmosis, which may be associated to a strong and persistent inflammatory response in the ocular tissue.

Author's contribution

CCBM corresponding author and head of the FAMERP Toxoplasma Research Group. CCBM, LCM were responsible to concept and design of the study. MP, GCAJr, FBF, APB, performed the inclusion of patients with ocular toxoplasmosis, sample collection, and develop the ophthalmological clinical evaluation and clinical analyses. GMFJ, APO, ALG, FHM performed the laboratorial tests. CCBM, LCM, GMFJ, CMA performed the data analysis. CCBM, LCM, GMFJ, CMA wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grants: 2015/17226-7 to GCAJr; 2013/06580-9 to CMA; 2013/10050-5 to MP; 2013/15879-8 to FHAM; 2013/25650-8, 2009/17540-2 to LCM). GMFJ received a scholarship by PIBIC/FAMERP. GMFJ, ALG and APO were supported by scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). CCBM was supported by grant from the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (BAP-FAMERP). LCM was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant: 473579/2009-0). The opinions, assumptions, and conclusions or recommendations expressed in this material are the responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of FAPESP. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflicts of interest

The authors do not have any conflict of interest with the present work.

Acknowledgments

Many thanks to David Hewitt for the English version and to Professor Stephen Henry from Auckland University of the Technology for providing library access.

References

Aliberti, J., Reis e Sousa, C., Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G.B., Sher, A., 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha

+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 1, 83–87. <http://dx.doi.org/10.1038/76957>.

Arantes, T.E.F., Silveira, C., Holland, G.N., Muccioli, C., Yu, F., Jones, J.L., Goldhardt, R., Lewis, K.G., Belfort, R., 2015. Ocular involvement following post-natally acquired toxoplasma gondii infection in southern Brazil: a 28-year experience. *Am. J. Ophthalmol.* 159, 1002–1012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajo.2015.02.015>.

Ayo, C.M., Camargo, A.V., da, S., Frederico, F.B., Siqueira, R.C., Previato, M., Murata, F.H.A., Silveira-Carvalho, A.P., Barbosa, A.P., Brandão de Mattos, C., De, C., de Mattos, L.C., 2015. MHC class I chain-related gene a polymorphisms and linkage disequilibrium with HLA-B and HLA-C alleles in ocular toxoplasmosis. *PLoS One* 10, e0144534. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0144534>.

Ayo, C.M., Frederico, F.B., Siqueira, R.C., Brandão de Mattos, C.C., Previato, M., Barbosa, A.P., Murata, F.H., Silveira-Carvalho, A.P., de Mattos, L.C., 2016. Ocular toxoplasmosis: susceptibility in respect to the genes encoding the KIR receptors and their HLA class I ligands. *Sci. Rep.* 9 (6), 36632. <http://dx.doi.org/10.1038/srep36632>.

Blanco, J.R., Ochoa-Callejero, L., 2012. Could CCR5 be a potential target against infections? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 10, 411–414. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.12.26>.

Blanpain, C., Lee, B., Tackoen, M., Puffer, B., Boom, A., Libert, F., Sharron, M., Wittamer, V., Vassart, G., Doms, R.W., Parmentier, M., 2000. Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations. *Blood* 96, 1638–1645.

Bonfá, G., Benevides, L., Souza, M., Do, C., Fonseca, D.M., Mineo, T.W.P., Rossi, M.A., Silva, N.M., Silva, J.S., de Barros Cardoso, C.R., 2014. CCR5 controls immune and metabolic functions during Toxoplasma gondii infection. *PLoS One* 9, e104736. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0104736>.

