

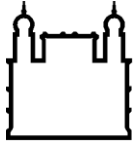
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS GENES *KIR* NA RECIDIVA DE
TOXOPLASMOSE OCULAR APÓS EPISÓDIO ATIVO**

THAYS EUZEBIO JOAQUIM

Rio de Janeiro
Janeiro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

THAYS EUZEBIO JOAQUIM

Caracterização do perfil dos genes *KIR* na recidiva de toxoplasmose ocular após episódio ativo

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Regina Reis Amendoeira.

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

J62 Joaquim, Thays Euzebio

Caracterização do perfil dos genes KIR na recidiva de toxoplasmose ocular após episódio ativo / Thays Euzebio Joaquim. – Rio de Janeiro, 2016.

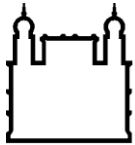
xiii, 65 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2016.

Bibliografia: f. 56-63

1. Toxoplasmose ocular. 2. Genes KIR. 3. Retinocoroidite.
4. Recidiva. I. Título.

CDD 616.936



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

THAYS EUZEBIO JOAQUIM

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS GENES *KIR* NA RECIDIVA DE TOXOPLAMOSE OCULAR APÓS EPISÓDIO ATIVO

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Maria Regina Reis Amendoeira

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Membros da Banca

Prof^ª. Dr^ª. Dalma Maria Banic - **Presidente** (FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto (UERJ)

Prof. Dr. Eliezer Israel Benchimol (INI/FIOCRUZ)

Suplentes

Prof^ª. Dr^ª. Daiana de Souza Perce da Silva (FIOCRUZ/RJ)

Prof^ª. Dr^ª. Joseli de Oliveira Ferreira (FIOCRUZ/RJ)

Rio de Janeiro, 28 de Janeiro de 2016.

Este trabalho é dedicado ao meu amado avô Milton, por todas as vezes que me levou a escola e por cada lição que me ensinou.

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha fortaleza, socorro bem presente nas tribulações. Toda honra e toda glória. Muito obrigada, Senhor, por me sustentar e estar comigo todos os dias!

Aos meus pais, Marilza e Milton, pela dedicação, incentivo e amor. Muito obrigada por investirem na minha educação, amo vocês!

À minha família, em especial, minha florzinha Marianny. Sobrinha esperta que Deus me deu. Muito falante e, apesar da pouca idade, aprendeu a fazer menos barulho pra que eu pudesse estudar.

Ao amor da minha vida, meu melhor amigo, minha melhor companhia: Luan Lacerda. Meu amor, seus abraços me confortam e me impulsionam a prosseguir! Superar obstáculos ao seu lado é mais fácil. Mais uma conquista juntos, te amo!

À minha orientadora Dr^a Maria Regina Reis Amendoeira, pela oportunidade e conhecimentos transmitidos na orientação deste trabalho.

À Dra. Dalma Maria Banic por aceitar a tarefa de ser a revisora desta dissertação e pelas diversas contribuições neste trabalho.

À Dra Daiana Perce, pelos comentários, sugestões pessoais e/ou profissionais sempre pertinentes. MUITÍSSIMO obrigada!

À minha turma MARA, como carinhosamente apelidamos. Vocês são demais! Os momentos que passamos juntos serão eternizados nas fotografias e em minha memória. Um destaque especial para, Josiane Müller, melhor representante de turma que poderíamos ter. Essa mineirinha conquistou a todos com sua dedicação e simpatia.

Aos meus companheiros e amigos do LabTOXOP, pela cooperação, descontração e risadas. É ótimo trabalhar com vocês!

A amiga Pâmela, companheira de turma, laboratório e da vida. Por todos os momentos de alegria, as conversas no trem, as idas à campo, os almoços e as risadas. Conseguimos, flor!

Aos companheiros do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação – HLA/UERJ, Juliana Motta, Virgínia, Gabriela, Ronald, Aline e Lisa pelo aprendizado e auxílio na genotipagem;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq pelo auxílio financeiro.

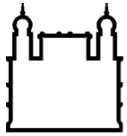
Aos pacientes que concordaram em participar do estudo e à todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

“Eu plantei, Apolo regou, mas o crescimento veio de Deus. De modo que, nem o que planta é alguma coisa, nem o que rega, mas Deus, que dá o crescimento.”

1Coríntios 3:6 e 7

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS GENES *KIR* NA RECIDIVA DE TOXOPLASMOSE OCULAR APÓS EPISÓDIO ATIVO.****RESUMO****DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL****Thays Euzebio Joaquim**

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório de ampla distribuição mundial. A lesão característica da toxoplasmose ocular (TO) é a retinocoroidite, principal causa de uveíte posterior, podendo deixar sequelas graves, inclusive a perda da visão. Embora existam muitos estudos referentes à imunologia da toxoplasmose sistêmica, pouco se conhece a respeito da resposta imune na TO humana. As células *natural killers* (NK) são células efectoras do sistema imune inato, cuja função principal é a atividade citotóxica. Elas interagem com as células-alvos por meio de receptores, que emitem sinais de inibição ou ativação. Dentre os receptores de células NK, os receptores semelhantes à imunoglobulina (KIR), merecem destaque devido ao seu elevado polimorfismo. O interesse pelo estudo desses genes está na eficiência de serem utilizados como marcadores genéticos em estudos de associação com doenças. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar o polimorfismo dos genes *KIR*, no curso da infecção toxoplásmica ocular, verificando se o mesmo estaria associado com a ocorrência de recidivas oculares após episódio ativo. Participaram desse estudo 101 pacientes com diagnóstico de toxoplasmose ocular, oriundos do ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia (INI/Fiocruz) RJ. Observamos que os genes *KIR3DL1*, *KIR2DL1*, *KIR2DS4*, *KIR2DP1* foram os mais prevalentes (acima de 95%) em nossa população e que essas altas frequências são similares às encontradas em outras regiões brasileiras. Caracterizamos 25 genótipos *KIR* e observamos uma maior frequência dos genótipos 1 (31,7%), 4 (11,9%), 2 (10,9%) e 3 (7,9%), todos com distribuição cosmopolita. A análise entre as distâncias genéticas revelou um agrupamento dos pacientes em estudo com populações do Rio de Janeiro, Porto Velho e de países do continente Americano. Observamos que o gene inibidor *KIR2DL2* e o gene ativador *KIR2DS2* estavam mais frequentes nos indivíduos sem recidiva ($P=0,03$ e $P=0,02$, respectivamente), sugerindo que ambos possam estar atuando como marcadores de proteção à recidiva de TO. O grupo recidiva apresentou maior variabilidade genotípica (20/25), sendo os genótipos 1 (36,3%) e 2 (13,8%), os mais frequentes. No grupo sem recidiva, os genótipos mais frequentes foram o 1 (23,7%) e o 4 (21%). Ao avaliarmos a variação da proporção entre genes *KIR* inibidores e ativadores, observamos que a maioria dos indivíduos com média ponderada negativa pertencia ao grupo dos indivíduos com recidiva (62,7%; $P=0,003$), sugerindo que a menor proporção de genes *KIR* ativadores possa estar associada à susceptibilidade. Não há na literatura dados que relacionem o polimorfismo de genes *KIR* com esta doença. A caracterização destes genes torna este estudo pioneiro na pesquisa de associação entre o polimorfismo dos genes *KIR* e a recidiva de TO.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CHARACTERIZATION OF HUMAN KILLER IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS (KIRs) IN OCULAR TOXOPLASMOSIS AFTER AN ACTIVE EPISODE

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Thays Euzebio Joaquim

Toxoplasmosis is an infection caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, obligate intracellular parasite of worldwide distribution. The characteristic injury of ocular toxoplasmosis (OT) is the retinochoroiditis, which is the main cause of posterior uveitis and can leave serious consequences, including blindness. Although there are many studies about the immunology of systemic toxoplasmosis, the immune response in human TO still unclear. The natural killer cells (NK) are effectors cells of the innate immune system, whose main function is the cytotoxic activity. They interact with target cells through receptors that emit inhibition or activation signals. Among the NK cell receptors, immunoglobulin-like receptors (KIR) deserve attention due to their high polymorphism. Interest in the study of these genes is in the efficiency of use as genetic markers in association studies to diseases. In this context, this study aimed to analyze the polymorphism of KIR genes in the course of ocular toxoplasmosis infection by checking whether it was associated with the occurrence of eye relapse after active episode. Participated in this study 101 patients with ocular toxoplasmosis, arising from the Ophthalmologic Clinic of the National Institute of Infectious Diseases (INI/Fiocruz) RJ. We observed that the genes *KIR3DL1*, *KIR2DL1*, *KIR2DS4*, *KIR2DP1* were the most prevalent (over 95%) in our population and that these high frequencies are similar to those found in other Brazilian regions. We identified 25 KIR genotypes and found a higher frequency of genotypes 1 (31.7%), 4 (11.9%) and 2 (10.9%), all with worldwide distribution. The analysis of genetic distances revealed a cluster of patients in a study with populations of Rio de Janeiro, Porto Velho and the American continent. We note that the *KIR2DL2* inhibitor gene and the gene activator *KIR2DS2* were more frequent in patients without recurrence ($P = 0.03$ and $P = 0.02$, respectively), suggesting that both may be acting as a protective marker for recurrence TO. The recurrence group had higher genotypic variability (20/25), and genotype 1 (84%) and 2 (32%), were the most frequent. In the group without recurrence, the most common genotypes were 1 (36%) and 4 (32%). When evaluating the change of ratio of KIR genes inhibitors and activators, observed that most individuals with negative weighted average belonged to the group of individuals with recurrence (62.7%; $P = 0.003$), suggesting that the lowest proportion of KIR genes activators may be associated with susceptibility. There is no data in the literature that relate polymorphism of KIR genes with this disease. The characterization of these genes makes this pioneering study on the association between the polymorphism survey of KIR genes and the recurrence OT.

Sumário

Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura.....	3
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	3
2.1.1 Estágios do <i>T.gondii</i>	4
2.1.2 Ciclo biológico	5
2.2 Toxoplasmose	7
2.2.1 Toxoplasmose ocular.....	8
2.2.2 Imunologia da Toxoplasmose.....	9
2.2.3 Imunidade da Toxoplasmose ocular.....	12
2.3 Células <i>Natural Killer</i>	12
2.3.1 Receptores das células NK.....	14
2.3.2 Receptores KIR.....	15
2.3.3 Nomenclatura e Classificação <i>KIR</i>	17
2.3.4 Organização genética dos <i>KIR</i> e variabilidade haplotípica.....	19
2.4 Ligantes de KIR.....	21
2.5 Associação entre <i>KIR</i> e doenças.....	21
3. Justificativa.....	23
4. Objetivos.....	25
4.1 Objetivo Geral	25
4.2 Objetivos Específicos	25
5. Material e métodos	26
5.1 Aspectos éticos	26
5.2 Voluntários.....	26

5.2.1 Critérios de elegibilidade	27
5.3 Sorologia	27
5.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta.....	27
5.3.2 ELISA.....	28
5.4 Tipagem dos genes <i>KIR</i>	28
5.4.1 Extração do DNA genômico.....	28
5.4.2 Quantificação do DNA.....	29
5.4.3 Genotipagem <i>KIR</i>	29
5.4.3.1 Amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase.....	30
5.4.3.2 Desnaturação e neutralização.....	32
5.4.3.3 Hibridização.....	32
5.5 Análises estatísticas	33
6. Resultados.....	34
6.1 Características epidemiológicas da população estudada (indivíduos com e sem recidiva).....	34
6.2 Análise da presença dos genes <i>KIR</i> na população.....	36
6.3 Perfil genético dos receptores <i>KIR</i>.....	38
6.4 Análise das distâncias genéticas.....	40
6.5 Análises comparativas dos indivíduos com recidiva <i>versus</i> indivíduos sem recidiva.....	42
6.5.1 Características epidemiológicas dos indivíduos com recidiva	42
6.5.2 Características epidemiológicas dos indivíduos sem recidiva.....	42
6.6 Análise da presença dos genes <i>KIR</i> nos indivíduos com e sem recidiva.....	42
6.7 Perfil genético dos receptores <i>KIR</i> nos indivíduos com e sem recidiva.....	44
6.8 Análise entre a média ponderada dos genes <i>KIR</i> inibidores e ativadores nos grupos dos indivíduos com e sem recidiva.....	45
7. Discussão.....	48
8. Conclusão	55
9. Referências.....	56
10. Anexos.....	64

Lista de Tabelas

Tabela 5.1: Quantidade dos reagentes para a reação em cadeia da polimerase	31
Tabela 5.2: Condições da ciclagem das regiões alvos dos genes <i>KIR</i>	31
Tabela 5.3: Mistura para SAPE por amostra	32
Tabela 6.1: Principais características epidemiológicas de pacientes atendidos no ambulatório de oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz,RJ.....	35
Tabela 6.2: Distribuição das frequências dos genes <i>KIR</i> em pacientes atendidos no ambulatório de oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ....	37
Tabela 6.3: Perfil genotípico de <i>KIR</i> de pacientes atendidos no ambulatório de oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ.....	39
Tabela 6.4: Distribuição das frequências dos genes <i>KIR</i> nos indivíduos com e sem recidiva atendidos no ambulatório de oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz RJ.....	43
Tabela 6.5: Média ponderada dos genes <i>KIR</i> Inibidores e Ativadores nos grupos dos indivíduos com e sem recidiva.....	46
Tabela 6.6: Distribuição dos genótipos entre os indivíduos a partir da média ponderada	47

Lista de Figuras

Figura 2.1: Ciclo biológico do <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Figura 2.2: Mapa do mundo simplificado da soroprevalência global para <i>T. gondii</i>	7
Figura 2.2.1: Resposta imune inata para <i>Toxoplasma gondii</i> durante a infecção	11
Figura 2.3: Reconhecimento das células alvo	14
Figura 2.4: Localização cromossômica do <i>LRC</i> (Complexo do Receptor Leucocitário) destacando-se os genes <i>KIR</i>	16
Figura 2.5: Nomenclatura dos genes <i>KIR</i> adotada pelo HUGO.	18
Figura 2.6: Estrutura esquemática dos receptores <i>KIR</i>	19
Figura 2.7: Organização dos genes <i>KIR</i>	20
Figura 2.8: Organização genômica do conjunto de genes <i>KIR</i>	21
Figura 5.1: Principais etapas da genotipagem dos genes <i>KIR</i>	30
Figura 6.1: Tempo de acompanhamento e quantidade de episódios de recidiva de pacientes atendidos no ambulatório de oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz RJ.	31
Figura 6.2: Dendograma Neighbour-Joining	41
Figura 6.3: Diagrama de Venn identificando os perfis genotípicos de <i>KIR</i> da população de pacientes atendidos no ambulatório de oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz RJ (n=96), nos grupos com e sem recidiva	40
Figura 6.4: Distribuição dos genótipos nos indivíduos com e sem recidiva atendidos no ambulatório de oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz RJ.	41

Lista de abreviaturas

ATIV: Ativadores

CD4: Molécula expressa na superfície de células T auxiliares e em subpopulações de células *NKT* e *NK*

CD8: Molécula expressa na superfície de linfócitos T citotóxicos, e em subpopulações de células *NKT* e *NK*

CD16: Receptor de células *NK*, neutrófilos, monócitos e macrófagos

CD94: Receptor de células *NK* (também conhecida como *KLRD1* - *killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1*)

CD94/NKG2: Receptor do tipo Lectina-C (formado pela associação covalente da proteína *CD94* e uma molécula de *NKG2*)

DAPI2: *Adaptador proteico transmembrana 12* (DNAX activation protein of 12 kD)

DP: Desvio padrão

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HLA: Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leucocyte Antigen*)

HUGO: Organização do Genoma Humano (*Human Genome Organization*)

IC: Intervalo de Confiança

IFN- γ : Interferon-gama

IgG: Imunoglobulina G

IL: Interleucina

INIB: Inibidores

ITIM: Imunoreceptores com Motivos Inibidores baseados em Tirosina

ITAM: Imunoreceptores com Motivos Ativadores baseados em Tirosina

kb: Quilobase

KIR: Receptores de células *NK* semelhantes à imunoglobulina (*Killer-cell Ig-like Receptor*)

LIR: Receptores de leucócitos semelhantes à imunoglobulina (*Leukocyte Ig-like Receptor*)

mL: Mililitros

min: Minutos

μ L: Microlitros

μ g: Micrograma

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

N: Número de amostras

ng: nanograma

NK: célula *Natural killer*

NKG2: Receptor de ativação de células *NK* (também conhecido como *CD159a*)

NKT: célula T do tipo *Natural killer*

NO: Óxido nítrico

pb: Pares de bases

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

seg: segundos

SSO: Sonda Sequência Específica (*Sequence-Specific Oligonucleotide*)

TGF- β : Fator de Crescimento Tumoral Beta (TUMOR GROWTH FACTOR)

Th1: Célula T *helper* do tipo 1

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa (TUMOR NECROSIS FACTOR)

TO: Toxoplasmose ocular.

1. Introdução

A toxoplasmose é uma infecção originada por um coccídeo, o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), parasita intracelular obrigatório de humanos, pássaros, roedores e outros animais (hospedeiros intermediários) e de felídeos (hospedeiros definitivos). Pertence ao filo Apicomplexa, ordem Eucocciida e possui ampla distribuição mundial, caracterizando, na maioria dos casos, uma infecção crônica assintomática (Splendore, 1909; Coura 2005; Rey, 2008; Amendoeira *et al*, 2010).

O *T. gondii* pode ser encontrado em vários tecidos e células (exceto nas hemácias) e fluidos corporais. Apresenta-se de três formas: taquizoítos (forma proliferativa encontrada nos órgãos, sangue e secreções dos hospedeiros durante a fase aguda), bradizoítos (forma encontrada em vários tecidos, geralmente durante a fase crônica da infecção) e oocisto (forma de resistência, produzida nas células intestinais de felídeos não imunes e eliminados imaturos nas fezes) (Neves, 2005). A infecção pode ser causada pela ingestão de oocistos (solo, água e alimentos contaminados) ou cistos teciduais (carne crua ou mal cozida) e por via transplacentária (Amendoeira *et al.*, 1999).

De acordo com o momento da infecção, a toxoplasmose pode ser classificada como congênita ou adquirida. A toxoplasmose congênita pode ser exclusivamente ocular ou estar acompanhada de alterações sistêmicas ou do sistema nervoso central (Holland, 2003). Enquanto que, a forma adquirida é geralmente assintomática e acomete os olhos na sua fase aguda em até 10% dos casos, sendo que nestes casos, na maioria das vezes, apresenta-se quadro clínico leve, transitório e até pode passar despercebida, principalmente em crianças e adultos jovens (Nussenblatt *et al*, 1996).

O diagnóstico é realizado por meio da associação das manifestações clínicas com a confirmação por técnicas sorológicas, como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e a Prova de Hemoaglutinação (HAI), que visam à detecção do parasita (Brasil, 2010).

A toxoplasmose é uma das causas mais importantes de uveítes no mundo. No Brasil, a forma ocular é responsável por aproximadamente 50% do total de uveítes (Souza e Belfort, 2014). A prevalência de infecção por *T. gondii* aumenta com a idade, na mesma proporção que a incidência de retinocoroidite, ou seja, ocorrendo com frequência na segunda e terceira

décadas da vida. Tais fatores podem estar relacionados com aspectos imunológicos (Holland, 2003).

A retinocoroidite é a lesão característica da toxoplasmose ocular e consiste em uma inflamação grave e necrosante. É comumente acompanhada de uveíte anterior e reação inflamatória do vítreo, sendo, reconhecidamente, a causa mais comum de uveíte posterior e podendo deixar sequelas graves, inclusive ocasionando perda completa da visão (Montoya & Liesenfeld, 2004; Cordeiro *et al*, 2010). Essa lesão se mantém ativa durante semanas e, mesmo após cicatrização, pode conter cistos do *T. gondii*, de forma que o protozoário permanece viável nos tecidos durante anos (Medeiros *et al*, 2010).

A toxoplasmose ocular é uma doença de caráter recidivante. Segundo Oréfice (2005) cerca de dois terços dos pacientes apresentam recorrência. Embora existam muitos estudos referentes à imunologia da toxoplasmose sistêmica, pouco se conhece a respeito da resposta imune na toxoplasmose ocular humana.

As células *natural killers* (NK) são células efectoras do sistema imune inato, que interagem com outras células por meio de citocinas e quimiocinas, sendo a atividade citotóxica sua principal função. O reconhecimento das células-alvo pelas NK é realizado pelos seus receptores celulares, que podem tanto enviar sinais de ativação como de inibição. Dentre os receptores de células NK, podemos destacar os receptores semelhantes à imunoglobulina (da sigla em inglês *KIR - Killer Immunoglobulin- like Receptor*) (Jobim e Jobim, 2008; Lysakova-Devine *et al*. 2014; Ge *et al.*, 2014).

Os receptores KIR são codificados por uma família de 16 genes localizada no braço longo do cromossomo 19 (19q13.47). O polimorfismo desses genes pode ser representado por presença/ausência gênica, diversidade alélica e formação de haplótipos. Dessa forma, os genes KIR são altamente polimórficos e suas frequências variam entre populações (Jobim e Jobim, 2008; Rudnick *et al*, 2010; Augusto *et al*, 2015).

A importância da tipagem de genes KIR está relacionada com o conhecimento da diversidade desses genes em diferentes indivíduos, ao papel exercido pelos mesmos na resposta imune inata e sua relação com a predisposição ou com a resistência ao desenvolvimento de doenças (Rudnick *et al*, 2010; Augusto *et al*, 2015).

2. Revisão da literatura

2.1. *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii*, agente causal da toxoplasmose, foi descrito por Nicolle e Manceaux em 1909, em um pequeno roedor (*Ctenodactylus gundi*), na Tunísia, no norte da África. Simultaneamente no Brasil, Splendore (1909) observou o mesmo parasita em coelhos mantidos em laboratório. Inicialmente, acreditou-se ser uma forma particular de *Leishmania* sp., no entanto, os primeiros autores constataram que se tratava de um novo parasita, sendo, então, criado o gênero *Toxoplasma* e a espécie *T. gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909).

