



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

Ana Vitória da Silveira Camargo

**Genes *HLA* de classe II (*DRB1* e *DQB1*)
como fatores de risco para a toxoplasmose
ocular**

São José do Rio Preto

2016

Ana Vitória da Silveira Camargo

**Genes *HLA* de classe II (*DRB1* e *DQB1*)
como fatores de risco para a toxoplasmose
ocular**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Área de Concentração: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto
2016

Camargo, Ana Vitória da Silveira

Genes *HLA* de classe II (*DRB1* e *DQB1*) como fatores de risco para a toxoplasmose ocular.

São José do Rio Preto, 2016

74 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. Gene *HLA-DRB1*; 4. Gene *HLA-DQB1*.

Ana Vitória da Silveira Camargo

**Genes *HLA* de classe II (*DRB1* e *DQB1*)
como fatores de risco para a toxoplasmose
ocular**

BANCA EXAMINADORA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE**

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

2º Examinador: Profa. Dra. Lilian Castiglioni

3º Examinador: Profa. Dra. Fabiana Nakashima

Suplentes: Prof. Dr. Rubens Camargo Siqueira

Profa. Dra. Ida Maria M. F. Charpiot

São José do Rio Preto, 06/06/2016.

Sumário

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Quadros e Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xi
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	2
1.2 Toxoplasmose humana	3
1.3 Toxoplasmose ocular	4
1.4 Organização dos genes do Sistema <i>HLA</i>	8
1.5 Nomenclatura	10
1.6 Estrutura e função das moléculas <i>HLA</i>	11
1.7 <i>HLA</i> e toxoplasmose ocular	13
1.8 Objetivo geral	16
1.8.1 Objetivos específicos	16
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
2.1 Aspectos éticos do estudo.....	19
2.2 Local de realização do estudo.....	19
2.2.1 Composição dos grupos de estudo.....	20
2.2.2 Diagnóstico clínico	21
2.2.3 Coleta de sangue.....	21
2.3 Métodos	22

2.3.1 Identificação de anticorpos das classes IgM e IgG anti- <i>T. gondii</i>	22
2.3.2 Extração de DNA genômico humano	22
2.3.3 Avaliação da concentração e pureza do DNA genômico.....	22
2.3.4 Diluição das amostras de DNA.....	23
2.3.5 Identificação dos alelos HLA de classe II	23
2.3.6 Análise estatística.....	27
3. RESULTADOS	28
3.1 Características gerais dos pacientes.....	29
3.2 Frequência dos alelos HLA-DRB1.....	30
3.2.1 Frequência dos alelos HLA-DRB1 nos grupos com e sem toxoplasmose ocular.....	31
3.2.2 Frequência dos alelos HLA-DRB1 entre o grupo sem toxoplasmose ocular e o subgrupo com manifestação primária.....	33
3.2.3 Frequência dos alelos HLA-DRB1 entre o grupo sem toxoplasmose ocular e o subgrupo com manifestação recorrente.....	34
3.2.4 Frequência dos alelos HLA-DRB1 entre os subgrupos com manifestação primária e com manifestação recorrente.....	35
3.3 Frequência dos alelos HLA-DQB1.....	36
3.3.1 Frequência dos alelos HLA-DQB1 nos grupos com e sem toxoplasmose ocular.....	36
3.3.2 Frequência dos alelos HLA-DQB1 entre o grupo sem toxoplasmose ocular e o subgrupo com manifestação primária.....	37
3.3.3 Frequência dos alelos HLA-DQB1 entre o grupo sem toxoplasmose ocular e o subgrupo com manifestação recorrente.....	38
3.3.4 Frequência dos alelos HLA-DQB1 entre os subgrupos com manifestação primária e com manifestação recorrente.....	38
3.4 Frequência dos haplótipos HLA-DRB1_HLA-DQB1.....	39
3.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	45
4. DISCUSSÃO	47

5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7. ANEXOS.	70
7.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	71
7.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	72
7.3 Ficha de Dados Epidemiológicos.....	74

Dedicatória

Dedico este trabalho

A Deus,

Aos meus pais, Orlando e Angela,

E meu irmão José Antônio,

Meus eternos amores.

Agradecimentos

A Deus por tudo que Ele é em minha vida e que sem Ele nada seria possível.

À minha mãe Angela, meu pai Orlando, meu irmão José Antônio por todo amor, apoio, incentivo, por sempre acreditarem em mim e estarem ao meu lado.

A todos os meus familiares, por todo amor e por tornarem minha vida mais alegre.

À FAMERP, pela oportunidade concedida.

Ao Diretor Geral da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP
Prof. Dr. Dulcimar Donizeti de Souza.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e seus coordenadores:
Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira e Prof. Dr Mário Abbud Filho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação, José Antônio, Luís Henrique e Fabiana por toda atenção, auxílio e explicações.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pelo apoio financeiro concedido ao projeto.

Ao Ministério da Educação, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos, pela oportunidade concedida, por compartilhar seus preciosos ensinamentos, por confiar em meu potencial, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pela paciência e compreensão. Muito obrigada por toda contribuição para meu crescimento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos, por abrir as portas do laboratório para mim, pela confiança, por todo auxílio, ensinamentos e amizade.

A todos os pacientes que aceitaram participar do estudo, pela confiança depositada.

Aos médicos colaboradores e participantes da pesquisa: Prof. Prof. Dr. Gildásio Castello de Almeida Júnior e Dr. Fábio Batista Frederico.

Ao Ambulatório de Retinopatia do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina (HB-FUNFARME) e o Ambulatório Médico de Especialidade (AME) de São José do Rio Preto. Aos médicos residentes que auxiliaram na seleção dos pacientes e todos os funcionários, pela ajuda em conduzi-los ao projeto.

Às funcionárias do Laboratório de Imunogenética Molecular do Hemocentro de São José do Rio Preto, Mirela e Otávia, por todo auxílio na realização da genotipagem dos genes *HLA*. Quero agradecer especialmente a Denise por estar sempre disposta a me auxiliar, pela compreensão e amizade.

Aos amigos que o Laboratório de Imunogenética me presenteou:

Cássia e Amanda pela acolhida, por todos os ensinamentos, por estarem sempre prontas a me ajudar, pelos momentos compartilhados e amizade.

À Fabiana, Christiane e Fernando, pela amizade, companheirismo, por todo auxílio e esclarecimentos essenciais no desenvolvimento do projeto.

Ao Márcio, pela amizade, por toda a ajuda, conversas e cafés.

A Regina e Cidinha por me auxiliarem, pela amizade e apoio.

A todos os amigos do Laboratório de Imunogenética: Ana Iara, Valquíria, Geraldo, Vinícius, Alessandro, Warlen, Natália, Júlia, Camila, Karina, Milton, Ulisses e Marcos, vocês tornaram meus dias mais alegres. Obrigada por toda compreensão, companheirismo e auxílio na realização deste trabalho.

Aos docentes que compuseram a banca examinadora, pela disponibilidade e pelas contribuições na finalização deste trabalho.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Biologia Molecular da FAMERP, por compartilharem vossos conhecimentos, pelo apoio e incentivo.

A todos os meus amigos por todo carinho, apoio e incentivo que tornaram essa jornada mais bonita.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Epígrafe

“Quando abro a porta de uma nova descoberta já encontro Deus lá dentro.”

- Albert Einstein

Lista de Figuras

Figura 1.	Ciclo Biológico do <i>Toxoplasma gondii</i> e suas principais fontes de infecção.....	3
Figura 2.	Retinografia colorida mostrando as várias fases de lesões oculares causadas por uma infecção pelo <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Figura 3.	Organização genômica do MHC.....	9
Figura 4.	Nomenclatura do sistema HLA	10
Figura 5.	Estrutura da molécula HLA de classe I.....	12
Figura 6.	Estrutura da molécula HLA de classe II.....	12
Figura 7.	Géis de agarose com as setas evidenciando os fragmentos de confirmação do produto amplificado por PCR.....	25

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1.	Ciclo utilizado para a amplificação por PCR para LabType™ SSO	24
Tabela 1.	Características gerais dos pacientes com e sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.....	30
Tabela 2.	Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com e sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.....	31
Tabela 3.	Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com e sem toxoplasmose ocular.....	32
Tabela 4.	Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes sem toxoplasmose ocular e com a manifestação primária da doença.....	33
Tabela 5.	Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes sem toxoplasmose ocular e com a manifestação recorrente da doença.....	34
Tabela 6.	Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com a manifestação primária e recorrente da toxoplasmose ocular.....	35

Tabela 7.	Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com e sem toxoplasmose e sua manifestação primária e recorrente.....	36
Tabela 8.	Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com e sem toxoplasmose ocular.....	37
Tabela 9.	Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes sem toxoplasmose ocular e com manifestação primária da doença.....	37
Tabela 10.	Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes sem toxoplasmose ocular e com manifestação recorrente da doença.....	38
Tabela 11.	Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com manifestação primária e recorrente da doença.....	39
Tabela 12.	Distribuição dos haplótipos HLA-DRB1_HLA-DQB1 em pacientes com e sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.....	40
Tabela 13.	Distribuição dos haplótipos HLA-DRB1_HLA-DQB1 em pacientes com e sem toxoplasmose ocular.....	42
Tabela 14.	Distribuição dos haplótipos HLA-DRB1_HLA-DQB1 em pacientes sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.....	44
Tabela 15.	Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o <i>locus HLA-DRB1</i> nos grupos de pacientes com e sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.....	45

Tabela 16. Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o <i>locus HLA-DQB1</i> nos grupos de pacientes com e sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.....	46
---	----

Lista de Abreviaturas e Símbolos

C1	Concentração inicial
C2	Concentração final
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
D.O.	Densidade Óptica
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>Et. al.</i>	E colaboradores
ETDRS	<i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
G	Gravidade
IC	Intervalo de confiança
HB	Hospital de Base
HLA	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MP	Manifestação primária
MR	Manifestação recorrente
n	Número amostral
N	Número de alelos
OR	<i>Odds Ratio</i>
<i>p</i>	Nível de significância
<i>pc</i>	Valor de <i>p</i> corrigido pelo método de Bonferroni
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-SSO	<i>Sequence-specific oligonucleotide probe</i>
SAPE	R-Ficoeritrina conjugada com estreptavidina
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF- α	Fator α de necrose tumoral-dependente
TNF- β	Fator β de necrose tumoral-dependente
TO	Toxoplasmose Ocular
V1	Volume inicial
V2	Volume final
μ l	Microlitro
$^{\circ}$ C	Graus Celcius

Resumo: Genes *HLA* de classe II (*DRB1* e *DQB1*) como fatores de risco para a toxoplasmose ocular

Introdução: A toxoplasmose, uma doença resultante da infecção por *Toxoplasma gondii*, manifesta-se clinicamente nas formas ocular, cerebral e congênita. Este parasito Apicomplexa infecta células nucleadas de todos os tecidos e pode permanecer em estado latente ou provocar danos celulares irreversíveis. Os genes *HLA* de classe II controlam a resposta imune adaptativa humoral e influenciam a suscetibilidade e a resistência às doenças infecciosas e parasitárias. A toxoplasmose ocular, além de ser dependente da infecção por *T. gondii* e da variabilidade das cepas infectantes, é fortemente influenciada por fatores genéticos do hospedeiro. **Objetivo:** Testar a hipótese de que os genes *HLA* de classe II (*HLA-DRB1* e *HLA-DQB1*) estão associados à toxoplasmose ocular. **Materiais e Métodos:** Foram analisadas amostras de DNA de 249 indivíduos submetidos à avaliação oftalmológica e com sorologia reagente para *T. gondii*. De acordo como quadro clínico, dois grupos distintos foram compostos: um formado por pacientes com toxoplasmose ocular (n=123) e outro grupo, por pacientes sem a forma ocular da doença (n=126). Os pacientes com toxoplasmose ocular foram subdivididos em dois grupos de acordo com o tipo de manifestação ocular: primária (n=93) ou recorrente (n=30). A genotipagem dos alelos *HLA* de classe II foi realizada pela técnica reação da cadeia de polimerase com sequência de oligonucleotídeos específicos (PCR-SSO; One Lambda®). **Resultados:** A média de idade dos pacientes com toxoplasmose ocular foi

menor (40.9 ± 19.9) que a daqueles sem toxoplasmose ocular (57.6 ± 17.2) ($p < 0.0001$). Os alelos HLA-DRB1*03 (OR=1,94; IC 95% 1.09-3.45; $p=0.031$; $p_c=0.404$) e HLA-DQB1*02 (OR=1.52; IC 95% 1.03-2.24; $p=0.039$; $p_c=0.197$) apresentaram maior frequência alélica no grupo sem toxoplasmose ocular em comparação ao grupo com toxoplasmose ocular. O alelo HLA-DRB1*14 foi mais frequente no subgrupo com a manifestação recorrente em comparação ao grupo sem toxoplasmose ocular (OR=0.32; IC 95% 0.12-0.83; $p=0.032$; $p_c=0.417$) e com o subgrupo manifestação primária (OR=0.25; IC95% 0.08-0.73; $p=0.017$; $p_c=0.223$). O haplótipo HLA-DRB1*03_DQB1*02 não se mostrou associado ao menor risco de toxoplasmose ocular (OR=1.86; IC 95%: 1.03-3.36; $p=0.052$).

Conclusões: Os resultados obtidos sugerem que os genes *HLA* de classe II (*DRB1* e *DQB1*) não estão associados com o desenvolvimento da toxoplasmose ocular e que nenhum haplótipo HLA DRB1_DQB1 influencia o desenvolvimento desta doença na população analisada.

Palavras-chave: Toxoplasmose Ocular, *Toxoplasma gondii*, Gene *HLA-DRB1*, Gene *HLA-DQB1*.

Abstract

Abstract: Class II *HLA* genes (*DRB1* and *DQB1*) as risk factors for ocular toxoplasmosis

Introduction: Toxoplasmosis, a disease resulting from *Toxoplasma gondii* infection, is clinically manifested through ocular, cerebral and congenital ways. This parasite Apicomplexa is capable of infecting cells of all nucleated tissues and may remain in a latent state or cause irreversible cell damage. The *HLA* class II genes control the adaptive immune response humoral and influence susceptibility and the resistance to infectious and parasitic diseases. The ocular toxoplasmosis, besides being dependent on infection with *T. gondii* as well as the variability of the infecting strain, is influenced by host genetic factors. **Aim:** To test the hypothesis that the *HLA* class II genes (*HLA-DRB1* and *HLA-DQB1*) are associated with ocular toxoplasmosis. **Materials and Methods:** Samples of 249 patients undergoing ophthalmologic evaluation and positive serology to *T. gondii* were analyzed. According to the clinical conditions, two distinct groups were composed: one formed by patients with ocular toxoplasmosis (n=123); and another group with patients without the disease ocular form (n=126). The patients with ocular toxoplasmosis were subdivided into two groups, according to the type of ocular manifestation: primary (n=93 samples) or recurrent (n=30). Genotyping of Class II *HLA* alleles were performed by the polymerase chain reaction technique with specific oligonucleotide sequence (PCR-SSO; One Lambda®). **Results:** The average ages of the group of patients

with ocular toxoplasmosis was less (40.9 ± 19.9) than the average age of patients without ocular toxoplasmosis (57.6 ± 17.2) ($p < 0.0001$). The alleles HLA-DRB1*03 (OR=1.94; IC 95% 1.09-3.45; $p=0.031$; $pc=0.404$) and HLA-DQB1*02 (OR=1.52; IC 95% 1.03-2.24; $p=0.039$; $pc=0.197$) showed a more allelic frequency in patients without ocular toxoplasmosis when compared to the group with ocular toxoplasmosis. The HLA-DRB1*14 allele was more frequent in the subgroup of the recurrent manifestation, when compared to the group without ocular toxoplasmosis (OR=0.32; IC 95% 0.12-0.83; $p=0.032$; $pc=0.417$) and to the primary manifestation subgroup (OR=0.25; IC95% 0.08-0.73; $p=0.017$; $pc=0.223$). The HLA-DRB1*03_DQB1*02 haplotype was not associated with the lower risk of ocular toxoplasmosis (OR=1.86; IC 95%: 1.03-3.36; $p=0.052$).