Carpenter, D., Taype, C., Goulding, J., Levin, M., Eley, B., Anderson, S., Shaw, M.-A., Armour, J.A.L., 2014. CCL3L1 copy number, CCR5 genotype and susceptibility to tuberculosis. *BMC Med. Genet.* 15, 5. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2350-15-5>.

de Oliveira, A.P., Bernardo, C.R., Camargo, A.V., Ronchi, L.S., Borim, A.A., de Mattos, C.C., de Campos Júnior, E., Castiglioni, L., Netinho, J.G., Cavasini, C.E., Bestetti, R.B., de Mattos, L.C., 2015. Genetic susceptibility to cardiac and digestive clinical forms of chronic chagas disease: involvement of the CCR5 59029 A/G polymorphism. *PLoS One* 10, e0141847. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141847>.

de-la-Torre, A., González, G., Díaz-Ramirez, J., Gómez-Marín, J.E., 2007. Screening by ophthalmoscopy for Toxoplasma retinochoroiditis in Colombia. *Am. J. Ophthalmol.* 143, 354–356.

de-la-Torre, A., López-Castillo, C.A., Rueda, J.C., Mantilla, R.D., Gomez-Marín, J.E., Anaya, J.M., 2009. Clinical patterns of uveitis in two ophthalmology centres in Bogota Colombia. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 37, 458–466.

de-la-Torre, A., Pfaff, A.W., Grigg, M.E., Villard, O., Candolfi, E., Gomez-Marín, J.E., 2014. Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. *Cytokine* 68, 23–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyt.2014.03.005>.

Denkers, E.Y., Del Rio, L., Bennouna, S., 2003. Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chem. Immunol. Allergy* 83, 95–114.

Dhakal, R., Gajurel, K., Pomares, C., Talucod, J., Press, C.J., Montoya, J.G., 2015. Significance of a positive Toxoplasma Immunoglobulin M test result in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 53 (11), 3601–3605.

Dubey, J.P., Lago, E.G., Gennari, S.M., Su, C., Jones, J.L., 2012. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 139, 1375–1424.

ETDRS, 1985. Photocoagulation for diabetic macular edema. early treatment diabetic retinopathy study report number 1. early treatment diabetic retinopathy study research group. *Arch. Ophthalmol.* 103, 1796–1806.

Ferreira, A.L.C., De Mattos, C.C.B., Frederico, F.B., Meira, C.S., Almeida, G.C., Nakashima, F., Bernardo, C.R., Pereira-Chioccola, V.L., De Mattos, L.C., 2014. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiol. Infect.* 142 (1), 142–148.

Gazzinelli, R.T., Brézina, A., Li, Q., Nussenblatt, R.B., Chan, C.C., 1994. Toxoplasma gondii: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of TNF-alpha and IFN-gamma. *Exp. Parasitol.* 78 (2), 217–229.

Gonzalez Fernandez, D., Nascimento, H., Nascimento, C., Muccioli, C., Belfort Jr., R., 2016. Uveitis in São Paulo, Brazil: 1053 new patients in 15 months. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 25, 1–6.

Gupta, A., Padh, H., 2015. Analysis of CCR5 and SDF-1 genetic variants and HIV infection in Indian population. *Int. J. Immunogenet.* 42 (4), 270–278.

Hofhuis, A., van Pelt, W., van Duynhoven, Y.T.H.P., Nijhuis, C.D.M., Mollema, L., van der Klis, F.R.M., Havelaar, A.H., Kortbeek, L.M., 2011. Decreased prevalence and age-specific risk factors for Toxoplasma gondii IgG antibodies in The Netherlands between 1995/1996 and 2006/2007. *Epidemiol. Infect.* 139 (4), 530–538.

Khan, I.A., Murphy, P.M., Casciotti, L., Schwartzman, J.D., Collins, J., Gao, J.L., Yeaman, G.R., 2001. Mice lacking the chemokine receptor CCR1 show increased susceptibility to Toxoplasma gondii infection. *J. Immunol.* 166 (3), 1930–1937.

Khan, I.A.I., Thomas, S.Y.S., Moretto, M.M.M., Lee, F.F.S., Islam, S.A., Combe, C., Schwartzman, J.D., Luster, A.D., 2006. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following Toxoplasma gondii infection. *PLoS Pathog.* 2, e49. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0020049>.

Kijlstra, A., Petersen, E., 2013. Epidemiology, pathophysiology, and the future of ocular toxoplasmosis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 22 (2), 138–147.

Kikumura, A., Ishikawa, T., Norose, K., 2012. Kinetic analysis of cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in murine ocular toxoplasmosis. *Br. J. Ophthalmol.* 96 (9), 1259–1267.

