



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

Karina de Oliveira Younan

**Tempo de Reação a Estímulos Visuais e Infecção
por *Toxoplasma gondii* – uma possível influência do
sistema RH**

São José do Rio Preto
2014

Karina de Oliveira Younan

**Tempo de Reação a Estímulos Visuais e Infecção
por *Toxoplasma gondii* – uma possível influência
do sistema RH**

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

**São José do Rio Preto
2014**

Younan, Karina de Oliveira

Tempo de reação a estímulos visuais e infecção por *Toxoplasma Gondii* : uma possível influência do sistema RH / Karina de Oliveira Younan.

São José do Rio Preto, 2014.

32 p.

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

1.Toxoplasmose; 2.Fator Rh; 3.Tempo de Reação

KARINA DE OLIVEIRA YOUNAN

Tempo de Reação a Estímulos Visuais e Infecção
por *Toxoplasma Gondii* – uma possível influência do
sistema RH

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE

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

1º Examinador: Prof. Dra. Maysa Alamar Bianchin

2º Examinador: Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira

1º Suplente: Prof. Dr. Nelson Iguimar Valério

2º Suplente: Profa. Dra. Marilanda Ferreira Bellini

São José do Rio Preto, 22 de agosto de 2014.

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. Introdução.....	01
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	01
1.2. Sistema Rh.....	04
1.3. Influência da infecção por <i>T. gondii</i> na atividade neurológica e sua relação com o sistema Rh.....	05
2. Casuística e Métodos.....	07
2.1. Aspectos étnicos.....	07
2.2. Composição da casuística.....	07
2.3. Avaliação ocular dos pacientes.....	07
2.4. Coleta de sangue.....	08
2.5. Identificação dos fenótipos eritrocitários Rh.....	08
2.6. Identificação dos anticorpos IgG.....	09
2.7. Medida do tempo médio de reação a estímulos visuais.....	09
2.8. Análise estatística.....	11
3. Resultados.....	12
4. Discussão.....	15
5. Conclusões.....	23
Referências Bibliográficas.....	24
Anexos.....	29

Dedicatória

*Dedico este trabalho à minha filha,
razão pela qual dou sentido a todo o
meu esforço e trabalho.*

Agradecimentos

À Diretoria Geral da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FAMERP.

À Secretaria de Pós-Graduação e aos funcionários - Pela atenção e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular e ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos - Pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Pela competência, criteriosidade e paciência, interesse genuíno e contagiante pela ciência. Minha admiração e eterna gratidão.

À sua esposa Cinara Brandão de Mattos - que apontou critérios e normas, análises de amostras coletadas e pela contribuição com estudos relativos à minha dissertação.

À Ana Iara Costa Ferreira - Cuja competência é exemplo do esforço incansável, diário e contínuo. Pela companhia, docilidade, responsabilidade e abnegação.

À Fabiana Nakashima e Cássia Bernardo – pelo auxílio com as amostras, com a ansiedade, com o exemplo.

Aos demais colegas do Laboratório de Imunogenética – Pela grande rede de colaboração que formam, pelo senso de cooperação e auxílio ao desenvolvimento nos estudos, a gentileza e o acolhimento.

Ao Márcio – pelo café reconfortante que nunca me faltou, e que fez toda diferença.

Ao Laboratório e funcionárias do AME - Por terem sido também muito generosas e prestativas.

Aos pacientes do ambulatório - Por terem consentido em participar da pesquisa e por acreditarem no desenvolvimento científico.

Ao Tiro de Guerra de Mirassol - Por contribuírem com empenho cívico ao participar desta pesquisa.

Aos membros da Banca Examinadora - Pela disponibilidade na contribuição para finalização deste trabalho.

Agradeço o apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2009/17540-2), ao Ministério da Ciência e Tecnologia – CNPq (Proc:473579/2009-0), BAP-FAMERP, Biotechnology Research Institute (Auckland University of Technology).

Enfim, quero agradecer a minha família, meu pai pelo exemplo de ética e trabalho e minha mãe e irmãs, minhas grandes companhias - pelo afeto fortificante, pela fé e estímulo ao estudo. E à Maluzinha, minha filha querida, por tentar compreender, mesmo com pouca idade, minha necessidade pelo trabalho e desenvolvimento intelectual. Agradeço à Deus pela vida e pelas responsabilidades que confia a mim.

Epígrafe

“... não importa tanto o tema da tese quanto a experiência de trabalho que ela comporta.”

”Com o tempo vamos conhecendo mais coisas, porém o modo como trabalhamos nas que sabemos sempre dependerá da maneira com que estudamos no início muitas coisas que ignorávamos.”

Umberto Eco

Lista de Figuras

Figura 1	Ciclo de transmissão do parasito <i>Toxoplasma gondii</i>	03
Figura 2	Ilustração dos resultados da fenotipagem eritrocitária Rh	09
Figura 3	Ilustração da execução do teste de medida do tempo de reação a estímulos visuais com software específico.	10

Lista de Tabelas

Tabela 1	Média de idade, desvio-padrão, idades: mínima, máxima e mediana, de indivíduos infectados e não infectados por <i>Toxoplasma gondii</i> , separados por gênero.	12
Tabela 2	Tempo médio de reação (TMR) e desvio-padrão (DP) de indivíduos reagentes e não reagentes para <i>Toxoplasma gondii</i> , por gênero e faixa etária.	13
Tabela 3	Diferenças entre o tempo médio de reação (TMR) e desvio-padrão (DP) dos indivíduos Rh positivo e Rh negativos, por gênero.	13
Tabela 4	Tempo médio de reação (TMR) observado em indivíduos reagentes e não reagentes para a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> comparados por gênero, idade e fenótipo Rh.	14

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AME	Ambulatório Especialidades Médicas
Anti D	Imunoglobulina Humana Específica (Rh0)
CO ₂	Dióxido de Carbono
DP	Desvio Padrão
ELISA	Teste Imunoenzimático
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IgM	Imunoglobulina de classe M
IgG	Imunoglobulina de classe G
N	Número
NH ₃	Amônia
OR	<i>Odds ratio</i>
p	<i>p- value</i>
Rh	Sistema de grupo sanguíneo
RhD	Antígeno D no sistema Rh
rpm	Rotações por minuto
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TMR	Tempo Médio de Reação

Resumo

Introdução: O parasito *Toxoplasma gondii* infecta elevado percentual de indivíduos em todo o mundo e os distúrbios resultantes da infecção contribuem para os agravos da saúde e podem acometer o desenvolvimento intelectual de crianças e adultos. Tem sido proposto que o antígeno D (Rh₀), uma glicoproteína que constitui a base bioquímica sistema Rh mas que se encontra ausente no tecido nervoso, influencia a resposta motora na presença de infecção por *T. gondii*. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta motora e o tempo de reação a estímulos visuais na presença e na ausência de infecção pelo parasito *T. gondii* em indivíduos com boa acuidade visual, Rh positivos e Rh negativos. **Métodos:** foram analisados 212 indivíduos voluntários, de ambos os sexos, submetidos a exame de acuidade visual e teste de medição de tempo médio de reação a estímulos visuais (TMR) com o uso de um software específico. As amostras de sangue coletadas foram utilizadas na identificação dos fenótipos eritrocitários Rh (positivo e negativo) e dos anticorpos da classe IgG, anti-*T. gondii* (presença ou ausência). Os tempos médios de reação foram comparados de acordo com o sexo, presença (reagentes) e ausência (não reagentes) de infecção e fenótipos eritrocitários Rh (positivo e negativo). O teste t para comparação das médias e os valores de Odds Ratio (OR) e do intervalo de confiança a 95% foram calculados com o uso do software GraphPad InStat (versão 3.06). O valor p igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo. **Resultados:** As diferenças entre as médias de idade de indivíduos reagentes (n=134) e não reagentes (n=78) ao *T. gondii* foram consideradas estatisticamente significante (54,1 ± 18,7 vs 34,4 ± 18,9; p=0,0001). O fenótipo Rh positivo (n=189) esteve presente em 89% dos indivíduos, enquanto o Rh negativo (n=23) em 11%. O TMR dos indivíduos reagentes para o *T. gondii* foi menor no sexo

masculino (0.672 ± 0.303) que no feminino (0.819 ± 0.270) ($p=0,0036$). Esta mesma diferença foi observada entre os não reagentes (0.475 ± 0.140 vs 0.791 ± 0.323), respectivamente ($p<0,0001$). Homens infectados (0.658 ± 0.282) apresentam TMR maiores que homens não infectados (0.488 ± 0.129) por *T. gondii*, ambos Rh positivo ($p=0,0004$). Mulheres, infectadas ou não, não diferiram quanto ao TMR mesmo quando comparadas pelo fenótipo Rh (positivo ou negativo). **Conclusões:** Homens Rh positivos infectados por *T. gondii* apresentam TMR maior que homens Rh positivos não infectados. Mulheres infectadas não diferem quanto ao TMR em comparação a mulheres não infectadas por *T. gondii*.