Conclusions: The obtained results suggest that the Class II *HLA* genes (*DRB1* and *DQB1*) are not associated with the ocular toxoplasmosis development; and that none HLA DRB1_DQB1 haplotype influences the ocular toxoplasmosis development in the study population.

Key Words: Ocular Toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, *HLA-DRB1* gene, *HLA-DQB1* gene.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma doença resultante da infecção por um protozoário parasita intracelular obrigatório⁽¹⁾, *Toxoplasma gondii*, que pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia, família Sarcocystidae⁽²⁾. Foi descrito inicialmente por Nicolle e Manceaux em 1908, no Instituto Pasteur da Tunísia, como parasito em um roedor africano (*Ctenodactylus gondii*). Ao mesmo tempo e independentemente, Splendore isolou o parasito de um coelho mantido no Instituto Biológico de São Paulo, no Brasil. Este parasito é capaz de invadir e se multiplicar no interior de células nucleadas de mamíferos e outros animais de sangue quente. Apresenta três estágios infectantes: taquizoítos (livres), bradizoítos (presente nos cistos teciduais) e esporozoítos (presente nos oocistos).⁽³⁾

O ciclo biológico do *T. gondii* envolve duas fases, uma sexuada e uma assexuada. A fase sexuada do parasita ocorre apenas nos membros da família Felidae (gatos domésticos e felídeos selvagens), que são os hospedeiros definitivos do parasito.⁽⁴⁾ Já a fase assexuada ocorre no hospedeiro intermediário e também no hospedeiro definitivo. O ser humano além de vários animais de sangue quente são hospedeiros intermediários.⁽⁵⁻⁶⁾

Em humanos a infecção pelo *T. gondii* ocorre, principalmente, pela ingestão de oocistos maduros encontrados no solo, verduras, água contaminada e pelo consumo de carnes mal cozidas ou cruas contendo cistos

com bradizoítos. Outras vias de transmissão foram relatadas como transplante de órgãos, transmissão congênita, transfusão sanguínea e acidentes laboratoriais.⁽⁶⁻⁸⁾ A figura 1 ilustra o ciclo de vida e as fontes de infecção por este protozoário.

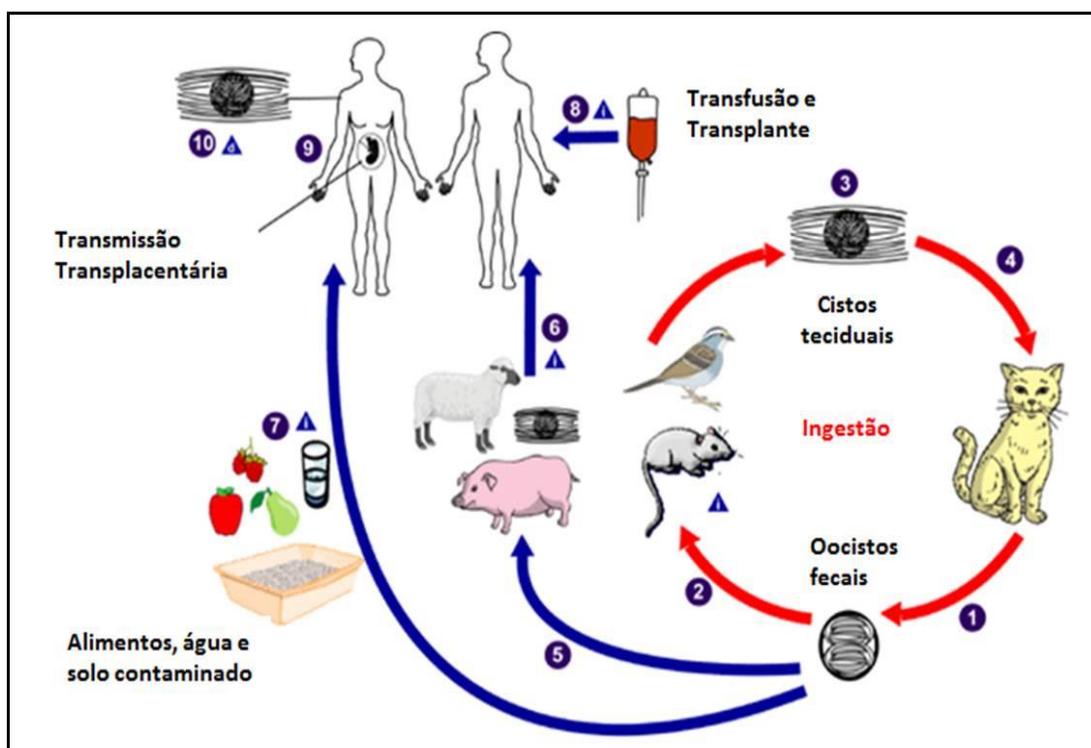


Figura 1. Ciclo Biológico do *T. gondii* e suas principais fontes de infecção. Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>.

1.2 Toxoplasmose humana

A toxoplasmose é uma zoonose altamente disseminada, com taxas de prevalência que variam geograficamente no mundo.⁽⁹⁻¹⁰⁾ A incidência da doença está sujeita às variações particulares de cada região, assim como o tipo de clima, hábitos culturais e alimentares de determinadas populações.^(1, 9)

O *T. gondii*, no hospedeiro humano, possui alta infectividade e baixa patogenicidade.⁽¹⁰⁾ Os indivíduos infectados podem apresentar sintomas inespecíficos que consistem em linfadenopatia isolada, com linfonodos rígidos, e febre.⁽¹¹⁾ A severidade da doença esta relacionada ao tipo da cepa infectante, quantidade de parasitos, rota de infecção, e estado imunológico do hospedeiro.⁽¹⁰⁾ A importância clínica da doença está relacionada aos seguintes grupos: toxoplasmose adquirida em pacientes imunocompetentes, a adquirida ou reativada em indivíduos imunocomprometidos, a forma congênita e a doença ocular.⁽¹²⁾

1.3 Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose é a principal causa de uveíte posterior em pacientes imunocompetentes⁽¹⁾, podendo ser de origem congênita ou adquirida, resultante da infecção aguda ou reativada.⁽¹³⁻¹⁴⁾ Em ambos os casos as manifestações clínicas podem ser precoces ou tardias, com manifestações primárias e recorrentes⁽¹⁵⁾, apresentando diferentes graus de comprometimento ocular nos indivíduos afetados, que irão depender do estado imune do indivíduo^(1, 8) e do tipo de cepa do *T. gondii*.⁽¹⁶⁻¹⁷⁾

A lesão característica da toxoplasmose ocular é a retinocoroidite granulomatosa (focal) necrosante, com envolvimento vítreo e do humor aquoso secundários, com a presença de lesões satélites hiperpigmentadas. Primeiramente a lesão se localiza na retina, sendo denominada retinite, posteriormente afeta outras camadas adjacentes, até alcançar a coróide, sendo

então caracterizada como retinocoroidite.⁽¹⁸⁾ Embora muitos episódios de retinocoroidite possam ser assintomáticos, tem se relatado que muitos resultam em perda visual, dor e fotofobia, isoladamente ou em conjunto.⁽¹⁹⁾

Clinicamente as lesões originadas por toxoplasmose ocular são classificadas como: lesões ativas e lesões cicatriciais. As lesões ativas apresentam aspecto clínico de exsudato branco-amarelado, com limites indefinidos. Podendo evoluir à cura espontânea, em tempo variável, dependendo da resposta imune do hospedeiro e da cepa infectante. A cicatriz é caracterizada por lesão com margens mais nítidas e hiperpigmentação.⁽¹⁸⁾

A manifestação recorrente, caracteristicamente, se inicia nas margens de uma cicatriz causada por retinocoroidite, sendo denominada lesão satélite.⁽¹⁸⁾ É comum tanto na forma congênita quanto na adquirida e pode ser consequência da ruptura do cisto e liberação dos parasitos, multiplicação dos parasitos na retina, reinfecção pelo *T. gondii* dentre outros.⁽²⁰⁻²¹⁾ A figura 2 mostra as diferentes fases de lesões oculares causadas pela infecção por *T. gondii* por retinografia colorida.

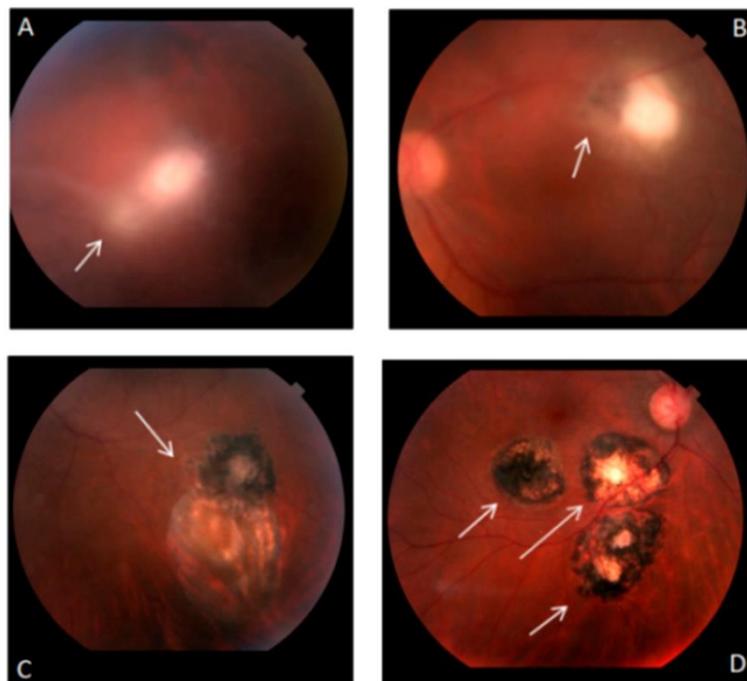


Figura 2. Retinografia colorida mostrando as várias fases de lesões oculares causadas por uma infecção pelo *T. gondii*. Em (A) a seta indica a região com uma lesão ativa exsudativa retinocoroidiana ("casa de luz no nevoeiro"). Em (B) a seta indica a lesão retinocoroidiana no processo de cura - o paciente teve boa resposta clínica ao tratamento e a cicatriz apresenta bordas em definição. Em (C) a seta indica uma cicatriz retinocoroidiana antiga e uma lesão satélite retinocoroidiana. Em (D) a cicatriz retinocoroidiana com margens bem definidas indicadas pelas setas. Adaptada de Ayo et al.⁽²²⁾

A retinocoroidite toxoplásmica vem sendo apontada de longa data como o dano ocular mais comum resultante da infecção pelo *T. gondii*.^(1, 23-24) Sua prevalência parece ser bastante variável nos diferentes países, mas estima-se que de 0,3% a 1% dos europeus e norte-americanos desenvolvem esta doença no intervalo de um a dois anos após contraírem a infecção.^(23, 25-26) Acredita-se ainda que o risco de desenvolvimento varia de 18 para 100.000 indivíduos no Reino Unido, até 382 para 100.000 indivíduos no oeste da África.⁽¹⁹⁾

Entre aqueles que adquirem a infecção no período pós-natal, o risco de desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica, dentro do período de um ano, varia de 0,3% a 3%.⁽²³⁾ Como a aquisição da infecção congênita por *T. gondii* é menor que a pós-natal, a maioria dos casos de retinocoroidite toxoplásmica diagnosticada pelos oftalmologistas parece resultar de infecções adquiridas após o nascimento.⁽²⁶⁾ Além do mais, entre 30% e 80% dos casos de uveíte posterior observados em indivíduos imunocomprometidos e também em imunocompetentes são devidos à infecção por *T. gondii*.^(24, 27-29)

Estudos realizados no Brasil demonstram que a prevalência de retinocoroidite toxoplásmica é bastante elevada em adolescentes e adultos oriundos de diferentes regiões do país, variando de 2% na região sudeste a 25% na região sul.^(24, 30-32) Um estudo realizado no Rio Grande do Sul revelou a prevalência de toxoplasmose ocular igual a 21,3 % em pessoas maiores de treze anos de idade e concluiu que a doença é consequência da infecção pós-natal.⁽²⁴⁾ No Estado de Pernambuco, foi observado que 56,2% dos casos de uveíte posterior eram devido à presença do *T. gondii*.⁽³³⁾

A prevalência da toxoplasmose ocular é elevada entre os pacientes portadores de doenças oculares atendidos no Serviço de Oftalmologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto.⁽³⁴⁾ Dentre 349 pacientes analisados 71 (20,3%) foram diagnosticados como portadores desta doença (lesão e/ou cicatriz) e todos apresentavam anticorpos IgG anti-*T. gondii* atestando a exposição ao parasito.