Machado, A.S., Carneiro, A.C., Béla, S.R., Andrade, G.M., Vasconcelos-Santos, D.V., Januário, J.N., Coelho-dos-Reis, J.G., Ferro, E.A., Teixeira-Carvalho, A., Vitor, R.W., Martins-Filho, O.A., 2014. Biomarker analysis revealed distinct profiles of innate and adaptive immunity in infants with ocular lesions of congenital toxoplasmosis. *Mediators. Inflamm.* 910621. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/910621>.

Maenz, M., Schlüter, D., Liesenfeld, O., Schares, G., Gross, U., Pleyer, U., 2014. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog. Retin. Eye Res.*

- 39, 77–106.
- Martins, L.M., Rangel, A.L.P., Peixe, R.G., Silva-Dos-Santos, P.P.S.P., Lemos, E.M., Martins-Filho, O.A., Oliveira, L.M.G.B., Bahia-Oliveira, L.M.G., 2015. Specific IgM, IgG and IgG1 directed against *Toxoplasma gondii* detected by flow cytometry and their potential as serologic tools to support clinical indirect fundoscopic presumed diagnosis of ocular disease. *J. Immunol. Methods* 417, 97–106.
- Moser, B., Loetscher, P., 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* 2 (2), 123–128.
- Nogareda, F., Le Strat, Y., Villena, I., De Valk, H., Goulet, V., 2014. Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980–2020: model-based estimation. *Epidemiol. Infect.* 142 (8), 1661–1670.
- Oliveira, A.P., Bernardo, C.R., Camargo, A.V.S., Villafanha, D.F., Cavasini, C.E., de Mattos, C.C.B., De Godoy, M.F., Bestetti, R.B., de Mattos, L.C., 2014. CCR5 chemokine receptor gene variants in chronic Chagas' disease. *Int. J. Cardiol.* 176 (2), 520–522.
- Oliveira, A.P., Bernardo, C.R., Camargo, A.V.S., Ronchi, L.S., Borim, A.A., de Mattos, C.C.B., Júnior, E.C., Castiglioni, L., Netinho, J.G., Cavasini, C.E., Bestetti, R.B., de Mattos, L.C., 2015. Genetic susceptibility to cardiac and digestive clinical forms of chronic chagas disease: involvement of the CCR5 59029 A/G polymorphism. *PLoS One* 10, e0141847. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141847>.
- Ortiz-Alegria, L.B., Caballero-Ortega, H., Cañedo-Solares, I., Rico-Torres, C.P., Sahagún-Ruiz, A., Medina-Escutia, M.E., Correa, D., 2010. Congenital toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immun.* 11, 363–373. <http://dx.doi.org/10.1038/gene.2010.21>.
- Ozgonul, C., Besirli, C.G., 2017. Recent developments in the diagnosis and treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmic Res.* 57, 1–12.
- Pfaff, A.W.A., De-la-Torre, A., Rochet, E., Brunet, J., Sabou, M., Sauer, A., Bourcier, T., Gomez-Marin, J.E., Candolfi, E., 2014. New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 44 (2), 99–107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.09.007>.
- Pleyer, U., Schlüter, D., Mänz, M., 2014. Ocular toxoplasmosis: recent aspects of pathophysiology and clinical implications. *Ophthalmic. Res.* 52 (3), 116–123. <http://dx.doi.org/10.1159/000363141>.
- Rao, D.A., Gurish, M.F., Marshall, J.L., Slowikowski, K., Fonseka, C.Y., Liu, Y., Donlin, L.T., Henderson, L.A., Wei, K., Mizoguchi, F., Teslovich, N.C., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Coblyn, J.S., Helfgott, S.M., Lee, Y.C., Todd, D.J., Bykerk, V.P., Goodman, S.M., Pernis, A.B., Ivashkiv, L.B., Karlson, E.W., Nigrovic, P.A., Filer, A., Buckley, C.D., Lederer, J.A., Raychaudhuri, S., Brenner, M.B., 2017. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* 542, 110–114. <http://dx.doi.org/10.1038/nature20810>.
- Roberts, F., McLeod, R., 1999. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol. Today* 15 (2), 51–57. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758\(98\)01377-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758(98)01377-5).
- Scott, P., Hunter, C.A., 2002. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr. Opin. Immunol.* 14 (4), 466–470. [http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915\(02\)00353-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00353-9).
- Silva-Carvalho, W.H.V., Moura, R.R., Coelho, A.V.C., Crovelha, S., Guimarães, R.L., 2016. Frequency of the CCR5-delta 32 allele in Brazilian populations: a systematic literature review and meta-analysis. *Infect. Genet. Evol.* 43, 101–107.
- Souza, M.S.Q.A., Souza, C.A., Cunha, L.M.P., Souza, A.Q.A., Morais, M.S., Rabenhorst, S.H.B., 2015. A new look at osteomyelitis development –Focus on CCR5delta32. Study in patients from Northeast Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 31, 61–63.
- Vallochi, A.L., Goldberg, A.C., Falcai, A., Ramasawmy, R., Kalil, J., Silveira Jr, C., Belfort, R., Rizzo, L.V., 2008. Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and guest behaving badly. *Clin. Ophthalmol.* 4, 837–848.
- Vasconcelos-Santos, D.V., 2012. Ocular manifestations of systemic disease. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 23, 543–550. <http://dx.doi.org/10.1097/ICU.0b013e328358bae5>.
- Wong, M.M., Fish, E.N., 2003. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin. Immunol.* 15, 5–14. [http://dx.doi.org/10.1016/S1044-5323\(02\)00123-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1044-5323(02)00123-9).