Descritores: *Toxoplasma gondii*; sistema Rh; tempo de reação a estímulos

Abstract

Introduction: The parasite *Toxoplasma gondii* infects a high percentage of individuals worldwide and disturbances resulting from this infection contribute to the aggravations of health conditions and may affect the intellectual development of children and adults. It has been suggested that the D antigen (Rh0) a glycoprotein that is the biochemical basis Rh but is absent in the nervous tissue, influence the motor response in the presence of *T. gondii* infection. **Objectives:** This study aims to evaluate the motor response and the reaction time for visual stimulus in the presence and in the absence of infection by the parasite *T. gondii* in individuals with good visual acuity, Rh positive and Rh negative. **Methods:** 212 volunteers from both sexes underwent visual acuity testing and measurement of average response time to visual stimulus (ART) by using a specific software. The collected blood samples were used to identify the erythrocyte RH phenotypes (positive and negative) and antibodies of IgG class anti-*T. gondii* (presence or absence). Average response times were compared according to sex, presence (reagents) and absence (non-reagent) infection and erythrocyte Rh phenotypes (positive and negative). The t test for comparison of average and the values of Odds Ratio (OR) and 95% confidence interval were calculated using the GraphPad InStat (version 6.3) software. The *p-value* equal to or less than 0.05 was considered significant. **Results:** The differences between the average age of reagents individuals (n = 134) and non-reagent (n = 38) to *T. gondii* were considered statistically significant (54.1 ± 18.7 vs 34.4 ± 18.9 ; $p = 0.0001$). The Rh phenotype positive (n = 189) was present in 89% of individuals, while the Rh-negative (n = 23) in 11%. The ART of reagents individuals for *T. gondii* was lower in males (0.672 ± 0.303) than in females (0.819 ± 0.270) ($p = 0.0036$). This same difference was observed between the non-reagent (0.475 ± 0.140 vs 0.791 ± 0.323), respectively ($p < 0.0001$). Infected men (0.658 ± 0.282) had higher ART

than uninfected men (0.488 ± 0.129) for *T. gondii*, both Rh positive ($p = 0.0004$). Women, infected or not, did not differ for ART even when compared by phenotype (positive or negative) Rh. **Conclusions:** Rh positive men infected with *T. gondii* have a higher ART than uninfected Rh positive men. Infected women do not differ in ART compared to women uninfected by *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Rh system; reaction time to stimulus

1. Introdução

A infecção por *Toxoplasma gondii* vem sendo associada a manifestações neurológicas tais como agressividade, esquizofrenia e enxaqueca.⁽¹⁻⁴⁾ Estudos realizados com modelos murinos demonstram que a presença deste parasito no tecido nervoso pode afetar algumas funções neurológicas.^(5,6) Há evidências de que este parasito compromete o funcionamento cerebral, age sobre o comportamento, a personalidade e a habilidade psicomotora, inclusive em humanos.⁽²⁾

Estudos encontraram evidências de que a atenção e a aptidão escolar, a concentração e o tempo de reação a estímulos visuais estão diminuídos nos indivíduos infectados por *T. gondii*.⁽⁷⁻⁹⁾ Os distúrbios resultantes da infecção por este parasito contribuem para os agravos da saúde e podem acometer o desenvolvimento intelectual de crianças e adultos.^(10,11) Além disso, elevam os riscos de acidentes de trânsito e reduzem ou impedem a realização de atividades que requerem habilidades específicas.^(11,12)

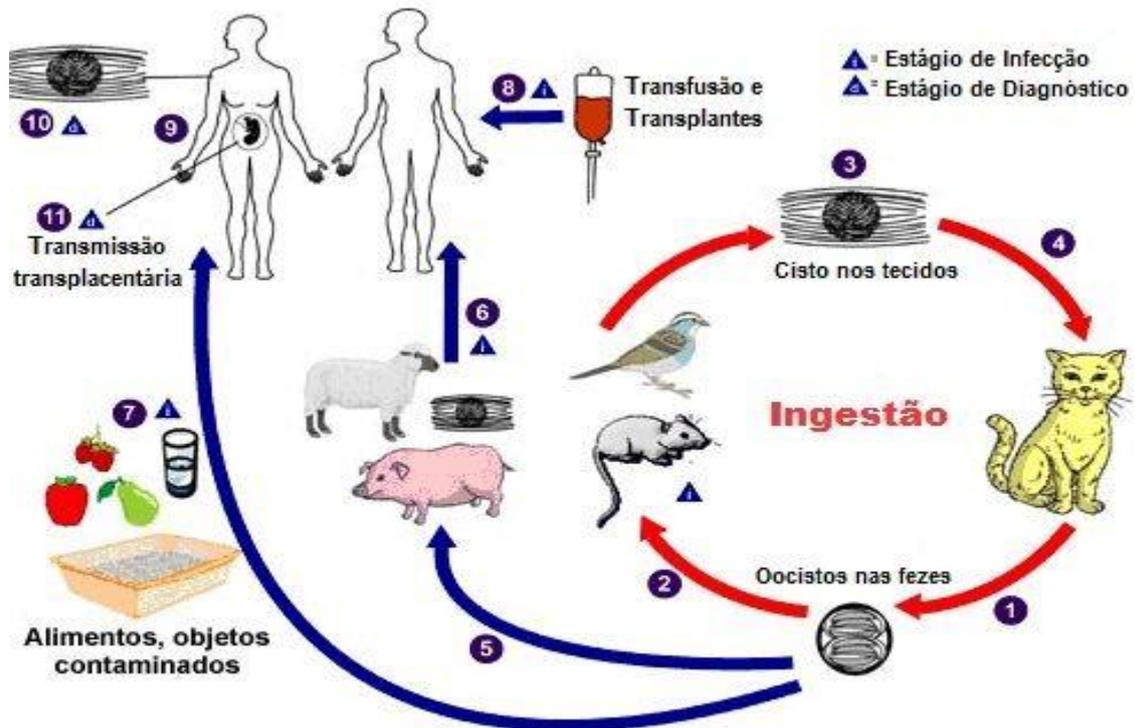
1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um protozoário oportunista, intracelular obrigatório que infecta elevado percentual de indivíduos em todo o mundo.⁽¹³⁻¹⁵⁾ A infecção por este parasito acomete os humanos e animais incluindo suínos, caprinos, aves, animais silvestres, cães, gatos e a maioria dos vertebrados terrestres homeotérmicos. Reveste-se de grande importância epidemiológica, clínica e econômica uma vez que acarreta abortos e nascimento de fetos mal formados tanto nos seres humanos como nos animais.⁽¹⁶⁾

T. gondii possui três formas infectantes em seu ciclo de vida: oocisto, bradizoítos contidos em cistos e taquizoítos. O gato e outros felídeos são os hospedeiros

definitivos e contribuem com a produção e eliminação de oocistos (ovos) e perpetuação do parasito. Ao ingerirem cistos presentes nos tecidos de suas presas (ratos e pássaros) contribuem com a reprodução sexuada do *T. gondii*. Desta forma, eliminam pelas fezes oocistos não esporulados por um período aproximado de quinze dias. As condições ideais de temperatura, pressão, oxigenação e umidade favorecem a esporulação dos oocistos.⁽¹⁷⁾

Nos humanos, a infecção por *T. gondii* se dá por transmissão congênita ou pós-natal.⁽¹³⁾ A forma congênita ocorre por via placentária quando a mãe apresenta infecção aguda ou uma reativação de infecções crônicas durante a gestação.⁽¹⁸⁾ A forma pós-natal se dá principalmente pelo consumo de alimentos (frutas, legumes e carnes mal cozidas) e água contaminados.^(15,19) Entretanto, há demonstrações de que este parasito é transmitido por meio da transfusão de hemocomponentes,⁽²⁰⁻²²⁾ transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea.^(15,19,23) A figura 1 mostra o ciclo de transmissão do parasito *T. gondii*.