Estudos realizados em outros países bem como aqueles conduzidos no Brasil, exploraram os fatores de risco que contribuem para a infecção por

T. gondii. Entretanto, não foi investigada a importância dos fatores imunogenéticos do hospedeiro, especialmente aqueles envolvidos no desenvolvimento das respostas imunes ao parasito (genes *HLA*, por exemplo). Como o desenvolvimento desta doença é fortemente influenciado pela interação parasito-hospedeiro, novos estudos focados nesta relação são necessários para elucidar a importância dos fatores imunogenéticos do hospedeiro na suscetibilidade à toxoplasmose ocular.⁽³⁵⁾

1.4 Organização dos genes do Sistema *HLA*

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) ou MHC (*major histocompatibility complex*), no ser humano é denominado *HLA* (*human leukocyte antigen*), representa um conjunto de *loci* gênico que estão localizados no braço curto do cromossomo 6 na região p.21.3 e são responsáveis pela síntese de moléculas envolvidas na resposta imune.⁽³⁶⁻³⁸⁾

O CPH é dividido em três grupos conforme a estrutura e função dos produtos gênicos denominados como: *HLA* de classe I, *HLA* de classe II e *HLA* de classe III (Figura 3).⁽³⁶⁻³⁸⁾ Na região de classe I estão localizados os genes *HLA* clássicos de histocompatibilidade, *HLA-A*, *-B* e *-C*, além de genes *HLA* não clássicos e outros genes. Os genes de histocompatibilidade clássicos são altamente polimórficos e sua principal função é o reconhecimento de antígenos pelas células T CD8⁺.⁽³⁷⁻³⁹⁾

Na região de classe II estão localizados os genes clássicos de histocompatibilidade *HLA-DR*, *-DQ* e *-DP*, além dos genes *HLA* de classe II

não clássicos e vários outros genes e pseudogenes. Os genes de histocompatibilidade clássicos de classe II codificam moléculas que se ligam aos linfócitos T CD4⁺ durante o reconhecimento antigênico.^(37,39)

A região de classe III possui, entre outros, os genes que codificam componentes do sistema complemento (C2, C4A, C4B), citocinas TNF- α (Fator α de necrose tumoral) e TNF- β (fator β de necrose tumoral), proteínas de choque térmico, entre outras.⁽³⁶⁻³⁸⁾

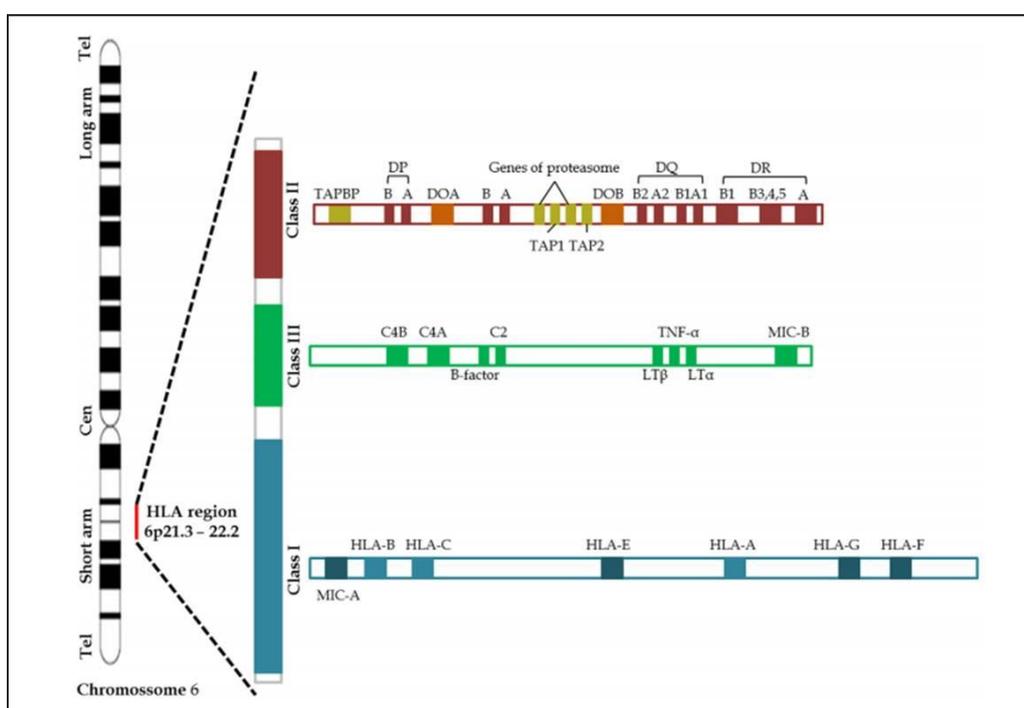


Figura 3. Organização genômica do MHC. Adaptado de Lima-Junior e Pratt-Riccio.⁽⁴⁰⁾

Os genes *HLA* são herdados em blocos, formando haplótipos. São expressos de forma codominante seguindo o padrão de segregação Mendeliana clássica.^(37-39,41) Dessa forma, o genótipo de um indivíduo é composto por dois haplótipos, sendo um de origem paterna e outro de origem materna.⁽³⁷⁾

Os genes *HLA* de classe I e II apresentam um vasto polimorfismo, determinado por sequências de nucleotídeos que podem variar de um indivíduo para outro, resultando na existência de dois ou mais alelos diferentes de um mesmo gene.⁽⁴²⁾ Essas variações estão localizadas nos domínios terminais da molécula codificada, na fenda de ligação do peptídeo, das regiões de classe I e classe II.^(37-39, 41)

1.5 Nomenclatura

A nomenclatura HLA é definida por um Comitê Internacional, designado pela Organização Mundial de Saúde, que se reúne periodicamente para nomear alelos descobertos recentemente e rever a nomenclatura em vigência.^(38,43) As regras utilizadas para a nomenclatura dos alelos HLA estão apresentadas na figura 4.

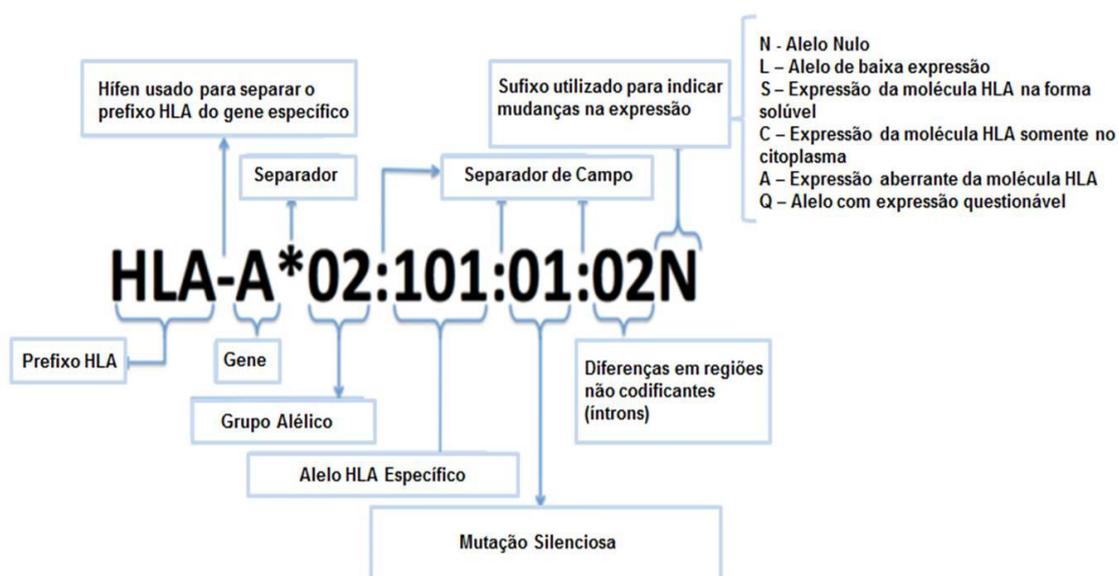


Figura 4. Nomenclatura do sistema HLA. Adaptado de <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>.

1.6 Estrutura e função das moléculas HLA

Os genes polimórficos de classe I e de classe II codificam dois grupos de proteínas com estruturas distintas, entretanto homólogas: as moléculas HLA de classe I e as moléculas HLA de classe II.⁽³⁷⁾

As moléculas HLA de classe I são formadas por duas cadeias polipeptídicas, sendo uma cadeia transmembrana α ou pesada, codificada por genes de HLA, e uma pequena cadeia não-covalentemente associada à cadeia α , a β 2-microglobulina, que é codificada fora do MHC. Esta molécula possui quatro domínios, três formados pela cadeia α (α 1, α 2, e α 3) e um formado pela cadeia β 2-microglobulina. Os domínios α 1 e α 2 formam uma fenda na superfície da molécula onde se insere o peptídeo a ser apresentado ao linfócito T. É justamente nesta região que está localizado a maior parte do polimorfismo da molécula (Figura 5). As moléculas HLA de classe I estão presentes em todas as células nucleadas e possuem a capacidade de apresentar peptídeos endógenos para as células T CD8⁺, desencadeando a resposta imune celular.^(36-37,44)

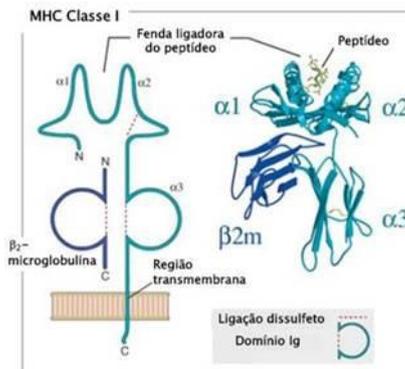


Figura 5. Estrutura da molécula HLA de classe I. Adaptada de Abbas AK, Lichman AH, Pillai S.⁽³⁷⁾

A molécula HLA de Classe II é composta por um complexo não-covalente de duas cadeias α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e duas cadeias β ($\beta 1$ e $\beta 2$) que atravessam a membrana celular. O polimorfismo nas moléculas HLA de classe II ocorre, sobretudo nos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$, que formam a fenda de ligação do peptídeo antigênico (Figura 6). As moléculas HLA de classe II estão presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos, como: células dendríticas, macrófagos e linfócitos B e estão envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T $CD4^+$, desencadeando a resposta imune humoral.^(36-37,44)

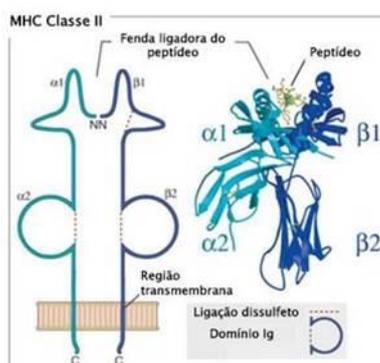


Figura 6. Estrutura da molécula HLA de classe II. Adaptada de Abbas AK, Lichman AH, Pillai S.⁽³⁷⁾

Portanto, as moléculas HLA são receptores expressos em várias células, que possuem a capacidade de se ligar a peptídeos próprios e não próprios do organismo e apresentá-los aos linfócitos T, iniciando a resposta imune, caso o peptídeo seja identificado como estranho.⁽³⁶⁾

1.7 HLA e toxoplasmose ocular

A associação entre alelos HLA e doenças infecciosas mostram que a variação no sistema HLA está relacionada à resistência ou à suscetibilidade a algumas doenças infecciosas. Os estudos de associação entre HLA e doenças infecciosas têm demonstrado que patógenos contribuem para a distribuição dos alelos HLA em populações humanas. Entretanto é importante evidenciar que nem todos os indivíduos portadores de alelos HLA relacionados à suscetibilidade a determinada doença é sinônimo de que irão desenvolvê-las, e que também indivíduos portadores de doenças associadas ao HLA nem sempre são portadores dos alelos relacionados a ela.^(38,42)

A literatura pertinente demonstra a existência de estudos relacionados a marcadores moleculares que afetam a suscetibilidade à toxoplasmose ocular em humanos.⁽⁴⁵⁾

Alguns estudos e seus resultados controversos despertaram atenção para o possível envolvimento dos genes *HLA* de classe I e II na suscetibilidade e resistência à toxoplasmose ocular. Em um deles, realizado no período em que apenas métodos sorológicos para identificação dos antígenos HLA

encontravam-se disponíveis, os autores não encontraram diferenças estatisticamente significantes na frequência do HLA-A em 20 pacientes com toxoplasmose ocular e em controles normais.⁽⁴⁶⁾ Outro estudo realizado na década de 90 investigou os antígenos HLA de classe I e II em pacientes com toxoplasmose ocular (N=52) e suas mães (N=47).⁽⁴⁷⁾ Nenhuma relação com estes antígenos foi observada no grupo de mães, as quais também apresentaram ausência total do antígeno HLA-B51. Entretanto, estes últimos autores relataram que o antígeno HLA-Bw62, além de apresentar maior frequência nos pacientes com toxoplasmose ocular, se correlacionava com a severidade desta doença.

Estudos *in vitro* também avaliaram a resposta proliferativa de linfócitos T de pacientes com toxoplasmose ocular aos antígenos do *T. gondii*. Em um deles foi observado que a resposta imune ao antígeno 2G11 pode elevar o risco do desenvolvimento da toxoplasmose ocular.⁽⁴⁸⁾

Utilizando um modelo murino transgênico, Mack e colaboradores⁽⁴⁹⁾ avaliaram o efeito dos genes *HLA* de classe II na toxoplasmose. Estes autores observaram que o alelo de classe II HLA-DQB1*0302 oferece menor proteção que o alelo HLADQB1*0601 em relação à gravidade da doença, e sugeriram que estas características imunogenéticas podem ser importantes para o desenvolvimento de vacinas. Em outro estudo, foi demonstrado que células T específicas infiltram o tecido ocular dos pacientes acometidos por toxoplasmose ocular, sugerindo que sua presença no sítio de inflamação pode estar relacionada à resposta imune adaptativa celular ao *T. gondii*.⁽⁵⁰⁾

Tan e colaboradores⁽⁵¹⁾ demonstraram que alguns peptídeos de *T. gondii* estimulam resposta imune protetora em camundongos BALBc (H-2^d) e transgênicos HLA-B*0702. Outro estudo⁽⁵²⁾ demonstrou que peptídeos extraídos de *T. gondii* induziram produção de IFN- γ de leucócitos do sangue periférico em indivíduos HLA-A02, e se ligaram a este antígeno HLA de classe I com alta afinidade. A subsequente imunização de camundongos transgênicos carreadores do gene *HLA-A*0201* com estes peptídeos induziu forte resposta imune mediada por células T CD8⁺ as quais protegeram estes animais quando os mesmos foram inoculados com *T. gondii*. Os autores concluíram que peptídeos que se ligam fortemente aos antígenos HLA contêm importantes epítomos que constituem potenciais candidatos para o desenvolvimento de vacinas contra o *T. gondii*. Estas observações sugerem que o produto do alelo HLA-A*0201 confere proteção contra o *T. gondii*.

Estes estudos evidenciam que os genes *HLA* constituem importantes fatores imunogenéticos que podem influenciar a suscetibilidade e a resistência à infecção por *T. gondii* e ao desenvolvimento da toxoplasmose ocular. Portanto, investigações desta natureza precisam ser estendidas, especialmente em países como o Brasil onde a prevalência de infecção por *T. gondii* é elevada. Além da variabilidade das cepas presentes no país^(17,53), a população pode apresentar distintos fatores imunogenéticos de risco para a manifestação ocular. É possível que a variabilidade dos genes *HLA* de classe II em pacientes brasileiros com toxoplasmose ocular seja peculiar, proporcionando níveis distintos de suscetibilidade que podem estar associados à heterogeneidade clínica na doença.

Diante deste panorama, do pequeno número de estudos que procurou correlacionar os genes *HLA* à toxoplasmose ocular, das controvérsias de alguns deles, pareceu razoável especular o envolvimento dos genes *HLA* de classe II como fatores de risco para a toxoplasmose ocular e utilizar este conjunto de marcadores para fundamentar a hipótese testada neste estudo.

1.8 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi testar a hipótese de que os genes *HLA* de classe II (*DRB1* e *DQB1*) estão associados com o desenvolvimento da toxoplasmose ocular.