Diversos casos de doença humana foram descritos e, com o desenvolvimento do teste sorológico, referido como prova do corante ou “*dye test*”, por Sabin e Feldman, em 1948, foi possível associar as várias apresentações clínicas da doença à etiologia por *T. gondii* (Sabin e Feldman, 1948).

Inicialmente foi classificado como pertencente ao filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina, Família Sarcocystidae (Cavalier-Smith 1993). No entanto, a Sociedade de Protozoologia, por meio de parâmetros filogenéticos e ultraestruturais, propôs uma reclassificação. Desta forma, o parasita foi inserido no Super-grupo: Sar (abrange todos dos grupos Stramenopiles, Alveolata, e Rhizaria - SAR), Primeiro grupo Alveolata, Segundo grupo Apicomplexa (complexo apical), Terceiro grupo Conoidasida (complexo apical), Quarto grupo Coccidia (gametas maduros intracelular) e Quinto grupo Eimeriorina (esporocisto no interior do oocisto imóvel) (Adl *et al.*, 2012).

O *T. gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório que pode infectar qualquer animal vertebrado de sangue quente, e é um patógeno de importância médica e veterinária (Dubey, 2008; Dupont *et al.*, 2012).

A infecção pelo *T. gondii* pode ocorrer por três vias principais: a) ingestão de oocistos eliminados nas fezes de gatos infectados - presentes no solo, água ou alimentos contaminados; b) ingestão de cistos encontrados em carne crua ou mal cozida e c) congênita ou transplacentária. Mais raramente, também pode ocorrer infecção por ingestão de taquizoítos em leite contaminado ou saliva, acidente de laboratório, transfusão sanguínea e transplante de órgãos (Dubey e Jones, 2008; Dubey, 2010).

Após a ingestão do oocisto, o parasita se converte em uma forma proliferativa rápida conhecida como o taquizoíto, o que resulta na disseminação sistêmica do parasita a todos os tecidos. Sob circunstâncias normais, esta infecção sistêmica é eficazmente controlada pela resposta imunitária do hospedeiro (Weiss *et al.*, 2009). O parasita então se converte em uma forma proliferativa lenta conhecida como o bradizoíto, que persistem em cistos teciduais nos tecidos neurais e musculares do hospedeiro durante toda a vida (Frenkel, 1973; Dupont *et al.*, 2012).

2.1.1 Estágios do *T. gondii*

Durante o ciclo evolutivo, o parasita apresenta as seguintes formas infectantes:

- Oocistos: forma de resistência produzida exclusivamente nas células intestinais de felídeos não imunes. Com a defecação pelo felino, os oocistos imaturos são libertados no ambiente, onde ocorre a esporulação. São esféricos, medindo cerca de 12,5x11 μm . Após a esporulação no meio ambiente contêm dois esporocistos, com quatro esporozoítos cada (Amato Netto e Campos, 1970; Dubey *et al.*, 1998; Amendoeira *et al.*, 1999; Furtado *et al.*, 2013).

- Taquizoítos: forma proliferativa rápida responsável pela disseminação sistêmica e infecção tecidual ativa nos hospedeiros intermediários. A invasão envolve a liberação de proteínas a partir de grânulos de secreção, que são excretadas através da organela conóide tubular, o qual é alojado dentro do complexo apical. Ao entrar em uma célula hospedeira, o taquizoíto torna-se envolvido por uma membrana formando o vacúolo parasitóforo, derivada principalmente a partir da membrana da célula hospedeira, na qual é capaz de sobreviver e se multiplicar. Além do complexo apical e um complexo de citoesqueleto, que permite a mobilidade independente, taquizoítos contêm organelas comuns, incluindo ribossomos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e mitocôndrias. São encontrados nos órgãos, sangue e secreções dos hospedeiros durante a fase aguda. Apresenta-se com a forma que lembra uma banana ou meia-lua, com uma das extremidades mais afilada e a outra arredondada, medindo cerca de 2x 6 μm e núcleo em posição central. São pouco resistentes à ação do suco gástrico (Amato Netto e Campos, 1970; Dubey *et al.*, 1998; Amendoeira *et al.*, 1999; Furtado *et al.*, 2013).

- Bradizoíto: forma encontrada em vários tecidos (musculares esqueléticos e cardíacos, nervoso e retina), geralmente durante a fase crônica da infecção. Os bradizoítos são encontrados, de início, dentro do vacúolo parasitóforo de uma célula, cuja membrana forma a parede porosa do cisto tecidual. O tamanho do cisto varia de acordo com a célula parasitada e

o número de bradizoítos em seu interior, podendo atingir até 200µm. Os bradizoítos são resistentes à tripsina e a pepsina, podendo permanecer viáveis nos tecidos por anos (Amato Netto e Campos, 1970; Dubey *et al.*, 1998; Amendoeira *et al.*, 1999; Furtado *et al.*, 2013).

2.1.2 Ciclo Biológico

O ciclo biológico do *T. gondii* desenvolve-se em duas fases distintas: fase sexuada ou coccidiana, que ocorre no epitélio intestinal de felídeos e fase assexuada, que ocorre nos tecidos de vários hospedeiros intermediários (Frenkel *et al.*, 1970; Dubey *et al.*, 1998; Furtado *et al.*, 2013) (Figura 2.1).

A fase sexuada ocorre somente nas células do epitélio intestinal dos felídeos, após a ingestão de cistos teciduais pelos mesmos. As enzimas digestivas liberam os bradizoítos, que invadem o epitélio intestinal. Os bradizoítos sofrem replicação e transformação produzindo microgametas, que fertilizam macrogametas para produzir zigotos. Após a formação da parede celular, o zigoto se diferencia em oocisto imaturo e rompe os enterócitos, sendo eliminado juntamente com as fezes dos felídeos no meio ambiente. A esporulação do oocisto ocorre no prazo de 5 dias. Cada oocisto esporulado tem o potencial para sobreviver durante 12 meses ou mais no solo ou a água do mar fria (Dubey, 1968; Tenter *et al.*, 2000; Lindsay e Dubey, 2009; Furtado *et al.*, 2013).

A fase assexuada inicia-se com a ingestão, pelo hospedeiro suscetível, de oocistos maduros contendo esporozoítos – encontrados em alimentos ou água contaminada, cistos contendo bradizoítos- encontrado em carne crua, ou, mais raramente, taquizoítos eliminados no leite (Dubey, 2004). Cada esporozoíto, bradizoíto ou taquizoíto, liberado no tubo digestivo, sofrerá intensa multiplicação intracelular, após passagem rápida pelo epitélio intestinal e invadirá vários tipos de célula do organismo formando um vacúolo parasitóforo, onde sofrerão divisões sucessivas por endodiogenia, formando novos taquizoítos (fase proliferativa) que irão romper a célula parasitada, liberando novos taquizoítos que invadirão novas células (Halonen e Weiss, 2013). Após um período de replicação ativa, taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos. A localização da formação de cistos depende da espécie hospedeira; nos seres humanos, o sistema nervoso central, incluindo a retina, é o sítio mais comum (Montoya, 1997; Furtado *et al.*, 2013).

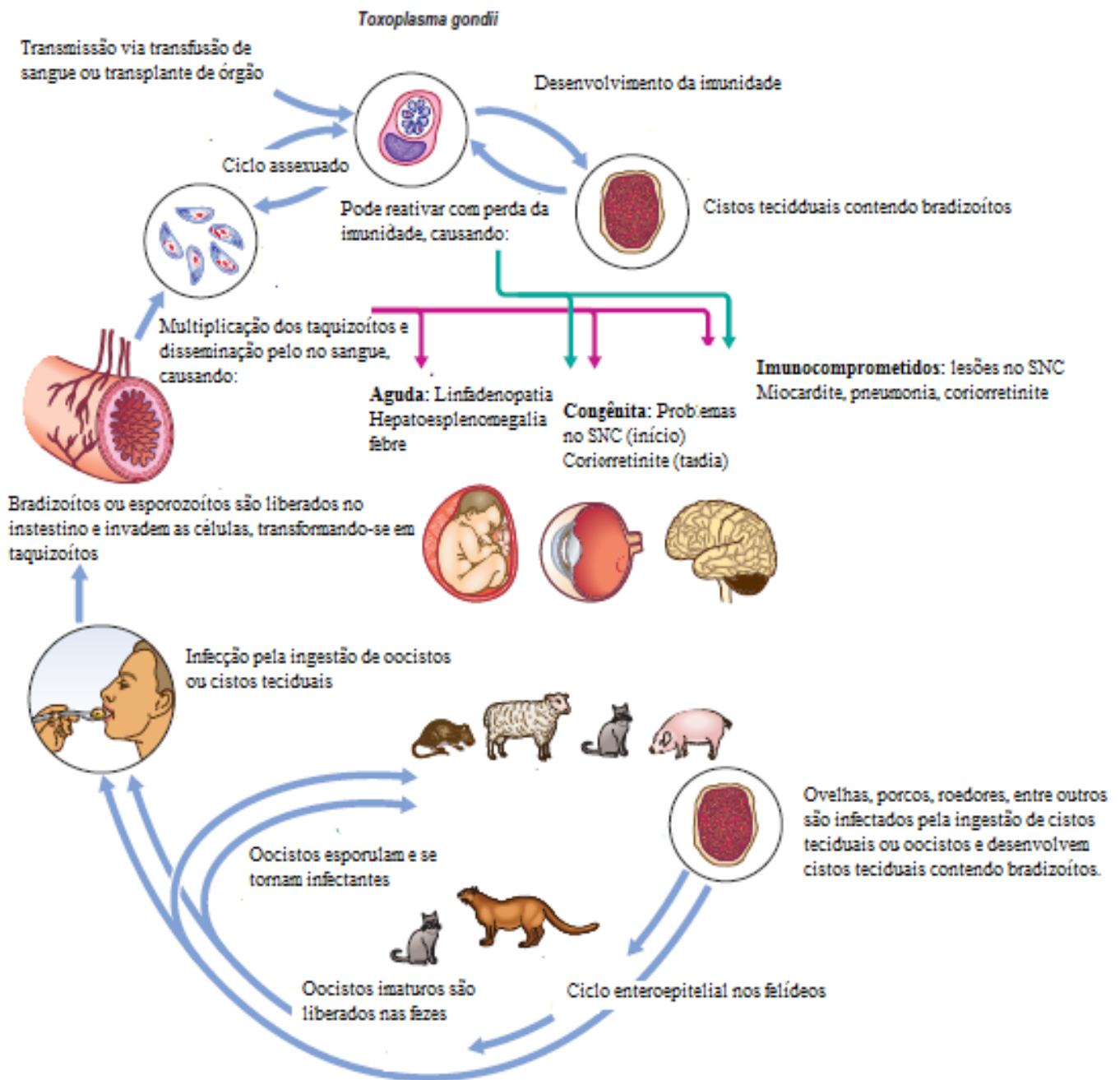


Figura 2.1 Ciclo biológico do *T. gondii*. Fonte: adaptado de Guerrant, 2011.

2.2 Toxoplasmose

A Toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição, cuja prevalência varia de 20 a 90% na população humana mundial. Essa variação deve-se a fatores climáticos, geográficos e culturais (Dubey *et al.*, 2012). Dubey e Jones, 2008 relatam baixa soroprevalência no Sudeste Asiático, na América do Norte e no Norte da Europa (10-30%). Prevalências entre 30 e 50% têm sido relatadas para a região Central e Sul da Europa, enquanto que altas prevalências são observadas na América Latina e nos países africanos tropicais (Robert-Gangneux e Darde, 2012). (Fig. 2.2).

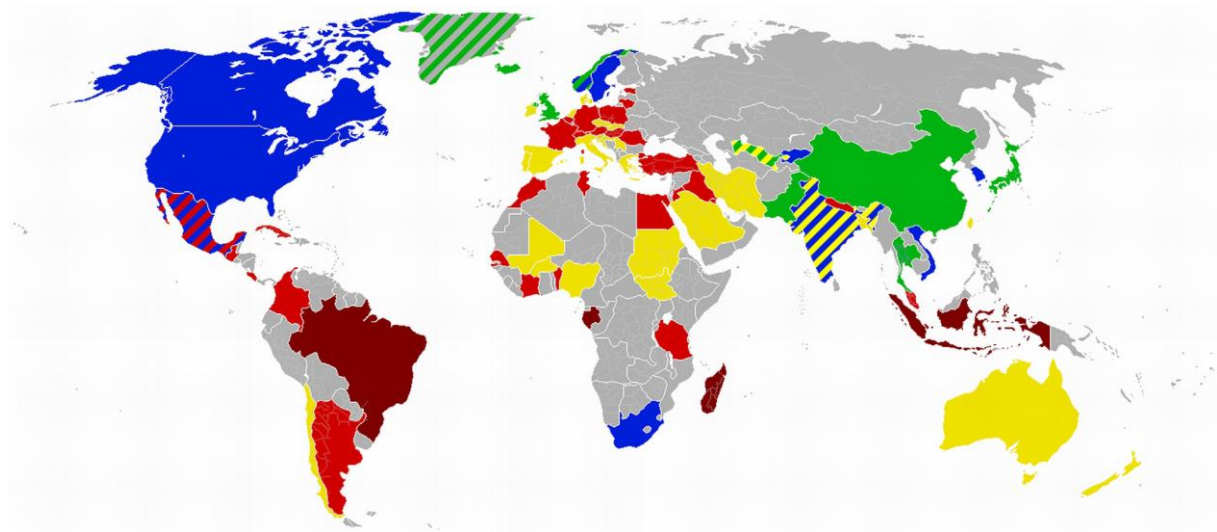


Figura 2.2 Mapa do mundo simplificado da soroprevalência global para *T. gondii*. Código de cores: vermelho escuro: > 60%; vermelho: 40-60%; amarelo: 20-40%; azul: 10-20%; verde: <10%; cinza: dados não disponíveis; áreas estriadas representam fortes diferenças regionais. Cabe ressaltar que vários casos de soroprevalência descritos podem não ser um verdadeiro retrato de um país, visto que, pequenos conjuntos de dados regionais têm sido utilizados e extrapolados em todo o país. Fonte: Maenz *et al.*, 2014.

O curso da infecção em seres humanos pode variar de assintomática a grave, dependendo de fatores genéticos do parasita e do hospedeiro e do estado imunitário do hospedeiro. A maioria dos casos de infecção humana é considerada assintomática (Pappas *et al.*, 2009). De acordo com o momento da infecção, a toxoplasmose pode ser denominada adquirida ou congênita.

A toxoplasmose adquirida apresenta-se assintomática na maioria dos casos (90% dos indivíduos) (Dubey *et al.*, 2012; Kravetz e Federman, 2005). Quando há sintomatologia, o

sinal mais característico é a linfadenopatia, podendo também ocorrer febre, mal estar, cefaléia, mialgia/artralgia. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção é benigna e autolimitada. Raramente evolui para a forma grave e apenas em casos extremos leva à morte (Dardé e Peyron, 2013).

A toxoplasmose congênita é a principal forma da doença decorrente da infecção intrauterina, quando mulheres grávidas não imunes, desenvolvem a infecção primária. Outra forma de transmissão ao feto ocorre por meio da reativação do parasita em mulheres grávidas imunodeprimidas. A maioria dos casos de toxoplasmose congênita é assintomática ou subclínica embora, cerca de 80% desenvolvam problemas visuais mais tarde. No feto, podem ocorrer calcificações intracranianas, hidrocefalia, retinocoroidite e retardo mental (Lynfield e Guerina 1997; Kravetz & Federman 2005; Dardé e Peyron, 2013).

2.2.1 Toxoplasmose ocular

A Toxoplasmose ocular (TO) ou retinocoroidite toxoplásmica, caracterizada por intensa inflamação, é reconhecida como uma das principais complicações associadas à infecção por *T.gondii*. O comprometimento ocular pode ocorrer tanto na forma adquirida quanto na congênita (Nussenblatt e Belfort 1994, Montoya e Remington 1996; Garweg e Candolfi, 2009).

Apesar da soroprevalência da toxoplasmose ser elevada, o percentual de indivíduos com comprometimento ocular é baixo (Garweg e Candolfi, 2009). Portela e colaboradores (2004) mostraram que em uma população rural de Minas Gerais, 12,5% dos indivíduos infectados pelo *T. gondii* (soro-reagentes) desenvolveram lesões oculares. Prevalências mais elevadas de retinocoroidite têm sido encontradas em determinadas regiões geográficas, como é o caso de Erechim (RS), que apresenta 95% da população soro-reagente e 17,7% destes indivíduos com lesões de retinocoroidite (Glasner *et al.*, 1992).

O diagnóstico clínico é baseado na presença de lesão retiniana focal ativa, branco amarelado, sugerindo área de necrose, com margens pouco distintas, eventualmente associadas a áreas de cicatrizes de lesões agudas anteriores de aspecto hiperpigmentado. Uma retinocoroidite primária difere dos episódios de recorrência, pela presença, nestes últimos, de lesões antigas cicatrizadas, ao lado de lesões ativas (Holland *et al.*, 1996).

Alguns autores consideram que para o diagnóstico definitivo da toxoplasmose ocular é necessário a observação de uma lesão cicatrizada associada uma ativa demonstrando o aspecto característico da doença ocular e constituindo uma forma recidivada (Aleixo, 2015). Não há como se obter um grupo controle em que se garanta que a recidiva não ocorreu, pois esse grupo sempre suscitará dúvidas quanto ao diagnóstico definitivo e também não se pode afirmar que em determinados pacientes a recidiva nunca ocorrerá, por isso é importante definir o intervalo temporal de acompanhamento no qual foram ou não observadas recorrências (Maenz *et al.*, 2014 Aleixo, 2015).

2.2.2 Imunologia da toxoplasmose

A resposta imune de um hospedeiro à toxoplasmose é complexa e envolve tanto mecanismo celular quanto humoral, sendo o primeiro um fator preponderante de resistência contra a infecção (Kahi *et al.*, 1998; Blader e Saeij, 2009; Munoz *et al.*, 2011).

A resposta imune é formada por uma cascata de eventos, envolvendo a imunidade inata que possui componentes importantes para a ativação, a diferenciação celular e a consolidação da defesa específica (Kahi *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2011). O *T. gondii* induz uma resposta imune consistente e duradoura que busca o controle da proliferação dos taquizoítos. A resposta imune inata, representada por macrófagos, células “natural killer” (NK) e células polimorfonucleares atuam na primeira linha de defesa do organismo (Cordeiro *et al.*, 2010).

Quando um hospedeiro se infecta com o parasito, ocorre a multiplicação na porta de entrada e logo em seguida ocorre a sua disseminação por todo o organismo através das vias linfática e sanguínea. Durante este período, inicia-se a formação de anticorpos específicos e o desenvolvimento de mecanismos imunes celulares que são responsáveis pela destruição dos taquizoítos extracelulares (Garweg e Candolfi, 2009).

Taquizoítos penetram ativamente ou são fagocitados por células do hospedeiro, multiplicando-se em vacúolos parasitóforos, onde impedem a fusão de lisossomas, conseguindo sobreviver e destruir a célula parasitada durante a fase aguda. Em poucos dias vai surgindo a resposta imune adaptativa do hospedeiro. A principal resposta imune celular é do tipo Th1, havendo liberação de citocinas, como o Interferon gamma (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são capazes de ativar macrófagos para destruição do parasita, limitando assim a fase aguda. Os mecanismos efetores dos macrófagos incluem a

produção de radicais tóxicos de oxigênio e intermediários do nitrogênio, produtos do metabolismo do ácido araquidônico pela via da 5-lipoxigenase e a degradação do triptofano intracelular do parasita (Cordeiro *et al.*, 2010; Yarovinsky, 2014). Células dendríticas tem importante papel na resposta imune celular, por serem eficazes apresentadoras de antígenos parasitários, além de produzirem interleucina 12 (IL-12), importantes para induzir a resposta Th1 e estimular linfócitos T, subtipos CD4⁺ e CD8⁺, específicos anti-*T.gondii* (Blader e Saeij, 2009).

A imunidade adquirida celular, mediada pelos linfócitos T, atua como mecanismo de defesa contra microrganismos que sobrevivem dentro de fagócitos ou células não-fagocíticas infectadas. Os linfócitos T auxiliares (Th), em resposta à estimulação antigênica, liberam citocinas, cuja função é estimular a proliferação e a diferenciação dos linfócitos, incluindo os linfócitos B, e dos macrófagos. Os linfócitos T citotóxicos eliminam células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares que se replicam no citoplasma das mesmas (Abbas, 2012).

Os linfócitos Th são divididos nas subpopulações Th1 e Th2, distinguidas pelo padrão seletivo de produção de citocinas. Células de perfil Th1 secretam preferencialmente IL-2 e IFN- γ e contribuem na resistência aos patógenos intracelulares (Hunter e Sibley, 2012). O IFN- γ estimula a atividade microbicida dos macrófagos e a IL-2 induz as células citocináticas de fenótipo das células NK ou células T CD8 que são citotóxicas contra células-alvo infectadas pelo *T. gondii* (Hunter e Sibley, 2012).

As células de perfil Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão associadas com “downregulation” da resposta imune celular. Na infecção toxoplásmica, as citocinas de perfil Th2 podem promover a multiplicação parasitária; entretanto, elas também podem ser recrutadas para controlar a resposta imune pró-inflamatória prejudicial (Cordeiro *et al.*, 2010; Yarovinsky, 2014).

A principal defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *T. gondii* é a imunidade mediada por células. No entanto, a infecção também estimula a produção de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE que, além de serem utilizados para o diagnóstico da infecção pelo parasita, parecem contribuir na primeira barreira de defesa. Taquizoítas extracelulares cobertos pelos anticorpos e complemento podem ser lisados pela via clássica do complemento ou destruídos dentro dos fagócitos. Esses mecanismos, no entanto, não oferecem proteção contra os parasitas vivos que estão no interior das células (Munoz *et al.*, 2011; Hunter e Sibley, 2012; Yarovinsky, 2014).