Fonte: Adaptado de dpd.cdc.gov

Figura 1. Ciclo de transmissão do parasito *Toxoplasma gondii*.

A infecção por *T. gondii* é, na maioria dos casos, assintomática nos indivíduos imunocompetentes.^(24,25) Em casos de infecções agudas sintomáticas há parasitemia demonstrável e os sintomas mais comuns são linfadenopatias, febre, fadiga, dores musculares, dor de garganta e dor de cabeça.^(15,26) Na maioria dos casos não é necessário tratamento, já que o sistema imunitário confere certo grau de proteção aos indivíduos infectados.^(26,27)

Um recente levantamento que abrangeu dados de diversos países revelou que os índices de infecção por este parasito variam de menos de 10% a mais de 60%, dependendo do país.⁽²⁸⁾ No Brasil, os inquéritos soropidemiológicos realizados nos últimos 12 anos revelaram índices de infecção variando de 40 a 75%.⁽²⁹⁻³¹⁾ Uma recente revisão sobre a toxoplasmose no Brasil revelou que a severidade desta doença pode

estar associada à variabilidade genética dos isolados de humanos e animais.⁽³²⁾ Nossos recentes estudos demonstraram que aproximadamente dois terços da população da região noroeste do Estado de São Paulo apresentam anticorpos anti-*T. gondii* (IgM e/ou IgG).^(33,34)

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* é essencialmente sorológico sendo realizado por meio da detecção dos anticorpos específicos das classes IgM e IgG. Os anticorpos IgM são comuns na fase aguda enquanto que aqueles de classe IgG, estão presentes na fase crônica da doença. Contudo, o diagnóstico baseado no uso de métodos moleculares encontrou evidências de parasitemia mesmo em indivíduos portadores de infecção crônica.^(26,35)

1.2. Sistema Rh

Rh é o nome de um dos 33 sistemas de grupos sanguíneos identificados no homem até o momento e permite a classificação do sangue em dois fenótipos distintos: Rh positivo e Rh negativo. Indivíduos Rh positivos possuem o gene funcional RHD e expressam uma glicoproteína de 416 aminoácidos nos eritrócitos, denominada antígeno D(Rh₀). A ausência deste gene, e conseqüentemente desta proteína, determina o fenótipo Rh negativo. Aproximadamente 85% da população são Rh positivo e 15%, Rh negativos.⁽³⁶⁾

O gene RHD se expressa essencialmente no tecido hematopoiético e não há evidências de que sua expressão ocorra nos demais tecidos, incluindo o cérebro.⁽³⁷⁾ Estudos realizados nos últimos anos demonstraram que o antígeno D(Rh₀) exerce importante papel fisiológico, atuando como canal de amônia na membrana eritrocitária.⁽³⁸⁾ A molécula de amônia (NH₃) representa o produto final do catabolismo das proteínas e por ser muito tóxica, é removida do sangue periférico.⁽³⁹⁾

A importância médica do sistema Rh resulta do fato de o mesmo ser de grande interesse transfusional e por estar envolvido na gênese da doença hemolítica do feto e do recém-nascido. Inúmeras publicações demonstraram que o antígeno D(Rh₀), por ser altamente imunogênico, induz a produção de anticorpos anti-D(Rh) de classe IgG. Estes anticorpos, além de serem responsáveis por reações hemolíticas transfusionais em receptores de sangue Rh negativo transfundidos com sangue Rh positivo, atravessam a placenta e provocam lise dos eritrócitos fetais Rh positivos, mediada pelo sistema Complemento e pelo sistema fagocitário mononuclear.⁽³⁶⁾

1.3. Influência da infecção por *Toxoplasma gondii* na atividade neurológica e sua relação com o sistema Rh

A identificação de alterações nas funções cerebrais resultantes da infecção por *T. gondii* é de extrema importância para a compreensão da epidemiologia, do diagnóstico e da fisiopatologia da toxoplasmose, mesmo tendo-se em mente que ambos os eventos - a infecção e a função cerebral - são complexos e influenciados por múltiplos fatores.^(16,40)

Recentemente foi observado que a incidência de acidentes de trânsito entre motoristas militares Rh negativos infectados por *T. gondii* é maior que entre os Rh positivos.⁽⁹⁾ Os autores acreditam que a presença da molécula Rh₀(D) apresenta efeito protetor para os indivíduos Rh positivo. Em um estudo anterior estes mesmos autores relataram perda de concentração, memória e menor capacidade neurológica nas pessoas infectadas por este parasito.⁽⁴¹⁾

Entretanto, são escassos estudos brasileiros correlacionando a ação conjunta do sistema Rh e da infecção por *T. gondii* e modificações nas funções cerebrais, como por exemplo, o tempo de reação a estímulos visuais. Acredita-se que a expressão dos fenótipos do sistema Rh apresente alguma peculiaridade, proporcionando níveis

distintos de suscetibilidade que possam ser associados à variabilidade da resposta motora a estímulos visuais.^(9,41,42)

Recentemente foi observado que o fenótipo Rh positivo desempenha importante papel na associação entre a infecção por *T. gondii* com o desempenho psicomotor, a personalidade e a inteligência.⁽⁴³⁾ Estes autores argumentam, com base nas análises estruturais e funcionais do antígeno D, que a atividade deste antígeno como canal de amônia e possivelmente de CO₂ pode influenciar direta ou indiretamente a tensão parcial de oxigênio e o equilíbrio de água em vários tecidos inclusive o tecido cerebral. Se assumirmos que a justificativa apresentada por Flegr e colaboradores (2013)⁽⁴³⁾ está fundamentada em um raciocínio fisiológico, podemos especular que alterações na concentração de CO₂ e de oxigênio podem modular a sobrevivência do *T. gondii* nas células nervosas e conseqüentemente afetar a cognição e as atividades neuropsicomotoras, incluindo o tempo de reação a estímulos visuais.

Diante da complexidade implícita nas atividades neuropsicomotoras, nas interações entre *T. gondii* e o ser humano e a ausência de expressão do antígeno D no tecido nervoso, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta motora e o tempo de reação a estímulos visuais na presença e na ausência de infecção por este parasito em indivíduos com boa acuidade visual, Rh positivos e Rh negativos.

2. Casuística e Métodos

2.1. Aspectos Étnicos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Rio Preto - FAMERP (Parecer 050/2009 de 09/03/09) (Anexo I). Cada participante, após receber todas as informações sobre os objetivos do estudo e os procedimentos médicos e laboratoriais realizados com suas amostras de sangue, assinou o termo de consentimento livre e esclarecido. (Anexo II).

2.2. Composição da casuística

No período de Abril de 2009 a fevereiro de 2011 foram selecionados 167 pacientes, de ambos os sexos atendidos no Ambulatório de Oftalmologia do Ambulatório de Especialidades Médicas (AME) de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil. Pacientes menores de 18 anos, com baixa acuidade visual, com quaisquer evidências de doenças oftalmológicas e com doenças neurológicas, foram excluídos. Um grupo composto por 45 jovens integrantes do tiro de guerra na Cidade de Mirassol também compôs a casuística de nosso estudo. Todos os 212 indivíduos foram avaliados por um oftalmologista experiente para a certificação de boa acuidade visual.

2.3. Avaliação ocular dos pacientes selecionados

A avaliação clínica ocular dos pacientes foi realizada por um profissional experiente (FBF), por meio do exame de fundoscopia com o uso de oftalmoscópio binocular indireto (Binocular Ophthalmoscope ID 10, Topcon Corporation).