CONCLUSÃO

5 Conclusões

1. Os polimorfismos CCR5 Δ 32 (rs333) e CCR5 59029 (rs1799987) não estão associados ao desenvolvimento da toxoplasmose ocular.
2. Os indivíduos com genótipos selvagens CCR5/CCR5 e CCR5 59029 AA ou AG apresentam maiores chances de desenvolver toxoplasmose ocular.
3. A resposta imune forte e persistente no tecido ocular está associada ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

6 Referências Bibliográficas

- 1 – de Oliveira Azevedo CT, do Brasil PE, Guida L, Lopes Moreira ME. Performance of Polymerase Chain Reaction Analysis of the Amniotic Fluid of Pregnant Women for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One. 2016; 11(4): 1-26.
- 2 – Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta tropica. 2002; 81: 111-122.
- 3- de Oliveira PA, Oliveira FC, Faria LMJ, Cadernartori BG, Marcolongo-Pereira C, Coelho ACB et al. Patogenicidade e virulência de *Toxoplasma gondii* isolado de suínos de criação artesanal no sul do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 2014; 34(12):1186-1190.
- 4 – Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 2012; 25(2): 264-96.
- 5 - Bottari NB, Baldissera MD, Tonin AA, Rech VC, Alves CB, D'Avila F et al. Synergistic effects of resveratrol (free and inclusion complex) and sulfamethoxazole-trimetropim treatment on pathology, oxidant/antioxidant status and behavior of mice infected with *Toxoplasma gondii*. Microb Pathog. 2016; 95: 166-174.
- 6 - Krick JA, Remington JS. Toxoplasmosis in the adult – an overview. N Engl J Med. 1978; 298(10): 550-3.
- 7 - Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009; 39(8): 895-901.
- 8 – Bonfá G. Papel de CCR5 na Infecção por *Toxoplasma gondii*. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós- graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- 9 – Goulart PRM, Brener B, Amendoeira MRR. Mamíferos de produção e seu papel na cadeia epidemiológica do *Toxoplasma gondii*- revisão. Vet Not. 2014; 19(2): 109-126.
- 10 – Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. Annu Rev Microbiol. 2015;69(1): 463-485.
- 11 – Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and Development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(2): 267-99.
- 12 - Afonso E, Thulliez P, Gilot-Fromont E. Transmission of *Toxoplasma gondii* in an urban population of domestic cats (*Felis catus*). Int. J. Parasitol. 2006; 36: 1373-1382.