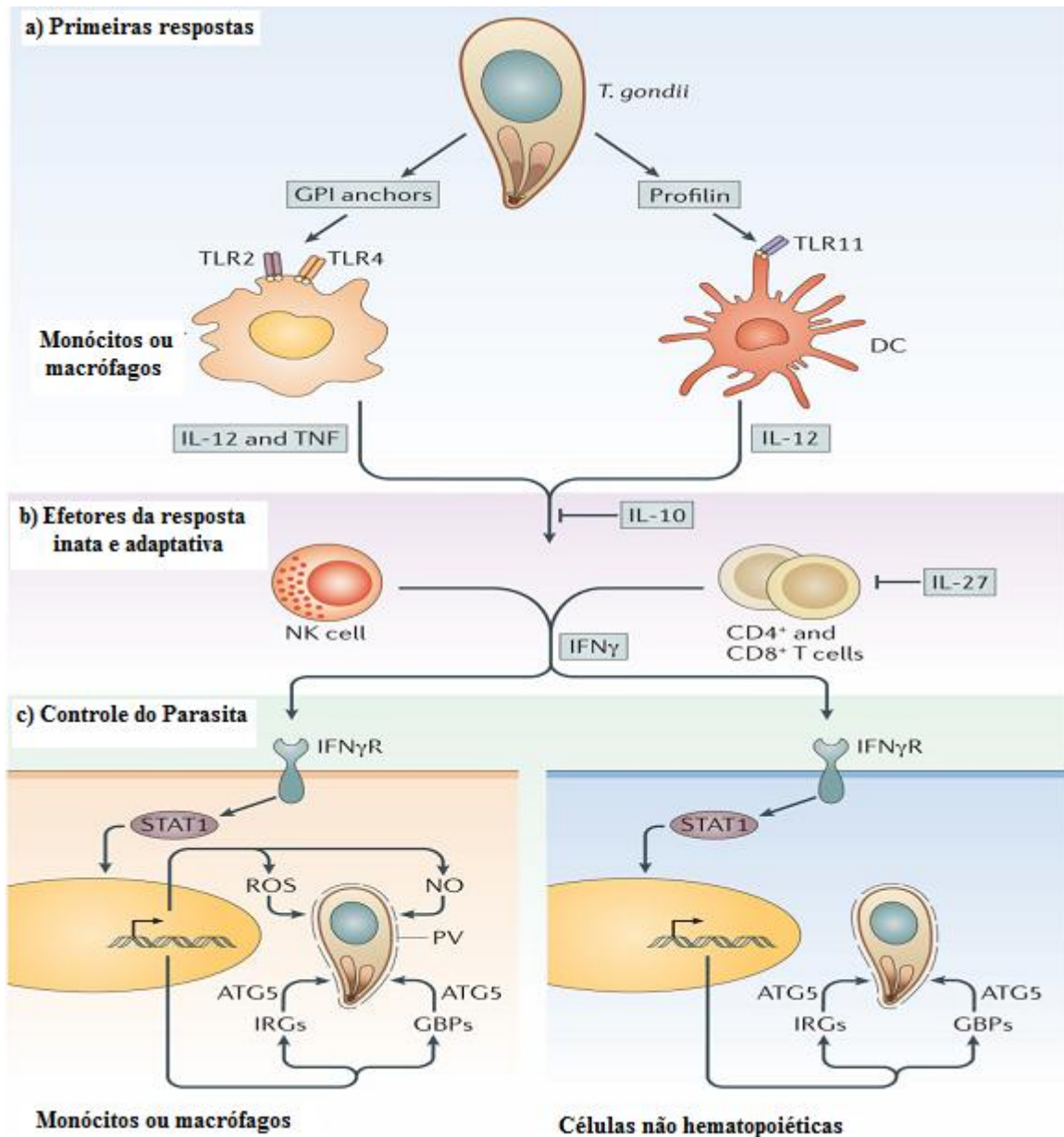


Figura 2.2.1 Resposta imune inata para *T. gondii* durante a infecção. a) No início da infecção, as primeiras células a responder são células dendríticas (DC) e monócitos /macrófagos. Interação da profilina de *T. gondii* com TLR11 em DCs é importante para a produção de IL-12. Além de estimular a produção de IL-12, os macrófagos também induzem a produção de TNF- α , um co-fator da atividade antimicrobiana, em resposta à detecção da proteína ancorada GPI através de TLR2 e TLR4. b) A resposta imunitária resulta na produção de IFN- γ a partir de células NK por meio da resposta inata e, eventualmente, a partir de células T CD4⁺ e T CD8⁺ como resposta adaptativa. IL-10 e IL-27 são a chave para modulação e estas vias evitam a produção excessiva de citocinas Th1. c) A produção de IFN- γ durante as fases inata e adaptativa é responsável pela ativação das células e controle da infecção. IFN- γ propaga um sinal através de um receptor de superfície (IFN- γ R) para ativar STAT1, um fator nuclear de transcrição que controla a expressão de muitos genes. Em resposta a atividade de STAT1, o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) são upregulated em monócitos /macrófagos, os quais contribuem para o controle de parasitas intracelulares. Células hematopoiéticas e não hematopoiéticas também regulam duas famílias de proteínas de defesa chamadas de GTPases relacionadas com a imunidade (IRGs) e proteínas de ligação guanilato (Gbps), que são recrutadas para

vacúolos contendo patógenos e estão envolvidas na depuração do parasita. A função de IRGs e GBPs depende da proteína autofagia Atg5. Fonte: adaptado de Hunter *et al.*, 2012

2.2.3 Imunidade da toxoplasmose ocular

Por muito tempo, os olhos foram considerados um sítio imunoprivilegiado devido à existência da barreira hemato-ocular, à falta de sistema de drenagem linfática e a ausência de APCs profissionais (Caspi, 2006; Cordeiro *et al.*, 2010; Maenz *et al.*, 2014). Contudo evidências recentes mostram ser este um sítio imunoespecializado, no qual ocorre apresentação de antígeno, produção de citocinas e de anticorpos, mas que possui um sistema de imunorregulação bem estabelecido (Furtado *et al.*, 2013; Maenz *et al.*, 2014).

Camundongos infectados pelo *T. gondii* desenvolveram inflamação ocular focal e envolvimento do epitélio pigmentar da retina. Na retina de animais infectados, os intensos infiltrados inflamatórios estão associados a altos níveis de IFN- γ e IL-6 e baixos níveis de IL-10 no humor aquoso. Por outro lado, animais não infectados apresentam baixos níveis de IFN- γ e IL-6 e altos níveis de IL-10, sugerindo que o desequilíbrio no perfil de citocinas contribui para a formação da inflamação e para a lesão na retina dos animais infectados por *T.gondii* (Brunton *et al.*, 2000; Cordeiro *et al.*, 2010). Altos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-12, TNF- α e IFN- γ foram implicados na patologia ocular em humanos e no modelo murino (Fatoohi *et al.*, 2006; Garweg e Candolfi, 2009).

Os quadros epidemiológicos de prevalência da TO sugerem a associação de virulência das cepas circulantes na região estudada e da genética do hospedeiro como influentes diretos no quadro final da TO (Garweg e Candolfi, 2009 ; Maenz *et al.*, 2014).

2.3 Células *Natural Killer*

As células NK (do inglês, *natural killers*) são derivadas de precursores da medula óssea e apresentam-se como grandes linfócitos com numerosos grânulos citoplasmáticos (Marangon *et al.* 2008). Correspondem cerca de 10 a 20% dos linfócitos circulantes; são timo independentes e, morfológicamente, são maiores do que os linfócitos T e B, apresentando citoplasma granular e marcadores de superfície CD16 e CD56 (Jobim e Jobim, 2008).

As células NK são as células efetoras do sistema imune inato, cuja principal função é a rápida atividade citotóxica, especialmente contra infecções virais, parasitas intracelulares e

células tumorais. Tal ação é possível, devido a sua capacidade de lise celular, sem sensibilização prévia, e pela produção e secreção de citocinas e quimiocinas que medeiam à resposta inflamatória (Marangon *et al.*, 2008). O interferon gamma (IFN- γ) é uma das principais citocinas produzidas pelas células NK, responsável pelo aumento da expressão de moléculas HLA de classe I e pela ativação dos macrófagos (Cooper *et al.*, 2001).

A morte celular mediada pelas células NK ocorre por meio da exocitose de grânulos, contendo perforinas e granzimas, enquanto que a indução de apoptose ocorre por meio da sinalização via membros da família de receptores de morte celular do TNF (Smyth *et al.*, 2005).

Para ação efetiva sobre as células alvo, as células NK dependem de sua habilidade em reconhecer a diminuição ou ausência de expressão de moléculas HLA na superfície dessas células, diferenciando-as das células normais ou próprias do organismo. Esse mecanismo é conhecido como teoria do *missing self* (reconhecimento do próprio). Além da ligação e interação entre receptores ativadores e inibidores presentes nas membranas das células NK com moléculas ligantes na superfície das células alvo, a ação efetiva das células NK envolve a integração de sinais transmitidos por estes receptores, que determinam se a célula deve ou não ser ativada (Lanier, 2005) (Figura 2.3).

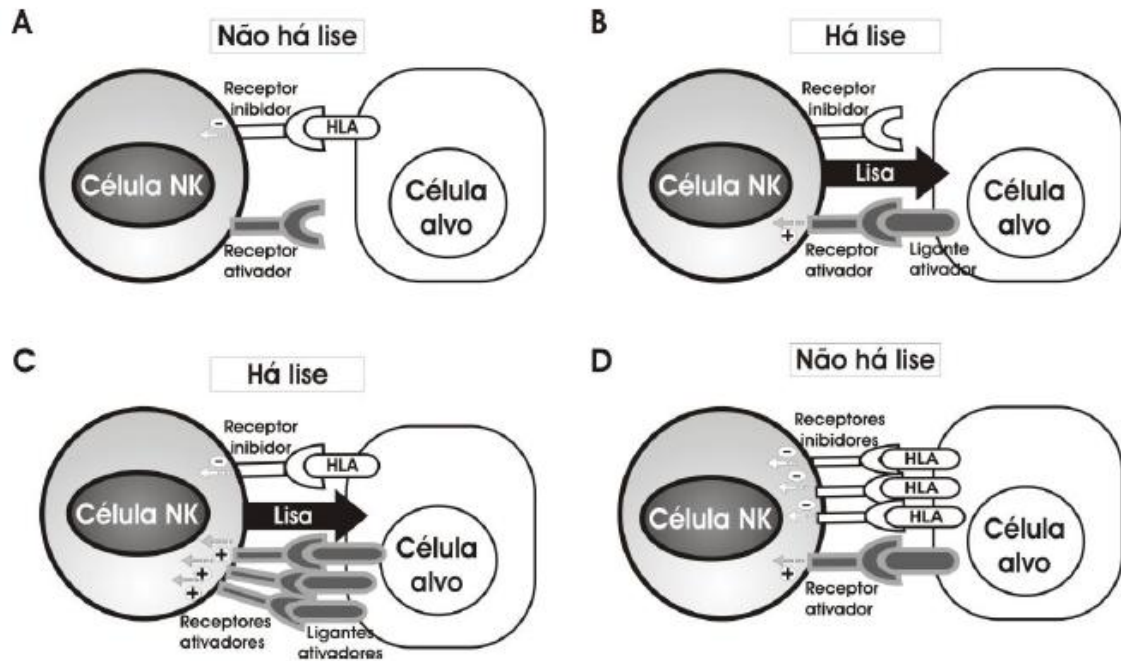


Figura 2.3– Reconhecimento das células alvo. Essa figura representa a regulação da atividade citotóxica das células NK por receptores ativadores e inibidores em diferentes situações: Em (A), o sinal inibidor prevalece por não haver ligação de nenhum receptor ativador. Em (B), há ligação de receptor ativador na ausência de sinais inibidores, de forma que ocorre lise da célula alvo. (C) e (D) representam situações mais complexas, em que ocorrem simultaneamente ligações de receptores ativadores e inibidores. Se houver mais sinais ativadores do que inibidores (C) ocorrerá lise da célula alvo. Por outro lado, se houver mais sinais inibidores do que ativadores (D), a célula alvo será protegida da lise por células NK. (Fonte: Almeida, 2011).

2.3.1 Receptores das células NK

Os receptores das células NK pertencem a duas famílias: a superfamília das imunoglobulinas e a família dos Receptores semelhantes à lectina, KLR (*Killer Lectin-like receptors*). Fazem parte da superfamília das imunoglobulinas os receptores: KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*), LILR (*leucocyte immunoglobulin-like receptor*), LAIR (*leucocyte associated inhibitory receptor*), FCaR e NKp46 (*activating NK receptor*), inseridos em uma região conhecida como LCR (*leucocyte receptor complex*), localizada no braço longo do cromossomo 19. Da família dos Receptores semelhantes à lectina, os membros mais representativos são as moléculas NKG2, que associadas às moléculas CD94 formam o receptor funcional. Cada família de receptores contém receptores inibidores e ativadores (Middleton *et al.*, 2002).

Devido à alta diversidade genética e haplotípica, os receptores KIR vêm despertando o interesse da comunidade científica. Estudos sobre o polimorfismo desses genes estão sendo realizados avaliando-se a relação desse polimorfismo com a susceptibilidade e/ou proteção às doenças (Rudnick et al., 2010; Augusto *et al.*, 2015)

2.3.2 Receptores KIR

Os receptores KIR foram descritos, pela primeira vez, em meados de 1990, em associação com Ly49 (*lectin-like* tipo C), em estudos em ratos (Moretta *et al.*, 1990). Em humanos, são expressos nas células NK, em células T $\gamma\delta$ e na subpopulação de células de memória $\alpha\beta$ T (Pisegna *et al.*, 2004). Localizam-se no braço longo do cromossomo 19 humano (19q13.4), em um complexo gênico de 1Mb denominado de *LRC* (Complexo de Receptores Leucocitários - *Leukocyte Receptor Complex*) e ocupam uma região de cerca de 150K (Figura 2.4).

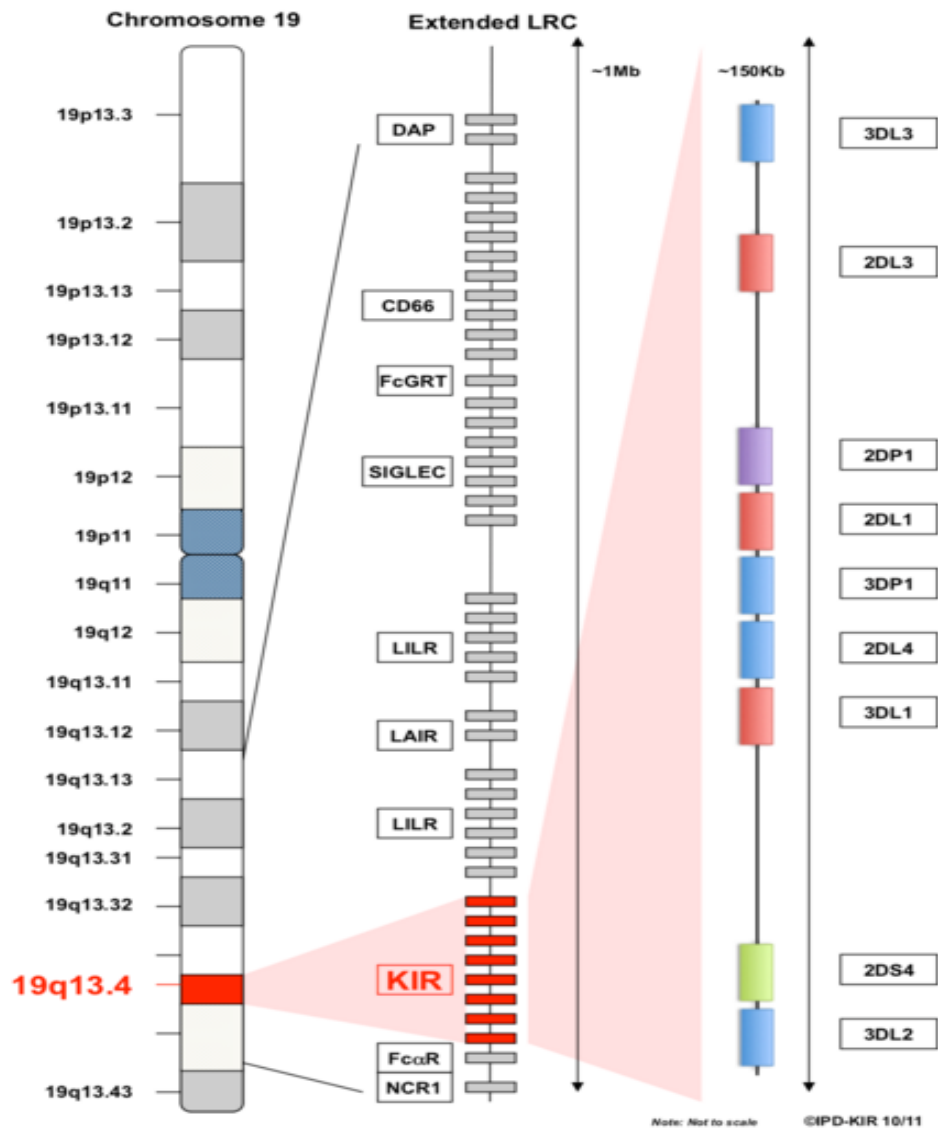


Figura 2.4: Localização cromossômica do *LRC* (Complexo do Receptor Leucocitário) destacando-se os genes *KIR*. Fonte: Robinson 2013, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>

A família dos genes *KIR*, atualmente é constituída por 14 genes (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DS1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*) e dois pseudogenes (*KIR2DP1* e *KIR3DP1*); apresentam grande similaridade molecular entre si e são derivados de um gene ancestral por uma série de duplicações, recombinações e mutações. A sequência genômica completa dos genes *KIR* varia de 4 a 16kb, podendo apresentar de 4 a 9 éxons (Andre *et al.*, 2001; Vilches e Parham, 2002).

2.3.3 Nomenclatura e classificação *KIR*

A nomenclatura dos genes *KIR* é definida pelo subcomitê *The Human Genome Organization* (HUGO) e o pelo *Hugo Gene Nomenclature Committee* (HGNC). É baseada na relação entre o número de domínios extracelulares semelhantes à imunogloblina com características da cauda citoplasmática (Carrington e Norman, 2003).

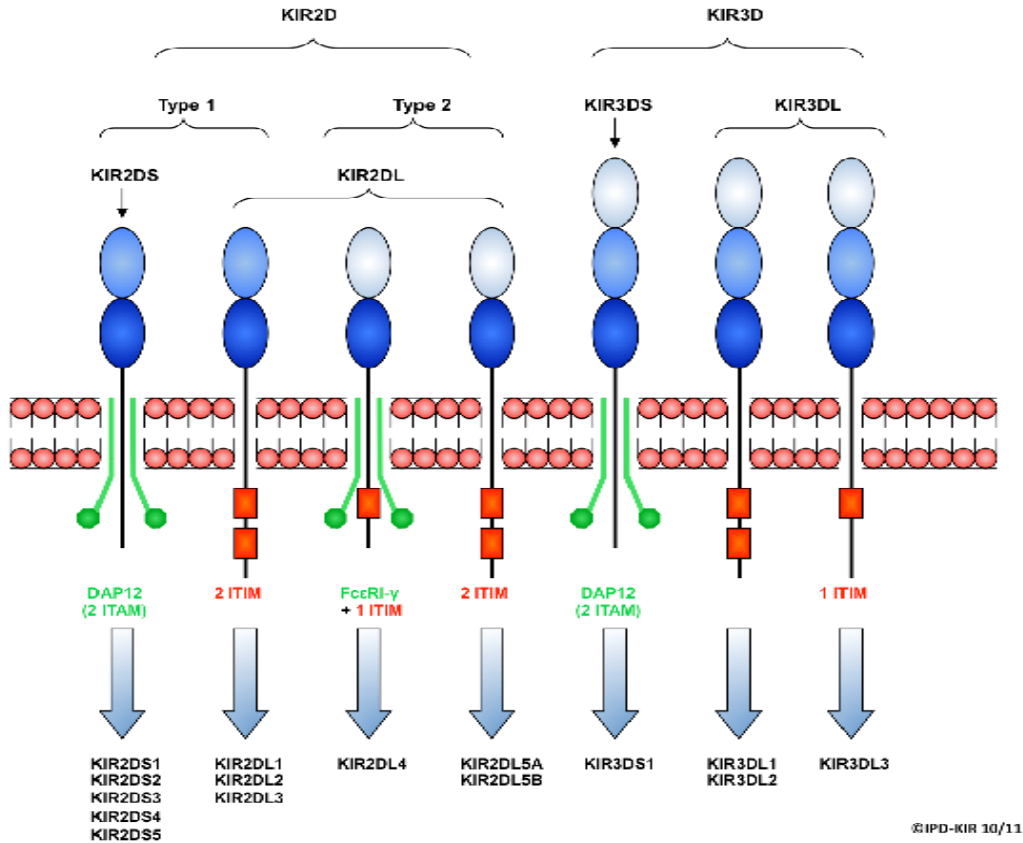
Na denominação, após a expressão *KIR*, chamada de acrônimo, o primeiro dígito corresponde ao número de domínios extracelulares na molécula, seguido pela letra D. Como as moléculas podem ter dois ou três domínios, a representação será 2D ou 3D, respectivamente. As caudas citoplasmáticas podem ser designadas pela letra “L” (do inglês *long*) quando forem longas, ou pela letra “S” (do inglês *short*) quando curtas ou ainda pela letra “P” se forem pseudogenes. Os números de 1 a 5 presentes após o sufixo S ou L foram sendo denominados à medida que os genes foram descobertos, por exemplo, o gene *KIR2DL1* é o primeiro loco *KIR* descrito com essas características, o *KIR2DL2*, o segundo. Caso dois ou mais genes codifiquem estruturas moleculares e sequências semelhantes, eles deverão ser designados pelo mesmo número, seguido de uma letra final, por exemplo, *KIR2DL5A* e *KIR2DL5B* (Pisegna *et al.*, 2004; Marsh *et al.* 2003; Vilches e Parham, 2002; Gomez-Lozano *et al.*, 2002). Após a designação do domínio e da cauda, é usado o asterisco como separador antes do código numérico que designará o alelo. Os três primeiros números deste código designam os alelos que diferem nas sequências de aminoácidos das proteínas que codificam. Os dois números subsequentes são utilizados para distinguir alelos que somente diferem entre si por uma ou mais mudanças sinônimas dentro da região codificante do gene. Os dois últimos números distinguem alelos que diferem entre si por mudanças nucleotídicas numa região não codificante da sequência do gene, como íntrons e promotor (Marsh *et al.* 2003) (Figura 2.5).