1.8.1 Objetivos específicos

- Selecionar dois grupos de pacientes assim constituídos: um grupo composto por pacientes com toxoplasmose ocular (Com TO) caracterizado com a presença de lesão e/ou cicatriz retinocoroidiana e com sorologia positiva para *T. gondii*; e outro grupo contendo pacientes sem a forma ocular da doença (Sem TO), caracterizados pela ausência de lesão e/ou cicatriz retinocoroidiana, entretanto com sorologia positiva para *T. gondii*;
- Averiguar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* de classe IgM e IgG no soro destes pacientes, como indicadores de infecção;

- Identificar os alelos HLA de classe II (HLA-DRB1 e HLA-DQB1) em ambos os grupos;
- Verificar se alelos e haplótipos destes genes estão associados ao desenvolvimento da toxoplasmose ocular.

Casística e Métodos

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos do estudo

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, como extensão do projeto “Associação entre a toxoplasmose ocular e o perfil de glicoconjugados ABH-Lewis”, previamente aprovado (Protocolo nº1980/2009). Todos os indivíduos participantes do projeto receberam amplas explicações sobre os objetivos e procedimentos adotados na pesquisa, posteriormente assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

2.2 Local de realização do estudo

Este trabalho foi desenvolvido com amostras biológicas estocadas no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Estas amostras foram coletadas de pacientes que buscaram tratamento oftalmológico no Ambulatório de Retinopatia do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina (HB-FUNFARME) e no Ambulatório Médico de Especialidade (AME), ambos em São José do Rio Preto, no período de abril de 2009 a de março de 2015.

2.2.1 Composição dos grupos de estudo

Foram selecionadas amostras de 249 pacientes não relacionados, de ambos os sexos, independente de etnia que possuíam sorologia positiva para *T. gondii*. De acordo com o quadro clínico de cada paciente foram compostos dois grupos: um composto por amostras de pacientes que foram caracterizados com a presença de lesão/cicatriz devido à toxoplasmose (123 amostras) - denominado com toxoplasmose ocular (Com TO); e outro grupo contendo pacientes sem a forma ocular da doença (126 amostras) – chamado sem toxoplasmose ocular (Sem TO).

O grupo Sem TO foi composto por pacientes que possuíam sorologia positiva para *T. gondii* e eram portadores de outras doenças oculares, tais como catarata (34,1%), miopia e astigmatismo (20,6%), descolamento de retina (5,6), pterígio (4,8%), degeneração macular relacionada à idade (3,9%), glaucoma (3,2%), retinopatia diabética (2,4%), entre outras doenças oculares (17,5%), e 7,9% não possuíam problemas oculares.

O grupo de pacientes Com TO foi subdividido em dois grupos de acordo com o tipo de manifestação ocular observada durante um período de acompanhamento de pelo menos dois anos, compondo os seguintes grupos: manifestação primária (93 amostras) caracterizada pela presença de lesão ou cicatriz, e manifestação recorrente caracterizada pela presença de lesões satélites (30 amostras).

Por ocasião da seleção dos pacientes acima referidos, conforme determinado no projeto original, os seguintes critérios de exclusão foram adotados: portadores de outras doenças infecciosas e parasitárias, pacientes com qualquer tipo de deficiência mental, com discrasia sanguínea e em uso de anticoagulantes orais.

2.2.2 Diagnóstico clínico

Para se estabelecer ou excluir o diagnóstico de toxoplasmose ocular, os pacientes selecionados foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial. A avaliação clínica ocular dos pacientes foi realizada por dois profissionais experientes, por meio do exame de fundoscopia, realizado com o uso do oftalmoscópio binocular indireto (*Binocular Ophthalmoscope ID 10, Topcon Corporation*), de acordo com os critérios do Estudo para Tratamento Precoce da Retinopatia Diabética (*Early Treatment Diabetic Retinopathy Study – ETDRS*).⁽⁵⁴⁾

2.2.3 Coleta de sangue

De cada paciente selecionado foram coletadas por punção venosa duas amostras de sangue periférico (5 mL), uma com e outra sem anticoagulante (EDTA). A amostra com EDTA foi utilizada para extração do DNA genômico e a sem anticoagulante para obtenção do soro, para a identificação dos anticorpos das classes IgM e IgG anti-*T. gondii*.

2.3 Métodos

2.3.1 Identificação de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*T. gondii*

Os anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados por ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (ETI-TOXOK-M reverse PLUS; DiaSorin S.p.A. Itália e ETI-TOXO-G PLUS; DiaSorin S.p.A. Itália).

2.3.2 Extração de DNA genômico humano

O DNA genômico humano foi obtido do sangue periférico com o uso do kit comercial para extração por coluna sílica (QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Holanda) obedecendo rigorosamente as instruções do fabricante. O DNA genômico foi empregado na identificação dos alelos HLA de classe II.

2.3.3 Avaliação da concentração e pureza do DNA genômico

Este procedimento foi feito para aferir a qualidade do DNA genômico das amostras extraídas conforme o item 2.3.2. Para isso, foram utilizados 2 µL de tampão de eluição (kit comercial) como branco e 2 µL da amostra de DNA genômico. A leitura da concentração e a pureza do DNA foram determinadas

por proporção de Densidade Óptica (D.O.) a 260-280nm no espectrofotômetro Epoch (BioTek Instruments, VT, USA).

2.3.4 Diluição das amostras de DNA

O DNA genômico das amostras selecionadas foram diluídos em água ultrapura para adequar a concentração a 20 ng/μL para a genotipagem dos genes *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1*, devido às exigências ideais de concentração para realização da técnica de genotipagem em concordância com o protocolo do fabricante (LABType[®] SSO). Para calcular o volume de água ultrapura e a quantidade de DNA genômico utilizado, foi empregada a seguinte fórmula $\text{Concentração Inicial (C1)} \cdot \text{Volume Inicial (V1)} = \text{Concentração Final (C2)} \cdot \text{Volume Final (V2)}$. Após a diluição, as amostras foram depositadas em placas de polipropileno com 96 poços, específicas para amplificação por PCR, e armazenadas a -4°C.

2.3.5 Identificação dos alelos HLA de classe II

A genotipagem dos alelos *HLA-DRB1* e *HLA-DQB1* foi realizada no Laboratório de Imunogenética Molecular do Hemocentro de São José do Rio Preto, utilizando a reação em cadeia da polimerase com oligonucleotídeos de sequência específica (PCR-SSO), seguido de hibridização reversa com kits comerciais (LabType[®] SSO, One Lambda, Canoga Park, CA, USA), de baixa

resolução, e verificada em um Citômetro de Fluxo (analisador de fluxo LABScan™ 100) - Luminex®. Os resultados foram interpretados utilizando um programa de computador (HLA Fusion™, versão 3.4, One Lambda®). A metodologia utilizada pode ser sintetizada em quatro etapas: Amplificação do DNA, Desnaturação e Neutralização do produto da PCR, Hibridização e Leitura e interpretação dos resultados.

1ª etapa: Amplificação do DNA

As amostras de DNA genômico foram submetidas a uma reação de PCR-SSO, seguindo as instruções do fabricante utilizando grupos de *primers* marcados com biotina e específicos para detecção do grupo alélico.

Para a amplificação foi utilizada a enzima Taq Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e, os demais reagentes da reação (*primer* e *D-mix*) presentes no kit de genotipagem. A placa contendo as amostras e a mistura de reagentes foi submetida à amplificação no termociclador *Applied Biosystems* e as condições de amplificação estão descritas no quadro 1.

Etapa	Temperatura	Incubação	Número de ciclos
Etapa 1	96° C	03:00	1
Etapa 2	96°C	00:20	5
	60°C	00:20	
	72°C	00:20	
Etapa 3	96°C	00:10	30
	60°C	00:15	
	72°C	00:20	
Etapa 4	72°C	10:00	1
Etapa 5	4°	∞	1

Quadro 1: Ciclo utilizado para a amplificação por PCR para LabType™ SSO.

Após a amplificação foi realizada uma corrida eletroforética em um gel de agarose 2,5%, para verificar se houve a amplificação das amostras (Figura 7).

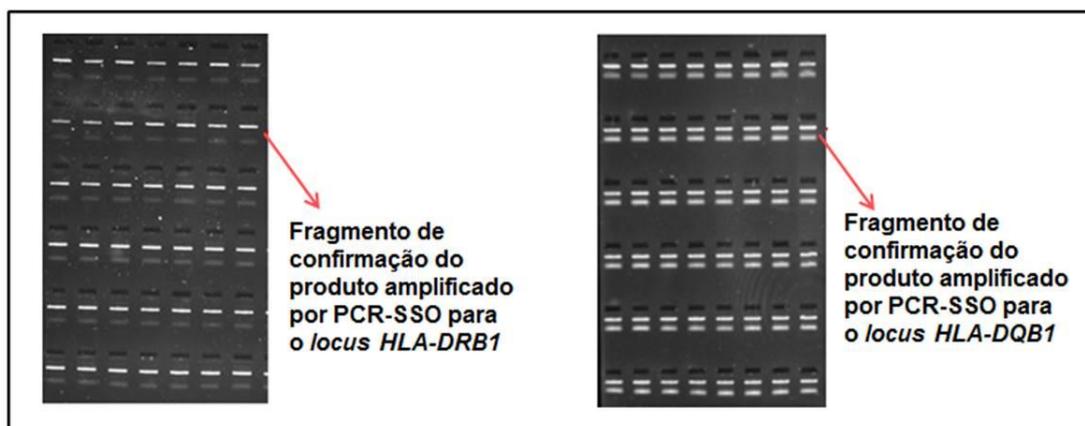


Figura 7. Géis de agarose com as setas evidenciando os fragmentos de confirmação do produto amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR), avaliado em eletroforese. Na figura apresentada todas as amostras amplificaram.

2ª etapa: Desnaturação e Neutralização do produto da PCR

Após a 1ª etapa, foi transferido 2,5 µl do DNA amplificado para uma nova placa de PCR, em seguida adicionou-se 1,25 µl de tampão de desnaturação. Prosseguiu-se com centrifugação, agitação em vórtex por 20 segundos e posterior incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 2,5 µl do tampão de neutralização, prosseguiu-se com centrifugação, e agitação da placa por 20 segundos em vórtex, houve a mudança da cor roxo para amarelo e a placa foi mantida no gelo até a etapa seguinte.

3ª etapa: Hibridização

A hibridização foi realizada com sondas complementares ao DNA desnaturado, conjugadas à microesferas fluorescentes (*beads*). Para cada amostra foi pipetado 2 µl de *beads* e 17 µl de tampão de hibridização. Após a adição das *beads*, a placa foi agitada em vórtex por 20 segundos, e depois incubada a 60°C por 15 minutos. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com adição de 40 µl de tampão de lavagem, seguido de centrifugação por 5 minutos a 1000 g. Após cada lavagem, o sobrenadante foi descartado.

Após a última centrifugação foi adicionada a solução SAPE (R-Ficoeritrina conjugada com estreptavidina), preparada na seguinte proporção: 0,25 µl de solução SAPE e 24,75 µl de tampão de SAPE para cada amostra. Após a adição da solução SAPE, a placa foi incubada a 60°C por 5 minutos. Posteriormente, a placa foi lavada uma vez com adição de 40 µl de tampão de lavagem seguida de centrifugação por 5 minutos a 1000g. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 65 µl de tampão de lavagem. O produto foi homogeneizado, delicadamente, e transferido para uma placa de ELISA com fundo em V, para ser analisado.

4ª etapa: Leitura e interpretação dos resultados

A leitura foi realizada fazendo uso da metodologia de citometria de fluxo, utilizando-se o LABScan™ 100 - Luminex®, que identifica a intensidade da fluorescência da ficoeritrina em cada microesfera. Os resultados foram interpretados pelo programa computacional HLA Fusion (HLA Fusion, versão 3.4, One Lambda®) para determinar os alelos dos genes *HLA*. A análise do

padrão de reatividade de cada amostra de DNA em relação ao conjunto de sondas conjugadas às microesferas permite o estabelecimento do genótipo e foram gerados relatórios com os resultados.

2.3.6 Análise estatística

As médias de idade foram comparadas utilizando o teste-t., fazendo uso do *software* GraphPad InStat (versão 3.06). O equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências dos alelos e haplótipos foram calculados utilizando o *software* ARLEQUIN (versão 3.11; <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>).

A comparação da frequência dos alelos e haplótipos entre os grupos de pacientes foram realizadas usando o Qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher. A *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foi calculada para avaliar o risco de associação. Estes cálculos foram realizados usando o *software* Open Epi: *Open Source* Estatísticas epidemiológicas de código aberto para a Saúde Pública, versão 3.03 (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm). Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando o valor $p \leq 0,05$, após a correção pelo método de Bonferroni para comparações múltiplas (pc).

Resultados

3. RESULTADOS

Neste estudo foram analisadas amostras de 249 indivíduos. O grupo de pacientes com toxoplasmose ocular foi composto por 123 pacientes portadores da forma ocular da doença, e posteriormente este foi dividido em dois subgrupos de acordo a manifestação clínica da doença (93 pacientes com manifestação primária, 30 pacientes com manifestação recorrente). O grupo de pacientes sem toxoplasmose ocular foi composto por 126 pacientes portadores de outras doenças oculares e com sorologia reagente para *T. gondii*.

3.1 Características gerais dos pacientes

As características gerais dos participantes do estudo são apresentadas na tabela 1. O grupo de pacientes sem toxoplasmose ocular apresentou uma idade média significativamente maior em comparação com o grupo de pacientes com toxoplasmose ocular ($p < 0,0001$; $t = 7.056$), com o subgrupo dos pacientes com manifestações primárias de toxoplasmose ocular ($p < 0,0001$; $t = 5.216$) e com o subgrupo de pacientes com a forma recorrente da doença ($p < 0,0001$; $t = 7.970$). Também foram observadas diferenças de idade entre os subgrupos de pacientes: aqueles com a manifestação primária da doença tiveram uma média de idade mais elevada do que aqueles que tiveram manifestações recorrentes ($p < 0.0011$; $t = 3.336$).

Tabela 1. Características gerais dos pacientes com e sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.

Característica	Pacientes sem TO (n=126)	Pacientes com TO (n=123)	Pacientes com MP (n=93)	Pacientes com MR (n=30)
Idade (Média±SD)	57.6 ± 17.2	40.9±19.9	44.2±20.7	30.7±13.3
Mediana	61.5	35.0	41.0	29.0
Mínima	19	10	14	10
Máxima	88	90	90	68
Gênero (%)				
Feminino	55 (43.7%)	53 (43,1%)	36 (38.7 %)	17 (56.7%)
Masculino	71 (56.3%)	70 (56.9%)	57 (61.3%)	13 (43.3%)

t= Teste t Student

Valor de $p < 0.0001$ $t = 7.056$ (Pacientes sem toxoplasmose ocular vs. Pacientes com toxoplasmose ocular).

Valor de $p < 0.0001$ $t = 5.216$ (Pacientes sem toxoplasmose ocular vs. Pacientes com manifestação primária).

Valor de $p < 0.0001$ $t = 7.970$ (Pacientes sem toxoplasmose ocular vs. Pacientes com manifestação recorrente).

Valor de $p < 0.0011$ $t = 3.336$ (Pacientes com manifestação primária vs. Pacientes com manifestação recorrente).