- 13 - Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 1998; 28: 1019-1024.
- 14 - Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends Parasitol.* 2002; 18: 355-359.
- 15 - Jones JL, Dubey JP. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. *Exp. Parasitol.* 2010; 124: 10-25.
- 16 - Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31:1699 –1703.
- 17 - Jones JL, Dargelas V, Roberts J, Press C, Remington JS, Montoya JG. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clin Infect Dis.* 2009; 49(6): 878-84.
- 18 – Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol.* 2012; 34(6): 793-813.
- 19 - Pfaff AW, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Villard O, Senegas A, Mousli M et al. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. *Parasitology.* 2007. 134:1895–1902.
- 20 - Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am. J. Vet. Res.* 1988. 49:910–913.
- 21 - Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jennum PA, et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ.* 2000. 321:142–147.
- 22 - Hill DE, Benedetto SM, Coss C, McCrary JL, Fournet VM, Dubey JP. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. *J. Food Prot.* 2006. 69:1961–1965.
- 23 - Gómez-Marin JE, de-la-Torre A, Angel-Muller E, Rubio J, Arenas J, Osorio E. et al. First Colombian multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011. 5(5).
- 24 Dabritz HA, Miller MA, Atwill ER, Gardner IA, Leutenegger CM, Melli AC, et al. Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2007. 231(11):1676–1684.
- 25 - Dubey JP. 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

- 26 - Dumètre A, Le Bras C, Baffet M, Meneceur P, Dubey JP, Derouin F, et al. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol.* 2008. 153(3-4):209–213.
- 27 - Balasundaram MB, Andavar R, Palaniswamy M, Venkatapathy N. Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. *Arch. Ophthalmol.* 2010. 128(1):28–32.
- 28 - de Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.* 2006. 12(2):326–329.
- 29 - Ferreira IM, Vidal JE, de Mattos Cde C, de Mattos LC, Qu D, Su C. et al. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP–PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol.* 2011. 129(2):190-95.
- 30 - Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology.* 2009; 39(12):1385-94.
- 31 - Havelaar AH, Kemmeren JM, Kortbeek LM. Disease burden of congenital toxoplasmosis. *Clin Infect Dis.* 2007; 44(11):1467–1474.
- 32 - Israelski DM, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Infect Dis Clin North Am.* 1988;2(2):429–445.
- 33 - Israelski DM, Remington JS. Toxoplasmosis in patients with cancer. *Clin Infect Dis.* 1993;17(2):423–435.
- 34 - Leiva LE, Junprasert J, Hollenbaugh D, Sorensen RU. Central nervous system toxoplasmosis with an increased proportion of circulating gamma delta T cells in a patient with hyper-IgM syndrome. *J Clin Immunol.* 1998;18(4):283–290.
- 35 - Tsuge I, Matsuoka H, Nakagawa A, Kamachi Y, Aso K, Negoro T et al. Necrotizing toxoplasmic encephalitis in a child with the X-linked hyper-IgM syndrome. *Eur J Pediatr.* 1998;157(9):735–737.
- 36 - Yong PF, Post FA, Gilmour KC, Grosse-Kreul D, King A, Easterbrook P et al. Cerebral toxoplasmosis in a middle-aged man as first presentation of primary immunodeficiency due to a hypomorphic mutation in the CD40 ligand gene. *J Clin Pathol.* 2008;61(11):1220–1222.
- 37 - Derouin F, Pelloux H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(12):1089–1101.
- 38 - Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *The Journal of infectious diseases.* 2001;184(5):633–639.