Figura 2.5: Nomenclatura dos genes *KIR* adotada pelo HUGO. Fonte: Perce da Silva, 2015 adaptado de Robinson 2013, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>

Existem três tipos de domínios: D0, D1 e D2. Os receptores KIR que possuem três domínios têm configuração D0-D1-D2, enquanto que as moléculas com dois domínios podem ter configuração D1-D2, sendo chamadas de tipo 1, ou apresentar a configuração D0-D2, denominadas tipo 2 (Pisegna *et al.*, 2004) (Figura 2.6).

A atividade funcional dos receptores KIR está relacionada com as porções citoplasmáticas e transmembrana das moléculas. De forma geral, os receptores de cauda longa são inibidores porque possuem um ou dois epítomos denominados Imunorreceptores com Motivos Inibidores baseados em Tirosina, sigla ITIM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*) que liberam sinais inibidores. Já os de cauda curta, têm ausência de ITIM, contudo, possuem um aminoácido no domínio transmembrana que permite associação com a molécula DAP-12. Essa libera sinais ativadores por meio de Imunorreceptores com Motivos Ativadores baseados em Tirosina, sigla ITAM (do inglês *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*). O *KIR2DL4* é uma exceção, pois tem uma estrutura que combina um ITIM na cauda citoplasmática e um aminoácido no domínio transmembrana. Desta forma, possui função inibidora e ativadora. Estudos indicam que *KIR2DL4* se associa à proteína acessória FcεRI-γ que envia sinais estimulatórios à célula via ITAM, similarmente à DAP-12 (Kikuchi-Maki *et al.*, 2005; Vilches e Parham, 2002) (Figura 2.6).



©IPD-KIR 10/11

Figura 2.6: Estrutura esquemática dos receptores KIR. As moléculas adaptadoras do KIR ativador estão mostradas em verde, enquanto que as moléculas ITIM do KIR inibidor estão mostradas em vermelho. Fonte: Robinson 2013, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>.

2.3.4 Organização genética do *KIR* e variabilidade haplotípica

Os genes *KIR* são organizados em nove *exons*. Os dois primeiros *exons* codificam as sequências sinais ou líderes. Os *exons* três, quatro e cinco codificam os domínios semelhantes a imunoglobulinas D0, D1 e D2, respectivamente. O *exon* seis codifica a região de inserção da molécula na membrana plasmática e o *exon* sete codifica a região transmembrana. Por fim, os *exons* oito e nove codificam domínios citoplasmáticos (Carrington e Norman, 2003) (Figura 2.7).

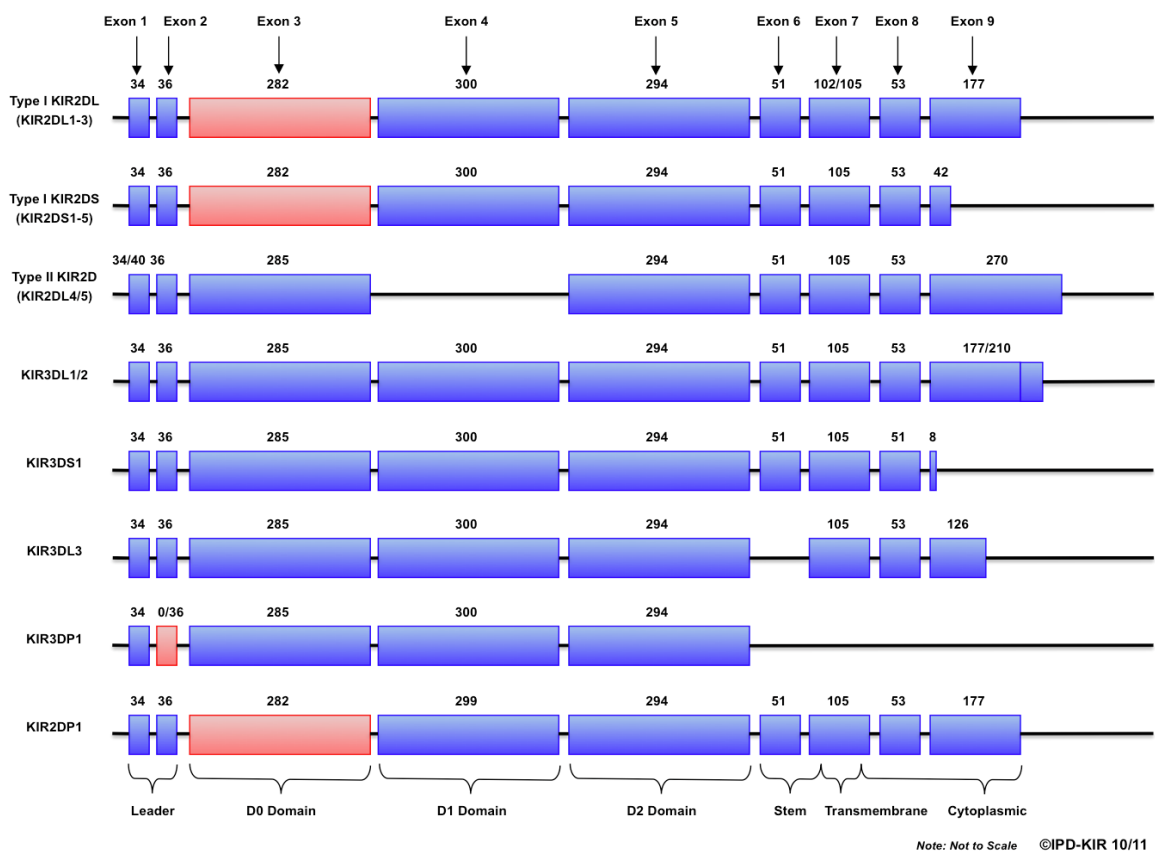


Figura 2.7: Organização dos genes *KIR*. As regiões codificantes estão representadas pelas caixas azuis e seu tamanho em pares de bases (pb) acima das caixas. O exon 3 não expresso do gene *KIR2DP1* e o exon 2 que por estar deletado no gene *KIR3DP1* são mostrados em vermelho. Fonte: Robinson 2013, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html>.

Ao conjunto de genes do mesmo cromossomo herdados em bloco denominamos de haplótipo. Com base no conteúdo gênico, os genes *KIR* foram divididos em dois tipos: haplótipo A e haplótipo B (Figura 2.8). Todos os haplótipos *KIR* conhecidos estão flanqueados em sua extremidade centromérica pelo *KIR3DL3* e em sua extremidade telomérica pelo *KIR3DL2*, além de dois locos centrais, os *KIR3DP1* e *KIR2DL4*. Esses genes presentes em todos os haplótipos são denominados genes de moldura ou genes estruturais (do inglês, *frameworks*) (Vendelbosch *et al.* 2015; Trowsdale *et al.*, 2001; Crum *et al.*, 2000).

O haplótipo A contém nove genes e tem como característica a presença de somente um gene que codifica um receptor ativador, o *KIR2DS4*. Esse haplótipo possui baixa variabilidade genética, contudo apresenta vários genes com extensa variação alélica (Crum *et al.*, 2000). Em contraste, o haplótipo B possui entre um a cinco receptores ativadores e

apresenta extensa diversidade em relação ao conteúdo gênico, porém possui menor variabilidade alélica (Vendelbosch *et al.* 2015).

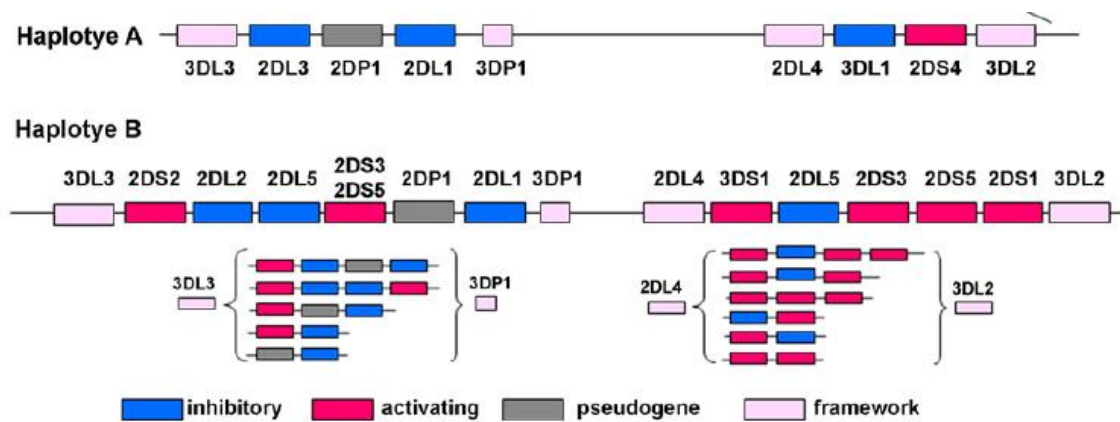


Figura 2.8: Organização genômica do conjunto de genes *KIR*. Os haplótipos *KIR* variam extensivamente no conteúdo do gene. O haplótipo A é fixo em termos de conteúdo dos genes, mas os haplótipos B são caracterizados por números variáveis de genes (demonstrados entre colchetes). Os genes de moldura (caixas cor-de-rosa) são presentes em todos os haplótipos. Fonte: adaptado de Kulkarni *et al.*, 2008.

2.4 Ligantes de KIR

Os ligantes de KIR são moléculas HLA de classe I (HLA-A, B e C), codificadas por genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal. A regulação das células NK está relacionada à variação da expressão dessas moléculas na superfície das células-alvo, principalmente células infectadas, tumorais e alogênicas. Pela interação desses ligantes com isotipos de KIR, que inibem a atividade de células NK, certas moléculas HLA de classe I são protetoras contra a lise natural mediada por essas células, enquanto outros isotipos KIR ativam a citotoxicidade mediada por NK (Marangon *et al.* 2008; Carrington e Norman, 2003).

2.5 Associação entre *KIR* e doenças

Os receptores KIR fazem parte de um grupo de moléculas regulatórias que participam do processo de ativação ou inibição da citólise, mediada pelas células NK. Devido ao seu extenso polimorfismo nos grupos populacionais e étnicos e na regulação da sua expressão em diferentes clones de células NK, os receptores KIR desempenham função significativa no controle da resposta imunitária inata e específica de cada indivíduo. Desta forma, o

conhecimento da diversidade genética desses receptores e de seu polimorfismo gênico, alélico e haplotípico abrem caminho para o entendimento de seu papel na susceptibilidade ou resistência a diversas doenças. Tal fato, explica o crescente interesse da comunidade científica em pesquisá-los (Marangon *et al.*, 2008).

Além de avaliar o potencial de associação com doenças infecciosas, autoimune/inflamatória, câncer, o conhecimento adquirido acerca destes receptores, tem sido usado para o entendimento do papel das células NK na patologia dos transplantes; nos possíveis benefícios na alorreatividade, em transplantes de células hematopoiéticas e na manutenção da gravidez (Kulkarni *et al.*, 2008; McQueen *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007).

Nas doenças infecciosas, no caso da Hepatite B, Zhi-Ming e colaboradores sugerem que os genes *KIR2DS2* e *KIR2DS3* conferem susceptibilidade ao vírus. Por outro lado, os genes *KIR2DS1*, *KIR3DS1* e *KIR2DL5* podem ser genes protetores ao vírus da hepatite C (Zhi-Ming *et al.*, 2007; Kibar *et al.* 2014). Com relação a infecção por HIV, as combinações *KIR-HLA* com forte potencial de ativação protetoras ao HIV, sendo os locos *KIR3DL1/KIR3DS1* considerados os mais importantes. A combinação *KIR3DS1* com seu ligante *HLA-Bw4-80I* está associada com a progressão mais lenta da AIDS, menor carga viral média, e proteção contra infecções oportunistas (Martin *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2006). Para a doença de Chagas, a combinação do receptor ativador *KIR2DS2* com seu ligante *HLA-C1* na ausência do *KIR2DL2* foi demonstrado como marcador de risco da forma crônica da doença (Ayo *et al.* 2015).

Quanto aos distúrbios inflamatórios e a autoimunidade, vários estudos já mostraram a associação com o gene ativador *KIR2DS2*. No caso da artrite reumatoide (AR) as células T CD4⁺ T CD28^{null} que sofrem expansão e causam dano epitelial, foram observadas expressando *KIR2DS2* na ausência de inibidor *KIR2DL2* (Namekawa *et al.*,2000). Além disso, a frequência de *KIR2DS2* foi maior em doentes com AR com vasculite em comparação com controles normais e pacientes com AR sem vasculite (Yen *et al.*, 2001). *KIR2DS2* na ausência de (os genes que estão em forte desequilíbrio de ligação positivo) *KIR2DL2* também foi observado para ser aumentado entre os pacientes com esclerodermia.

Em relação à toxoplasmose, os escassos trabalhos que existem, avaliam o efeito da infecção toxoplásmica sobre os receptores das células NK endometriais e o seu ligante não clássico HLA-G, na manutenção da gravidez (Liu *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013). No entanto, não há na literatura dados disponíveis sobre o papel dos genes *KIR* na toxoplasmose ocular, tampouco na recidiva.

3. Justificativa

A toxoplasmose é uma das causas mais importantes de uveítes no mundo. No Brasil, a forma ocular é responsável por aproximadamente 50% do total de uveítes (Souza e Belfort, 2014). A toxoplasmose ocular é uma doença autolimitada, mas a proliferação do parasita e a inflamação intraocular associada podem acarretar a perda visual. No sul do Brasil, o acometimento ocular em pacientes com toxoplasmose adquirida foi descrito em 17,7% dos indivíduos. (Silveira *et al.*, 1988; Glasner *et al.*, 1992). Devido ao seu caráter recidivante, uma parcela significativa desses indivíduos sofre recorrência (Oréfice, 2005). Os mecanismos que influenciam a ocorrência, a gravidade e a recorrência da toxoplasmose ocular, ainda hoje, não são bem compreendidos. Dentre eles, podemos destacar os fatores genéticos do hospedeiro associados à resposta imune (Ayo *et al.*, 2015; Maenz *et al.*, 2014).

Na fase inicial da infecção, a imunidade inata tem papel importante na resistência ao *T. gondii* e as células NK são uma importante subpopulação de linfócitos atuantes na fase aguda da resposta imunológica na toxoplasmose (Yarovinsky F. 2014; Yiyue *et al.*, 2014). A ativação das células NK limita a replicação dos taquizoítos além de desencadear a resposta imune adaptativa contra a toxoplasmose, através da liberação de citocinas, dentre elas o $\text{INF}\gamma$, (Yiyue Ge, 2014; Yiyue *et al.*, 2014;).

O controle da ação das células NK se dá através de receptores de membrana, entre os quais estão os receptores KIR, que reconhecem moléculas HLA de classe I expressas pela maioria das células do organismo. O extenso polimorfismo genético dos receptores KIR, assim como a regulação da sua expressão em diferentes clones de células NK são fatores importantes no delineamento da resposta imune inata e adaptativa de cada indivíduo (Lanier, 2005).

O interesse pelo estudo da família gênica dos receptores KIR tem aumentado nos últimos anos e muitos trabalhos vêm demonstrando sua eficiência como bons marcadores genéticos em estudos de associação com doenças (De Re *et al.* 2015; Hou *et al.* 2015). Além disso, são bastante utilizados em estudos populacionais para a compreensão da história biológica e evolutiva das populações (Augusto e Petzl-Erler 2015; Manser *et al.* 2015; Moffett e Colucci 2015).

Não foram encontrados na literatura estudos que abordem a associação de receptores KIR com a toxoplasmose ocular sequer com a recidiva. Deste modo, a caracterização destes

receptores em indivíduos com toxoplasmose ocular poderá auxiliar o entendimento do seu papel na regulação da resposta imune, evolução clínica da doença, bem como, sua relação com predisposição/resistência à recidiva. A identificação de indivíduos susceptíveis pode auxiliar na abordagem clínica, além de, contribuir para o conhecimento sobre o papel do KIR na toxoplasmose ocular.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral:

- Avaliar o perfil genotípico de um grupo de pacientes com diagnóstico de toxoplasmose ocular, oriundos do ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia (INI), usando como modelo a caracterização do perfil genético *KIR*, e verificar se há associação com a ocorrência de recidivas após episódio ativo.

4.2 Objetivos específicos:

- Determinar a frequência dos genes *KIR* nos pacientes com diagnóstico de toxoplasmose ocular;
- Determinar o perfil genotípico *KIR* desses pacientes;
- Verificar a associação do perfil genotípico *KIR* desses pacientes com a recidiva de toxoplasmose ocular após episódio ativo.

5. Materiais e Métodos

5.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC- Fiocruz CAAE 0075.0.009.000-11, como um subprojeto do projeto principal “Avaliação dos padrões de recorrência da toxoplasmose ocular e fatores de risco associados em pacientes do ambulatório de Oftalmologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas” (**Anexo 1**).

Os voluntários da pesquisa que concordaram em participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) onde permitiram a coleta de 8 mL de sangue para a realização de teste sorológicos e genéticos além de permitir que uma alíquota do seu material biológico fosse armazenada no LabTOXOP para futuras pesquisas (**Anexo 2**).

5.2 Voluntários

Foram utilizadas 101 amostras de sangue armazenadas no Laboratório de Toxoplasmose e outras Protozooses do IOC, oriundas de pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia do INI/ Fiocruz, nos anos de 2010 a 2014, com diagnóstico clínico e sorológico de toxoplasmose ocular. Esses pacientes foram acompanhados até junho 2015. Os indivíduos com lesão ativa e sorologia positiva, foram classificados quanto à ocorrência ou não de recidiva.

Foram incluídos no grupo de pacientes com recidiva, aqueles que responderam ao tratamento específico, e, durante o período de acompanhamento, apresentaram novo episódio ativo. Já os pacientes que responderam ao tratamento específico, e, durante o período de acompanhamento, não apresentaram novo episódio ativo, foram considerados sem recidiva.

Cabe ressaltar que dentre os indivíduos pertencentes ao grupo sem recidiva, apenas os acompanhados por um período acima de dois anos foram incluídos nas análises estatísticas de comparação recidiva *versus* sem recidiva. De acordo com o observado por Rothova (2003), o risco de recorrência da doença é maior durante os dois primeiros anos após um episódio ativo, do que nos anos seguintes. Em adição aos dados da literatura, efetuamos cálculos (mediana+ 25%percentil) para estabelecer o intervalo entre cada episódio de recidiva dos nossos pacientes, e o tempo encontrado foi de 2 anos. Portanto, indivíduos do grupo sem recidiva que foram acompanhados por período ≤ 2 anos foram excluídos das análises estatísticas de comparação recidiva *versus* sem recidiva.

5.2.1 Critérios de elegibilidade

a) **Critérios de inclusão:** para o diagnóstico definitivo da toxoplasmose ocular, é necessário que, no momento do exame oftalmológico, haja um episódio ativo, caracterizado por uma lesão com atividade inflamatória. Pois, uma lesão cicatrizada (lesão sem atividade inflamatória), não permite ao médico afirmar que é derivada de uma retinocoroidite toxoplásmica. Além da lesão ativa, é necessário que o paciente tenha sorologia positiva para *T. gondii* e que, com o tratamento específico, a lesão cicatrize.

b) **Critérios de exclusão:** foram excluídos os pacientes que possuíam grau de parentesco, lesões atípicas ou lesões típicas sem sorologia positiva para *T. gondii*; pacientes com múltiplas lesões de retinocoroidite exsudativa ou quadro sugestivo da forma pseudomúltipla; pacientes que apresentavam comorbidades como: insuficiência renal crônica, história de uso de drogas endovenosas, em uso de quimioterapia, transplantados, HIV positivos ou com infecções sistêmicas como sífilis, tuberculose ou ainda aqueles que apresentavam imunossupressão manifesta ou doença autoimune diagnosticada. Tais exames laboratoriais foram realizados no INI/Fiocruz por solicitação da equipe do Ambulatório de Oftalmologia.

5.3 Sorologia

Os testes sorológicos para confirmação do diagnóstico foram realizados no Laboratório de Toxoplasmose e outras Protozooses (LabTOXOP), por meio dos métodos ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e RIFI (Reação de imunofluorescência Indireta), para a pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii*.

5.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta

A primeira etapa desta técnica consiste na sensibilização das lâminas. Para tanto, pipetou-se 10 µL de suspensão de taquizoítas inativos em PBS 1x (concentração de 1×10^7 taquizoítas/mL) em cada quadrante da lâmina e deixou-se secar a temperatura ambiente. Em uma placa de 96 poços, foram realizadas as marcações dos controles positivo e negativo, das diluições (1:16 / 1:64 / 1: 256 / 1:1024 e 1: 4096), bem como a identificação das amostras. Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas. Primeiro adicionou-se 150 µL de PBS 1x a cada poço das colunas A, B, C, D e E de uma placa com 96 poços com fundo em U, e depois, pipetou-se 10 µL de soro, no seu respectivo poço da coluna A, formando assim a diluição 1:16. Com o auxílio de uma pipeta multicanal, homogeneizou-se as diluições da

coluna A e 50 µL foram transferidos para os poços da coluna B. Tal procedimento foi repetido para gerar as diluições posteriores, tendo como ponto de partida a diluição anterior. Após as diluições, 10 µL de cada diluição foram pipetados em seu respectivo quadrante na lâmina e, essas, incubadas em câmara úmida na estufa a 37 °C por 1 hora. Decorrido este tempo, foram realizadas duas lavagens de 5min com PBS 1x. Durante as lavagens, foi realizado o preparo do conjugado (IgG e IgM), diluído com a solução de Azul de Evans. Após a secagem das lâminas, 10 µL de conjugado foram distribuídos sobre cada quadrante seguido de nova incubação em câmara úmida na estufa a 37 °C por 1 hora. Procedeu-se nova lavagem, como descrito anteriormente. Uma vez secas, as lâminas foram montadas com lamínula após a adição de glicerina tamponada e encaminhadas para leitura em microscópio Y-FL de epifluorescência (Nikon E400), com lâmpada de mercúrio, filtro ND16, com objetiva de 40 vezes e ocular de 10 vezes. Foi considerada reação positiva as diluições do soro $\geq 1:16$ em que havia fluorescência completa na borda, de pelo menos 50% dos taquizoítos e as diluições menores que 1:16 foram consideradas não reagentes (NR).