Os pacientes deste estudo são de ascendência europeia, ascendência africana e ascendência africana e europeia mista. Devido à alta miscigenação da população brasileira⁽⁵⁵⁾, inclusive desta região onde os pacientes residem⁽⁵⁶⁾, eles foram agrupados como uma população de etnia mista.

3.2 Frequência dos alelos HLA-DRB1

A tabela 2 mostra a distribuição dos alelos HLA-DRB1. Treze alelos foram identificados nas amostras dos grupos de pacientes com e sem toxoplasmose ocular. Os alelos mais comuns no grupo de pacientes sem toxoplasmose ocular foram HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*04,

HLA-DRB1*13 e HLA-DRB1*15. Já no grupo com toxoplasmose ocular foram HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*04 e HLA-DRB1*11. Totalizando 65,9% e 64,7%, respectivamente, dos possíveis alelos em pacientes sem e com toxoplasmose ocular. Não foi verificada a presença do alelo HLA-DRB1*12 apenas no subgrupo de manifestação recorrente da toxoplasmose.

Tabela 2. Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com e sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.

Alelos HLA	Pacientes sem TO	Pacientes com TO	Pacientes com MP	Pacientes com MR
	(n=126) N (%)	(n=123) N (%)	(n=93) N (%)	(n=30) N (%)
DRB1*01	23 (9.1)	31 (12.6)	23 (12.3)	8 (13.3)
DRB1*03	37 (14.7)	20 (8.1)	17 (9.1)	3 (5.0)
DRB1*04	31 (12.3)	27 (11.0)	18 (9.7)	9 (15.0)
DRB1*07	41 (16,3)	36 (14.6)	30 (16.1)	6 (10.0)
DRB1*08	10 (4.0)	13 (5.3)	10 (5.4)	3 (5.0)
DRB1*09	5 (2.0)	4 (1.6)	3 (1.6)	1 (1.7)
DRB1*10	2 (0.8)	6 (2.4)	3 (1.6)	3 (5.0)
DRB1*11	24 (9.5)	26 (10.6)	21 (11.2)	5 (8.4)
DRB1*12	2 (0.8)	2 (0.8)	2 (1.1)	0 (0)
DRB1*13	31 (12.3)	39 (15.9)	28 (15.1)	11 (18.3)
DRB1*14	12 (4.8)	15 (6.1)	7 (3.8)	8 (13.3)
DRB1*15	26 (10.3)	15 (6.1)	13 (7.0)	2 (3,3)
DRB1*16	8 (3.1)	12 (4.9)	11 (6.0)	1 (1.7)

3.2.1 Frequência dos alelos HLA-DRB1 nos grupos com e sem toxoplasmose ocular

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na distribuição dos alelos HLA-DRB1 entre os grupos de pacientes com e sem toxoplasmose ocular para o grupo alélico DRB1*03, que apresentou maior

frequência alélica no grupo sem toxoplasmose ocular, comparado ao grupo com toxoplasmose ocular (14,7% x 8,1%), sugerindo um comportamento como fator de proteção (OR= 1,94; IC 95% 1.09-3.45; $p= 0.031$; $pc=0.404$), entretanto, após a correção de Bonferroni essa associação foi perdida.

Não foram observadas diferenças significativas para as demais frequências alélicas HLA-DRB1 entre os grupos analisados ($p>0,05$), conforme tabela 3.

Tabela 3. Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com e sem toxoplasmose.

Alelos HLA	Pacientes sem TO (n=126)	Pacientes com TO (n=123)	Pacientes sem TO X Pacientes com TO			
	N (%)	N (%)	OR	IC	p^*	pc^{**}
DRB1*01	23 (9.1)	31 (12.6)	0.69	0.39-1.23	0.271	
DRB1*03	37 (14.7)	20 (8.1)	1.94	1.09-3.45	0.031	0.404
DRB1*04	31 (12.3)	27 (11.0)	1.13	0.65-1.96	0.747	
DRB1*07	41 (16,3)	36 (14.6)	1.13	0.69-1.84	0.703	
DRB1*08	10 (4.0)	13 (5.3)	0.74	0.31-1.72	0.626	
DRB1*09	5 (2.0)	4 (1.6)	1.22	0.32-4.61	0.971	
DRB1*10	2 (0.8)	6 (2.4)	0.32	0.06-1.60	0.271	
DRB1*11	24 (9.5)	26 (10.6)	0.89	0.49-1.59	0.811	
DRB1*12	2 (0.8)	2 (0.8)	0.97	0.13-6.98	0.632	
DRB1*13	31 (12.3)	39 (15.9)	0.74	0.44-1.23	0.314	
DRB1*14	12 (4.8)	15 (6.1)	0.77	0.35-1.68	0.645	
DRB1*15	26 (10.3)	15 (6.1)	1.77	0.91-3.43	0.121	
DRB1*16	8 (3.1)	12 (4.9)	0.63	0.25-1.59	0.459	

*Valores calculados com o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

**Valores de p obtido com a correção de Bonferroni.

3.2.2 Frequência dos alelos HLA-DRB1 entre o grupo sem toxoplasmose ocular e o subgrupo com manifestação primária

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências alélicas dos grupos alélicos HLA-DRB1 entre o grupo e subgrupo analisados ($p > 0,05$), de modo que nenhuma associação de proteção ou suscetibilidade foi observada para este *locus*, de acordo com a tabela 4.

Tabela 4. Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes sem toxoplasmose ocular e com a manifestação primária da doença.

Alelos HLA	Pacientes sem	Pacientes com	Pacientes sem TO X Pacientes com MP		
	TO (n=126)	MP (n=93)	OR	IC	p^*
	N (%)	N (%)			
DRB1*01	23 (9.1)	23 (12.3)	0.71	0.38-1.31	0.349
DRB1*03	37 (14.7)	17 (9.1)	1.71	0.93-3.14	0.110
DRB1*04	31 (12.3)	18 (9.7)	1.30	0.70-2.42	0.479
DRB1*07	41 (16,3)	30 (16.1)	1.01	0.60-1.69	0.927
DRB1*08	10 (4.0)	10 (5.4)	0.72	0.29-1.78	0.641
DRB1*09	5 (2.0)	3 (1.6)	1.23	0.29-5.23	0.941
DRB1*10	2 (0.8)	3 (1.6)	0.48	0.08-2.95	0.732
DRB1*11	24 (9.5)	21 (11.2)	0.82	0.44-1.53	0.658
DRB1*12	2 (0.8)	2 (1.1)	0.73	0.10-5.27	0.840
DRB1*13	31 (12.3)	28 (15.1)	0.79	0.45-1.37	0.488
DRB1*14	12 (4.8)	7 (3.8)	1.27	0.49-3.31	0.787
DRB1*15	26 (10.3)	13 (7.0)	1.53	0.76-3.06	0.300
DRB1*16	8 (3.1)	11 (6.0)	0.52	0.20-1.32	0.249

*Valores calculados com o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

3.2.3 Frequência dos alelos HLA-DRB1 entre o grupo sem toxoplasmose ocular e o subgrupo com manifestação recorrente

HLA-DRB1*14 apresentou maior frequência no subgrupo de pacientes com manifestação recorrente, comparado com o grupo sem toxoplasmose ocular (13,3% x 4,8%), se comportando como fator de suscetibilidade para o desenvolvimento da manifestação recorrente da doença (OR= 0.32; IC 95% 0.12-0.83; $p=0.032$; $pc=0.417$), entretanto a importância desta associação não permaneceu estatisticamente significativa após correção para múltiplas comparações, de acordo com a tabela 5. As demais frequências alélicas entre os grupos analisados não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$).

Tabela 5. Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes sem toxoplasmose ocular e com a manifestação recorrente da doença.

Alelos HLA	Pacientes sem TO	Pacientes com MR (n=30)	Pacientes sem TO X Pacientes com MR			
	N (%)	N (%)	OR	IC	p^*	pc^{**}
DRB1*01	23 (9.1)	8 (13.3)	0.65	0.27-1.54	0.460	
DRB1*03	37 (14.7)	3 (5.0)	3.27	0.97-10.99	0.072	
DRB1*04	31 (12.3)	9 (15.0)	0.79	0.35-1.77	0.728	
DRB1*07	41 (16,3)	6 (10.0)	1.74	0.70-4.33	0.309	
DRB1*08	10 (4.0)	3 (5.0)	0.78	0.20-2.94	>0.999	
DRB1*09	5 (2.0)	1 (1.7)	1.19	0.13-10.41	0.717	
DRB1*10	2 (0.8)	3 (5.0)	0.15	0.02-0.93	0.078	
DRB1*11	24 (9.5)	5 (8.4)	1.15	0.42-3.17	0.969	
DRB1*12	2 (0.8)	0 (0)				
DRB1*13	31 (12.3)	11 (18.3)	0.62	0.29-1.32	0.309	
DRB1*14	12 (4.8)	8 (13.3)	0.32	0.12-0.83	0.032	0.417
DRB1*15	26 (10.3)	2 (3,3)	3.33	0.76-14.46	0.1472	
DRB1*16	8 (3.1)	1 (1.7)	1.93	0.23-15.77	0.8430	

*Valores calculados com o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

**Valores de P obtido com a correção de Bonferroni.

3.2.4 Frequência dos alelos HLA-DRB1 entre os subgrupos com manifestação primária e com manifestação recorrente

A frequência alélica do HLA-DRB1*14 no subgrupo com manifestação recorrente foi de 13.3%, enquanto no subgrupo com manifestação primária, a frequência foi de apenas 3.8% ($p < 0.017$). Desta forma, foi observada uma possível associação de suscetibilidade para o desenvolvimento da manifestação recorrente (OR=0.25; IC 95% 0.08-0.73), envolvendo este grupo alélico. Porém, a importância desta associação não permaneceu estatisticamente significativa após correção de Bonferroni, conforme tabela 6.

Tabela 6. Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com a manifestação primária e recorrente da toxoplasmose ocular.

Alelos HLA	Pacientes com	Pacientes com	Pacientes com MP X Pacientes com MR			
	MP (n=93)	MR (n=30)	OR	IC	p^*	pc^{**}
	N (%)	N (%)				
DRB1*01	23 (12.3)	8 (13.3)	0.91	0.38-2.17	0.978	
DRB1*03	17 (9.1)	3 (5.0)	1.91	0.54-6.76	0.454	
DRB1*04	18 (9.7)	9 (15.0)	0.60	0.25-1.43	0.363	
DRB1*07	30 (16.1)	6 (10.0)	1.731	0.68-4.38	0.338	
DRB1*08	10 (5.4)	3 (5.0)	1.08	0.28-4.05	0.827	
DRB1*09	3 (1.6)	1 (1.7)	0.96	0.09-9.47	0.576	
DRB1*10	3 (1.6)	3 (5.0)	0.31	0.06-1.58	0.318	
DRB1*11	21 (11.2)	5 (8.4)	1.40	0.50-3.89	0.684	
DRB1*12	2 (1.1)	0 (0)				
DRB1*13	28 (15.1)	11 (18.3)	0.78	0.36-1.70	0.688	
DRB1*14	7 (3.8)	8 (13.3)	0.25	0.08-0.73	0.017	0.223
DRB1*15	13 (7.0)	2 (3,3)	2.17	0.47-9.94	0.472	
DRB1*16	11 (6.0)	1 (1.7)	3.70	0.46-29.34	0.325	

*Valores calculados com o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

**Valores de P obtido com a correção de Bonferroni.

3.3 Frequência dos alelos HLA-DQB1

A Tabela 7 mostra a distribuição dos alelos HLA-DQB1. Foi identificado um total de cinco grupos de alelos para o *locus* HLA-DQB1.

Tabela 7. Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com e sem toxoplasmose e sua manifestação primária e recorrente.

Alelos HLA	Pacientes sem TO	Pacientes com TO	Pacientes com MP	Pacientes com MR
	(n=126)	(n=123)	(n=93)	(n=30)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
DQB1*02	88 (34.9)	64 (26.0)	49 (26.3)	15 (25.0)
DQB1*03	49 (19,4)	54 (22.0)	41 (22.0)	13 (21.7)
DQB1*04	7 (2.8)	12 (4.9)	10 (5.4)	2 (3.3)
DQB1*05	48 (19.0)	64 (26.0)	46 (24.7)	18 (30.0)
DQB1*06	60 (23.9)	52 (21.1)	40 (21.6)	12 (20.0)

3.3.1 Frequência dos alelos HLA-DQB1 nos grupos com e sem toxoplasmose ocular

Foi observada a existência de uma associação estatisticamente significativa para o *locus* HLA-DQB1 entre os grupos com e sem toxoplasmose ocular. O grupo alélico DQB1*02 apresentou maior frequência alélica no grupo de pacientes sem toxoplasmose ocular quando comparado com o grupo com toxoplasmose ocular (34.9% x 26.0%), se comportando como fator de proteção para o desenvolvimento da forma ocular da doença (OR= 1.52; IC 95% 1.03-2.24; $p=0.039$; $pc=0.197$), contudo a importância desta associação não permaneceu estatisticamente significativa após correção para múltiplas comparações, conforme tabela 8.

Tabela 8. Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com e sem toxoplasmose ocular.

Alelos HLA	Pacientes sem TO (n=126)	Pacientes com TO (n=123)	Pacientes sem toxoplasmose ocular X Pacientes com toxoplasmose ocular			
	N (%)	N (%)	OR	IC	p*	pc**
DQB1*02	88 (34.9)	64 (26.0)	1.52	1.03-2.24	0.039	0.197
DQB1*03	49 (19,4)	54 (22.0)	0.85	0.55-1.32	0.562	
DQB1*04	7 (2.8)	12 (4.9)	0.55	0.21-1.43	0.322	
DQB1*05	48 (19.0)	64 (26.00)	0.66	0.43-1.02	0.079	
DQB1*06	60 (23.9)	52 (21.1)	1.16	0.76-1.77	0.544	

*Valores calculados com o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

**Valores de *P* obtido com a correção de Bonferroni.

3.3.2 Frequência dos alelos HLA-DQB1 entre o grupo sem toxoplasmose ocular e o subgrupo com manifestação primária

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos alelos HLA-DQB1 entre o grupo sem toxoplasmose ocular e o subgrupo com manifestação primária, conforme tabela 9.

Tabela 9. Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes sem toxoplasmose ocular e com manifestação primária da doença.

Alelos HLA	Pacientes sem TO (n=126)	Pacientes com MP (n=93)	Pacientes sem TO X Pacientes com MP		
	N (%)	N (%)	OR	IC	p*
DQB1*02	88 (34.9)	49 (26.3)	1.50	0.98-2.27	0.070
DQB1*03	49 (19,4)	41 (22.0)	0.85	0.53-1.36	0.585
DQB1*04	7 (2.8)	10 (5.4)	0.50	0.18-1.347	0.254
DQB1*05	48 (19.0)	46 (24.7)	0.71	0.45-1.13	0.189
DQB1*06	60 (23.9)	40 (21.6)	1.14	0.72-1.79	0.650

*Valores calculados com o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

3.3.3 Frequência dos alelos HLA-DQB1 entre o grupo sem toxoplasmose ocular e o subgrupo com manifestação recorrente

Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos alelos HLA-DQB1 entre o grupo sem toxoplasmose ocular e o subgrupo com manifestação recorrente, de acordo com a tabela 10.