2.4. Coleta de sangue

De cada paciente selecionado foram coletadas, por punção venosa, duas amostras de sangue periférico, uma com e outra sem anticoagulante (EDTA). A amostra com EDTA foi utilizada para a identificação dos fenótipos eritrocitários Rh. As amostras sem anticoagulante foram utilizadas para obtenção do soro, o qual foi estocado a -20°C até o momento de seu uso, na identificação dos anticorpos da classe IgG, anti-*T. gondii*.

2.5. Identificação dos fenótipos eritrocitários Rh

A identificação dos fenótipos eritrocitários Rh foi realizada pelo método de hemaglutinação em tubos (prova direta), com o uso de soro anti-D (Rh_0) e soro controle Rh. Este método é universalmente aceito e o protocolo utilizado foi aquele rotineiramente realizado no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Uma gota de suspensão de hemácias a 5% em meio isotônico foi adicionada a dois tubos devidamente identificados, contendo respectivamente uma gota do soro anti-D (Rh_0) e uma gota do soro controle Rh, cada. Os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm durante 1 minuto. Os resultados foram marcados em graus de aglutinação (0, 1+, 2+, 3+ e 4+). A presença de aglutinação no tubo contendo o soro anti-D (Rh_0) em conjunto com a ausência de aglutinação no tubo contendo o soro controle Rh definiu o fenótipo Rh positivo. A ausência de aglutinação em ambos os tubos permitiu a definição do fenótipo Rh negativo.⁽³⁶⁾ A figura 2 ilustra os resultados da fenotipagem eritrocitária Rh.

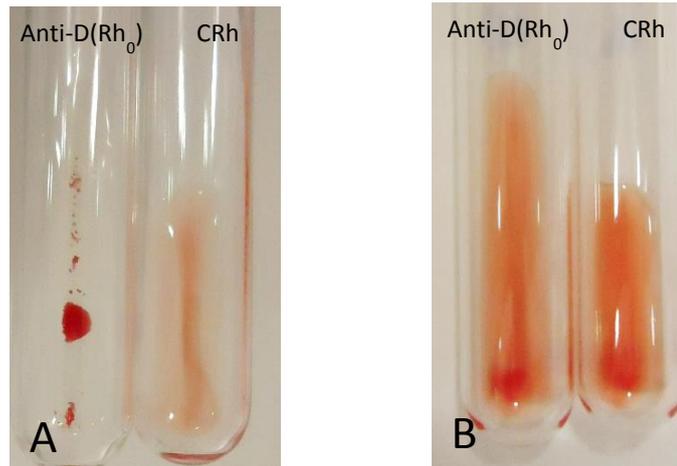


Figura2. Ilustração da fenotipagem eritrocitária Rh pelo método de aglutinação em tubos, com o uso dos anti-soros anti-D(Rh₀) e Controle Rh (CRh). Em A observa-se o resultado de uma fenotipagem eritrocitária Rh positivo e em B, Rh negativo.

2.6. Identificação de anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii*

A presença ou ausência de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG foi determinada pelo método imunoenzimático (ELISA) de acordo com uso de kits comerciais (Diasorin, Itália) seguindo o protocolo do fabricante.

2.7. Medida do tempo médio de reação aos estímulos visuais

Os pacientes foram submetidos a um teste para determinar o tempo de reação a estímulos visuais, com a utilização de um software desenvolvido especificamente para esta finalidade. Após acomodar-se de forma confortável em uma sala reservada, sem interferência de luz excessiva e ruídos, os pacientes receberam todas as instruções sobre a condução do teste.

Após o aparecimento de um retângulo amarelo no centro da tela do computador, cada paciente acionou o mouse o mais rápido possível, de acordo com sua percepção. O

acionamento leva ao desaparecimento imediato do retângulo, para repetição da avaliação. Este procedimento foi repetido 38 vezes em intervalos irregulares, dentro de um tempo regular de quatro minutos. O tempo decorrido entre o aparecimento do retângulo amarelo e o acionamento pelo indivíduo, foi registrado em milissegundos.

Cada um destes valores foi transferido para uma planilha para posterior cálculo do tempo médio de reação aos estímulos visuais de cada paciente analisado. Os cinco primeiros e os cinco últimos valores do tempo de reação foram arbitrariamente excluídos das análises. Esta estratégia foi adotada para se evitar possíveis vieses resultantes da não adequada familiarização do paciente com o teste ao seu início, bem como o possível cansaço ao seu final. A figura 3 ilustra um indivíduo realizando o teste para identificação do tempo médio de reação a estímulos visuais.

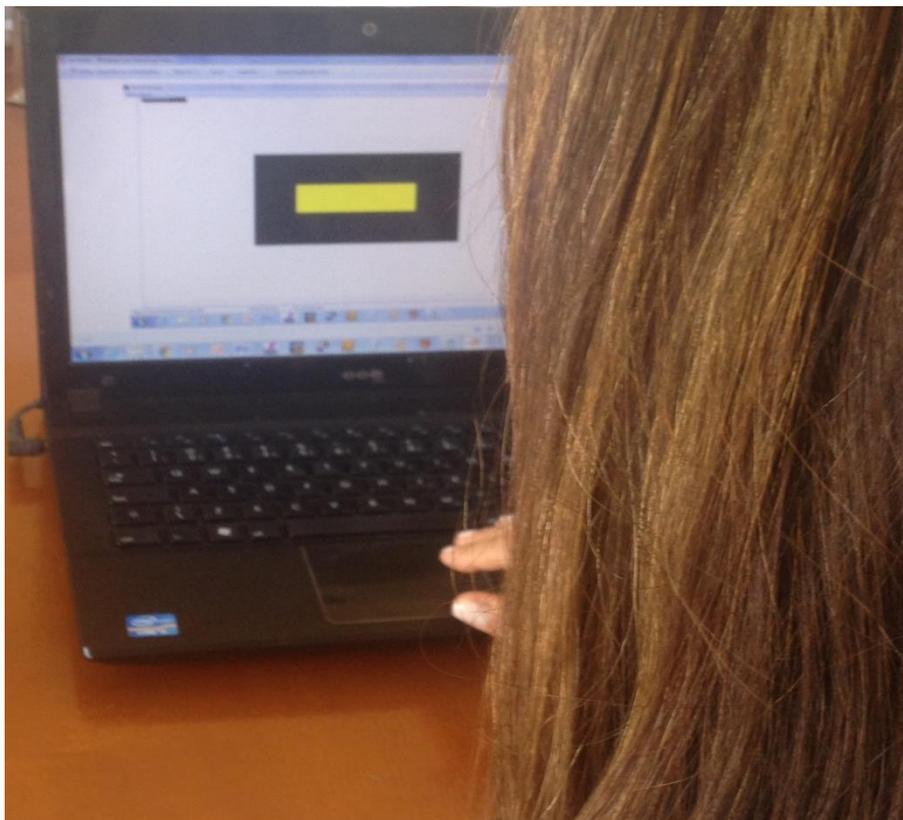


Figura 3. Ilustração da execução do teste de medida do tempo de reação a estímulos visuais com software específico.

2.8. Análise estatística

Os dados dos pacientes foram coletados e inseridos em uma planilha para análises. As variáveis anotadas foram: sexo, idade, fenótipo Rh, presença ou não de infecção por *T. gondii*, tempo médio de reação aos estímulos visuais. Os valores percentuais para sexo, fenótipo Rh e presença ou não de infecção por *T. gondii* foram obtidos por contagem direta e comparados entre os grupos. Os valores médios de idade e do tempo de reação a estímulos visuais foram comparados entre os grupos com o uso do teste t e calculados com o uso do software GraphPad InStat (versão 3.06). Os valores de Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança a 95% também foram calculados, quando necessários. O valor p igual ou menor que 0,05 foi considerado significativo.

3. Resultados

Dos 212 pacientes seleccionados, 112 (52,8%) eram do sexo masculino e 100 (47,2%) do sexo feminino. A média de idade foi igual a $46,8 \pm 21,02$ (mínimo de 14, máximo de 89 anos). A tabela 1 contém os valores de média de idade, desvio padrão, idade mínima, idade máxima e mediana de idade para indivíduos reagentes (n=134; 63,2%) e não reagentes (n=78; 36,8%) para infecção por *T. gondii*. A maioria dos indivíduos seleccionados apresentou o fenótipo Rh positivo (n=189), 89,0%. O fenótipo Rh negativo foi encontrado em 11,0% (n=23) dos indivíduos.