5.3.2 ELISA

O ensaio imunoenzimático foi realizado com o auxílio do kit BIOELISA TOXO (BioKit®). O teste foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante e foram consideradas positivas as amostras de soros com valores acima do *cut-off* da placa.

5.4 Tipagem dos genes KIR

Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação – HLA/UERJ.

5.4.1 Extração de DNA genômico

O DNA foi extraído segundo o protocolo do kit QIAamp® DNA Blood Midi (QIAgen, Hilden, Germany): 20 µL de proteinase K foram adicionados a tubos de 1,5 mL tipo *ependorf*, previamente identificados. Adicionou-se a estes tubos 200 µL da amostra de sangue, seguindo de 200 µL de tampão de lise. Os tubos foram homogeneizados em vórtex por 15 seg e incubados a 56° C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 200 µL de etanol absoluto realizando homogeneização por 15 seg e transferiu-se, cuidadosamente, o material lisado para a coluna contendo o tubo coletor. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 8.000 RPM por 1 min e descartando-se o tubo coletor contendo o filtrado e transferindo a

coluna para um tubo coletor limpo. Adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem 1 (um), seguido de centrifugação a 8.000 RPM por 1 min. Descartou-se o tubo coletor contendo o filtrado e a coluna foi transferida para um tubo coletor limpo. Em seguida, 500 µL de tampão de lavagem 2 (dois) foram adicionados e realizou-se centrifugação a 13.300 RPM por 3 min, seguida do descarte do filtrado e nova centrifugação a 13.300 RPM por 1 min. Em seguida, a coluna foi transferida para um tubo de 2,0 mL tipo *ependorf*, previamente identificado, e 100 µL de tampão de eluição foram adicionados, incubando-se o tubo por 5 min a temperatura ambiente, seguido de centrifugação final a 8.000 RPM por 1 min. A coluna foi descartada e o tubo armazenado em freezer a -20° C até o momento do uso.

5.4.2 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA das amostras foi realizada por meio do equipamento Qubit™ Fluorometer (Invitrogen®) com auxílio do kit Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen®). Após a quantificação, as concentrações de DNA foram ajustadas para 20 ng/µL.

5.4.3 Genotipagem KIR

Para a genotipagem dos 16 genes *KIR* foi utilizado o kit “KIR SSO Genotyping Test” (One Lambda Incorporation) que utiliza a tecnologia Luminex aliada ao método de tipagem PCR-SSO (*Polymerase Chain Reaction* e SSO, *Sequence-Specific Oligonucleotide*). Esta genotipagem é realizada por meio das seguintes etapas (Figura 5.1):

Etapa 1: Amplificação do DNA por PCR usando oligonucleotídeos iniciadores locus-específicos.

Etapa 2: Desnaturação e Neutralização do produto amplificado.

Etapa 3: Hibridização das microesferas (*beads*) codificadas fluorescentemente com sondas de Oligonucleotídeos Sequência-Específicos.

Etapa 4: Marcação com a SAPE (estreptavidina conjugada á R-ficoeritrina).

Etapa 5: Leitura através do citômetro de fluxo LABScan™ 100 (One Lambda Incorporation) para identificação da intensidade de fluorescência em cada microesfera.

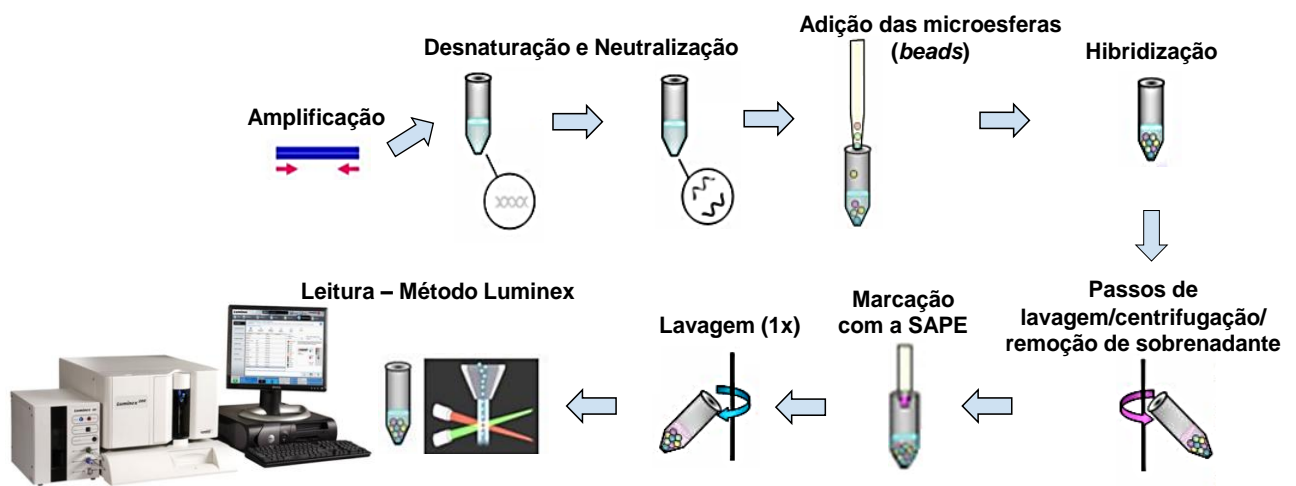


Figura 5.1: Principais etapas da genotipagem dos genes *KIR*. Fonte: www.biometrix.com.br adaptado por Perce da Silva, 2015.

5.4.3.1 Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase.

Para a amplificação dos segmentos gênicos correspondentes às regiões codificantes dos genes *KIR*, as amostras foram submetidas à técnica de PCR utilizando-se três diferentes pares de iniciadores locus-específicos biotinizados: grupo 1 (éxons 3 e 4), grupo 2 (éxon 5) e grupo 3 (éxons 7, 8 e 9). Foi utilizada a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e os demais reagentes foram fornecidos pelo fabricante do kit. Identificou-se um tubo de 1,5 mL tipo *ependorf*, para cada grupo (1, 2 e 3) e transferiu-se o volume de D-mix e primers, previamente calculados. Em seguida, o tubo foi agitado em vórtex por 10 seg e centrifugado (*spin*) por 5 seg. Adicionou-se o volume necessário de Taq Polimerase e foi realizado o mesmo procedimento de agitação e centrifugação anterior. Em uma placa de PCR de 96 poços elevados, adicionou-se 1 μ L de DNA para o respectivo poço da placa de PCR e, em seguida, transferiu-se 9 μ L da solução (D-Mix + *primer* + Taq Polimerase), para cada poço da placa, de acordo com o grupo a amplificar. Após a selagem, homogeneização em vórtex por 5 seg e centrifugação a 1.500 RPM por 30 seg, a placa seguiu para a amplificação. Esta, foi realizada no termociclador modelo GeneAmp 9600 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O protocolo da reação de PCR (Tabela 5.1), bem como o programa do termociclador (Tabela 5.2), estão especificados nas tabelas abaixo.

Tabela 5.1: Quantidade dos reagentes para a Reação em Cadeia da Polimerase (Protocolo PCR)

Reagentes	Quantidade (μL)
D-Mix	6,9
Primer	2
Taq Polimerase	0,1
DNA	1
Volume final: 10 μL	

Tabela 5.2: Condições da ciclagem das regiões alvos dos genes *KIR*

Temperatura e tempo de incubação	n° de ciclos
96 °C 3 min	1 ciclo
96 °C 20 s 60 °C 20s 72 °C 20s	5 ciclos
96 °C 10s 60 °C 15s 72 °C 20s	30 ciclos
72 °C 10 min	1 ciclo
4 °C ∞	1 ciclo

Após a PCR, parte do produto amplificado (1,5 μL) foi submetido à eletroforese em gel de agarose (2%) com o corante *Syber Safe* para visualização das bandas amplificadas sob incidência de luz ultravioleta. Os fragmentos foram submetidos a uma voltagem de 150 v por oito min e 30 seg. e fotografados para registro. Com a confirmação da presença de material amplificado, os amplicons foram submetidos às etapas de desnaturação e neutralização com tampões fornecidos pelo fabricante.

5.4.3.2 Desnaturação e neutralização

Transferiu-se 3 μL do material amplificado para uma nova placa de 96 poços e adicionou-se 1,5 μL de tampão de desnaturação, seguido de agitação em vórtex por 10 seg e descanso durante 10 min a temperatura ambiente. Na sequencia, 3 μL de tampão de neutralização foram adicionados a fim de interromper a desnaturação. Então, a placa foi submetida à agitação em vórtex por 20 seg e apoiada em gelo para que a solução de hibridização fosse distribuída.

5.4.3.3 Hibridização

Em um tubo de 1,5 mL tipo *ependorf* previamente identificado para cada grupo (1, 2 e 3), foi realizado o preparo da solução de hibridização utilizando-se 17 μL de tampão de hibridização + 2 μL de *beads*, para cada amostra. Em seguida, 18 μL desta solução, foram adicionados à placa de 96 poços e, a mesma, foi submetida à agitação por 10 seg e incubação em termociclador a 60 °C por 15 min. Após a incubação, 40 μL de tampão de lavagem foram adicionados, a placa foi selada e centrifugada a 2.700 RPM por 5 min, seguida de uma vigorosa inversão da placa de PCR, para remoção de ligações inespecíficas da reação. Realizou-se este procedimento de lavagem e centrifugação por três vezes. Após este procedimento de lavagem, foram adicionados 24 μL de mistura SAPE preparada conforme a Tabela 5.3, seguidos de incubação a 60°C por 5 min em termociclador. Após a incubação, foram adicionados 40 μL de tampão de lavagem, a placa foi selada e centrifugada por 5 min a 2.700 RPM e o sobrenadante descartado. O material foi ressuspensão em 65 μL de tampão, transferido para uma placa de leitura e levado ao equipamento Luminex (LABScan™ 100). A interpretação foi feita por meio do software Fusion Research 3.0 – One Lambda.

Tabela 5.3: Mistura para SAPE por amostra.

Reagentes	Quantidade (μL)
Tampão SAPE	24,75
SAPE estoque	0,25

5.5 Análises estatísticas:

Os dados foram armazenados no banco de dados Epi-info (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA) e analisados por meio dos programas *Graphpad Prism* versão 5.0 (San Diego, CA) e “R” versão 2.14.0 (disponível em <http://www.R-project.org/>). Os dados foram considerados significativos quando apresentaram $P \leq 0,05$.

No *Graphpad Prism* foi utilizado o teste exato de Fischer para avaliar se as proporções observadas entre dois grupos eram estatisticamente distintas.

As distâncias entre populações foram calculadas pela distância genética, não Euclidiana, proposta por Tamura-Ney (1993), e foram utilizadas para a construção do dendrograma, segundo o modelo neighbor-joining, com 1.000 réplicas de bootstrap. A análise foi conduzida no programa “R” e feita com a população do presente estudo juntamente com 61 populações distribuídas pelo globo, disponíveis no banco de dados público *Allele frequencies* (disponível em www.allelefrequencies.net). A fim de evitar associações ilegítimas resultantes do emprego de dados não robustos, só foram utilizados dados de populações com um número acima de 100 indivíduos e aqueles cujos dados foram previamente publicados.

Para calcular a frequência gênica, realizou-se a contagem direta de indivíduos que possuíam pelo menos uma cópia do gene. Fez-se necessário pré-assumir que as frequências se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg dado que a técnica empregada para a tipificação dos genes *KIR* não consegue distinguir entre um indivíduo homocigoto para a presença de um mesmo loco daquele hemizigótico para a presença desse loco. A frequência genotípica (FG) foi calculada pela fórmula $FG = 1 - \sqrt{1 - FPG}$, que foi derivada a partir da frequência portador do gene (FPG) = frequência (F)% / 100 (Single RM et al., 2007).

6. Resultados

6.1 Características epidemiológicas da população estudada (indivíduos com e sem recidiva)

A Tabela 6.1 resume as principais características epidemiológicas da população. Participaram do presente estudo 101 indivíduos, dos quais 56,4% pertenciam ao sexo masculino. A média de idade foi de 32 anos (DP=11). Quanto à naturalidade, a maioria dos indivíduos (91%) era natural do estado do Rio de Janeiro.

Os indivíduos foram acompanhados por diferentes períodos, e a maioria (92/91%) teve um acompanhamento superior a dois anos. Cabe ressaltar que 46 indivíduos (45,5%) foram acompanhados por mais de 4 anos (Figura 6.1). Quanto ao número de episódios de recidiva, houve variação entre 1 e 5 episódios, 33 indivíduos (32,7%) tiveram um episódio de recidiva, 18 (17,8%) apresentaram 2 episódios, 5 (4,9%) apresentaram 3 episódios e 2 (2%) tiveram 5 episódios de recidiva durante o período de acompanhamento (Tabela 6.1).

Tabela 6.1: Principais características epidemiológicas de pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ.

Características Epidemiológicas		
Gênero	Masculino (N/%)	57/56,4
	Feminino (N/%)	44/43,6
	Total (N)	101
Idade ($\bar{x} \pm DP$)		32 \pm 11
Tempo de Acompanhamento dos indivíduos	até 1 ano (N/%)	1/1
	mais de 1 até 2 anos (N/%)	8/7,9
	mais de 2 até 3 anos (N/%)	18/17,8
	mais de 3 até 4 anos (N/%)	28/27,7
	mais de 4 até 5 anos (N/%)	45/44,6
N recidivas	mais de 5 até 6 anos (N/%)	1/1
	0 (N/%)	43/42,6
	1(N/%)	33/32,7
	2(N/%)	18/17,8
	3(N/%)	5/4,9
Tempo em dias entre os episódios de recidiva	5(N/%)	2/2
	md (IQR: 25% - 75%)	491(240 - 731)
Procedência	Rio de Janeiro (N/%)	92/91,1
	Outros estados* (N/%)	9/8,9

\bar{x} :média; DP: desvio padrão; md: mediana; IQR: intervalo interquartil; N: número de indivíduos; * Alagoas, Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba e Rio Grande do Sul.

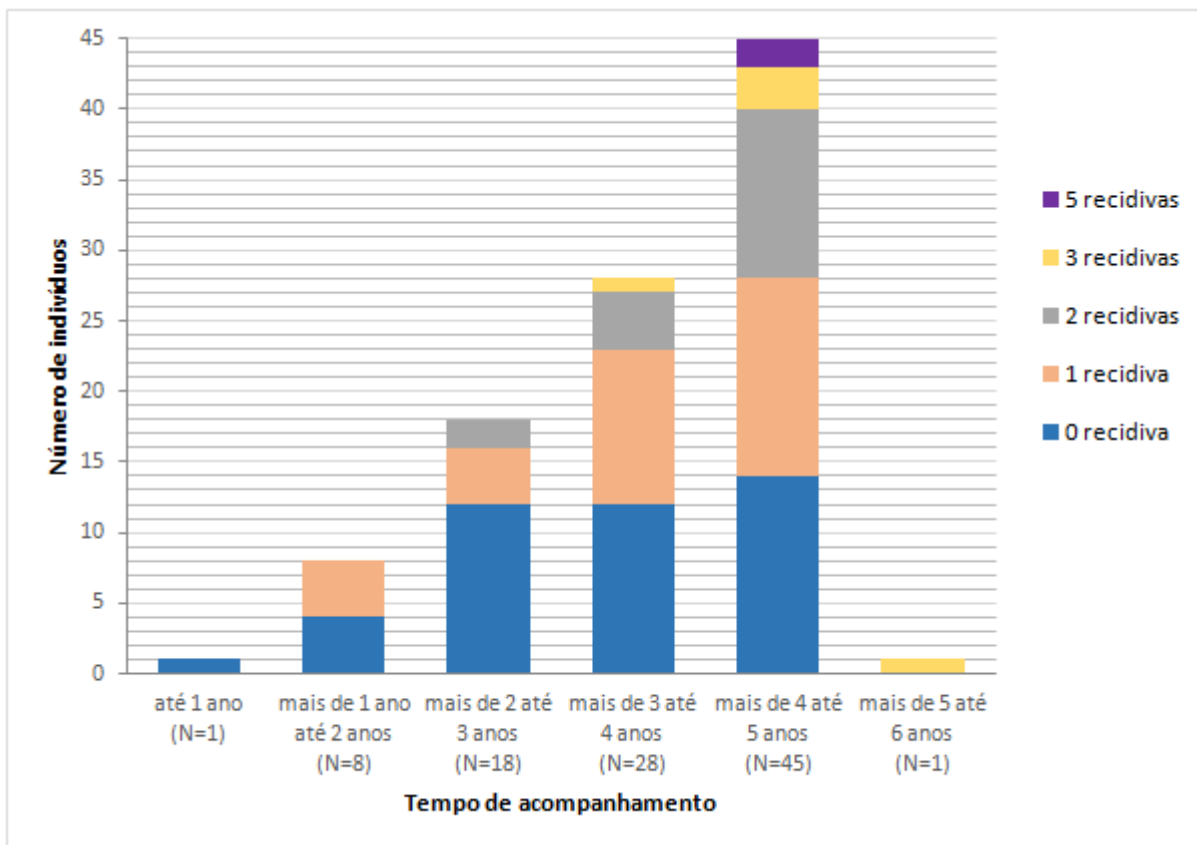


Figura 6.1: Tempo de acompanhamento e quantidade de episódios de recidiva nos pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ. N: número de indivíduos.

6.2 Análise da presença dos genes *KIR* na população

A Tabela 6.2 contém os dados referentes à distribuição das frequências de genes *KIR* (F%). Todos os 16 genes *KIR* investigados (14 genes e 2 pseudogenes) foram detectados na população em estudo, e os genes estruturais *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* e *KIR3DP1* estavam presentes em todos os indivíduos.

Dentre os genes que codificam receptores *KIR* inibidores ou ativadores, o gene mais frequente foi o *KIR3DL1*, presente em 99% da população; seguido do *KIR2DL1* (98%) e do *KIR2DS4* e *KIR2DP1* (ambos com 97%).

No geral, as frequências dos genes que codificam receptores *KIR* inibidores foram maiores que 90%, exceto pelos genes *KIR2DL2* e *KIR2DL5* (ambos com 54,5%). Por outro lado, a frequência dos genes que codificam receptores ativadores variou de 19,8% a 51,5%, com exceção do *KIR2DS4* frequente em 97% da população.

Tabela 6.2: Distribuição das frequências dos genes *KIR* em pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ.

Genes <i>KIR</i>	(N)	F%	Frequência Genotípica
INIBIDORES			
<i>KIR2DL1</i>	99	98	0,858
<i>KIR2DL2</i>	55	54,5	0,325
<i>KIR2DL3</i>	93	92,1	0,718
<i>KIR2DL5</i>	55	54,5	0,325
<i>KIR3DL1</i>	100	99	0,900
ATIVADORES			
<i>KIR2DS1</i>	41	40,6	0,229
<i>KIR2DS2</i>	52	51,5	0,303
<i>KIR2DS3</i>	20	19,8	0,104
<i>KIR2DS4</i>	98	97	0,826
<i>KIR2DS5</i>	42	41,6	0,235
<i>KIR3DS1</i>	35	34,7	0,191
ESTRUTURAIIS			
<i>KIR2DL4</i>	101	100	1
<i>KIR3DL2</i>	101	100	1
<i>KIR3DL3</i>	101	100	1
^A <i>KIR3DPI</i>	101	100	1
PSEUDOGENE			
<i>KIR2DPI</i>	98	97	0,826

N: número de indivíduos; F%: frequência dos genes *KIR*; ^A:gene estrutural e pseudogene.

6.3 Perfil genético dos receptores KIR

Os genótipos *KIR* da população estudada estão descritos na Tabela 6.3. Dentre os 101 indivíduos participantes do estudo, um total de 25 diferentes genótipos *KIR* foi identificado. Todos os genótipos encontrados estão descritos no banco de dados público *Allele frequencies* (disponível em www.allelefrequencies.net).

A população foi classificada de acordo com o haplogrupos (A e B) existentes para os genes *KIR*. O haplogrupo B foi denominado Bx em virtude da falta de distinção entre o haplótipo AB e BB. O haplogrupo Bx foi o mais frequente (68,3%) enquanto que o haplogrupo AA estava presente em 31,7% da nossa população.

Quanto aos genótipos, o mais frequente foi o 1 (31,7%) seguido dos genótipos 4, 2 e 3 (11,9%, 10,9% e 7,9%, respectivamente). Dentre os 25 genótipos encontrados, mais da metade (14 genótipos) estavam em baixa frequência, ou seja, presentes em apenas 1% da população.

Tabela 6.3: Perfil genotípico do *KIR* de pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ.

ID Genótipo	KIR Inibidor									KIR Ativador					Pseudogenes		Haplótipo	Total		
	2DL					3DL				2DS					3DS	2DP		3DP	N	%
	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	4	5	1	1	1				
1	■		■	■		■	■	■				■			■	■	AA	32	31,7	
2	■																Bx	11	10,9	
3																	Bx	8	7,9	
4					■												Bx	12	11,9	
5																	Bx	6	5,9	
6																	Bx	5	5	
7																	Bx	4	4	
9																	Bx	2	2	
18																	Bx	1	1	
20																	Bx	2	2	
21																	Bx	3	3	
24																	Bx	1	1	
28	■																Bx	1	1	
32	■																Bx	1	1	
72		■		■													Bx	1	1	
73	■																Bx	1	1	
79	■		■														Bx	1	1	
86																	Bx	1	1	
90																	Bx	2	2	
92																	Bx	1	1	
106		■															Bx	1	1	
112	■																Bx	1	1	
184																	Bx	1	1	
188																	Bx	1	1	
237																	Bx	1	1	
N	99	55	93	101	55	100	101	101	41	52	20	98	42	35	98	101		101	100	
%	98	54,5	92,1	100	54,5	99	100	100	40,6	51,5	19,8	97	41,6	34,7	97	100				

ID: Identificação do genótipo segundo o allelefrequencies.net; N: número de indivíduos positivos. Os retângulos cinza- escuros indicam a presença do gene, os retângulos cinza-claros representam os genes estruturais e os retângulos brancos indicam ausência do gene.

6.4 Análise das Distâncias Genéticas

A fim de estabelecer uma inter-relação entre os padrões genéticos do KIR encontrados na nossa população de estudo com os de outras populações do mundo realizamos a construção do dendograma Neighbour-Joining. Utilizamos informações depositadas no banco de dados *Allele Frequencies Net Database* (<http://www.allelefrequencies.net>) e comparamos a frequência gênica encontradas no presente estudo com outras 61 populações distribuídas em 3 continentes, tais como: Europa, América (Norte, Central e Sul), Ásia (Ocidental, nordeste, sudeste e sul) e África (região Sub-Sahariana) (Figura 6.2).

Podemos observar que a população do presente estudo (BrRJToxo) proveniente, na sua maioria, de indivíduos naturais do Rio de Janeiro estava próxima de duas populações brasileiras (BrPV e BrRJ), uma população latino-americana (VenM), algumas populações do continente americano (USACAA, USACH, USAC) e uma população da Europa (EngPOP5).

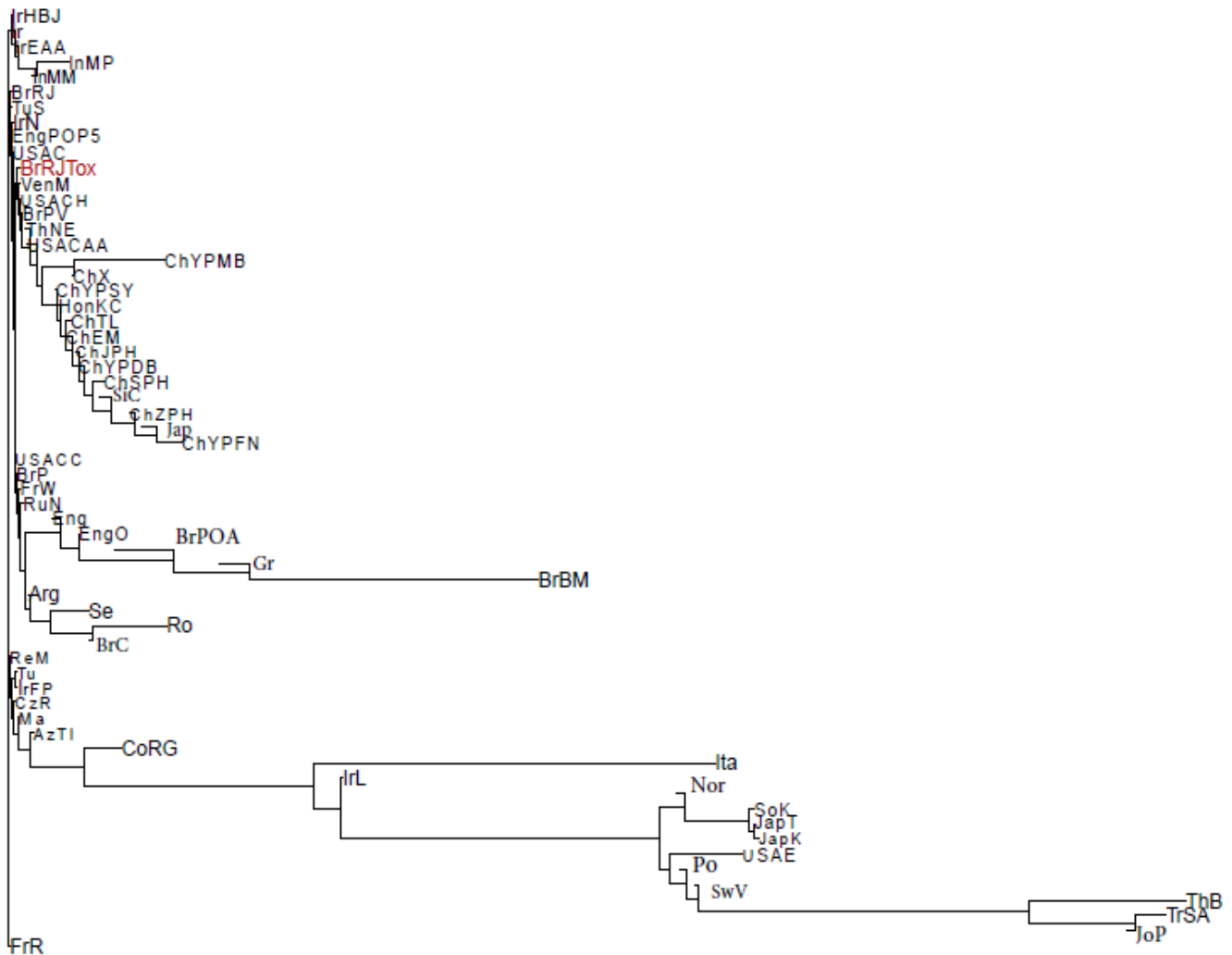


Figura 6.2: Dendrograma construído a partir das distâncias genéticas Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) com base em frequências de genes *KIR* para 62 populações em todo o mundo, incluindo a nossa população de estudo. Sigla das populações: Arg - Argentina *KIR*; AzTI - Azores Terceira Island *KIR*; BrBM - Brazil Belem Mixed *KIR*; BrC - Brazil Curitiba; BrP - Brazil Parana Mixed *KIR*; BrPOA - Brazil Porto Alegre Caucasian *KIR*; BrRJ - Brazil Rio de Janeiro Mixed *KIR*; BrPV - Brazil Porto Velho *KIR*; BrRJTox - Brazil Rio de Janeiro Toxo; ChEM - China Eastern Mainland Han *KIR*; ChJPH - China Jiangsu Province Han *KIR*; ChSPH - China Shaanxi Province Han *KIR*; ChTL - China Tibet Lhasa *KIR*; ChX - China Xinjiang Region Urumqi Uygur *KIR*; ChYPDB - China Yunnan Province Dali Bai *KIR*; ChYPFN - China Yunnan Province Fugong Nu *KIR*; ChYPMB - China Yunnan Province Menghai Bulang *KIR*; ChYPSY - China Yunnan Province Sunan Yugu *KIR*; ChZPH - China Zhejiang Province Han *KIR*; CoRG - Costa Rica Guanacaste *KIR*; CzR - Czech Republic *KIR*; Eng - England *KIR*; EngPOP5 - England *KIR* pop 5; EngO - England Oxfordshire *KIR*; FrR - France Reims *KIR*; FrW - France West *KIR*; Gr - Greece *KIR*; HonKC - Hong Kong Chinese *KIR*; InMM - India Mumbai Maharashtrian *KIR*; InMP - India Mumbai Parsi *KIR*; IrEAA - Iran East Azerbaijan Azerbaijani *KIR*; IrFP - Iran Fars Persian *KIR*; IrHBJ - Iran Hormozgan and Balochistan Jonobi *KIR*; Ir - Iran *KIR*; IrL - Iran Lur *KIR*; IrN - Iran Northern *KIR*; Ita -

Italy KIR; Jap - Japan KIR pop 3; JapK - Japan Kyoto KIR; JapT - Japan Tokyo KIR; JoP - Jordan Palestine KIR; Ma - Macedonia KIR; Nor - Norway KIR; Po - Poland KIR; ReM - Réunion Mixed KIR; Ro - Romania KIR; RuN - Russia Northwest pop 3 KIR; Se - Senegal KIR; SiC - Singapore Chinese KIR pop 2; SoK - South Korea KIR; SwV - Sweden Vasterbotten KIR; ThB - Thailand Bangkok KIR; ThNE - Thailand North East; TrSA - Trinidad South Asians KIR; Tu- Turkey KIR pop 2; TuS - Turkey South KIR; USACAA - USA California Asian American KIR; USACC - USA California Caucasians KIR; USACH - USA California Hispanic KIR; USAC - USA Caucasian KIR; USAE - USA Eastern KIR; VenM - Venezuela Mestizo KIR.

6.5 Análises comparativas dos indivíduos com recidiva versus indivíduos sem recidiva.

A fim de investigar a possível influência dos genes *KIR* na recidiva de toxoplasmose ocular após episódio ativo, o grupo recidiva foi comparado ao grupo sem recidiva.

6.5.1 Características epidemiológicas dos indivíduos com recidiva

Ao considerar os indivíduos que tiveram recidiva, o gênero masculino também foi predominante, havia 34 homens (58,6%) e 24 (41,4%) de mulheres. Totalizando um grupo composto por 58 pessoas. A média de idade deste grupo foi de 34 anos (DP=11). Em relação ao tempo de acompanhamento, a maioria (54/93%) teve acompanhamento superior a dois anos, sendo 55,2% (32 indivíduos) acompanhados por mais de 4 anos.

6.5.2 Características epidemiológicas dos indivíduos sem recidiva

O grupo sem recidiva inicialmente era composto por 43 indivíduos. No entanto, 5 (cinco) indivíduos foram acompanhados por período inferior a 2 anos. Desta forma, o grupo sem recidiva resultou em 38 indivíduos. Desses, 52,6% (20 indivíduos) eram homens e 47,4 % (18 indivíduos) mulheres, com média de idade de 30 anos (DP=10). Quanto ao tempo de acompanhamento, a maioria 68,48% (26 indivíduos) foi acompanhada mais de 3 anos.

6.6 Análise da presença dos genes *KIR* nos indivíduos com e sem recidiva

A tabela 6.4 contém os dados referentes à distribuição das frequências de genes *KIR* (N/F%) nos indivíduos com e sem recidiva. Quando avaliamos se havia diferenças significativas quanto às frequências dos genes *KIR* entre os indivíduos que apresentaram recidiva e os que não

apresentaram recidiva, observamos que dentre os 16 genes *KIR* estudados, o gene inibidor *KIR2DL2* e o gene ativador *KIR2DS2* estavam mais frequentes nos indivíduos sem recidiva quando comparados aos indivíduos que apresentaram recidiva (P=0,03 e P= 0,02, respectivamente). Em nossa população a presença desses genes está, em sua maioria, em coexistência (49 dos 52 indivíduos que eles existem).

Tabela 6.4: Distribuição das frequências dos genes *KIR* nos indivíduos com e sem recidiva atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ.

Receptores KIR	Indivíduos com Recidiva(N= 58) N/%	Indivíduos sem Recidiva (N= 38) N/%	Valor de P
Inibidores			
<i>KIR2DL1</i>	57/98,3	37/97,3	1
<i>KIR2DL2</i>	26/45,0	26/68,4	0,03
<i>KIR 2DL3</i>	53/91,4	35/92,1	1
<i>KIR 2DL5</i>	33/57,0	20/53,0	0,8
<i>KIR 3DL1</i>	58/100,0	37/97,3	0,3
Ativadores			
<i>KIR2DS1</i>	26/45,0	14/37,0	0,5
<i>KIR2DS2</i>	24/41,4	25/66,0	0,02
<i>KIR2DS3</i>	18/31,0	8/21,0	0,3
<i>KIR2DS4</i>	57/ 98,3	36/95,0	0,5
<i>KIR2DS5</i>	26/45,0	15/39,0	0,6
<i>KIR3DS1</i>	21/36,2	13/34,2	1
Estruturais			
<i>KIR2DL4</i>	58/100,0	38/100,0	-
<i>KIR3DL2</i>	58/100,0	38/100,0	-
<i>KIR3DL3</i>	58/100,0	38/100,0	-
<i>KIR3DP1</i>	58/100,0	38/100,0	-
Pseudogene			
<i>KIR2DP1</i>	56/96,5	37/97,36	1

N: número de indivíduos; %: frequência dos genes KIR.

6.7 Perfil genético dos receptores KIR nos indivíduos com e sem recidiva

Para verificar possíveis particularidades na distribuição genotípica da população estudada em relação à recidiva, comparamos os genótipos dos indivíduos com e sem recidiva. Observamos que dentre os 25 genótipos encontrados na população, a maioria estava presente apenas no grupo com recidiva (13/52%), enquanto que 5 (20%) estava presente apenas nos indivíduos sem recidiva e 7 (28%) foram encontrados tanto no grupo com recidiva quanto no sem recidiva (Figura 6.3).

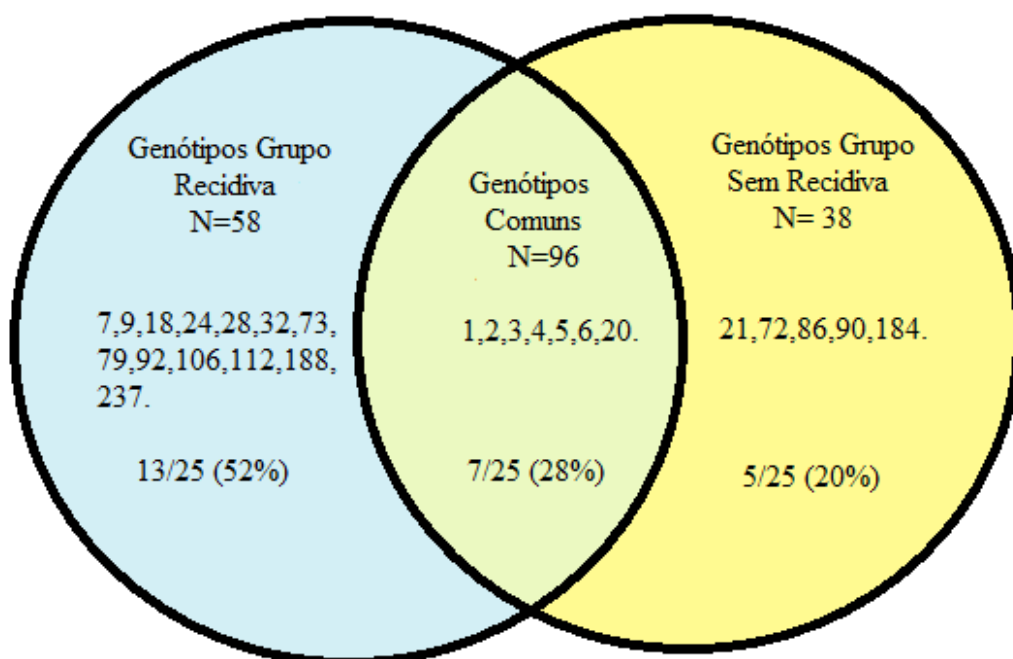


Figure 6.3: Diagrama de Venn identificando os perfis genotípicos de *KIR* de pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ (n=96), nos grupos com e sem recidiva. N: número de indivíduos.

No grupo recidiva o genótipo 1 (36,3%) foi o mais frequente, seguido do genótipo 2 (13,8%). Por sua vez, no grupo sem recidiva, os genótipos mais frequentes foram o genótipo 1 e 4, que tiveram frequências bem semelhantes (23,7% e 21%, respectivamente) (Figura 6.4).

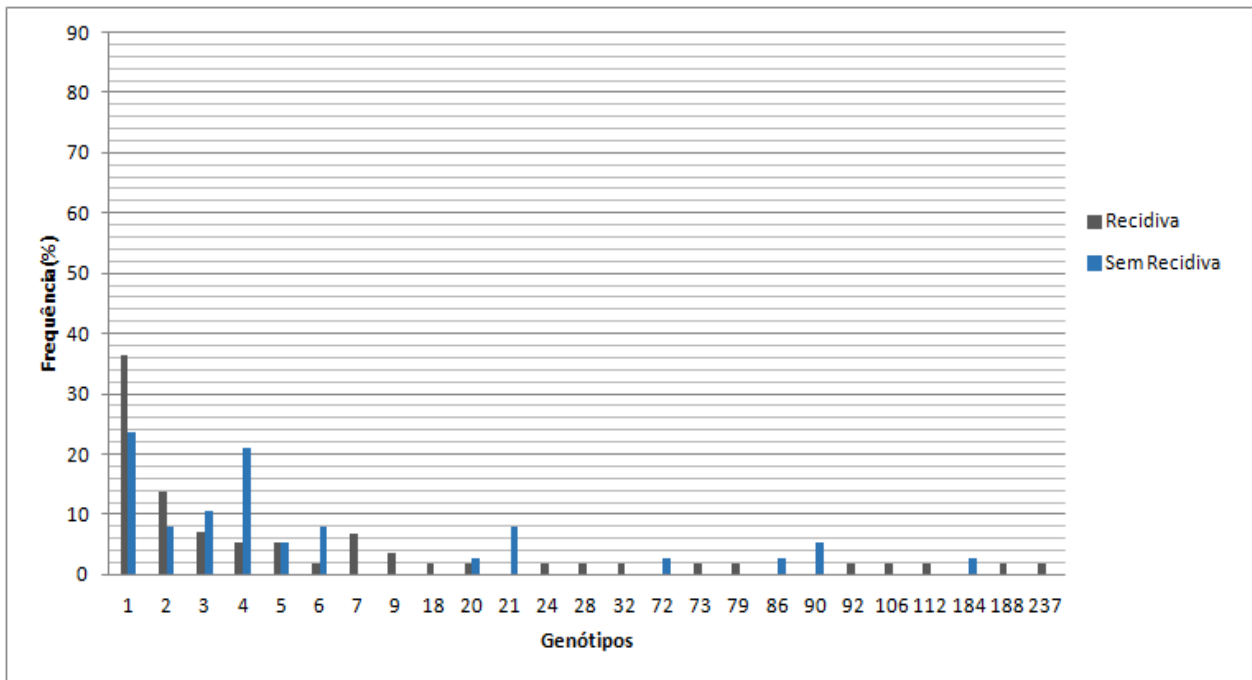


Figura 6.4: Distribuição dos genótipos nos indivíduos com e sem recidiva atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ.

6.8 Análise entre a média ponderada dos genes *KIR* Inibidores e Ativadores nos grupos dos indivíduos com e sem recidiva

Com a finalidade de avaliarmos se a média ponderada de genes inibidores e ativadores, presentes nos genótipos encontrados na nossa população, estaria associada com a ocorrência de recidivas, utilizamos a seguinte fórmula $MP = [(n^\circ \text{ATIV} * 5) - (n^\circ \text{INIB} * 3)]$. Através desse cálculo, verificamos que a média ponderada negativa pertence aos indivíduos com menor proporção de genes ativadores (entre 1 a 4 genes, N=75), enquanto que a média ponderada positiva está presente nos indivíduos com maior proporção de genes ativadores (entre 4 a 6 genes, N= 21). Observamos que a maioria apresentou média ponderada negativa, ou seja, apresentavam em seu genótipo de 1 a 4 genes *KIR* ativadores (78%; $P < 0,01$).

Também observamos que dentre os indivíduos com média ponderada negativa, ou seja, com menor proporção de genes *KIR* ativadores a maioria pertencia ao grupo dos indivíduos com recidiva (62,7%; $P = 0,003$) (Tabela 6.5). Enquanto que dentre os indivíduos com média ponderada positiva, ou seja, como maior proporção de genes *KIR* ativadores, as frequências foram semelhantes entre os grupos.

Tabela 6.5: Média ponderada dos genes *KIR* Inibidores e Ativadores nos grupos dos indivíduos com e sem recidiva atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ.

Média ponderada	Indivíduos		Valor de P
	Com recidiva (58) (N/%)	Sem recidiva (38) (N/%)	
Negativa (entre 1 a 4 genes ativadores)	47/62,7	28/37,3	0,003
Positiva (entre 4 a 6 genes ativadores)	11/52,4	10/47,6	1

N: número de indivíduos; %: frequência dos genes *KIR*.

Cabe ressaltar, que a distinção entre média ponderada negativa e positiva ocasionou a divisão entre os genótipos, ou seja, os genótipos presentes nos indivíduos com média ponderada negativa, não são os mesmos presentes nos indivíduos com média ponderada positiva. Desta forma, a média ponderada negativa apresentou maior variabilidade de genótipos (18/25) do que a média ponderada positiva (7/25). A distribuição dos genótipos de acordo com a média ponderada, bem como, suas frequências nos grupos podem ser observadas na tabela 6.6.

Tabela 6.6 Distribuição dos genótipos entre os indivíduos a partir da média ponderada, nos grupos dos indivíduos com e sem recidiva de pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, RJ.

Média Ponderada	ID Genótipo	N de genes inibidores	N de genes ativadores	Recidiva (58) (N/%)	Sem Recidiva (38) (N/%)
Negativa	1	6	1	21/44,7	9/32,1
	2	7	4	8/17	3/10,7
	4	7	2	3/6,4	8/28,6
	5	8	3	3/6,4	2/7,1
	9	8	4	2/4,2	
	18	8	4	1/2,1	-
	20	8	2	1/2,1	1/3,6
	21	8	3	-	3/10,7
	24	8	4	1/2,1	-
	28	7	4	1/2,1	-
	32	7	2	1/2,1	-
	72	5	2	-	1/3,6
	79	7	3	1/2,1	-
	92	7	4	1/2,1	-
	112	7	4	1/2,1	-
	184	8	4	-	1/3,6
	188	7	2	1/2,1	-
237	7	4	1/2,1	-	
				N= 47	N=28
Positiva	3	8	5	4/36,4	4/40
	6	8	6	1/9,1	3/30
	7	8	5	4/36,4	-
	73	7	6	1/9,1	-
	86	7	5	-	1/10
	90	7	5	-	2/20
	106	6	4	1/9,1	-
				N=11	N=10

N: número de indivíduos; %: frequência dos genótipos de KIR.

7. Discussão

Dado o papel de KIR na resposta imune e sua extensa diversidade genômica, é concebível que a variação dos genes *KIR* afeta a resistência e/ou susceptibilidade a patogênese de diversas doenças, e como tal, eles se tornaram um alvo atraente para os estudos de associação. Além disso, a caracterização dos perfis genéticos de *KIR* em indivíduos com toxoplasmose ocular torna este estudo pioneiro. Desta forma, no presente estudo nós caracterizamos o perfil das frequências gênicas dos 16 genes que codificam os receptores KIR, em pacientes com toxoplasmose ocular após episódio ativo. Além disso, buscamos identificar uma possível associação entre esses genes e a ocorrência de recidiva de toxoplasmose ocular.