Tabela 10. Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes sem toxoplasmose ocular e com manifestação recorrente da doença.

Alelos HLA	Pacientes sem	Pacientes com	Pacientes sem TO X		
	TO (n=126)	MR (n=30)	OR	IC	p*
	N (%)	N (%)			
DQB1*02	88 (34.9)	15 (25.0)	1.61	0.84-3.05	0.188
DQB1*03	49 (19,4)	13 (21.7)	0.87	0.43-1.73	0.835
DQB1*04	7 (2.8)	2 (3.3)	0.82	0.16-4.09	0.843
DQB1*05	48 (19.0)	18 (30.0)	0.54	0.29-1.03	0.091
DQB1*06	60 (23.9)	12 (20.0)	1.25	0.62-2.50	0.646

*Valores calculados com o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

3.3.4 Frequência dos alelos HLA-DQB1 entre os subgrupos com manifestação primária e com manifestação recorrente

Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos alelos HLA-DQB1 entre os subgrupos com manifestação primária e manifestação recorrente, de acordo com a tabela 11.

Tabela 11. Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com manifestação primária e recorrente da doença.

Alelos HLA	Pacientes com MP (n=93)	Pacientes com MR (n=30)	Pacientes com MP X Pacientes com MR		
	N (%)	N (%)	OR	IC	p*
DQB1*02	49 (26.3)	15 (25.0)	1.07	0.54-2.09	0.970
DQB1*03	41 (22.0)	13 (21.7)	1.02	0.50-2.06	0.906
DQB1*04	10 (5.4)	2 (3.3)	1.64	0.35-7.73	0.768
DQB1*05	46 (24.7)	18 (30.0)	0.76	0.40-1.46	0.522
DQB1*06	40 (21.6)	12 (20.0)	1.09	0.53-2.25	0.947

*Valores calculados com o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

3.4 Frequência dos haplótipos HLA-DRB1_HLA-DQB1

Os haplótipos HLA-DRB1_HLA-DQB1 encontrados nos grupos analisados estão apresentados na tabela 12. Trinta e seis haplótipos foram identificados no grupo de pacientes sem toxoplasmose ocular, trinta e sete no grupo de pacientes com toxoplasmose ocular, trinta e quatro no grupo de pacientes com manifestações clínicas primária da doença e vinte e dois no grupo com pacientes com a manifestação recorrente da doença. O haplótipo mais comum em ambos os grupos foi o HLA-DRB1*07_HLA-DQB1*02.

Tabela 12. Distribuição dos haplótipos HLA-DRB1_HLA-DQB1 em pacientes com e sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.

Genótipos HLA	Pacientes sem		Pacientes com		Pacientes com		Pacientes com	
	TO (n=126)		TO (n=123)		MP (n=93)		MR (n=30)	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
DRB1*01_DQB1*02	0	0	2	0,8	0	0	2	3,5
DRB1*01_DQB1*03	0	0	1	0,3	1	0,4	0	0
DRB1*01_DQB1*05	23	9,1	27	11	21	11,3	6	9,8
DRB1*01_DQB1*06	0	0	1	0,6	1	0,7	0	0
DRB1*03_DQB1*02	34	13,5	19	7,7	16	8,6	3	5
DRB1*03_DQB1*04	1	0,4	1	0,4	1	0,5	0	0
DRB1*03_DQB1*05	1	0,4	0	0	0	0	0	0
DRB1*03_DQB1*06	1	0,4	0	0	0	0	0	0
DRB1*04_DQB1*02	5	2	4	1,6	1	0,5	3	4,8
DRB1*04_DQB1*03	19	7,5	19	7,7	14	7,5	5	8,3
DRB1*04_DQB1*04	2	0,8	1	0,4	1	0,5	0	0
DRB1*04_DQB1*05	1	0,2	3	1,3	2	1,1	1	1,9
DRB1*04_DQB1*06	4	1,8	0	0	0	0	0	0
DRB1*07_DQB1*02	35	13,8	33	13,4	27	14,5	6	10
DRB1*07_DQB1*03	4	1,7	1	0,4	1	0,5	0	0
DRB1*07_DQB1*05	2	0,8	2	0,8	2	1,1	0	0
DRB1*08_DQB1*02	4	1,6	0	0	0	0	0	0
DRB1*08_DQB1*03	3	1,2	1	0,4	1	0,5	0	0
DRB1*08_DQB1*04	3	1,1	10	4,1	8	4,3	2	3,3
DRB1*08_DQB1*06	0	0	2	0,8	1	0,5	1	1,7
DRB1*09_DQB1*02	2	0,8	1	0,4	1	0,5	0	0
DRB1*09_DQB1*03	2	0,8	3	1,2	2	1,1	1	1,7
DRB1*09_DQB1*06	1	0,4	0	0	0	0	0	0
DRB1*10_DQB1*05	2	0,8	5	2	2	1,1	3	5
DRB1*10_DQB1*06	0	0	1	0,4	1	0,5	0	0
DRB1*11_DQB1*02	4	1,6	3	1,2	2	1,1	1	1,7
DRB1*11_DQB1*03	16	6,3	17	6,8	14	7,4	3	4,7
DRB1*11_DQB1*05	1	0,4	1	0,4	1	0,5	0	0
DRB1*11_DQB1*06	3	1,2	5	2,2	4	2,3	1	1,9
DRB1*12_DQB1*02	1	0,4	0	0	0	0	0	0
DRB1*12_DQB1*03	0	0	1	0,4	1	0,5	0	0
DRB1*12_DQB1*05	1	0,4	1	0,4	1	0,5	0	0
DRB1*13_DQB1*02	3	1,2	1	0,4	1	0,6	0	0
DRB1*13_DQB1*03	2	0,8	8	3,1	4	2,4	3	5,3
DRB1*13_DQB1*05	0	0	4	1,7	3	1,6	1	1,7
DRB1*13_DQB1*06	26	10,3	26	10,6	20	10,5	7	11,3
DRB1*14_DQB1*03	0	0	1	0,4	0	0	1	1,7

Tabela 12. Continuação

Genótipos HLA	Pacientes sem		Pacientes com		Pacientes com		Pacientes com	
	TO (n=126)		TO (n=123)		MP (n=93)		MR (n=30)	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
DRB1*14_DQB1*04	1	0,4	0	0	0	0	0	0
DRB1*14_DQB1*05	10	4	13	5,3	7	3,9	6	10
DRB1*14_DQB1*06	1	0,4	1	0,4	0	0	1	1,7
DRB1*15_DQB1*05	3	1	0	0	0	0	0	0
DRB1*15_DQB1*06	23	9,3	15	6,1	13	7	2	3,3
DRB1*16_DQB1*02	0	0	1	0,4	1	0,5	0	0
DRB1*16_DQB1*03	3	1,2	3	1,3	3	1,6	0	0
DRB1*16_DQB1*05	5	2	8	3,2	7	3,9	1	1,7
Total	252	100	246	100	186	100	60	100

O haplótipo HLA-DRB1*03_HLA-DQB1*02 sugeriu uma possível associação à proteção contra o desenvolvimento da forma ocular da toxoplasmose (OR: 1.86; IC 95%: 1.03-3.36; p= 0.052), quando comparados os grupos de pacientes sem e com toxoplasmose ocular (13.5% x 7.7%), embora no limite da significância estatística, conforme tabela 13.

Tabela 13. Distribuição dos haplótipos HLA-DRB1_HLA-DQB1 em pacientes com e sem toxoplasmose ocular.

Genótipos HLA	Pacientes sem TO (n=126)		Pacientes com TO (n=123)		Pacientes sem TO X Pacientes com TO		
	N	(%)	N	(%)	OR	IC	p*
DRB1*01_DQB1*02	0	0	2	0,8	0	0	0
DRB1*01_DQB1*03	0	0	1	0,3	0	0	0
DRB1*01_DQB1*05	23	9,1	27	11	0.8147	0.45-1.46	0.591
DRB1*01_DQB1*06	0	0	1	0,6	0	0	0
DRB1*03_DQB1*02	34	13,5	19	7,7	1.863	1.03-3.36	0.052
DRB1*03_DQB1*04	1	0,4	1	0,4	0.9761	0.06-15.69	0.489
DRB1*03_DQB1*05	1	0,4	0	0	0	0	0
DRB1*03_DQB1*06	1	0,4	0	0	0	0	0
DRB1*04_DQB1*02	5	2	4	1,6	1.225	0.32-4.61	0.971
DRB1*04_DQB1*03	19	7,5	19	7,7	0.9742	0.50-1.88	0.927
DRB1*04_DQB1*04	2	0,8	1	0,4	1.96	0.17-21.75	0.983
DRB1*04_DQB1*05	1	0,2	3	1,3	0.3227	0.03-3.12	0.598
DRB1*04_DQB1*06	4	1,8	0	0	0	0	0
DRB1*07_DQB1*02	35	13,8	33	13,4	1.041	0.62-1.73	0.981
DRB1*07_DQB1*03	4	1,7	1	0,4	3.952	0.43-35.60	0.383
DRB1*07_DQB1*05	2	0,8	2	0,8	0.976	0.13-6.98	0.633
DRB1*08_DQB1*02	4	1,6	0	0	0	0	0
DRB1*08_DQB1*03	3	1,2	1	0,4	2.952	0.30-28.57	0.633
DRB1*08_DQB1*04	3	1,1	10	4,1	0.2843	0.07-1.04	0.083
DRB1*08_DQB1*06	0	0	2	0,8	0	0	0
DRB1*09_DQB1*02	2	0,8	1	0,4	1.96	0.17-21.75	0.983
DRB1*09_DQB1*03	2	0,8	3	1,2	0.648	0.10-3.91	0.978
DRB1*09_DQB1*06	1	0,4	0	0	0	0	0
DRB1*10_DQB1*05	2	0,8	5	2	0.3856	0.07-2.01	0.427
DRB1*10_DQB1*06	0	0	1	0,4	0	0	0
DRB1*11_DQB1*02	4	1,6	3	1,2	1.306	0.28-5.89	0.974
DRB1*11_DQB1*03	16	6,3	17	6,8	0.9133	0.45-1.85	0.943
DRB1*11_DQB1*05	1	0,4	1	0,4	0.9761	0.06-15.69	0.489
DRB1*11_DQB1*06	3	1,2	5	2,2	0.5807	0.13-2.45	0.696
DRB1*12_DQB1*02	1	0,4	0	0	0	0	0
DRB1*12_DQB1*03	0	0	1	0,4	0	0	0
DRB1*12_DQB1*05	1	0,4	1	0,4	0.9761	0.06-15.69	0.489
DRB1*13_DQB1*02	3	1,2	1	0,4	2.952	0.30-28.57	0.633
DRB1*13_DQB1*03	2	0,8	8	3,1	0.238	0.05-1.13	0.102
DRB1*13_DQB1*05	0	0	4	1,7	0	0	0
DRB1*13_DQB1*06	26	10,3	26	10,6	0.9735	0.54-1.72	0.956
DRB1*14_DQB1*03	0	0	1	0,4	0	0	0
DRB1*14_DQB1*04	1	0,4	0	0	0	0	0

Tabela 13. Continuação

Genótipos HLA	Pacientes sem TO (n=126)		Pacientes com TO (n=123)		Pacientes sem TO X Pacientes com TO		
	N	(%)	N	(%)	OR	IC	p*
DRB1*14_DQB1*05	10	4	13	5,3	0.7406	0.31-1.72	0.626
DRB1*14_DQB1*06	1	0,4	1	0,4	0.9761	0.06-15.69	0.489
DRB1*15_DQB1*05	3	1	0	0	0	0	0
DRB1*15_DQB1*06	23	9,3	15	6,1	1.547	0.78-3.04	0.270
DRB1*16_DQB1*02	0	0	1	0,4	0	0	0
DRB1*16_DQB1*03	3	1,2	3	1,3	0.9759	0.19-4.88	0.703
DRB1*16_DQB1*05	5	2	8	3,2	0.6022	0.19-1.86	0.544

*Valores calculados com o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

Não houve diferença significativa na comparação dos demais haplótipos HLA-DRB1_HLA-DQB1 entre pacientes com manifestações primárias e aqueles com manifestações recorrentes de toxoplasmose ocular, de acordo com a tabela 14.

Tabela 14. Distribuição dos haplótipos HLA-DRB1_HLA-DQB1 em pacientes sem toxoplasmose ocular e com manifestação primária ou recorrente.

Genótipos HLA	Pacientes sem TO X Pacientes com MP			Pacientes sem TO X Pacientes com MR			Pacientes com MP X Pacientes com MR		
	OR	IC	<i>p</i> *	OR	IC	<i>p</i> *	OR	IC	<i>p</i> *
DRB1*01_DQB1*05	0.79	0.42-1.47	0.559	0.90	0.35-2.32	0.969	1.14	0.43-2.98	0.967
DRB1*03_DQB1*02	1.66	0.88-3.10	0.150	2.96	0.87-9.99	0.108	1.79	0.50-6.36	0.528
DRB1*03_DQB1*04	0.74	0.04-11.86	0.616	0	0	0	0	0	0
DRB1*04_DQB1*02	3.74	0.43-32.32	0.383	0.38	0.08-1.65	0.382	0.10	0.01-1.01	0.073
DRB1*04_DQB1*03	1.00	0.48-2.05	0.858	0.89	0.32-2.50	0.950	0.89	0.30-2.59	0.940
DRB1*04_DQB1*04	1.48	0.13-16.44	0.791	0	0	0	0	0	0
DRB1*04_DQB1*05	0.37	0.03-4.07	0.791	0.23	0.01-3.81	0.835	0.64	0.05-7.19	0.754
DRB1*07_DQB1*02	0.95	0.55-1.63	0.962	1.45	0.58-3.62	0.556	1.53	0.59-3.90	0.499
DRB1*07_DQB1*03	2.98	0.33-26.91	0.570	0	0	0	0	0	0
DRB1*07_DQB1*05	0.74	0.10-5.27	0.840	0	0	0	0	0	0
DRB1*08_DQB1*03	2.23	0.23-21.60	0.840	0	0	0	0	0	0
DRB1*08_DQB1*04	0.27	0.07-1.02	0.080	0.35	0.05-2.13	0.538	1.30	0.26-6.31	0.963
DRB1*08_DQB1*06	0	0	0	0	0	0	0.32	0.01-5.17	0.983
DRB1*09_DQB1*02	1.48	0.13-16.44	0.791	0	0	0	0	0	0
DRB1*09_DQB1*03	0.74	0.10-5.27	0.840	0.47	0.04-5.29	0.909	0.64	0.05-7.19	0.754
DRB1*10_DQB1*05	0.74	0.10-5.27	0.840	0.15	0.02-0.93	0.078	0.21	0.03-1.26	0.178
DRB1*11_DQB1*02	1.48	0.26-8.18	0.968	0.95	0.10-8.67	0.597	0.64	0.05-7.19	0.754
DRB1*11_DQB1*03	0.83	0.39-1.75	0.771	1.29	0.36-4.57	0.926	1.55	0.42-5.57	0.705
DRB1*11_DQB1*05	0.74	0.04-11.86	0.616	0	0	0	0	0	0
DRB1*11_DQB1*06	0.55	0.12-2.47	0.684	0.71	0.07-6.95	0.731	1.29	0.14-11.83	0.768
DRB1*12_DQB1*05	0.74	0.04-11.86	0.616	0	0	0	0	0	0
DRB1*13_DQB1*02	2.23	0.23-21.60	0.840	0	0	0	0	0	0
DRB1*13_DQB1*03	0.36	0.06-2.00	0.428	0.15	0.02-0.93	0.078	0.42	0.09-1.92	0.479
DRB1*13_DQB1*05	0	0	0	0	0	0	0.97	0.09-9.47	0.576
DRB1*13_DQB1*06	0.95	0.51-1.76	0.991	0.87	0.35-2.11	0.942	0.91	0.36-2.27	0.967
DRB1*14_DQB1*05	1.06	0.39-2.82	0.888	0.37	0.12-1.06	0.114	0.35	0.11-1.09	0.122
DRB1*14_DQB1*06	0	0	0	0.23	0.01-3.81	0.835	0	0	0
DRB1*15_DQB1*06	1.34	0.65-2.71	0.529	2.91	0.66-12.71	0.223	2.18	0.47-9.94	0.472
DRB1*16_DQB1*03	0.74	0.14-3.68	0.968	0	0	0	0	0	0
DRB1*16_DQB1*05	0.52	0.16-1.65	0.405	1.19	0.13-10.41	0.717	2.31	0.27-19.14	0.705

*Valores calculados com o teste de Qui-quadrado com correção de Yates.