- 39 - Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W et al. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis*. 2007;45(7):88–95.
- 40 - Yolken RH, Torrey EF. Are some cases of psychosis caused by microbial agents? A review of the evidence. *Mol Psychiatry*. 2008;13:470–479.
- 41 - Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004. 363(1):1965–1976.
- 42 - Fernandes GC, Azevedo RS, Amaku M, Yu AL, Massad E. Seroepidemiology of *Toxoplasma* infection in a metropolitan region of Brazil. *Epidemiol Infect*. 2009. 137(12):1809-15.
- 43 - Ferreira AI, De Mattos CC, Frederico FB, Meira CS, Almeida GC Jr, Nakashima F et al. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiol Infect*. 2014.142(1):142-8.
- 44 - Commodaro AG, Chiasson M, Sundar N, Rizzo LV, Belfort R Jr, Grigg ME. Elevated *Toxoplasma gondii* Infection Rates for Retinas from Eye Banks, Southern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015.22(4):691-3.
- 45 - Lim DC, Cooke BM, Doerig C, Saeij JP. Toxoplasma and Plasmodium protein kinases: roles in invasion and host cell remodelling. *International journal for parasitology*. 2012; 42(1):21–32.
- 46 - Cesbron-Delauw MF, Gendrin C, Travier L, Ruffiot P, Mercier C. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic*. 2008; 9(5):657–664
- 47 - Ruiz-Rosado JD, Olguín JE, Juárez-Avelar I, Saavedra R, Terrazas LI, Robledo-Avila FH. MIF Promotes Classical Activation and Conversion of Inflammatory Ly6C^{high} Monocytes into TipDCs during Murine Toxoplasmosis. *Mediators of Inflammation*. 2016.
- 48 – Cordeiro CA, Moreira PR, Dutra WO, Young L, Campos WR, Oréface F et al. Imunologia da retinocoroidite toxoplásmica. *Arq Bras Oftalmol*. 2010. 73:548-51.
- 49 - Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994; 219(1): 127-39.
- 50 - Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
- 51 - Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol Today*. 1999;15(2):51-7.

- 52 - Hunter CA, Suzuki Y, Subauste CS, Remington JS. Cells and cytokines in resistance to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996; 219(1):113-25.
- 53 - Lawton, A.R. B-cell development. In: POLIN, R. A.; FOX, W. W. Ed Fetal and Neonatal Physiology. Phil, WB. Saun Comp. 2 ed. 1432-1438, 1992.
- 54 –Araújo TE. Perfil de Quimiocinas e Citocinas séricas em recém-nascidos com diferentes manifestações da Toxoplasmose Congênita Ocular. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós- graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.
- 55 - Zorgi, NE, Costa A, Galisteo AJJR. Humoral response and immune protection in mice immunized with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. *Immunol Lett*. 2011.138(2):187-96.
- 56 – Montoya JG. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 2002; 185:73-82.
- 57 – Suzuki LA, Rocha R, Rossi C. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Med Microbiol*. 2001; 50: 63-70.
- 58 – Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012; 139(11):1375-424.
- 59 - Jula M, Jula FM, Nowzari GKN, Hashemazadeh FH. A serological and molecular study on *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goat in Tabriz. *Razi Intitute*. 2013;68(1):29-35.
- 60 – Kompalic-Cristo A, Britto C, Fernandes O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *J Bras Patol e Med Lab*. 2005;41(4):229-35.
- 61 – Reichl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa J. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BCM Infection Diseases*. 2003;9:1-9.
- 62 – Nguyen TD, Kesel MDE, Bigaignon G, Hoet P, Pazzaglia G, Lammens M, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites and Bradyzoites in blood, urine and brains of infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996;3(6):635-9.
- 63 – Tlamçani Z, Lemkhenete Z, Lmimouni BE. Toxoplasmosis: The value of molecular methods in diagnosis compared to conventional methods. *JMID*. 2013; 3(2):93-9.
- 64 – Detecção P, Vírus DOS, Na H-EHC V, Sangue TDE. *Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologia em Saúde*. 2007; 1-9.

- 65 – Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, Issert E, Bastien P, Pratlong F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71(2):174-6.
- 66 – Lajolo CP, Langhi Junior DM, Marques Junior JFC. HIV – negative ELISA and positive NAT: a reality in Blood Banking. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(4):330-4.
- 67 – Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med*. 2004;315(8):760-8.
- 68 - Maenz M, Schlüter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U, Pleyer U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog Retin Eye Res*. 2014; 39(1):77-106.
- 69 - Vasconcelos-santos, DV. Ocular manifestations of systemic disease: toxoplasmosis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012; 23(1):542-550.
- 70 - Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different diseases? *Curr Opin Microbiol*. 2002; 5(1):438-442.
- 71 - Furtado JM, Winthrop KL, Butler NJ, Smith JR. Ocular toxoplasmosis I: parasitology, epidemiology and public health. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2013; 41(1): 82-94.
- 72 - Pleyer U1, Schlüter D, Mänz M. Ocular toxoplasmosis: recent aspects of pathophysiology and clinical implications. *Ophthalmic Res*. 2014; 52(1):116-123.
- 73 - Roberts C, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(3): 478-488.
- 74 - Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier MN Jr et al. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(2):345-350.
- 75 - Caspi RR. Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev*. 2006; 213(1):23-35.
- 76 - Klaren VN, Peek R.. Evidence for a compartmentalized B cell response as characterized by IgG epitope specificity in human ocular toxoplasmosis. *J Immunol*. 2001; 167(11):6263-6269.
- 77 - de Boer JH, Limpens J, Orengo-Nania S, de Jong PT, La Heij E, Kijlstra A. Low mature TGF- β 2 levels in aqueous humor during uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(10):3702-3710.