Tabela 1. Média de idade, desvio-padrão, idades: mínima, máxima e mediana, de indivíduos infectados e não infectados por *Toxoplasma gondii*, separados por gênero.

	Reagentes (n=134)	Não Reagentes (n=78)	p*
Média de idade (SD)	54,1 ± 18,7	34,4 ± 18,9	0,0001
Mínimo/Máximo	14 / 89	17 / 80	
Mediana	58	20,5	
Masculinos (n=112)	50,3 ± 21,6	29,8 ± 18,2	0,0001
Mínimo/Máximo	14 / 89	18 / 80	
Mediana	56	19	
Femininos (n=100)	57,5 ± 15,0	42,1 ± 17,9	0,0001
Mínimo/Máximo	18 / 87	17 / 73	
Mediana	58	44	

*Calculado com o uso do teste t.

A tabela 2 mostra as diferenças entre o tempo médio de reação de homens e mulheres, reagentes e não reagentes ao parasito, de acordo com a faixa etária. O tempo médio de reação dos indivíduos reagentes para o *T. gondii* foi menor no sexo masculino que no feminino (p=0,0036). Esta diferença também foi observada entre os indivíduos não infectados, quando comparados por sexo (p<0,0001).

Tabela 2. Tempo médio de reação (TMR) e desvio-padrão (DP) de indivíduos reagentes e não reagentes para *Toxoplasma gondii*, por gênero e faixa etária.

Indivíduos	N	Reagentes		Não Reagentes		p*
		N	TMR (\pm DP)	N	TMR (\pm DP)	
Todos	212	134	0.766 \pm 0.341	78	0.586 \pm 0.270	<0.0001
Masculino	112	63	0.672 \pm 0.303	49	0.475 \pm 0.140	<0.0001
Até 29 anos	53	18	0.458 \pm 0.071	35	0.424 \pm 0.079	0.1284
30 – 59 anos	26	17	0.653 \pm 0.263	9	0.615 \pm 0.209	0.7177
60 – 89 anos	33	28	0.821 \pm 0.336	5	0.578 \pm 0.120	0.1237
Feminino	100	71	0.819 \pm 0.270	29	0.791 \pm 0.323	0.5904
Até 29 anos	14	10	0.696 \pm 0.164	4	0.693 \pm 0.120	0.9734
30 – 59 anos	46	32	0.751 \pm 0.211	14	0.802 \pm 0.448	0.5964
60 – 89 anos	40	35	0.957 \pm 0.437	5	0.859 \pm 0.130	0.6259

*Calculado com o uso do teste t.

A tabela 3 apresenta as diferenças no tempo médio de reação dos indivíduos Rh positivo e Rh negativo, separados por gênero.

Tabela 3. Diferenças entre o tempo médio de reação (TMR) e desvio-padrão (DP) dos indivíduos Rh positivos e Rh negativos, por gênero.

Indivíduos	N	Rh positivo		Rh negativo		p*
		N	TMR (\pm DP)	N	TMR (\pm DP)	
Todos	212	187	0.700 \pm 0.329	25	0.696 \pm 0.328	0.9494
Masculino	112	98	0.580 \pm 0.240	14	0.626 \pm 0.403	0.5390
Feminino	100	89	0.816 \pm 0.354	11	0.794 \pm 0.239	0.6780

*Calculado com o uso do teste t.

A tabela 4 apresenta as diferenças entre o tempo médio de reação dos indivíduos Rh positivos e Rh negativos, reagentes ou não ao *T. gondii*, separados por gênero e idade.

Tabela 4. Tempo médio de reação (TMR) observado em indivíduos reagentes e não reagentes para a infecção por *Toxoplasma gondii* comparados por gênero, idade e fenótipo Rh.

Rh	Masculino				p*	Feminino				p*
	Reagentes		Não Reagentes			Reagentes		Não Reagentes		
	N	TMR (\pm DP)	N	TMR (\pm DP)		N	TMR (\pm DP)	N	TMR (\pm DP)	
Rh pos	53	0.658 \pm 0.282	45	0.488 \pm 0.129	0.0004	62	0.859 \pm 0.372	27	0.773 \pm 0.335	0.3031
Até 29	15	0.468 \pm 0.072	31	0.437 \pm 0.045	0.0803	4	0.693 \pm 0.120	9	0.708 \pm 0.169	0.8770
30 - 59	14	0.624 \pm 0.263	9	0.615 \pm 0.209	0.9317	27	0.733 \pm 0.222	14	0.802 \pm 0.448	0.5129
60 - 89	24	0.795 \pm 0.307	5	0.578 \pm 0.120	0.1346	31	0.990 \pm 0.450	4	0.816 \pm 0.103	0.4523
Rh neg	10	0.748 \pm 0.407	4	0.322 \pm 0.185	0.0713	9	0.779 \pm 0.167	2	0.809 \pm 0.311	0.8844
Até 29	3	0.407 \pm 0.041	4	0.322 \pm 0.185	0.4773	0	–	1	0.589 \pm 0.0	–
30 - 59	3	0.784 \pm 0.269	0	0	0	5	0.844 \pm 0.109	0	–	–
60 - 89	4	0.978 \pm 0.510	0	0	0	4	0.698 \pm 0.206	1	1.030 \pm 0.0	–

*Calculado com uso do teste t

4. Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar se a infecção por *T. gondii* modula o tempo médio de reação a estímulos visuais. A proposição prévia de que a infecção por este parasito aumenta o risco de acidentes de tráfego em indivíduos Rh negativo por meio da redução da resposta motora nos motivou a verificar se estas associações ocorrem com indivíduos expostos a estímulos visuais.^(9,42)

Para tanto, foi selecionada uma casuística composta de indivíduos de ambos os sexos infectados e não infectados, Rh positivos e negativos, estratificados por faixa etária. Todos os indivíduos selecionados foram submetidos à avaliação oftalmológica e apresentaram acuidade visual adequada para a idade. A seguir, suas respostas aos estímulos visuais foram avaliadas com o uso de um software específico que forneceu os valores do tempo médio de reação em milissegundos durante três minutos e trinta segundos.

O percentual de infecção por *T. gondii* encontrado na casuística foi semelhante àquele relatado em outros estudos realizados pelo nosso grupo na mesma região.^(33,34) Neste sentido, os dados deste estudo confirmam que aproximadamente dois terços da população da região noroeste do Estado de São Paulo encontram-se infectados pelo parasito e esta condição é evidenciada pela detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (IgM e/ou IgG) em amostras de soro.

A média de idade dos indivíduos infectados foi maior que a dos não infectados. Esta diferença se manteve quando os indivíduos infectados e não infectados foram comparados por gênero. Há evidências de a prevalência de infecção por *T. gondii* aumenta com a idade, pois há maior exposição às reinfecções pelo parasito, sem necessariamente apresentar manifestações clínicas da doença.^(33,34) Relações diretamente

proporcionais entre o aumento da idade e resultados de testes sorológicos reagentes com anticorpos IgG anti-*T.gondii* foram relatados em cubanos e em tchecos.^(44,45)

O tempo médio de reação dos indivíduos infectados por *T. gondii* foi maior que dos não infectados sugerindo que a infecção por este parasito afeta, pelo menos em parte, a resposta motora. Estes dados concordam com as proposições da literatura as quais revelam que a infecção modularia, tanto a atividade motora, como o tempo de reação a estímulos visuais.^(9,11,42)

A motricidade é dependente de um conjunto de fatores que regulam as atividades neurológicas e este estudo explorou apenas a implicação do estímulo visual e do tempo transcorrido entre este estímulo e o comando cerebral para a resposta motora na presença e na ausência de infecção por *T. gondii*. Este parasito infecta células nucleadas de animais de sangue quente e apresenta tropismo por células nervosas, mas o mecanismo pelo qual modula a resposta motora não é totalmente compreendido.^(40,46)

Após a fase aguda da infecção, *T. gondii* se diferencia em bradizoíto e permanece em cistos teciduais no músculo e no tecido nervoso. A maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática e esta condição tende a se perpetuar para o resto da vida do hospedeiro. Sob condições de imunodeficiências os cistos podem ser reativados e ao readquirir sua atividade patogênica causam doença no hospedeiro.^(47,48) Contudo, ainda é difícil dimensionar os efeitos deletérios da presença de cistos de *T. gondii* no tecido nervoso de indivíduos imunocompetentes.