3.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para o *locus* HLA-DRB1 em todos os grupos e subgrupos analisados no estudo (Tabela 15). Os grupos de pacientes sem TO, com TO, manifestação primária e recorrente apresentaram altas taxas de heterozigosidade, com valores de 87,3%, 86,9%, 86.0% e 90.0%, respectivamente.

Tabela 15. Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o *locus* HLA-DRB1 nos grupos de pacientes com e sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.

<i>Locus</i> HLA-DRB1	N	Het. Obs	Het. Esp.	P	D. P.
Pacientes sem toxoplasmose ocular	126	0.87302	0.89183	0.44720	0.00063
Pacientes com toxoplasmose ocular	123	0.86992	0.89786	0.43318	0.00100
Pacientes com manifestação primária	93	0.86022	0.89706	0.33305	0.00085
Pacientes com manifestação recorrente	30	0.90000	0.89718	0.45131	0.00116

n = número de pacientes; Het. Obs.= frequência de heterozigotos observada;

Het. Esp.= frequência de heterozigotos esperada; P= probabilidade; D. P.= desvio padrão

Para o *locus* HLA-DQB1, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi observado apenas no subgrupo de pacientes com manifestação recorrente, enquanto para os grupos sem TO, com TO e o subgrupo com manifestação primária foi observado um desvio ($p=0,000$), sugerindo um excesso de homozigose para este gene na população estudada (Tabela 16).

Tabela 16. Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o *locus* HLA-DQB1 nos grupos de pacientes com e sem toxoplasmose ocular e sua manifestação primária e recorrente.

Locus HLA-DQB1	N	Het. Obs	Het. Esp.	P	D. P.
Pacientes sem toxoplasmose ocular	126	0.56349	0.74948	0.00000	0.00000
Pacientes com toxoplasmose ocular	123	0.57724	0.77252	0.00000	0.00000
Pacientes com manifestação primária	93	0.56989	0.77588	0.00000	0.00000
Pacientes com manifestação recorrente	30	0.60000	0.77232	0.10279	0.00079

n = número de pacientes; Het. Obs.: frequência de heterozigotos observada;

Het. Esp.: frequência de heterozigotos esperada; P: probabilidade; D. P.: desvio padrão

Discussão

4. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que os genes *HLA* de classe II estão associados ao desenvolvimento da toxoplasmose ocular. Além disso, investigar se estes genes estão envolvidos com o desenvolvimento da manifestação primária e recorrente da doença.

Como as moléculas HLA de classe II são responsáveis pela apresentação dos peptídeos antigênicos processados para as células T CD4⁺, desempenham um importante papel na regulação do sistema imune. Sendo importante avaliar esses genes em pacientes expostos ao *T. gondii*, que desenvolveram ou não a forma ocular da doença, a fim de verificar se estes genes exercem alguma influencia no desenvolvimento da toxoplasmose ocular.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação à idade dos pacientes com a forma ocular da doença, comparada aos pacientes que não desenvolveram a toxoplasmose ocular, sendo a média de idade do grupo e subgrupos de pacientes com toxoplasmose ocular menor do que a idade média dos pacientes sem toxoplasmose ocular. Os pacientes que apresentam manifestações oculares recorrentes tiveram a idade média inferior do que aqueles com a manifestação primária.

Os pacientes que compõem o grupo sem toxoplasmose ocular possuem outras doenças oculares prevalentes em idade mais elevada⁽⁵⁷⁾ o que pode justificar a diferença encontrada neste grupo. Vários estudos têm demonstrado a importância da idade no desenvolvimento clínico da toxoplasmose ocular e a

maior parte deles evidencia que a doença acomete frequentemente pacientes a partir da segunda para a quarta década de vida.⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾ Os dados deste estudo estão alinhados com esta proposição.

Tem sido postulado que a recorrência está associada com a reativação de cistos na retina, atribuída à imaturidade ou alterações na imunidade do hospedeiro.⁽²⁰⁾ Segundo Holland e colaboradores 2004⁽⁵⁹⁾, o risco de recorrência da retinite é maior após o primeiro ano do que nos anos subsequentes. Estudos prévios mostraram que indivíduos com retinocoroidite toxoplásmica primária sem lesão retinocoroidal pré-existente são mais velhos do que aqueles com toxoplasmose ocular recorrente.⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾ Os resultados deste estudo corroboram estas observações. Além disso, é possível que as manifestações oculares recorrentes possam resultar de infecções repetidas de mais de uma cepa do parasita⁽⁶²⁻⁶³⁾, ou podem também estar associadas a cepas mais virulentas do parasita.^(16,53,64)

Comparando os grupos estudados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os gêneros masculino e feminino. Entretanto Nogareda e colaboradores⁽⁶⁵⁾, relataram maior incidência da toxoplasmose em mulheres devido à exposição aos cistos encontrados na carne crua durante a sua preparação. Por outro lado Jones e colaboradores⁽⁶⁶⁾, relataram que nos homens o risco elevado poderia estar relacionado com o aumento do contato com o solo em fazenda e áreas rurais. Contudo, há evidências de que o desenvolvimento da toxoplasmose ocular relacionada ao sexo pode ser dependente da exposição a fatores ambientais ausentes na

casuística analisada neste estudo. Estas proposições foram observadas por Ferreira e colaboradores.⁽³⁴⁾

Embora vários estudos tenham dado destaque à importância dos fatores ambientais na toxoplasmose ocular, os fatores imunogenéticos do hospedeiro não foram totalmente explorados como determinantes de suscetibilidade e resistência a esta doença. Neste sentido, os genes *HLA* de classe II, merecem especial atenção pelo fato de controlarem parte da resposta imune do hospedeiro a microrganismos causadores de doenças.

No presente estudo, o principal objetivo foi determinar os alelos e haplótipos HLA-DRB1 e DQB1 que poderiam influenciar de alguma forma o desenvolvimento da toxoplasmose ocular. A frequência dos alelos HLA-DRB1 na casuística estudada foi semelhante à encontrada por Ayo e colaboradores⁽⁵⁶⁾ em uma população saudável de doadores voluntários de medula óssea da região noroeste estado de São Paulo.

Os alelos HLA-DRB1*03 e HLA-DQB1*02 foram mais frequentes nos pacientes sem toxoplasmose ocular, sugerindo um comportamento como fator de proteção ao desenvolvimento de lesões e cicatrizes por toxoplasmose. Já o alelo HLA-DRB1*14 foi mais frequente no subgrupo com a manifestação recorrente, sugerindo ser um fator de suscetibilidade ao desenvolvimento da forma recorrente. Entretanto, após a correção de Bonferroni essas associações foram perdidas. Portanto, estes alelos, embora mais frequentes nos grupos analisados, não parecem constituir fatores imunogenéticos que afetam a suscetibilidade ou resistência à toxoplasmose ocular.

Existem poucos estudos sobre a variabilidade dos alelos HLA em casos de toxoplasmose ocular. Ohno e colaboradores⁽⁴⁶⁾ realizaram a sorotipagem dos antígenos HLA-A e-B, por meio do método de linfotoxicidade, em 20 pacientes portadores de retinocoroidite toxoplásmica e 72 controles saudáveis, para verificar se os pacientes possuíam perfis imunogenéticos diferentes dos controles. Entretanto os resultados não diferiram estatisticamente, não demonstrando associações entre retinocoroidite toxoplásmica e antígenos HLA. Meenken e colaboradores⁽⁴⁷⁾ investigaram os antígenos HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-D em paciente com toxoplasmose congênita e com a forma ocular da doença (n=52), suas mães (n=47) e controles saudáveis (n=2495). Este último estudo não encontrou relações com estes antígenos no grupo de mães, mas verificou que elas não apresentavam o antígeno HLA-B51. Entretanto, seus autores observaram em pacientes com comprometimento ocular grave frequência elevada do antígeno HLA-Bw62.

Demarco e colaboradores⁽⁶⁷⁾ analisaram a frequência dos marcadores HLA associados com a rápida progressão da AIDS em pacientes brasileiros possuindo ou não retinocoroidite por toxoplasmose. Com base na associação com o HLA-B35, estes autores sugeriram que este alelo confere maior predisposição à progressão para a AIDS e simultaneamente ao desenvolvimento da retinocoroidite por toxoplasmose. Ayo e colaboradores⁽²²⁾ verificaram que o polimorfismo do gene *MICA* e alelos HLA-B e HLA-C não estão associados ao desenvolvimento da forma ocular da toxoplasmose.

Tomados em conjunto, os dados apresentados por Ohno e colaboradores⁽⁴⁶⁾, Meenken e colaboradores⁽⁴⁷⁾, Demarco e colaboradores⁽⁶⁷⁾,

Ayo e colaboradores⁽²²⁾ e aqueles observados neste estudo, sugerem que os alelos HLA analisados não influenciam a predisposição ou resistência à toxoplasmose ocular.

Em 2005 Habegger de Sorrentino e colaboradores⁽⁶⁸⁾, estudaram 220 indivíduos, sendo 112 indivíduos saudáveis e HIV-negativos e 108 pacientes infectados por HIV (dos quais 18 possuíam encefalite por toxoplasmose, 49 sem encefalite e 41 assintomáticos). A genotipagem HLA-DR e -DQ foi realizada por meio de técnicas de biologia molecular. O alelo HLA-DQB1*04:02 (OR=20.43) e o alelo DRB1*08 (OR=11) foram associados ao maior risco de desenvolver neurotoxoplasmose. Estes dados não foram suportados por aqueles observados no presente estudo. Salienta-se que Habegger de Sorrentino e colaboradores⁽⁶⁸⁾ analisaram outra forma de manifestação clínica da toxoplasmose, a neurotoxoplasmose. Portanto, é possível que a influência dos alelos HLA de classe II nas doenças causadas por *T. gondii* seja específica para o tipo de forma clínica.

Shimokawa e colaboradores⁽⁶⁹⁾ investigaram os genótipos HLA-DQA1 e HLA-DQB1 como fatores associados à patogênese da toxoplasmose congênita. A elevada frequência dos alelos HLA-DQA1*01:03 e -*03:02, assim como do alelo HLA-DQB1*05:04 nos recém-nascidos infectados, sugeriu uma possível suscetibilidade ao desenvolvimento da toxoplasmose congênita. Contudo, esta diferença não permaneceu estatisticamente significativa após a correção para múltiplas comparações. De forma semelhante, este estudo também verificou que algumas das associações observadas não foram mantidas após a correção de Bonferroni.

O haplótipo HLA-DRB1*03_DQB1*02 sugeriu uma possível tendência ao menor risco de desenvolvimento da toxoplasmose ocular. A análise separada dos alelos deste haplótipo também sugeriu que ambos parecem influenciar na proteção ao desenvolvimento à toxoplasmose ocular. Entretanto, verifica-se a perda da significância estatística após a correção de Bonferroni. Contudo, é possível que a tendência de associação do haplótipo e de seus alelos tenha ocorrido por obra do acaso e os mesmos não tenham efeito modulador da resistência imune à toxoplasmose ocular.

Os grupos Com e Sem TO e o subgrupo de pacientes com a manifestação primária, ao contrário do subgrupo de pacientes com a manifestação recorrente, não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o *locus* HLA-DQB1, apresentando uma elevada taxa de homozigotos. De acordo com Chen e colaboradores⁽⁷⁰⁾, o desvio da proporção do equilíbrio de Hardy-Weinberg pode estar relacionado à forças naturais, como vantagem seletiva ou recente mistura racial, ou pode refletir ainda dificuldades ou erros relacionados com a identificação dos alelos. Embora tenhamos utilizado uma metodologia de alta sensibilidade e especificidade na caracterização dos alelos e genótipos, não se pode descartar que outros fatores que influenciam a toxoplasmose tenham contribuído para o desequilíbrio de Hardy-Weinberg observado em três dos quatro grupos analisados.

Ponderamos que este estudo foi realizado em uma população de etnia mista e com o uso de métodos de identificação de baixa e média resolução, que permitem a identificação de apenas alguns alelos específicos e na maioria das vezes, a identificação de grupos alélicos. É importante salientar que, deste

modo, os indivíduos com alelos aparentemente iguais em um determinado *locus* podem não ser verdadeiramente homozigotos devido à metodologia utilizada.⁽⁷¹⁾ Portanto, a alta frequência de homozigotos pode estar elevada, resultando em desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Este foi o primeiro estudo que investigou as frequências dos alelos HLA-DRB1 e -DQB1 no desenvolvimento da toxoplasmose ocular em pacientes brasileiros. Nossos resultados são autênticos e, além disso, constituiu-se de número amostral mais elevado que aqueles utilizados nos estudos anteriores. Contudo, é necessário que novos estudos sejam realizados em populações menos miscigenadas para confirmar os dados aqui relatados.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- ❖ Os genes *HLA* de classe II (*DRB1* e *DQB1*) não estão associados com o desenvolvimento da toxoplasmose ocular na população analisada;
- ❖ Nenhum haplótipo *HLA DRB1_DQB1* influencia o desenvolvimento desta doença na população do presente estudo.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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;39:77-106.
2. 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;11:267-99.
3. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. J
Eukaryot Microbiol 2008;55:467-75.
4. Frenkel JK. Pursuing toxoplasma. J Infect Dis 1970;122:553-9.
5. Speer CA, Dubey JP. Ultrastructure of early stages of infections in mice
fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Parasitology 1998;116(Pt 1):35-42.
6. Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol
2004;126:57-72.
7. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004;363:1965-76.