- 78 – Nagineni CN, Detrick B, Hooks JJ. Transforming growth factor-beta expression in human retinal pigment epithelial cells is enhanced by *Toxoplasma gondii*: A possible role. *Clin Exp Immunol*. 2002;128(2):372-378.
- 79 - Treilein JW. Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Prog Retin Eye Res*.1999;18(3):357- 370.
- 80 - Lu F, Huang S, Kasper LH. CD4+ T cells in the pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. *Infect Immun*. 2004;72(9):4966-4972.
- 81 - Lemaitre C, Thillaye-Goldenberg B, Naud MC, de Kozak Y. The effects of intraocular injection of interleukin-13 on endotoxin- induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42(9):2022-30.
- 82 - Holdsworth SR, Gan PY. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015. 10(12):2243-54.
- 83 - Kikumura A, Ishikawa T, Norose K. Kinetic analysis of cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in murine ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol*. 2012; 96(9):1259-67.
- 84 - Reis e Sousa C, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN. In Vivo Microbial Stimulation Induces Rapid CD40 Ligand–independent Production of Interleukin 12 by Dendritic Cells and their Redistribution to T Cell Areas. *J Exp Med*. 1997; 186(11): 1819–1829.
- 85 – Pifer R, Yarovinsky F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends Parasitol*. 2011; 27(9): 388–393.
- 86 - Aliberti J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat rev immunol*. 2005;5(2):162-170.
- 87 - Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol*. 2002;168(6):2988-96.
- 88 - Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(3):469-73.
- 89 – Gonçalves RM. O papel das quimiocinas nas uveítes. *Arq. Bras. Oftalmol*. 2007; 70(2): 363-370.
- 90 – Charo IF, Raansohoff RM. The many roles of chemokines receptor in inflammation. *J Med*. 2006; 354(1): 610-621.
- 91 – Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function and regulation. *Cell sign*. 2004; 16(1): 1201-10.

- 92 – Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev. Immunol.* 2002; 2(1):106-15.
- 93 – Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector and memory immune response. *An Ver Immunol.* 2000;18(1):593-620.
- 94 – Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect. In HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 1996; 86(1): 367-377.
- 95 - Mummidi S, Ahuja SS, McDaniel BL, Ahuja SK. The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons. *J Biol Chem.* 1997;272(49):30662-71.
- 96 - Barmania F, Pepper MS. C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection. *Appl Transl Genom.* 2013;2:3-16.
- 97 - Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* 1996;381(6584):661-6.
- 98 - Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature.* 1996;381(6584):667-73.
- 99 - de Faria Junior GM, Ayo CM, de Oliveira AP, Lopes AG, Frederico FB, Silveira-Carvalho AP. CCR5 chemokine receptor gene polymorphisms in ocular toxoplasmosis. 2018; 178(1):276-280.
- 100 - McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet.* 1998;352(9131):866-70.
- 101- Khan, I.A., et al., CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog*, 2006. 2(6): p. e49.
- 102 - Nishimura, M; Umeda, K; Suwa, M; Hidefumi Furuoka,b Yoshifumi Nishikawaa. CCR5 Is Involved in Interruption of Pregnancy in Mice Infected with *Toxoplasma gondii* during Early Pregnancy. *Infection and Immunity*, 2017. 85(9). p. 1-16.