A maioria dos indivíduos infectados desenvolve respostas imunes que oferecem relativa imunidade ao *T. gondii*. As imunidades humoral e celular contribuem para esta proteção reduzindo as chances de doença em gestantes, fetos e indivíduos imunologicamente competentes. Embora os anticorpos específicos não exerçam ação

efetiva contra as formas parasitárias intracelulares, são cruciais na proteção contra as formas extracelulares deste parasito. Acredita-se também que a ruptura periódica dos cistos constitua um fator biológico que modula a manutenção da resposta imune a este parasito.⁽⁴⁷⁾ É possível que a ruptura periódica de cistos no tecido nervoso afeta diferentes funções neurológicas contribuindo para os efeitos deletérios da infecção por *T. gondii* no comportamento dos seres humanos.⁽¹¹⁾

Há demonstrações de que pelo menos na toxoplasmose congênita, o parasito pode se proliferar no tecido nervoso independente do controle exercido pelos anticorpos maternos em outros tecidos.⁽⁴⁶⁾ Isto sugere que o parasito pode apresentar baixa proliferação em tecidos imunologicamente privilegiados como o cérebro e que a barreira hemato-encefálica, por não ser totalmente permeável a determinados anticorpos específicos, facilita indiretamente a ação parasitária.^(40,49) Sob estas condições o parasito poderá não desencadear necessariamente um quadro de gravidade, mas ao longo do tempo, poderá exercer ação parasitária que module a resposta motora, aumentando o tempo médio de reação a estímulos visuais.

A imunidade celular é crucial para a resposta imune do hospedeiro uma vez que macrófagos ativados, linfócitos T, células Natural Killer, citocinas e a mediação do reconhecimento de antígenos do parasito por moléculas HLA de classe I, atuam em conjunto na construção da imunidade a este parasito.⁽⁴⁸⁾

Análises histopatológicas realizadas no tecido nervoso de indivíduos imunocompetentes mostrando a potencial influência da infecção por *T. gondii* nas atividades motoras são escassas. Contudo, observações indiretas revelaram que a infecção por este parasito diminui a capacidade cognitiva em crianças.⁽¹⁰⁾ Além disso,

foi relatado que a perda de concentração, de memória e menor capacidade neurológica são comuns em mulheres infectadas por este parasito.⁽⁴¹⁾

As observações feitas neste estudo estão em concordância com aquelas que demonstraram que indivíduos infectados por *T. gondii* apresentam maior tempo de reação a estímulos e capacidade motora reduzida uma vez que ambas implicam modificações de atividades neurológicas.^(9,11,41,42) Contudo, as bases bioquímicas que fundamentam as modificações do comportamento resultantes da infecção por *T. gondii* ainda permanecem inconclusivas.

O grupo tcheco coordenado por Jaroslav Flegr avaliou a infecção por *T. gondii* e o desempenho neurológico e comportamento em homem e mulheres nos últimos anos.⁽²⁾ Em 2002 este grupo demonstrou que o risco de acidentes de trânsito é maior entre motoristas com sorologia reagente para *T. gondii* em comparação àqueles sem infecção por este parasito.⁽¹²⁾ Posteriormente, observaram que homens Rh negativos não infectados por *T. gondii* apresentam tempo de reação a estímulos menor que homens Rh positivos.⁽⁴²⁾ Além disso, estes autores relataram que indivíduos Rh positivos infectados respondem mais lentamente a estímulos do que os Rh negativos não infectados. Estas proposições são desafiadoras uma vez que não há demonstrações de que a expressão dos genes do sistema Rh ocorra no tecido nervoso mesmo sabendo-se que a infecção por *T. gondii* pode resultar em doença neurológica (neurotoxoplasmose em neonatos e imunocomprometidos).⁽³⁷⁾

Com o objetivo de compreender o potencial papel da infecção por *T. gondii* como modulador neurológico, elaboramos um estudo que se caracterizou pela análise de indivíduos de ambos os sexos, infectados e não infectados, Rh positivos e Rh negativos.

Todos foram expostos a estímulos visuais e o tempo médio de reação numa escala de milissegundos foi comparado, com o uso de um software específico.

Nossos resultados mostraram que o tempo médio de reação de homens Rh positivo infectados foi maior que os não infectados. Contudo estas diferenças não foram encontradas entre mulheres Rh positivas infectadas e não infectadas. Entre os indivíduos Rh negativos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para o tempo médio de reação entre homens e entre mulheres. Esta condição é esperada, pelo menos em tese, uma vez que diferenças no tempo médio de reação a estímulos visuais entre indivíduos não infectados não podem ser atribuídas ao *T. gondii*, mas podem ser dependentes de outros fatores não investigados neste estudo. O tempo médio de reação não apresentou diferenças estatisticamente significantes quando homens e mulheres Rh positivos, Rh negativos, reagentes, não reagentes foram estratificados por idade.

Estas observações se opõem àquelas verificadas por Flegr e colaboradores.⁽⁴²⁾ As razões que embasam estas discordâncias não são conhecidas, mas o principal argumento contra o envolvimento do sistema Rh na modulação da resposta motora por *T. gondii* é que os antígenos deste sistema não são expressos no tecido nervoso.⁽³⁷⁾ Portanto, as potenciais relações entre a infecção por *T. gondii* e o sistema Rh relatadas pelo grupo de Jaroslav Flegr parecem estar muito mais fundamentadas em bases estatísticas que em mecanismos bioquímicos consistentes.

A frequência do fenótipo Rh positivo é elevada na população paulista e em outras áreas do Brasil.^(50,51) Contudo, foram relatadas variações percentuais em diferentes grupos étnicos brasileiros.⁽⁵²⁻⁵⁴⁾ A base genética do fenótipo Rh positivo resulta da presença do gene RHD, mas a ausência deste gene determina o fenótipo Rh

negativo. A base bioquímica do Rh positivo é determinada pela presença de um polipeptídeo contendo 436 aminoácidos, cuja síntese é controlada pelo gene RHD. Este polipeptídeo está ausente nos indivíduos Rh negativo.^(38,55)

Embora o gene RHD esteja presente em homozigose ou heterozigose nos indivíduos Rh positivos, sua expressão é restrita ao tecido hematopoiético e somente os eritrócitos são capazes de carregar o polipeptídeo RH.⁽⁵⁶⁾ Até o momento não foram encontradas evidências de que o gene RH se expressa em outros tecidos, incluindo o nervoso.⁽³⁷⁾

O *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório, infecta todas as células nucleadas de animais de sangue quente.⁽⁴⁰⁾ Tem predileção pelo tecido nervoso o que é fortemente demonstrado pelo grande número de casos de neurotoxoplasmose diagnosticado em pacientes com imunodeficiências.^(46,57,58) Além disso, há evidências epidemiológicas e experimentais demonstrando que a infecção por este parasito modifica o comportamento em humanos e animais, respectivamente, embora haja contestações.⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ Contudo, é correntemente aceito que o neurônio é uma importante célula que serve de hospedeira para este parasito intracelular obrigatório.

Tendo-se em mente que o *T. gondii* não infecta eritrócitos em seu ciclo biológico torna-se difícil estabelecer uma relação de causa e efeito entre este parasito e os glóbulos vermelhos. Fica difícil mais ainda correlacionar a infecção por *T. gondii* no tecido nervoso com uma molécula que, embora seja comum na população e expressa em larga escala nos eritrócitos, não se encontra presente nos neurônios.

O menor número de indivíduos Rh negativos na casuística selecionada para este estudo resultou de sua menor frequências populacional e isso de fato comprometeu a realização de análises mais apuradas dos indivíduos com este fenótipo em relação ao

tempo médio de reação aos estímulos visuais bem como em relação à infecção por *T. gondii*.

Os resultados deste estudo nos impelem a refletir sobre o papel da infecção por *T. gondii* nas atividades psicomotoras. O fato da infecção por este parasito possivelmente aumentar o tempo de reação a estímulos visuais pode comprometer de forma mais ou menos intensa o reflexo de um indivíduo em situações que requerem manobras bruscas ao volante, por exemplo. A largada mais rápida realizada por atletas de alto nível em competições de curto espaço pode ser afetada na presença da infecção por este parasito. Os cuidados que devem ser tomados por tratadores de animais peçonhentos e selvagens requerem condições de reflexão motora mais rápida para evitar acidentes. Além disso, pilotos de caça em situações de risco necessitam ejetar como forma de evasão de acidentes, bem como aqueles que inconscientemente, executam movimentos bruscos (retirar a mão da chapa quente, tossir, espirrar, piscar, etc.) como resultado do arco-reflexo. É possível que a infecção por *T. gondii*, despercebida pela grande maioria da população, tenha impactos nas atividades cotidianas do ser humano.

Este estudo encontrou resultados interessantes que podem ser explorados e ampliados em outras populações e sob diferentes circunstâncias. Contudo, apresenta algumas limitações que precisam ser refletidas. A primeira delas se refere à amplitude etária da casuística. É possível que boa parte dos indivíduos selecionados com idade acima de 60 anos não estejam totalmente familiarizados com o manuseio de computadores, haja vista este tipo de dispositivo ter sido introduzido de forma regular em nosso meio, nos últimos 30 anos. Isso pode ter contribuído para algumas incorreções na avaliação de suas habilidades em responder adequadamente aos propósitos do teste destinado a medir o tempo de reação a estímulos visuais. Uma forma de compensar

estas potenciais incorreções foi submeter todos os indivíduos selecionados a avaliação da acuidade visual por um oftalmologista experiente.

A segunda limitação se refere ao fato de que o sistema Rh foi avaliado apenas pela fenotipagem eritrocitária e não pela genotipagem. Este último teste permite diferenciar entre os Rh positivos aqueles que são homozigotos daqueles que são heterozigotos. De fato, foi proposto por Novotná e colaboradores (2008) que a infecção por *T. gondii* modula a distribuição populacional dos genótipos Rh de indivíduos homozigotos e heterozigotos para o gene RHD.⁽⁴²⁾ Contudo, é possível que esta condição não investigada seja compensada pelo fato do gene RHD não ser expresso no tecido nervoso.⁽³⁷⁾

Finalmente, a terceira limitação se refere ao fato de que a existência ou não de uma ou mais associações entre as variáveis investigadas (gênero, faixa etária, fenótipos Rh positivo e negativo, tempo de reação a estímulos visuais) não implica necessariamente a potencial ocorrência de um efeito biológico absolutamente dependente da infecção por *T. gondii*, quando demonstrado por meio de análises estatísticas simples ou mesmo sofisticadas.

Em síntese, é altamente provável que resultados similares aos relatados neste estudo também ocorram em relação à infecção por outros microrganismos patogênicos e que os mesmos possam afetar de forma direta ou indireta diferentes aspectos do comportamento psicossocial e neuromotor. Os indivíduos selecionados neste estudo foram analisados quanto à presença ou ausência de infecção por *T. gondii*, mas não para a infecção por outros microrganismos. Portanto, a presença ou a ausência de infecção por outros potenciais microrganismos poderia contribuir com a obtenção de resultados

falso-negativos (em indivíduos com outras infecções e além do *T. gondii*) mas não os falso positivos (indivíduos sem outras infecções mas com o *T. gondii*).

5. Conclusões

Homens Rh positivos infectados por *T. gondii* apresentam tempo médio de reação maior que homens Rh positivos não infectados.

Mulheres infectadas não diferem quanto ao tempo médio de reação em comparação a mulheres não infectadas por *T. gondii*.

O tempo médio de reação, independente da infecção por *T. gondii*, não difere entre homens e mulheres Rh positivo e negativo.

Referências Bibliográficas

1. Arnott MA, Cassella JP, Aitken PP, Hay J. Social interactions of mice with congenital *Toxoplasma* infection. *Ann Trop Med Parasitol*. 1990;84(2):149-56.
2. Flegr J. Effects of toxoplasma on human behavior. *Schizophr Bull*. 2007;33(3):757-60.
3. Li Y, Weber NS, Fisher JA, Yolken RH, Cowan DN, Larsen RA, et al. Association between antibodies to multiple infectious and food antigens and new onset schizophrenia among US military personnel. *Schizophr Res*. 2013;151(1-3):36-42.
4. Koseoglu E, Yazar S, Koc I. Is *Toxoplasma gondii* a causal agent in migraine? *Am J Med Sci*. 2009;338(2):120-2.
5. Hrdá S, Votýpka J, Kodým P, Flegr J. Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral changes in mice. *J Parasitol*. 2000;86(4):657-63.
6. Berenreiterova M, Flegr J, Kubena AA, Nemeč B. The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: implications for the behavioral manipulation hypothesis. *Plos One*. 2011;6(12):e28925.
7. Flegr J, Hrdý I. Influence of chronic toxoplasmosis on some human personality factors. *Folia Parasitol*. 1994;41(2):122-6.
8. Flegr J, Preiss M, Klose J, Havlíček J, Vitáková M, Kodým P. Decreased level of psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* dopamine, a missing link between schizophrenia and toxoplasmosis? *Biol Psychol*. 2003;63(3):253-68.
9. Flegr J, Klose J, Novotná M, Berenreitterová M, Havlíček J. Increased incidence of traffic accidents in *Toxoplasma*-infected military drivers and protective effect RhD molecule revealed by a large-scale prospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2009;9:72.
10. Hengst P. Zur häufigkeit und entwicklung der kinder mit latenter konnataler *toxoplasma gondii*- infektion. *Angew Parasitol*. 1979;20:216-21.
11. Havlíček J, Gasova Z, Smith AP, Zvara K, Flegr J. Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis. *Parasitology*. 2001;122(5):515-20.
12. Flegr J, Havlíček J, Kodým P, Malý M, Smahel Z. Increased risk of traffic accidents in subjects with latent toxoplasmosis: a retrospective case-control study. *BMC Infect Dis*. 2002 2;2:11.

13. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol.* 1998;11(2):267-99.
14. Howe AK, Honore S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1997;35(6):1411-4.
15. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(10):634-40.
16. Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different diseases? *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(4):438-42.
17. Bradley PJ, Sibley LD. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10(6):582-7.
18. Detanico L, Basso RMC. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. *Rev Bras Anal Clin.* 2006; 38(1):15-8.
19. Walker M, Zunt JR. Parasitic central nervous system infections in immunocompromised hosts. *Clin Infect Dis.* 2005;40(7):1005-15.
20. Singel SE, Lund MN, Gelderman AH, Halterman RH, Brown JA, Levine AS, et al. Transmission of Toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood.* 1971;37(4):388-94.
21. Räisänen S. Toxoplasmosis transmitted by blood transfusions. *Transfusion.* 1978;18(3):329-32.
22. Nelson JC, Kauffmann DJ, Ciavarella D, Senisi WJ. Acquired toxoplasmic retinochoroiditis after platelet transfusions. *Ann Ophthalmol.* 1989;21(7):253-4.
23. Cavattoni I, Ayuk F, Zander AR, Zabelina T, Bacher A, Cayroglu E, et al. Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection after allogeneic stem cell transplant can be difficult and requires intensive scrutiny. *Leuk Lymphoma.* 2010;51(8):1530-5.
24. Guimarães AC, Kawarabayashi M, Borges MM, Tolezano JE, Andrade Junior HF. Regional variation in Toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1993;35(6):479-83.
25. Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 2002;81(2):111-22.
26. Silveira C, Vallochi AL, Silva UR, Muccioli C, Holland GN, Nussenblatt RB, et al. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(3):396-400.

27. Colombo FA, Vida JE, Oliveira ACP, Hernandez AV, Bonasser Filho F, Nogueira RS, et al . Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):5044-7.
28. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Intern J Parasitol.* 2009;39(12):1385-94.
29. Cantos GA, Prando MD, Siqueira MV, Teixeira RM. Toxoplasmosis: occurrence of antibodies anti-*Toxoplasma gondii* and diagnosis. *Rev Ass Med Brasil.* 2000;46(4):335-41.
30. Coêlho RAI, Kobayashi M, Carvalho Junior LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003;45(4):229-31.
31. Vaz RS, Guimarães ATB, Bonanato LD, Thomaz-Soccol V. Technical evaluation of serological screening tests for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies to prevent unnecessary transfusion risks. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(4):277-80.
32. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.* 2012;139(11):1375-424.
33. Rodrigues ACF, Uezato S, Vono MB, Pandossio T, Spegiorin LCJF, Oliani AH, et al. Non-association between anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and ABO blood group system. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2011;17(2):184-9.
34. Gonçalves MAS, Mattos CCB, Spegiorin LCJF, Oliani DCMV, Oliani AH, Mattos LC. Seropositivity rates for toxoplasmosis, rubella, syphilis, cytomegalovirus, hepatitis and HIV among pregnant women receiving care at a public health service, São Paulo state, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2010;14(6):601-5.
35. Mattos CCB, Meira CS, Ferreira AIC, Frederico FB, Hiramoto RM, Almeida Junior GC, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(3):362-6.
36. Daniels G. *Human Blood Groups.* Oxford: Blackwell; 2013.
37. Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood.* 2010;115(23):4635-43.
38. Van-Kim CL, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev.* 2006;20(2):93-110.

39. Kosenko E, Kaminsky YG, Felipo V, Minana MD, Grisolia S. Chronic hyperammonemia prevents changes in brain energy and ammonia metabolites induced by acute ammonium intoxication. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1180(3):321-6.
40. Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol*. 2003;11(9):426-30.
41. Flegr J, Novotná M, Lindová J, Havlíček J. Neurophysiological effect of the Rh factor: protective role of the RhD molecule against *Toxoplasma*-induced impairment of reaction times in women. *Neuroendocrinol Lett*. 2008;29(4):475-81.
42. Novotná M, Havlíček J, Smith AP, Kolbeková P, Skallová A, Klose J, et al. *Toxoplasma* and reaction time: role of toxoplasmosis in the origin, preservation and geographical distribution of Rh blood group polymorphism. *Parasitology*. 2008;135(11):1253-61.
43. Flegr J, Preiss M, Klose J. Toxoplasmosis-associated difference in intelligence and personality in men depends on their rhesus blood group but not ABO blood group. *Plos One*. 2013;8(4):e61272.
44. López R, Fano R, Contreras R, Font L. Anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en Cubanos donantes de sangre. *Rev Latinoam Microbiol*. 1993; 35(2):207-10.
45. Kolbekova P, Kourbatova E, Novotna M, Kodym P, Flegr J. New and old risk factor for *Toxoplasma gondii* infection: prospective cross-sectional study among military personnel in the Czech Republic. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(10):1012-7.
46. Ferguson DJ, Bowker C, Jeffery KJ, Chamberlain P, Squier W. Congenital toxoplasmosis: continued parasite proliferation in the fetal brain despite maternal immunological control in other tissues. *Clin Infect Dis*. 2013;56(2):204-8.
47. Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*. 2004; 40(1):71-80.
48. Munhoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev*. 2011;240(1):269-85.
49. Skrlj N, Dolinar M. New engineered antibodies against prions. *Bioengineered* 2013;5(1):1-5.
50. Novaretti MCZ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucásios e negróides na cidade de São Paulo. *Rev bras hematol hemoter*. 2000; 22(1):23-32.

51. Guerreiro JF, Maia EACF. ABO and Rh blood groups, migration and estimates of racial admixture for the population of Belém, State of Pará, Brazil. *Rev Bras Genet.* 1988;11(1):171-86.
52. Rosa VL, Salzano FM, Franco MHLP, Freitas MJ. Blood genetic studies in five Amazonian populations. *Rev Bras Genet.* 1984;7(3):569-82.
53. Venturelli LE, Morais MMJB. Frequências gênicas dos sistemas ABO, MNSs e Rh em caucásóides e negróides da cidade de Campinas, SP. *Rev Bras Genet.* 1986; 9(1):179-85.
54. Salaru NN, Otto P. Blood groups in a large sample from the city of São Paulo (Brazil): allele and haplotype frequencies for MNSs, Kell-Cellano, Rh and ABO systems. *Rev Bras Genet.* 1989;12:625-43.
55. Avent ND. RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges. *Methods Mol Biol.* 2008;444:185-201.
56. Iwamoto S, Yamasaki M, Kawano M, Okuda H, Omi T, Takahashi J, et al. Expression analysis of human Rhesus blood group antigens by gene transduction into erythroid and non-erythroid cells. *Int J Hematol.* 1998;68(3):257-68.
57. Finsterer J, Auer H. Parasitoses of the human central nervous system. *J Helminthol.* 2013;87(3):257-70.
58. Schmidt M, Sonnevile R, Schnell D, Bigé N, Hamidfar R, Mongardon N, et al. Clinical features and outcomes in patients with disseminated Toxoplasmosis admitted to intensive care: a multicenter study. *Clin Infect Dis.* 2013;57(11):1535-41.
59. Webster JP, Kaushik M, Bristow GC, McConkey GA. Toxoplasma gondii infection, from predation to schizophrenia: can animal behaviour help us understand human behaviour? *J Exp Biol.* 2013;216(1):99-112.
60. Jia B, Lu H, Liu Q, Yin J, Jiang N, Chen Q. Genome-wide comparative analysis revealed significant transcriptome changes in mice after Toxoplasma gondii infection. *Parasit Vectors.* 2013;6:161.
61. Worth AR, Lymbery AJ, Thompson RC. Adaptive host manipulation by Toxoplasma gondii: fact or fiction? *Trends Parasitol.* 2013;29(4):150-5.

ANEXO I

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

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

Parecer n.º 050/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo nº 1980/2009 sob a responsabilidade de Luiz Carlos de Mattos, com o título "Associação entre a toxoplasmose ocular e o perfil de glicoconjugados ABH-Lewis" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 09 de março de 2009.


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP

ANEXO II

FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa denominada **Associação entre a toxoplasmose ocular e o perfil de glicoconjugados ABH-Lewis**. O *Toxoplasma gondii* é o parasita que causa a toxoplasmose e essa doença pode ser transmitida aos seres humanos pelo gato e outros animais. Ela representa uma das principais doenças infecciosas encontradas em mulheres grávidas, pode ser transmitida da mãe para o bebê e também afeta outras pessoas.

Essa pesquisa tem como objetivos identificar os tipos sanguíneos ABO, Lewis e Secretor em mulheres grávidas e em doadores de sangue para determinar se essas características genéticas favorecem ou não a infecção pelo *Toxoplasma gondii*. Além disso, irá verificar se pessoas sem problemas de visão tem alterações nos estímulos visuais quando estão ou não estão infectadas por *T. gondii*. Os resultados dessa pesquisa poderão ajudar na compreensão dos fatores genéticos que influenciam a infecção pelo *T. gondii* e poderão beneficiar você e muitas outras pessoas.

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

Para participar como voluntária nessa pesquisa será necessário:

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

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

Se você tiver qualquer dúvida sobre essa pesquisa ou mesmo sobre lesões relacionadas à coleta de sangue, entre em contato com o Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos pelo telefone ou pelo endereço abaixo indicados. Caso você tenha qualquer dúvida sobre seus direitos como sujeito de pesquisa, você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo telefone (17) 3201-5700 – Ramal 5813.

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

Declaração do sujeito da pesquisa

Eu voluntariamente aceito participar da pesquisa “**Associação entre a toxoplasmose ocular e o perfil de glicoproteínas ABH-Lewis**”. Li e compreendi essa declaração de consentimento livre e esclarecido e os riscos descritos. Entendo que posso retirar meu consentimento ou retirar-me dessa pesquisa a qualquer momento, sem perder nenhum benefício aos quais tenho direito.

....., de de

 Responsável pela discussão do
 consentimento livre e esclarecido

 Assinatura do sujeito da pesquisa
 ou seu representante legal

 Pesquisador responsável

Endereço para contato:

Laboratório de Imunogenética

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

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416

São José do Rio Preto - 15090-000

Fones: (17) 3201-5854 (Faculdade)