Na análise epidemiológica de nossa população, os dados demonstram que, dos 101 indivíduos que participaram do estudo, mais de 90% são naturais do Rio de Janeiro; apresentaram idade média de 32 anos, não havendo diferenças significativas entre os gêneros e a idade. Apesar de não termos evidenciado diferenças entre as médias de idade nos grupos, o impacto da idade do paciente na severidade da TO tem sido debatido por décadas. A idade do paciente no primeiro episódio sintomático de TO é semelhante em muitos estudos (Maenz *et al.*, 2014). Vários centros de pesquisa europeus relataram uma média de idade entre 25 e 31 anos no primeiro episódio sintomático (Friedmann e Knox, 1969; Gilbert *et al.*, 1999; Bosch-Driessen *et al.*, 2002). No passado, Silveira e colaboradores (1988), observaram que, no Sul do Brasil, as maiores taxas de TO são encontradas em adultos jovens. Contudo, esses achados diferem dos encontrados por Portela e colaboradores (2004) e Dubey (2012) que verificaram que a idade mais avançada foi um fator de risco para a TO.

A quantidade de recidivas variou entre 1 a 5 episódios, sendo a mediana do intervalo entre cada episódio de 491 dias. Em relação ao período de acompanhamento, 91% dos 101 participantes foram acompanhados por mais de 2 anos. Estabelecemos como critério para ser considerado sem recidiva, o cálculo da mediana adicionada à 25%, como o tempo mínimo de acompanhamento. Tempo esse que corrobora o encontrado por Reich e cols. (2014), Rothova (2003) e Bosch-Driessen (2002) que observaram que o risco de recorrência da toxoplasmose ocular é maior durante os dois primeiros anos após um episódio ativo, do que nos anos seguintes.

Cabe ressaltar, que os indivíduos acompanhados entre 4 e 5 anos apresentaram heterogeneidade quanto ao número de recidiva, sendo este intervalo de tempo que apresentou a maior número tanto de indivíduos que recidivaram quanto de indivíduos que não recidivaram. Tal fato nos indica que a ausência de recidiva observada na maioria no 38 indivíduos da nossa população, não foi devido ao pouco tempo de acompanhamento.

Na análise do perfil das frequências gênicas dos receptores *KIR* na população de estudo observamos que os genes *KIR3DL1*, *KIR2DL1*, *KIR2DS4*, *KIR2DP1* foram os mais prevalentes (acima de 97%). Essas altas frequências são similares às encontradas em outras populações brasileiras como: Belém, Curitiba, Mato Grosso, Paraná, Rio de Janeiro e Porto Velho (Pedroza *et al.*, 2011; Augusto *et al.*, 2012 a e b; Franceschi *et al.*, 2008; Single *et al.* 2007, Perce da Silva *et al.*, 2015).

As frequências dos genes que codificam receptores inibidores foram maiores que as frequências que dos genes ativadores; inibidores, a maioria acima de 90%, enquanto que os ativadores ficaram entre 20% a 51%. Esta alta frequência de genes inibidores está de acordo com as frequências de outras populações espalhadas pelo mundo, conforme o banco de dados *Allele frequencies*, e com o fundamento de regulação da atividade citotóxica das células NK (Almeida, 2011). Visto que, para que haja a tolerância de antígenos próprios o quantitativo de genes inibidores deve ser maior que o de ativadores (Davis e Rizzieri 2015). No banco de dados *Allele frequencies* é possível observar alguns genótipos que não possuem nenhum gene *KIR* ativador, enquanto que o contrário, ou seja, genótipo com nenhum gene *KIR* inibidor nunca foi evidenciado, reforçando a importância evolutiva da manutenção de uma maior frequência de genes *KIR* inibidores (Augusto e Petzl-Erler, 2015).

O *KIR2DS4* é o único gene que codifica um receptor ativador que apresenta alta frequência (<http://www.allelefrequencies.net/kir6006a.asp>). Em nossa população sua frequência foi de 97% e em 32 indivíduos (32,6%) ele é o único gene ativador presente. A presença do *KIR2DS4* como o único gene ativador do repertório genético do indivíduo é característica do genótipo 1, o único genótipo representante do haplótipo AA na nossa população. Cabe ressaltar que embora o gene *KIR2DS4*, com uma certa frequência, seja o único ativador no genótipo de um indivíduo, há versões mutadas do *KIR2DS4* que não serão expressas na membranas, mas sim permanecerão solúveis, enquanto que a versão selvagem desse gene, será expressa na superfície das membranas celulares (Vendelbosch *et*

al. 2015). Considerando que o haplogrupo A é muito frequente na maioria das populações estudadas e a ocorrência da versão mutada do *KIR2DS4*, há a possibilidade que indivíduos não apresentem genes ativadores funcionais em seu repertório KIR (Vendelbosch *et al.* 2015). Além disso, como em nossa população o genótipo 1 foi mais frequente nos indivíduos que recidivaram, podemos sugerir que a versão do gene encontrada nesses indivíduos pode ser a versão mutada.

Genótipos *KIR* são um conjunto de genes *KIR* encontrados em uma pessoa e são considerados marcadores mais informativos na diferenciação entre grupos étnicos do que as frequências gênicas (Osman *et al.*, 2014). Diversos trabalhos demonstram que as frequências genotípicas podem variar enormemente entre as populações, como resultado de diferentes pressões seletivas, além da deriva genética, do fluxo gênico e dos efeitos gargalo e fundador. (Shi *et al.*, 2011). Atualmente há 571 perfis genotípicos descritos no banco de dados *Allele Frequencies* (<http://www.allelefrequencys.net/kir6001a.asp>). Nosso estudo permitiu identificar 25 genótipos já descritos. Dentre os genótipos identificados, observamos uma maior frequência dos genótipos 1 (31,7%), 4 (11,9%), 2 (10,9%) e 3 (7,9%). Os genótipos identificados apresentam distribuição cosmopolita, contudo as frequências variam inter e intrapopulações (Rudnick *et al.*, 2008; Ewerton *et al.*, 2007). A essas variações podem estar relacionadas fatores demográficos e/ou evolutivos (Augusto *et al.*, 2013).

Segundo Dunphy e colaboradores (2015) a célula NK não necessariamente expressa todos os genes *KIR* ao mesmo tempo, nem em todas as populações clonais, e a coexpressão de um subconjunto de genes codificantes pode ocorrer de forma aleatória. Desta forma, nem todas as células NK do organismo apresentam os mesmos receptores, entretanto, o repertório de receptores *KIR* expressos por um indivíduo depende diretamente dos genes *KIR* herdados. Considerando este aspecto, verificamos que em nossa população o número de genes *KIR* por perfil variou entre 8 a 16 genes e, conforme o esperado, a quantidade de genes *KIR* inibidores foi mais abundante que a de *KIR* ativadores. Dentre os 25 perfis caracterizados, o mais diversificado foi o genótipo 6. Esse perfil é definido por possuir todos os genes *KIR* descritos, incluindo os pseudogenes, permitindo que a célula NK tenha disponíveis genes para codificar todos os receptores KIR. Encontramos esse perfil em baixa frequência, representando 5% da população (5 indivíduos). Segundo estudos anteriores, cujos dados compõem o banco de dados *Allele frequencies*, a frequência do

perfil 6 se mantém baixa em várias partes do mundo e apresenta distribuição cosmopolita (Davis e Rizzieri 2015).

Em nossa população, quatro perfis genotípicos (ID 1 a 4) representam cerca de 62% da diversidade encontrada, enquanto que mais da metade (14 perfis - 56%) possui apenas um indivíduo como representante. Este resultado está de acordo com estudos realizados em outras populações brasileiras e pode ser reflexo da nossa história demográfica (Augusto *et al.*, 2015).

Os genótipos 1,4,2 e 3 foram os mais frequentes em nossa população. De acordo com os dados do *Allele frequencies*, este resultado está de acordo com o encontrado em outras regiões geográficas, visto que, estes genótipos foram os primeiros a serem descritos. Comparando com os dados do *Allele frequencies*, as frequências dos perfis genotípicos 1, 2, 4 e 3 na nossa população foram semelhantes as observadas nas Américas (Norte, Central e Sul), corroborando os achados obtidos através de estudos utilizando marcadores clássicos, bem como DNA mitocondrial, que explicam a história demográfica humana do continente americano.

Objetivando encontrar uma inter-relação, com base nas frequências dos genes *KIR*, entre a população de pacientes atendidos no ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz (RJ) e outras populações do globo realizamos a análise das distâncias genéticas entre populações e construímos o dendrograma neighbor-joining. Essa análise revelou um agrupamento dos nossos pacientes (BrRJToxo) proveniente, na sua maioria, do Rio de Janeiro com populações do Rio de Janeiro, Porto Velho e de países do continente Americano. Esses dados, também, refletem a mistura étnica existente em nossa população e, também, o processo de colonização deste país (Augusto *et al.*, 2012; Rivero *et al.*, 2013).

A fim de investigar a possível influência dos genes *KIR* na recidiva de toxoplasmose ocular após episódio ativo, o grupo recidiva foi comparado ao grupo sem recidiva. Na análise epidemiológica dos grupos, observamos que os parâmetros sexo e idade foram homogêneos entre os mesmos ($P > 0,05$). Em relação ao tempo de acompanhamento, mais da metade (55%) dos indivíduos do grupo recidiva foram acompanhados por mais de 4 anos, enquanto que, no grupo sem recidiva, a maioria (68,5%) dos indivíduos foi acompanhada mais de 3 anos.

Quando avaliamos se havia diferenças significativas quanto às frequências dos genes *KIR* entre os grupos recidiva e sem recidiva observamos que o gene inibidor *KIR2DL2* e o gene ativador *KIR2DS2* estavam mais frequentes nos indivíduos sem recidiva do que nos indivíduos com recidiva ($P=0,03$ e $P= 0,02$, respectivamente). Além disso, em nossa população, a presença desses genes está, em sua maioria, em coexistência (49 dos 52 indivíduos que eles existem). Os genes *KIR2DL2* e *KIR2DS2* estão em forte desequilíbrio de ligação na maioria das populações em todo o mundo, incluindo as de origem africana (Denis et al., 2005; Single et al., 2007; Yindom et al., 2010). Devido a este forte desequilíbrio de ligação existente entre os dois loci é difícil separar o efeito de um locus do outro. Ou seja, é difícil determinar qual deles está realmente mediando o efeito (Yindom et al., 2011). O gene inibidor *KIR2DL2* e o seu correspondente ativador *KIR2DS2* já foram associados a outras doenças. Foram associados com a redução do risco do desenvolvimento de leucemia mieloide crônica, na presença de ambos os genes juntamente com seus respectivos ligantes HLA-C, (Middleton et al., 2009). Em contrapartida, um estudo determinou e comparou as frequências dos genes *KIR* de crianças com malária grave ou malária não complicada com controles saudáveis da mesma área, e verificou que as frequências de ambos os genes foram significativamente maiores nos casos de malária (grave ou não complicada) do que nos controles, sugerindo que os portadores de *KIR2DL2* + *C1* e / ou *KIR2DS2* + *C1* tinham mais risco de serem infectados com parasitas da malária do que aqueles sem qualquer um destes genótipos (Yindom et al., 2011). A ausência de ambos os genes tem sido associada com a resistência à infecção com vírus tipo 1 do herpes simples (HSV-1) (Estefania et al., 2007). Enquanto que a presença de *KIR2DS2* na ausência dos seus ligantes específicos tem sido associada com um aumento da susceptibilidade à artrite psoriática (Martin et al., 2002). Como em nossa população ambos os genes estavam mais frequentes no grupo sem recidiva, podemos sugerir que o gene inibidor *KIR2DL2* juntamente com o ativador *KIR2DS2* podem estar atuando como marcadores de proteção à recidiva de toxoplasmose ocular na população de estudo.

Os perfis genotípicos também foram agrupados e avaliados nos grupos recidiva ou sem recidiva, com a finalidade de verificarmos possíveis particularidades na distribuição genotípica da população estudada em relação à recorrência. Observamos que, o grupo recidiva, apresentava uma maior variabilidade de genótipos (20/25) e que um grande número desses genótipos (13/25) só ocorria nesse grupo. No grupo sem recidiva, além da

menor variabilidade genotípica (12/25) apenas 5 genótipos só ocorriam nesse grupo. O genótipo 4 junto com o genótipo 1 foram os mais frequentes nesses indivíduos. Vale ressaltar que a diferença entre esses perfis é a presença do gene inibidor *KIR2DL2* e do gene ativador *KIR2DS2*. No entanto, nenhuma tendência de associação foi encontrada entre o genótipo apresentado e a condição recidiva ou sem recidiva.

Como as células NK podem expressar em suas superfícies de um a todos os genes *KIR* presentes em seu genótipo e, considerando que o repertório *KIR* de um indivíduo depende diretamente dos genes *KIR* herdados, a variação do conteúdo gênico e a diversidade alélica dos genes *KIR* podem afetar a função e o nível de especificidade e sensibilidade das células NK (Rempel et al., 2011). Neste contexto, avaliamos se a variação da proporção entre genes *KIR* inibidores e ativadores, presentes nos genótipos de nossa população, poderia ser indicadores de recorrência de toxoplasmose ocular. Para tanto, calculamos a média ponderada dos genes *KIR* inibidores e ativadores, que fez a distinção entre os indivíduos que possuíam maior ou menor proporção de genes *KIR* ativadores e comparamos entre os grupos recidiva e sem recidiva..

Na análise das frequências dos genes ativadores na população estudada observamos que a maioria dos indivíduos (78%) possui menor proporção de genes *KIR* ativadores (entre 1 a 4 genes ativadores) ($P < 0,01$). Tal fato pode ser reflexo da alta frequência genótipo 1, visto que, neste genótipo o único gene ativador é o *KIR2DS4*. Além disso, o resultado observado está de acordo com princípio para a manutenção da homeostase da resposta imune (Almeida *et al.*, 2011; Davis e Rizzieri 2015).

Quanto à distribuição dos indivíduos que apresentaram menor proporção de genes ativadores, observamos que a maioria pertencia ao grupo dos indivíduos com recidiva (62,7%; $P = 0,003$). Tal achado está de acordo com fundamento para o equilíbrio da resposta imune, visto que, é o balanço entre os sinais de inibição e ativação que regula a função das células NK e protege ou predispõe um indivíduo a doenças (Almeida *et al.*, 2011; Hoteit *et al.*, 2014; Hoteit *et al.* 2015) e nos permite sugerir que a menor proporção de genes *KIR* ativadores pode estar associada a susceptibilidade, uma vez que, os indivíduos com recidiva apresentaram menos genes ativadores.

A distinção entre média ponderada negativa e positiva ocasionou a divisão entre os genótipos. Desta forma, a média ponderada negativa apresentou maior variabilidade de

genótipos (18/25) do que a média ponderada positiva (7/25). Contudo não houve diferença entre a distribuição dos genótipos entre os grupos recidiva e sem recidiva.

No presente estudo caracterizamos o perfil dos genes *KIR* em pacientes com toxoplasmose ocular após episódio ativo e observamos dois genes (*KIR2DL2/KIR2DS2*) atuando conjuntamente como possíveis marcadores de proteção, além, da menor proporção de genes ativadores observada nos indivíduos com recidiva corroborando com a hipótese de que estes indivíduos são mais susceptíveis a TO. A caracterização destes genes torna este estudo pioneiro na pesquisa de associação entre o polimorfismo dos genes *KIR* e a recidiva de toxoplasmose ocular, uma vez que, não há na literatura dados que relacionem o polimorfismo de genes *KIR* com a toxoplasmose ocular. Mais estudos necessitam ser realizados em diferentes populações. Com o intuito de compreender melhor tal processo, nossa perspectiva é dar continuidade a caracterização genética de indivíduos com toxoplasmose ocular após episódio ativo, ampliando o N amostral, realizando a tipagem dos ligantes HLA, dosando os níveis séricos de IFN- γ e verificando o polimorfismo do mesmo.

8. Conclusão

Com base nos resultados obtidos a partir da caracterização dos genes *KIR* em pacientes com toxoplasmose ocular após episódio ativo, atendidos no ambulatório de Oftalmologia do INI, Fiocruz, RJ, pode-se concluir que:

- A distribuição das frequências dos genes *KIR* nesta população de estudo não difere das observadas em outras regiões brasileiras;
- Todos os 25 genótipos caracterizados apresentam distribuição cosmopolita. Contudo, o perfil da distribuição gênica dos receptores *KIR* não apresentou associações significativas sobre a recidiva de toxoplasmose ocular na população estudada;
- O gene inibidor *KIR2DL2* juntamente com o ativador *KIR2DS2* estavam mais frequentes no grupo dos indivíduos que não recidivaram, sugerindo que os mesmos possam estar atuando como marcadores de proteção à recidiva de toxoplasmose ocular;
- Nossos dados sugerem que a menor proporção de genes *KIR* ativadores possa estar associada à susceptibilidade, uma vez que, os indivíduos que recidivaram apresentaram menor proporção de genes ativadores;
- Os achados obtidos fornecem uma descrição desses genes na população estudada e, além disso, a diversidade gênica desses pacientes pode fornecer informações relevantes para futuras pesquisas.

9. Referências Bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Propriedades gerais das respostas imunes. In: *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011a. p. 1-14.

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. p.579.

Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, MITCHELL EAD., Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, e Spiegel FW. The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 59(5), 2012 pp. 429-493.

Aleixo, A. L. Q. C. (2015). “Avaliação da recorrência da toxoplasmose ocular e fatores de risco associados em pacientes do ambulatório de Oftalmologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Tese (Doutorado). Rio de Janeiro. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Junho de 2015.

Almeida, A.O. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum.Immunol.*, 2011.

Amato Netto, & Campos, R. *Toxoplasmose* 2 ed., São Paulo, Ateneu, 1970.

Amendoeira, M. R. R.; Camilo-Coura, L. F. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. *Scientia medica*, v. 20, n.1, p. 113-119, 2010

Amendoeira, M. R. R.; Costa, T.; Spalding, S. M. *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: *Sarcocystidae*) e a Toxoplasmose. *Revista Souza Marques*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 15-29, 1999.

Andre P, Biassoni R, Colonna M, Cosman D, Lanier LL, Long EO, et al. New nomenclature for MHC receptors. *Nat Immunol*. 2001; 2:661.

Augusto DG, Lobo-Alves SC, Melo MF, Pereira NF, Petzl-Erler ML. Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. *PLoS One*. 2012;7(7):e39991. (a)

Augusto DG, Zehnder-Alves L, Pincerati MR, Martin MP, Carrington M, Petzl-Erler ML. Diversity of the KIR gene cluster in an urban Brazilian population. *Immunogenetics*. 2012 Feb;64(2):143-52. doi: 10.1007/s00251-011-0565-1. Epub 2011 Aug 18.

Augusto DG, Piovezan BZ, Tsuneto LT, Callegari Jacques SM, Petzl-Erler ML. KIR Gene Content in Amerindians Indicates Influence of Demographic Factors. *PLoS One* 2013;8(2):e56755.

Augusto DG, Hollenbach JA, Petzl-Erler ML. A deep look at KIR-HLA in Amerindians: comprehensive meta-analysis reveals limited diversity of KIR haplotypes. *Hum Immunol*. 2015 Apr;76(4):272-80

Augusto DG, Petzl-Erler ML. KIR and HLA under pressure: evidences of coevolution across worldwide populations. *Hum Genet*. 2015 Jun 23.

Ayo CM, Reis PG, Dalalio MM, Visentainer JE, Oliveira Cde F, de Araújo SM, de Oliveira Marques DS, Sell AM. Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors and Their HLA Ligands are Related with the Immunopathology of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 May 15;9(5):e0003753.

- Blader IJ, Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune invasion and virulence. *APMIS* 2009; 117: 458-476.
- Bosch-Driessen LH, Berendschot TT, Ongkosuwito JV, Rothova A 2002. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. *Ophthalmology* 109: 869-878.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso 8. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010. 444 p. : Il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).
- Brunton CL, Wallace GR, Graham E, Stanford MR. The effect of cytokines on the replication of *T. gondii* within rat retinal vascular endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 2000;102(2):182-8.
- Carrington, M. and Norman, P. The KIR gene cluster. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2003 May 28.
- Caspi RR. Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev.* 2006; 213: 23-35.
- Cavalier-Smith, T. 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* 57, 953–994.
- Cooper, M. A. et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, v. 97, n. 10, p. 3146-3151, 2001.
- Cordeiro, C. A., P. R. Moreira, W. O. Dutra, L. Young, W. R. Campos, F. Orefice and A. L. Teixeira Junior (2010). "[Immunology of the toxoplasmic retinochoroiditis]." *Arq Bras Oftalmol* 73(6): 548-551.
- Coura, JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Toxoplasmose. Capítulo 26. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005 2v. Vol 1
- Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (*KIR*) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens.* 2000 Oct;56(4):313-26.
- Dardé ML, Peyron F. *Toxoplasma* y toxoplasmosis. *EMC - Pediatría* 2013;48(1):1-12 [Artículo E – 4-330-A-10].
- Davis CT, Rizzieri D. Immunotherapeutic applications of NK cells. *Pharmaceuticals (Basel).* 2015 May 25;8(2):250-6. doi: 10.3390/ph8020250. Review.
- De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, Repetto O, Zignego AL, Izzo F, Tornesello ML, Buonaguro FM, Mangia A, Sansonno D, Racanelli V, De Vita S, Pioltelli P, Vaccher E, Beretta M, Mazzaro C, Libra M, Gini A, Zucchetto A, Cannizzaro R, De Paoli P. Genetic diversity of the KIR/HLA system and susceptibility to hepatitis C virus-related diseases. *PLoS One.* 2015 Feb 20;10(2):e0117420
- Denis L, Sivula J, Gourraud PA et al. Genetic diversity of KIR natural killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion. *Tissue Antigens* 2005; **66**: 267–76.
- Dubey JP (2008) The history of *Toxoplasma gondii*—the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 55(6):467–475.
- 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 Sep;139(11):1375-424.
- Dubey JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 2004;126:57-72.

- Dubey, J. P. (1968). "Isolation of *Toxoplasma gondii* from the feces of a helminth free cat." *J Protozool* 15(4): 773-775.
- Dubey, J. P. and J. L. Jones (2008). "Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States." *Int J Parasitol* 38(11): 1257-1278.
- Dubey, JP. *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press; 2010.
- Dubey, J.P.; Lindsay, D. S and Speer, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Apr; 11(2): 267–299.
- Dunphy SE, Guinan KJ, Chorcora CN, Jayaraman J, Traherne JA, Trowsdale J, Pende D, Middleton D, Gardiner CM. 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on human NK cells. *Genes Immun.* 2015 May 7.
- Dupont C D, David A, Christian & Christopher A Hunter. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol* (2012) 34:793–813
- Estefania E, Gomez-Lozano N, Portero F et al. Influence of KIR gene diversity on the course of HSV-1 infection: resistance to the disease is associated with the absence of KIR2DL2 and KIR2DS2. *Tissue Antigens* 2007; 70: 34–41.
- Ewerton PD, Leite Mde M, Magalhães M, Sena L, Melo dos Santos EJ. Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles. *Immunogenetics.* 2007 Aug;59(8):625-30.
- Fatoohi F, Cozon GJ, Wallon M, Kodjikian L, Peyron F. Systemic T cell response to *Toxoplasma gondii* antigen in patients with ocular toxoplasmosis. *Jpn J Ophthalmol.* 2006;50(2):103-10.
- Franceschi D. S. A., Mazini P. S., Rudnick C. C. C., Sell A. M., Tsuneto L. T., De Melo F. C., Braga M. A., Peixoto P. R. F. e Visentainer J. E. L. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. *Tissue Antigens* (2008) 72 (5): 478-482.
- Frenkel JK (1973) *Toxoplasma* in and around us. *BioScience* 23(6):343–352.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 1970 Feb 6;167(3919):893–896.
- Friedmann, C.T., Knox, D.L., 1969. Variations in recurrent active toxoplasmic retinochoroiditis.
- Furtado JM, Winthrop KL, Butler NJ, and Smith JR. Ocular toxoplasmosis I: parasitology, epidemiology and public health. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2013; 41: 82–94
- Garweg JG, Candolfi E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(2):211-20.
- Ge Y, Chen J, Qiu X, Zhang J, Cui L, Qi Y, Liu X, Qiu J, Shi Z, Lun Z, J Shen e Wang Y. Natural killer cell intrinsic toll-like receptor MyD88 signaling contributes to IL-12-dependent IFN- γ production by mice during infection with *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 44 (2014) 475–484.
- Gilbert, R.E., Dunn, D.T., Lightman, S., Murray, P.I., Pavesio, C.E., Gormley, P.D., Masters, J., Parker, S.P., Stanford, M.R., 1999. Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol. Infect.* 123, 283e289.

- Glasner, P. D., C. Silveira, D. Kruszon-Moran, M. C. Martins, M. Burnier Junior, S. Silveira, M. E. Camargo, R. B. Nussenblatt, R. A. Kaslow and R. Belfort Junior (1992). "An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil." *Am J Ophthalmol* 114(2): 136-144.
- Guerrant RL, Walker DH, and Weller PF. *Tropical Infectious Diseases, 3rd Edition. Principles, Pathogens and Practice (Expert Consult - Online and Print)* (2011) 1156 p.
- Halonen S. K., Weiss L. M. (2013). Toxoplasmosis. *Handb. Clin. Neurol.* 114, 125–145.
- Hiby SE, Ashrafian-Bonab M, Farrell L, Single RM, Balloux F, Carrington M e Moffett A. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and their HLA-C ligands in two Iranian populations. *Immunogenetics* (2010) 62:65–73.
- Holland, G. O. C. G., Belfort R Jr, Remington JS. Toxoplasmosis. In: Pepose JS, Holland GN, Wilhelmus KR, (1996). *Ocular Infection & Immunity*. St Louis, Missouri, Mosby-Year Book, Inc.:1183–1223.
- Holland, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *American Journal of Ophthalmology*, 2003; 136: 973- 988.
- Hoteit R, Abboud M, Bazarbachi A , Salem Z, Shammaa D ,Ghazi Zaatari , RamiMahfouz KIR genotype distribution among Lebanese patients with Hodgkin's lymphoma. *Meta Gene* 4 (2015) 57–63
- Hoteit R, Bazarbachi A, Antar A, Salemb Z, Shammaa D, Mahfouza R. KIR genotype distribution among patients with multiplemyeloma: Higher prevalence of KIR 2DS4 and KIR 2DS5 genes. *Meta Gene* 2 (2014) 730–736.
- Hou Y, Zhang C, Xu D, Sun H. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor and human leucocyte antigen-Cw gene combinations with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2015 May;180(2):250-4.
- Hunter CA e Sibley DL. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence Effectors. *Nat Rev Microbiol.* 2012 November ; 10(11): 766–778.
- Jobim M, Jobim LF. Natural killer cells and immune surveillance. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84(4 Suppl):S58-67. doi:10.2223/JPED.1780
- Kahi S, Cozon GJN, Greenland T, Wallon M, Gay-Andrieu F, Peyron F. A rapid flow cytometric method to explore cellular immunity against *Toxoplasma gondii* in humans. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; 5: 745-748.
- Kibar F, Goruroglu Ozturk O, Ulu A, Erken E, Inal S, Dinkci S, Kurtaran B, Tasova Y, Aksu HS, Yaman A. Role of KIR genes and genotypes in susceptibility to or protection against hepatitis B virus infection in a Turkish cohort. *Med Sci Monit.* 2014 Jan 10;20:28-34.
- Kikuchi-Maki A, Catina TL, Campbell KS. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol.* 2005;174:3859-63.
- Kravetz, J. D. and D. G. Federman (2005). "Toxoplasmosis in pregnancy." *Am J Med* 118(3): 212-216.
- Kulkarni, S.; Martin, M. P.; Carrington, M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Seminars in Immunology* 20: 343-352; 2008.
- Lanier, L.L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 225-274; 2005.

- Lindsay DS, Dubey JP. Long-term survival of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts in seawater. *J Parasitol* 2009; **95**: 1019–20.
- Liu Y, Zhang L, Gao M, Zhang F, Xu X, Liu X, Hu X. Changes of Inhibitory Receptors on NK-92 Cells and HLA-G on BeWo Cells with *Toxoplasma gondii* Infection. *Inflammation*, Vol. 36, n° 6, December 2013.
- Lynfield, R.; Guerina N. G. (1997). "Toxoplasmosis." *Pediatr Rev* 18(3): 75-83.
- Lysakova-Devine T, O'Farrelly C. Tissue-specific NK cell populations and their origin. *J Leukoc Biol*. 2014 Dec;96(6):981-90.
- Maenz M, Schlüter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U, Pleyer U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 39 (2014) 77e106.
- Maragon AV; Guelsin GAS; Rudnick CCC; Franceschi DAS, Visentainer JEL, Sell AM. Kir receptors of natural killer cells. *Cienc Cuid saude* 2008; 7 (Suplem.1):153-160
- Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, Wain H. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Hum Immunol*. 2003 Jun;64(6):648-54.
- Martin MP, Nelson G, Lee JH et al. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 2002; 169: 2818–22.
- Martin, M.P.; Gao, X.; Lee, J.H.; Nelson, G.W.; Detels, R.; Goedert, J.J.; et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 31(4):429–34; 2002.
- McQueen KL, Dorigi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B, Parham P. Donor-recipient combinations of group A and B KIR haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA-matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol*. 2007;68:309-23.
- Medeiros A, Medeiros M, Gonçalves ER, Meyer I, de Souza Filho JP. Retinocoroidite toxoplásmica reativada provavelmente por cirurgia refrativa - Laser In Situ Keratomileusis – LASIK. *Rev. Bras Oftalmol*. 2010; 69 (3): 176-9
- Middleton D, Diler AS, Meenagh A, Sleator C, Gourraud PA. Killer immunoglobulin-like receptors (KIR2DL2 and/or KIR2DS2) in presence of their ligand (HLA-C1 group) protect against chronic myeloid leukaemia. *Tissue Antigens* 2009; **73**:553–60.
- Middleton D; Curran M; Maxwell L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl Immunol*. 2002 Aug; 10(2-3): 147-64.
- Moffett A, Colucci F. Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction. *Immunol Rev*. 2015 Sep;267(1):283-97
- Montoya JG, Remington JS 1996. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 23: 277-282.
- Montoya JG. *Toxoplasmosis of the Central Nervous System*. Boston, MA: Blackwell Scientific, 1997.
- Montoya, J. G. and O. Liesenfeld (2004). "Toxoplasmosis." *Lancet* 363(9425): 1965-1976.

Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med.* 1990 Jan/Aug;171(3):695-714.

Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunological Reviews* 2011; 240: 269-285.

Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM, et al. Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2000; 165(2):1138-45.

Neves, D. P. *Parasitologia Dinâmica*. Capítulo 18. pag. 177, 188. Autor: Urara kawazoe. Sao Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Nicolle, C.; Manceaux, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *Comptes Rendus de l'Academie des sciences*, Paris, v. 148, p. 369-372. 1909.

Nussenblatt RB, Belfort R Jr 1994. Ocular toxoplasmosis. An old disease revisited. *JAMA* 271: 304-307.

Nussenblatt, R.B.; Whitcup, S. M. & Paslestine, A. G. *Uveitis: fundamentals and clinical practice*. San Louis: Mosby, 1996.

Oréfice, F. *Uveíte clínica e cirúrgica*, Texto e Atlas, segunda edição, vol. II, Rio de Janeiro, Cultura Médica, 2005

Osman, A.E., Mubasher, M., ElSheikh, N.E, AlHarthi. H., Al Yami, A.S ,Rajalingam, R., Al-Dehaimi, A. , Middleton, D. ,ElGhazali, G. Characterization of human killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) among healthy Saudis /*Human Immunology* 75 (2014) 536-540

Pappas G, Roussos N, Falagas ME (2009) Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol* 39(12):1385-1394.

Perce da Silva, DS. Estudo da influência do polimorfismo dos genes *KIR-HLA* na susceptibilidade à malária em população de párea endêmica da Amazônia Legal, Porto Velho- RO. Tese [Doutorado]. Rio de Janeiro. Pós Graduação em Biologia Parasitária; 2015.

Perce-da-Silva DS, Silva LA, Lima-Junior JC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro-Alves M, Santos F, Porto LCMS, Oliveira-Ferreira J e Banic DM. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene diversity in a population naturally exposed to malaria in Porto Velho, Northern Brazil. *Tissue Antigens*, 2015, 85, 190-199.

Pisegna S, Pirozzi G, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Palmieri G. p38 MAPK activation controls the TLR3- mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. *Blood.* 2004 Dec;104(13):4157-64.

QI, Y.; Martin, M.P.; Gao, X.; Jacobson, L.; Goedert, J.J.; Buchbinder, S. KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog* 2(8):e79; 2006.

Reich, M., M. Ruppenstein, M. D. Becker and F. Mackensen. "Risk of Recurrence of Preexisting Ocular Toxoplasmosis during Pregnancy." *Ocul Immunol Inflamm*: 1-6. Volume 23, Issue 3, 2014.

Reich, M., M. Ruppenstein, M. D. Becker and F. Mackensen. "Time patterns of recurrences and factors predisposing for a higher risk of recurrence of ocular toxoplasmosis." *Retina*. (2014) *Ocul Immunol Inflamm* - Volume 35 - Issue 4 - p 809–819

Rempel JD, Hawkins K, Lande E, Nickerson P. The potential influence of KIR cluster profiles on disease patterns of Canadian Aboriginals and other indigenous peoples of the Americas. *Eur J Hum Genet*. 2011 Jul 6. doi: 10.1038/ejhg.2011.114.

Rey, L. *Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. Toxoplasma gondii e Toxoplasmosose* Capítulo 144ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Rivero S, Covas L. The processing and marketing of seeds from the Amazon City of Porto Velho, RO. *J Technol Manag Innov* 2013; 2013: 321-31.

Robert-Gangneux, F., Darde, M.L., 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 264e296.

Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Marsh SG. IPD--the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D1234-40. doi: 10.1093/nar/gks1140. Epub 2012 Nov 24. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> - Acessado em dezembro de 2015.

Rothova, A. (2003). "Ocular manifestations of toxoplasmosis." *Curr Opin Ophthalmol* 14(6): 384-388.

Rudnick CC, Franceschi DS, Marangon AV, Guelsin GA, Sell AM, Visentainer JE. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity in a Southern Brazilian population from the state of Paraná. *Hum Immunol*. 2008 Dec;69(12):872-6. Epub 2008 Oct 9.

Rudnick, CC; Guelsin, GAS; Marangon, AV; Franceschi DAS; Sell AM; Visentainer, JEL. Otimização de metodologia para o estudo de genes KIR. *J Bras Patol Med Lab* v. 46 n. 3 p.215-224 junho 2010.

Sabin, A.B. & Feldman, H.A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (toxoplasma). *Science*, 108: 660-3,1948.

Shi L, Tao Y, Lin K, Liu S, Yu L, Yang Z, Yi W, Huang X, Sun H, Chu J, Yao Y. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes and combinations with HLA-C ligands in an isolated Han population in southwest China. *Tissue Antigens*. 2011 Jul;78(1):60-4.

Silveira, C., R. Belfort, Jr., M. Burnier, Jr. and R. Nussenblatt (1988). "Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families." *Am J Ophthalmol* 106(3): 362-364.

Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR, Kidd KK, Carrington M. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1114-9. Epub 2007 Aug 12.

Smyth, M. J. et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol.Immunol.*, v. 42, n. 4, p. 501-510, 2005.
Souza W, Belfort Jr R, organizadores. *Toxoplasmosose & Toxoplasma gondii*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2014.

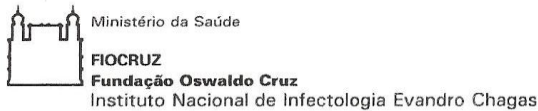
Splendore, A. Un nuovo protozoa parassita de conigli encontrado nelle lesioni anatomiche d.une malattiache ricorda in moltoprinti il kalazar dell'uomo: nóta preliminaire pel. *Revista da Sociedade Scientífica de São Paulo*. v. 3, p. 109-112, 1909

Tenter, A. M., A. R. Heckeroth and L. M. Weiss (2000). "Toxoplasma gondii: from animals to humans." *Int J Parasitol* 30(12-13): 1217-1258.

- Trowsdale, J.; Barlen, R.; Haude, A.; Stewart, C. A.; Beck, S.; Wilson, M. J. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 181:20; 2001.
- Vendelbosch S, de Boer M, van Leeuwen K, Pourfarzad F, Geissler J, van den Berg TK, Kuijpers TW. Novel insights in the genomic organization and hotspots of recombination in the human KIR locus through analysis of intergenic regions. *Genes Immun*. 2015 Mar;16(2):103-11.
- Vilches C., Parham P. (2002). KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 217–251.
- Weiss LM, Dubey JP (2009) Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol* 39(8):895–901.
- Xu X, Zhao M, Liu X, Jiang Y, Zhang H, et al. (2013) Toxoplasma gondii Infection Regulates the Balance of Activating and Inhibitory Receptors on Decidual Natural Killer Cells. *PLoS ONE* 8(2): e55432. doi:10.1371/journal.pone.0055432
- Yan, W.H.; Lin, A.; Chen, B.G.; Zhou, M.Y.; Dai, M.Z.; Chen, X.J.; et. al. Possible roles of KIR2DL4 expression on uNK cells in human pregnancy. *AmJ Reprod Immunol* 57(4):233–42; 2007.
- Yarovinsky F. innate Immunity to Toxoplasma gondii infection. *Nature Reviews. Immunology*. (2014). 109 – 121.
- Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2001; 193(10):1159–67.
- Yindom LM, Forbes R, Aka P, Janha O, Jeffries D, Jallow M, Conway DJ e Walther M. Killer-cell immunoglobulin-like receptors and malaria caused by Plasmodium falciparum in The Gambia. *Tissue Antigens* 2011;**79**, 104–113
- Yindom LM, Leligdowicz A, Martin MP et al. Influence of HLA class I and HLA-KIR compound genotypes on HIV-2 infection and markers of disease progression in a Manjako community in West Africa. *J Virol* 2010; **84**: 8202–8.
- Yiyue G, Jinling C, Xiaoyan Q , Jie Z , Lunbiao C , Yuhua Q , Xinjian L, Jingfan Q , Zhiyang S , Zhaorong L , Jilong S e Yong W. Natural killer cell intrinsic toll-like receptor MyD88 signaling contributes to IL-12-dependent IFN- γ production by mice during infection with Toxoplasma gondii. *International Journal for Parasitology* 44 (2014) 475–484.
- Zhi-ming, L.; Yu-lian, J.; Zhao-lei, F.; Chun-xiao, W.; Zhen-fang, D.; Bing-chang, Z.; Yue-ran, Z. Polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptor gene: possible association with susceptibility to or clearance of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *Croat Med* 6:800-6; 2007.

10. Anexos

Anexo 1 Aprovação pelo Comitê de Ética



Rio de Janeiro, 23 de julho de 2014.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC

Para: Dra. Maria Regina Reis Amendoeira

Prezada Dra. Maria Regina,

Com referência ao projeto: **“Análise retrospectiva e imunogenética de pacientes com recidiva de toxoplasmose ocular do ambulatório de oftalmologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas”**, subestudo do projeto: **“Avaliação dos padrões de recorrência da toxoplasmose ocular e fatores de risco associados em pacientes do ambulatório de Oftalmologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas”**, CAAE 0075.0.009.000-11, aprovado por este Comitê em 18/04/2011 – Parecer 022/2011, acusamos o recebimento de sua carta datada de 09 de julho de 2014, na qual V. Sa. solicita apreciação do subprojeto supra citado.

Este subprojeto contemplará uma Monografia de Especialização em Biologia Parasitária da Fundação Técnico-Educacional Souza Marques, orientada pela Dra. Ana Luísa do Couto Aleixo e Dra. Maria Regina Reis Amendoeira uma Dissertação de Mestrado do Programa de Medicina Tropical do IOC-Fiocruz, orientada pela Dra. Maria Regina Reis Amendoeira.

Tem como objetivo principal determinar a frequência das recidivas e analisar possíveis fatores associados aos episódios de recorrência, em um grupo de pacientes com diagnóstico de toxoplasmose ocular do ambulatório de Oftalmologia do IPEC e, como objetivo específico, identificar e analisar características clínicas, epidemiológicas e imunogenéticas da população com relação ao risco de recidivas oculares.

A metodologia compreenderá: Estudo 1 – Análise retrospectiva de prontuários; Estudo 2 – Análise de HLA e KIR.

Esta documentação foi apreciada e aprovada por esta Coordenação (Relatora) na presente data. Recomenda-se que, em futuro, cada projeto ou subprojeto seja apresentado em separado.

Atenciosamente,

Dr^a Léa Ferreira Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
Mat. SIAPE 003709620
IPEC / FIOCRUZ

VL

Projeto: “Estudo de fatores de risco para recidivas de toxoplasmose ocular”

Você está sendo convidado para participar de um estudo visando obter mais conhecimentos sobre a toxoplasmose ocular, que é uma infecção causada por um protozoário chamado *Toxoplasma gondii* e que pode levar a diminuição da visão em alguns casos. As consultas oftalmológicas de retorno obedecerão às práticas clínicas usuais de acompanhamento de toxoplasmose ocular, sendo realizadas anualmente por cinco anos para fins desta pesquisa. Você deverá procurar o ambulatório de Oftalmologia do IPEC caso perceba turvação visual, olhos vermelhos ou moscas volantes no intervalo das consultas de rotina. Todas as consultas deverão ser agendadas pela secretaria do ambulatório do IPEC pessoalmente ou por meio do telefone (21) 3865 9670 ou 3865 9595. Os procedimentos listados a seguir serão realizados por médicos oftalmologistas com a ajuda de outros profissionais ligados à pesquisa e tecnicamente habilitados para a sua perfeita realização. Procedimento para exame oftalmológico: 1) Medida da visão através de tabelas com letras de diferentes tamanhos; 2) Exame com luz, realizado num aparelho chamado lâmpada de fenda, para excluir pessoas que não possam pingar colírio para dilatar a pupila; 3) Instilação de colírio para dilatar a pupila (Mydriacyl), 1 gota em cada olho, três vezes com intervalo de 5 minutos; 4) Espera de 30 minutos para obtenção do efeito do colírio e 5) Exame de fundo de olho e sua fotografia através da luz de um aparelho chamado oftalmoscópio e retinógrafo. O colírio usado para dilatar sua pupila vai causar desconforto à exposição à luz e diminuirá sua visão para perto nas 3 ou 4 horas após o exame. Você não poderá dirigir veículos ou máquinas pesadas, de marcenaria ou de operação perigosa nas referidas 3 ou 4 horas de efeito do colírio. Também serão coletadas amostras de sangue periférico para realização de testes genéticos e, se necessário, de testes diagnósticos para Sífilis, HIV e Herpes. Você será informado quanto a qualquer alteração e ou doença encontrada no exame e será encaminhado para que possa ser devidamente tratado. Todas as informações fornecidas por você são consideradas confidenciais, sendo somente divulgadas sem identificação pessoal através de publicações científicas, garantindo sua total privacidade e sigilo médico. Caso seja necessário o tratamento da toxoplasmose será igual ao normalmente utilizado em todos os pacientes do ambulatório de Oftalmologia do IPEC-FIOCRUZ. Os profissionais envolvidos no estudo poderão esclarecer suas dúvidas e fornecer mais informações, além das citadas no presente termo, em qualquer momento durante a pesquisa. Sua participação neste projeto é inteiramente voluntária, estando livre para recusá-la ou retirar-se em qualquer fase da pesquisa, sem que isso possa afetar ou prejudicar o cuidado médico que vai receber. Estou ciente que não terei qualquer forma de pagamento em dinheiro por minha participação. Tendo entendido todas as informações aqui contidas, você receberá uma cópia deste termo de consentimento, e pelo presente, consente voluntariamente em participar desta pesquisa, permitindo que os procedimentos acima citados sejam realizados.

Fica também autorizado o armazenamento pela FIOCRUZ de amostras do seu sangue. Esse material armazenado somente poderá ser utilizado em novas pesquisas com o consentimento do Comitê de Ética Humana do IPEC - FIOCRUZ.

Assinatura: _____ RG _____ Testemunha: _____ RG _____

Pesquisador: _____ Data ____/____/____