8. Pleyer U, Schlüter D, Mänz M. Ocular toxoplasmosis: recent aspects of pathophysiology and clinical implications. *Ophthalmic Res* 2014;52:116-23.
9. Jones JL, Kruszon-Moran D, Sanders-Lewis K, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:405-10.
10. 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;139:1375-424.
11. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:634-40.
12. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000;30:1217-58.
13. Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 2002;5:438-42.
14. Vasconcelos-Santos DV. Ocular manifestations of systemic disease: toxoplasmosis. *Curr Opin Ophthalmol* 2012;23:543-50.

15. Furtado JM, Winthrop KL, Butler NJ, Smith JR. Ocular toxoplasmosis I: parasitology, epidemiology and public health. *Clin Experiment Ophthalmol* 2013;41(Pt 1):82-94.
16. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e277.
17. 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 São Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol* 2011;129:190-5.
18. Andrade REA, Belfort RJr, Muccioli C, Farah ME. Retinocoroidite por Toxoplasmose. In: Farah ME, editor. *Tomografia de coerência óptica - OCT: texto e atlas*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006. p.327-333.
19. Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, Murray PI, Pavesio CE, Gormley PD, et al. Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect* 1999;123:283-9.
20. Oréfice F, Bonfioli AA. Toxoplasmose. In: Oréfice F, editor. *Uveíte clínica e cirúrgica: texto e atlas*, 2ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2000. p. 619-80.

21. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: the influence of patient age. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:351-7.
22. Ayo CM, Camargo AV, Frederico FB, Siqueira RC, Previato M, Murata FH, et al. MHC Class I Chain-Related Gene A Polymorphisms and Linkage Disequilibrium with HLA-B and HLA-C Alleles in Ocular Toxoplasmosis. *PLoS One* 2015;10:e0144534.
23. Perkins ES. Ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol.* 1973;57:1-17.
24. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Júnior M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 1992;114:136-44.
25. Burnett AJ, Shortt SG, Isaac-Renton J, King A, Werker D, Bowie WR. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology* 1998;105:1032-7.
26. Gilbert RE, Stanford MR. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br J Ophthalmol* 2000;84:224-6.
27. Belfort Jr R, Hirata OS, Abreu MT 1978. Uveítes: estudo de 250 casos consecutivos. *Arq Bras Oftalmol* 1978;41:196-199.

28. Jain SD, Uppal B, Mehta DK. Seroepidemiology of ocular toxoplasmosis-profile of an urban population. *Indian J Pathol Microbiol* 1998;41:387-90.
29. Gehlen ML, Dabul MV, Obara SS, Grebos SP, Moreira CA. Incidência e etiologia de uveítis em Curitiba. *Arq. Bras. Oftalmol* 1999;62:622-626.
30. Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, de Oliveira RC, Kobilka E. Seroprevalence, epidemiology and ocular evaluation of human toxoplasmosis in the rural zone Jauguapitã (Paraná) Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 1999;6:157-63.
31. Silveira C, Belfort R Jr, Muccioli C, Abreu MT, Martins MC, Victora C, et al. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 2001;131:351-4.
32. Portela RW, Bethony J, Costa MI, Gazzinelli A, Vitor RW, Hermeto FM, et al. A multihousehold study reveals a positive correlation between age, severity of ocular toxoplasmosis, and levels of glycoinositolphospholipid-specific immunoglobulin A. *J Infect Dis* 2004;190:175-83.
33. Lynch MI, Moraes LFL, Malagueño EM, Ferreira S, Cordeiro F, Oréfice F. Características clínicas de 64 indivíduos portadores de uveítis posterior activa presumivelmente toxoplásmica em Pernambuco. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71:43-48.

34. 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;142:142-8.
35. da Silva RC1, Langoni H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitol Res* 2009;105:893-8.
36. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:702-9.
37. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*, 6^aed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
38. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013;14:301-23
39. Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*, 7^a ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.
40. Lima-Junior Jda C, Pratt-Riccio LR. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on Plasmodium vivax Infection. *Front Immunol* 2016;7:13.
41. Janeway CA, Travers P, Hunt SE, et al. *Imunobiologia. O Sistema Imune na Saúde e na Doença*, 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

42. Alves C, Souza T, Veiga S, Alves C, Toralles MB, Lemaire D.
Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em
Pediatria. *Pediatria (São Paulo)*, 2005; 27:274-86.
43. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et
al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*
2010; 75: 291–455.
44. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens* 2009;74:101-16.
45. Vallochi AL, Goldberg AC, Falcai A, Ramasawmy R, Kalil J, Silveira C, et
al. Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and
guest behaving badly. *Clin Ophthalmol* 2008;2:837-48.
46. Ohno S, O'Connor GR, Kimura SJ. HLA antigens and toxoplasmic
retinochoroiditis. *Tohoku J Exp Med* 1977;123:91-4.
47. Meenken C, Rothova A, de Waal LP, van der Horst AR, Mesman BJ,
Kijlstra A. HLA typing in congenital toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol*
1995;79:494-7.
48. Nussenblatt RB, Mittal KK, Fuhrman S, Sharma SD, Palestine AG.
Lymphocyte proliferative responses of patients with ocular toxoplasmosis
to parasite and retinal antigens. *Am J Ophthalmol* 1989;107:632-41.

49. Mack DG, Johnson JJ, Roberts F, Roberts CW, Estes RG, David C, et al. HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol* 1999;29:1351-8.
50. Feron EJ, Klaren VN, Wierenga EA, Verjans GM, Kijlstra A. Characterization of *Toxoplasma gondii*-specific T cells recovered from vitreous fluid of patients with ocular toxoplasmosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3228-32.
51. Tan TG, Mui E, Cong H, Witola WH, Montpetit A, Muench SP, et al. Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. *Vaccine* 2010;28:3977-89.
52. Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, et al. Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis: protective *Toxoplasma gondii* epitopes restricted by HLA-A*0201. *Vaccine* 2011;29:754-62.
53. Carneiro AC, Andrade GM, Costa JG, Pinheiro BV, Vasconcelos-Santos DV, Ferreira AM, et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 2013;51:901-7.

54. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group.
Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Arch Ophthalmol. 1985, 103: 1796–806.
55. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 177–182.
56. Ayo CM, da Silveira Camargo AV, Xavier DH, Batista MF, Carneiro OA, Brandão de Mattos CC, et al. Frequencies of allele groups HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 in a population from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. Int J Immunogenet 2015;42:19-25.
57. Rosenberg EA, Sperazza LC. The visually impaired patient. Am Fam Physician 2008;77:1431-6.
58. Bosch-Driessen LE, Berendschot TT, Ongkosuwito JV, Rothova A. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. Ophthalmology 2002;109:869-78.
59. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. Am J Ophthalmol 2004;137:1-17.

60. Mendes NH, Oliveira CB, Garcia CA, Holanda CM, Andrade-Neto VF. Epidemiological and serological profiles of ocular toxoplasmosis in the municipality of Natal, northeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2014;108:656-61.
61. Arantes TE, Silveira C, Holland GN, Muccioli C, Yu F, Jones JL, et al. Ocular Involvement Following Postnatally Acquired *Toxoplasma gondii* Infection in Southern Brazil: A 28-Year Experience. *Am J Ophthalmol* 2015;159:1002-1012.
62. Andrade GMQ, Vasconcelos-Santos DV, Carellos EVM, Romanelli RMC, Vitor RWA, Carneiro ACAV, et al. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. *J Pediatr (Rio J)* 2010; 86 85:88.
63. Aspinall TV, Guy EC, Roberts KE, Joynton DH, Hyde JE, Sims PF. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. *Int J Parasitol* 2003;33:97-103.
64. Meerburg BG, Kijlstra A. Changing climate-changing pathogens: *Toxoplasma gondii* in North-Western Europe. *Parasitol Res* 2009;105:17-24.

65. Nogueira F, Le Strat Y, Villena I, De Valk H, Goulet V. Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980-2020: model-based estimation. *Epidemiol Infect* 2014;142:1661-70.
66. Jones JL, Muccioli C, Belfort R Jr, Holland GN, Roberts JM, Silveira C. Recently Acquired *Toxoplasma gondii* Infection, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2006;12:582-587.
67. Demarco AL, Rodrigues Mde L, Figueiredo JF, Deghaide NH, de Menezes MB, Demarco LA, et al. Susceptibility to toxoplasmic retinochoroiditis is associated with HLA alleles reported to be implicated with rapid progression to AIDS. *Dis Markers* 2012;33:309-12.
68. Habegger de Sorrentino A, López R, Motta P, Marinic K, Sorrentino A, Iliovich E, Rubio AE, et al. HLA class II involvement in HIV-associated Toxoplasmic encephalitis development. *Clin Immunol* 2005;115:133-7.
69. Shimokawa PT, Targa LS, Yamamoto L, Rodrigues JC, Kanunfre KA, Okay TS. HLA-DQA1/B1 alleles as putative susceptibility markers in congenital toxoplasmosis. *Virulence* 2016;8:1-9.
70. Chen JJ, Hollenbach JA, Trachtenberg EA, Just JJ, Carrington M, Rønningen KS, et al. Hardy-Weinberg testing for HLA class II (DRB1, DQA1, DQB1, and DPB1) loci in 26 human ethnic groups. *Tissue Antigens* 1999;54:533-42.

71. Li S, Jiao H, Yu X, Strong AJ, Shao Y, Sun Y, et al. Human leukocyte antigen class I and class II allele frequencies and HIV-1 infection associations in a Chinese cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;44:121-31.

Anexos

7. ANEXOS

7.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto aprovou a extensão datada de 01 de dezembro de 2010, referente ao protocolo n.º 1980/2009 sob a responsabilidade de **Luiz Carlos de Mattos**, com o título "Associação entre a toxoplasmose ocular e o perfil de glicoproteínas ABH-Lewis".

São José do Rio Preto, 07 de dezembro de 2010.



Prof. Dr. Fernando Batigália
Coordenador do CEP/FAMERP

7.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde - Resolução CNS 196/96)

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa denominada **Sistemas histo-sanguíneos como fatores de risco para a toxoplasmose ocular**. O *Toxoplasma gondii* é o parasita que causa a toxoplasmose e essa doença pode ser transmitida aos seres humanos pelo gato e outros animais. Ela representa uma das principais doenças infecciosas encontradas em pessoas com danos visuais do tipo coriorretinite.

Essa pesquisa tem como objetivos identificar os tipos sanguíneos ABO, Secretor, Lewis e Duffy para determinar se essas características genéticas favorecem ou não a infecção pelo *Toxoplasma gondii*. Os resultados dessa pesquisa poderão ajudar na compreensão dos fatores genéticos que influenciam a infecção pelo *T. gondii* e poderão beneficiar você e muitas outras pessoas.

A sua participação nessa pesquisa é voluntária e de extrema importância e você não perderá os benefícios do atendimento médico aos quais tem direito, caso decida não participar ou mesmo se você se retirar dessa pesquisa a qualquer tempo.

Para participar como voluntária nessa pesquisa será necessário:

1. Você responder um questionário sobre você e seus hábitos de vida. Todas as informações a seu respeito serão mantidas em absoluto sigilo.
2. Você nos autorizar a colher uma amostra de seu sangue para exames da toxoplasmose e para a identificação dos seus tipos sanguíneos ABO, Secretor, Lewis e Duffy. A coleta de sangue é realizada com a introdução de uma agulha estéril na veia e de acordo com a sua sensibilidade, você poderá sentir uma leve ardência no local. O risco da coleta de sangue poderá incluir vermelhidão e raramente deixa o local de introdução da agulha inchado e com manchas roxas. O seu sangue será utilizado apenas para análises científicas. Você deve saber que não haverá riscos de qualquer tipo de contaminação durante a coleta de seu sangue, pois o material utilizado será individual e não contaminado. Esse material é totalmente estéril (seringa, agulha, algodão com álcool) e único para cada pessoa. Após a coleta de seu sangue, as agulhas, seringas e algodão utilizados serão colocados em saco de lixo e descartados em local seguro. Esses procedimentos serão realizados por profissionais com experiência.

Você será informada (o) de todos os resultados dos exames que serão realizados em seu sangue e eles serão mantidos em absoluto sigilo. Se essa pesquisa for encerrada antes do período previsto, você também será informada.

Se você tiver qualquer dúvida sobre essa pesquisa ou mesmo sobre lesões relacionadas à coleta de sangue, entre em contato com o Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos pelo telefone ou pelo endereço abaixo indicados. Caso você tenha qualquer dúvida sobre seus direitos como sujeito de pesquisa, você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo telefone (17) 3201-5813.

Você receberá uma cópia deste formulário de consentimento livre e esclarecido assinado e datado.

Declaração do sujeito da pesquisa

Eu voluntariamente aceito participar da pesquisa "Sistemas histo-sanguíneos como fatores de risco para a toxoplasmose ocular". Li e compreendi essa declaração de consentimento livre e esclarecido e os riscos descritos. Entendo que posso retirar meu consentimento ou retirar-me dessa pesquisa a qualquer momento, sem perder nenhum benefício aos quais tenho direito.

..... de de

Responsável pela discussão do
consentimento livre e esclarecido

Assinatura do sujeito da pesquisa
ou seu representante legal



Resquisador responsável

Endereço para contato:

Laboratório de Imunogenética

Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de S J do Rio Preto

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416

São José do Rio Preto - 15090-000

Fones: (17) 3201-5854 (Faculdade)

7.3 Ficha de Dados Epidemiológicos

 HOSPITAL DE BASE	Ficha Epidemiológica	
No. Prontuário:	Data da coleta:	Código do projeto:

Dados da paciente:

Nome:	DN:
Local de nascimento:	Idade:
Endereço atual:	Nº:
Cidade:	Estado:
	Telefone:

Você contraiu algumas dessas doenças infecto-parasitárias?

	Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não
Citomegalovírus			Mononucleose			Leishmaniose		
Rubéola			Malária			Toxoplasmose		
Catapora			Herpes			Chagas		
Dados clínicos:				Sim	Não			
Você já recebeu transfusão de sangue?						Tempo?		
Você já teve ou tem animal doméstico em casa?						Qual?		
Você tem o hábito de andar descalça no solo?								
Você tem o hábito de tomar leite cru?						Qual?		
Você come carne crua ou mal cozida de qualquer animal?						Qual?		
Você lava os legumes e verduras?								
Você teve gravidez anterior?						Quantas?		
Você teve filho prematuro?						Quando?		
Você teve algum aborto?						Quantos?		
Você sabe seu tipo sanguíneo e seu fator Rh?						Qual?		
Dados ambientais:								
Você mora em zona: urbana () rural ()								
Qual o tipo de moradia? alvenaria () madeira () outro () especificar								
própria () alugada () cedida () outro () especificar								
Tem rede de esgoto? Sim () não () Se não qual o tipo? fossa () outro () especificar								
Você bebe água: filtrada () fervida () torneira ()								
Qual o destino do lixo? coleta pública () outro () especificar								
Onde você mora tem: ratos () baratas () moscas ()								
Qual seu nível escolaridade?								
Qual a renda familiar em salários mínimos? 1 () 2 () 3 () 4 () acima de 4 ()								

Etnia: Pac.: _____ Pai: _____ Mãe: _____

OBS: