

**Ana Iara da Costa Ferreira**

**Fatores de Risco para Infecção por  
*Toxoplasma gondii* e Desenvolvimento  
da Retinocoroidite Toxoplásmica**

**São José do Rio Preto  
2011**

Ana Iara da Costa Ferreira

Fatores de Risco para Infecção por  
*Toxoplasma gondii* e Desenvolvimento da  
Retinocoroidite Toxoplásmica

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto  
para obtenção do Título de Doutor no  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde, Eixo Temático: Medicina e  
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto  
2011

Ferreira, Ana Iara da Costa

Fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* e desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica / Ana Iara da Costa Ferreira

São José do Rio Preto, 2011

195 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

1. Retinocoroidite Toxoplásmica; 2. Afinidade de Anticorpos; 3. Reação em Cadeia da Polimerase; 4. Fatores de Risco.

**ANA IARA DA COSTA FERREIRA**

**Fatores de Risco para Infecção por  
*Toxoplasma gondii* e Desenvolvimento  
da Retinocoroidite Toxoplásmica**

**BANCA EXAMINADORA**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR**

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

**2º Examinador: Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro**

**3º Examinador: Profa. Dra. Lilian Castiglioni**

**4º Examinador: Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini**

**5º Examinador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira**

**Suplentes: Prof. Dr. Fabiano Gazzi Taddei**

**Profa. Dra. Eliana Marcia Sotello Cabrera**

**São José do Rio Preto, 16/09/2011.**

## Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas e Quadros.....	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	01
1.2 Toxoplasmose humana.....	01
1.3 Retinocoroidite toxoplásmica.....	02
1.4 Imunidade do hospedeiro.....	09
1.5 Diagnóstico para infecção e retinocoroidite toxoplásmica.....	11
1.6 Glicoconjugados ABH-Lewis e infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> ....	12
1.7 Objetivo geral.....	17
1.7.1 Objetivos específicos.....	17
<b>2. Casuística e Métodos.....</b>	<b>19</b>
2.1 Aspectos éticos do estudo.....	19
2.2 Casuística.....	19
2.2.1 Diagnóstico da retinocoroidite toxoplásmica.....	20
2.2.2 Coleta de sangue.....	20

2.3 Métodos.....	20
2.3.1 Identificação dos fenótipos eritrocitários ABO.....	20
2.3.2 Identificação dos fenótipos eritrocitários Lewis.....	21
2.3.3 Identificação dos fenótipos Secretor e não Secretor.....	22
2.3.4 Identificação de anticorpos da classe IgG anti- <i>T. gondii</i> .....	24
2.3.5 Determinação dos valores de avidéz.....	24
2.3.6 Determinação dos títulos de anticorpos das classes IgM e IgG..	24
2.3.7 Extração do DNA genômico de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	24
2.3.8 Extração do DNA genômico humano.....	25
2.3.9 Avaliação da qualidade do DNA genômico humano.....	25
2.3.10 Seleção dos primers para amplificação do gene <i>B1</i> .....	28
2.3.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	28
2.3.12 Identificação dos genótipos da substituição <i>G428A-FUT2</i> .....	31
2.3.13 Identificação dos genótipos da substituição <i>T202C-FUT3</i> .....	35
2.3.14 Identificação dos genótipos da substituição <i>C314T-FUT3</i> .....	39
2.3.15 Análise estatística.....	43
<b>3. Resultados.....</b>	<b>44</b>
3.1 Manuscrito: Fatores de risco para infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> e desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica, Brasil.....	44
3.2 Manuscrito: Antígenos Lewis: potencial fator de risco para infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> e desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica.....	66
3.3 Manuscrito: Título e avidéz de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> e PCR convencional em pacientes com doenças oculares.....	100

<b>4. Conclusões.....</b>	<b>130</b>
<b>5. Referências.....</b>	<b>131</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>150</b>
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	150
Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	151
Anexo 3 – Ficha de dados epidemiológicos.....	153
<b>Apêndices.....</b>	<b>154</b>
Apêndice 1 – Morfologia e ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	154
Apêndice 2 – Toxoplasmose em imunocompetentes.....	160
Apêndice 3 – Toxoplasmose em imunocomprometidos.....	160
Apêndice 4 – Toxoplasmose congênita.....	160
Apêndice 5 – Sistema histo-sanguíneo ABO.....	161
Apêndice 6 – Biossíntese dos antígenos ABH nos eritrócitos.....	165
Apêndice 7 – Secretores e não Secretores dos glicoconjugados ABH.	166
Apêndice 8 – Sistema histo-sanguíneo Lewis.....	166
Apêndice 9 – Artigo completo publicado no periódico Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.....	170
Apêndice 10 – Artigo completo publicado no periódico São Paulo Medical Journal.....	171
Apêndice 11 – Resumo apresentado e premiado em 1º lugar na apresentação em forma de pôster durante a III Jornada de Ginecologia e Obstetrícia da SOGESP – Região Noroeste/Sudoeste, Centro de Convenções da UNIP, São José do Rio Preto, SP, 2009.....	172
Apêndice 12 – Resumo apresentado e premiado em 2º lugar na	

apresentação em forma de pôster durante a III Jornada de Ginecologia e Obstetrícia da SOGESP – Região Noroeste/Sudoeste, Centro de Convenções da UNIP, São José do Rio Preto, SP, 2009.....	174
Apêndice 13 – Resumo apresentado em forma de pôster durante o XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – MEDTROP 2010 – Foz do Iguaçu, PR, 2010.....	175
Apêndice 14 – Resumo apresentado em forma de pôster durante o XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – MEDTROP 2010 – Foz do Iguaçu, PR, 2010.....	176
Apêndice 15 – Resumo apresentado em forma de pôster durante o V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia – Guarulhos, SP, 2010.....	177
Apêndice 16 – Resumo apresentado e premiado em 3º lugar na apresentação em forma de pôster durante o V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia – Guarulhos, SP, 2010.....	178
Apêndice 17 – Resumo apresentado em forma de pôster durante o V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia – Guarulhos, SP, 2010.....	179
Apêndice 18 – Resumo apresentado e premiado em 2º lugar na apresentação em forma de pôster durante o V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia – Guarulhos, SP, 2010.....	180
Apêndice 19 – Resumo apresentado na forma oral durante XII th International Congress of Parasitology 2010 – Melbourne, Austrália.....	181
Apêndice 20 – Resumo apresentado em forma de pôster durante XII	

th International Congress of Parasitology 2010 – Melbourne, Austrália.....	182
Apêndice 21 – Resumo apresentado em forma de pôster durante XII th International Congress of Parasitology 2010 – Melbourne, Austrália.....	183
Apêndice 22 – Resumo apresentado em forma de pôster durante The Eleventh International Congress on Toxoplasmosis 2011 – Ottawa, Canada.....	184
Apêndice 23 – Resumo apresentado em forma de pôster durante The Eleventh International Congress on Toxoplasmosis 2011 – Ottawa, Canada.....	185
Apêndice 24 – Resumo apresentado na forma oral durante The Eleventh International Congress on Toxoplasmosis 2011 – Ottawa, Canada.....	186
<b>6. Referências dos apêndices.....</b>	<b>187</b>

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Paulo Cezar Ferreira e Dalcy da Costa Ferreira  
A vocês razão da minha existência,  
Pelo esforço que fizeram para eu chegar até aqui,  
Pela confiança mesmo sem entender o que eu faço,  
Pelo respeito as minhas decisões,  
Pelo amor, carinho e incentivo,  
Muito obrigada por tudo.  
Amo e os amarei por toda eternidade.*

## **Agradecimentos**

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

A Deus, o ser divino que me concedeu a dádiva da vida e que permitiu com que eu concluísse mais essa etapa de minha jornada terrestre.

À Diretoria Geral da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e seus Coordenadores: Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, Prof. Dr. Reinaldo Azoubel e Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos, pela orientação e oportunidade de ingressar na pesquisa, pelos ensinamentos transmitidos nesses anos de convivência e principalmente por acreditar no meu potencial. Minha gratidão pela amizade construída e o estímulo constante na realização deste trabalho. Obrigada por fazer parte desta grande conquista.

À MSc Cinara de Cássia Brandão de Mattos, pela oportunidade e confiança no meu trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, paciência e amizade. Minha sincera admiração e respeito.

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

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico-CNPq, pelo apoio concedido ao projeto.

À FAMERP, pelo apoio e suporte financeiro, especialmente ao Departamento de Biologia Molecular.

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

Ao Ambulatório de Oftalmologia do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto-FUNFARME. As funcionárias Sirlene e Sandra, pela ajuda e paciência em conduzir os pacientes direcionados ao projeto. Aos residentes, especialmente a Dra. Fabiana Kimie Kashiwabuchi e os médicos que nos ajudaram na seleção destes pacientes.

A Sala de Exames do Serviço de Oftalmologia do Hospital de Base, pelo fornecimento da retinografia colorida dos pacientes, em especial as funcionárias Sandra e Jane pela colaboração.

Aos médicos colaboradores do projeto Dr. Fábio B. Frederico e Dr. Gildásio C. Almeida Junior pela grande parceria, facilitando o acesso aos pacientes que compuseram a casuística e pelos ensinamentos transmitidos, meus sinceros agradecimentos.

Aos pacientes, pois com o sofrimento trazem junto de si a razão do estudo.  
Meus sinceros agradecimentos.

Aos Docentes e funcionários do Departamento de Biologia Molecular da FAMERP, pelo apoio e solidariedade.

Às funcionárias do Laboratório de Imunogenética Molecular do Hemocentro de São José do Rio Preto, em especial a MSc Juliana Rodrigues Cintra, pelos ensinamentos, paciência, apoio e amizade.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos do Instituto Adolfo Lutz (IAL) – São Paulo, em especial a Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola e Cristina da Silva Meira pela parceria, meus sinceros agradecimentos.

Aos mestres que acompanharam meus passos durante o colégio (E.E João Kopke), curso de graduação em Ciências Biológicas (Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP) e curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde (Faculdade de Medicina de Rio Preto – FAMERP).

Ao Prof. Dr. Fabiano Gazzi Taddei, pelos ensinamentos e amizade. Também pela sua participação na banca do meu exame geral de qualificação do mestrado, juntamente com o Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini que enriqueceram esse trabalho com as suas considerações.

Aos docentes que compuseram a banca da defesa do doutorado: Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro, Profa. Dra. Lilian Castiglioni, Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini e Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira que enriqueceram esse trabalho com as suas considerações.

Aos docentes responsáveis, funcionários e alunos do Laboratório de Virologia; Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular, Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular e a todos os outros que contribuíram direta ou indiretamente. Obrigada pelo apoio, amizade e carinho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, por todos os esclarecimentos e suporte.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética da FAMERP: Fabiana Nakashima (Japa), pelos ensinamentos, colaboração, amizade, carinho, confiança e respeito; Daniela Prudente Teixeira Nunes, pela colaboração, amizade e pelos bons momentos vividos; Cássia Rúbia Bernardo (Cássia Maria), pela colaboração, dedicação no projeto, amizade e carinho; Ulisses Camargo pela amizade e colaboração; Karina Younan, pelas horas de terapia e pelos conselhos que me ajudaram a lidar com as várias situações vividas ao longo dessa caminhada; Edson Pavan, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos; Laís Assenheimer de Paula Ferreira e Mariana Perez Borim pela colaboração e amizade; Márcio Roberto Rodrigues, pela colaboração na área laboratorial, pela amizade e pelos momentos de descontração; Milton Dorival

Pires, pela amizade e pelos ensinamentos na área sorológica; Maurício Cândido, pelo apoio técnico. Tenham certeza que aprendi muito com cada um de vocês.

Aos meus pais Paulo Cezar Ferreira e Dalcy da Costa Ferreira, por tudo que fizeram e fazem pelas suas filhas, não medindo esforços para que nossa felicidade venha em primeiro lugar. Obrigada por me oferecer todas as condições para que eu pudesse chegar até aqui, pelos cuidados, amor e dedicação. Vocês são meus maiores amores, Pai e Mãe AMOR eterno.

Às minhas irmãs Ana Paula Costa Ferreira e Ana Flávia Costa Ferreira, minhas melhores amigas e que sempre contribuíram de forma muito especial em tudo na minha vida. Vocês me enchem de orgulho e alegria, a vocês todo o meu respeito e amor.

Aos meus sobrinhos Luiz Paulo Ferreira Silva e Isabella Ferreira Silva, o homenzinho mais lindo e a princesa mais bela desse mundo. Obrigada por deixarem meus dias mais especiais e felizes, com todo amor de sua titia (madrinha).

Ao meu noivo Diego Henrique Andreo Estábio, por toda sua compreensão, paciência, apoio, carinho e amor. Pelos bons momentos que passamos juntos e pelos muitos que ainda iremos passar. Meu amor, minha paixão, minha vida,

meu futuro esposo e o futuro pai dos meus filhos. Obrigada por tudo, Eu Te Amo.

Aos meus cunhados Luiz Antonio da Silva Junior e Cassiano Feres Rodrigues, pela participação sempre constante em minha vida, pela amizade, conselhos, carinho e apoio.

Aos meus sogros: José Sulzer Andreo Estábio e Maria das Graças Pessini Estábio e cunhados: Natália Greici Andreo Estábio, Emerson Bianchi Ducati e Lívia Maria Andreo Estábio, por fazerem parte da minha nova família, pelo carinho e apoio.

A toda a minha família, especialmente minhas avós Venceslina e Marieta, pelo carinho e amor. Amo muito vocês.

A todas as amigas, especialmente a Ana Roberta (Beta), Angela Pinheiro de Matos, Areta Maria de Souza, Juliana da Neiva Oliveira, Juliana Villela, Karine Vanessa Luciano, Michely Dias Silva e Patricia Feijó. Obrigada por tantos momentos felizes compartilhados e pelo apoio incondicional nos momentos difíceis. Vocês fazem parte de minha vida!

Enfim, a todos que contribuíram direta e indiretamente para que eu chegasse até aqui.

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.*

*Mesmo as críticas nos auxiliam muito.*

*Chico Xavier*

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Lesão cicatricial de origem toxoplásmica.....	4
<b>Figura 2.</b>	Cisto de <i>Toxoplasma gondii</i> implantado na retina.....	5
<b>Figura 3.</b>	Lesão ativa satélite a uma lesão cicatricial.....	6
<b>Figura 4.</b>	Lesão ativa não satélite a uma lesão cicatricial.....	7
<b>Figura 5.</b>	Fenotipagem eritrocitária ABO em tubos.....	23
<b>Figura 6.</b>	Fenotipagem eritrocitária Lewis em gel centrifugação.....	23
<b>Figura 7.</b>	Perfil eletroforético de seis amostras de DNA genômico....	27
<b>Figura 8.</b>	Fragmentos dos genes <i>B1</i> e <i>β-globina</i> .....	30
<b>Figura 9.</b>	Fragmento de 1033 pb do gene <i>FUT2</i> .....	33
<b>Figura 10.</b>	Fragmento de 1033 pb clivado com a enzima <i>Ava II</i> .....	34
<b>Figura 11.</b>	Fragmento de 332 pb do gene <i>FUT3</i> .....	37
<b>Figura 12.</b>	Fragmento de 332 pb clivado com a enzima <i>Rsa I</i> .....	38
<b>Figura 13.</b>	Fragmento de 203 pb do gene <i>FUT3</i> .....	41
<b>Figura 14.</b>	Fragmento de 203 pb clivado com a enzima <i>Nla III</i> .....	42
<b>Figura 15.</b>	Formas infectantes do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	156

<b>Figura 16.</b>	Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	157
<b>Figura 17.</b>	Vias de contaminação por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	159
<b>Figura 18.</b>	Biossíntese dos antígenos ABH-Lewis.....	169

### **Figuras do Manuscrito 3.2**

<b>Figura 1.</b>	Fragmento de 1033 pb clivado com a enzima <i>Ava</i> II.....	97
<b>Figura 2.</b>	Fragmento de 332 pb clivado com a enzima <i>Rsa</i> I.....	98
<b>Figura 3.</b>	Fragmento de 203 pb clivado com a enzima <i>Nla</i> III.....	99

## Lista de Tabelas e Quadros

<b>Quadro 1.</b>	Perfis de glicoconjugados relacionados aos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis de acordo com as glicosiltransferases expressas.....	14
<b>Quadro 2.</b>	Grupos sanguíneos do sistema ABO segundo o modelo clássico de Landsteiner.....	163
<b>Quadro 3.</b>	Representação das estruturas lineares dos oligossacarídeos precursores dos antígenos do sistema histo-sanguíneo ABO.....	164

### Tabelas do Manuscrito 3.1

<b>Tabela 1.</b>	Parâmetros socioeconômicos e fatores de risco ambientais entre os pacientes com sorologia reagente e não reagente para anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , de um serviço de oftalmologia, SP, Brasil.....	64
<b>Tabela 2.</b>	Parâmetros socioeconômicos e fatores de risco ambientais entre os pacientes com retinocoroidite toxoplásmica e outras doenças oculares, ambos com sorologia reagente para anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , SP, Brasil.....	65

### Tabelas e Quadros do Manuscrito 3.2

<b>Quadro 1.</b>	Perfis de glicoconjugados relacionados aos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis de acordo com	
------------------	--	--

	as glicosiltransferases expressas.....	93
<b>Tabela 1.</b>	Sorologia para <i>Toxoplasma gondii</i> entre pacientes com e sem retinocoroidite toxoplásmica (RT).....	94
<b>Tabela 2.</b>	Frequências dos fenótipos ABO, Secretor e Lewis em pacientes com e sem sorologia reagente para a toxoplasmose.....	95
<b>Tabela 3.</b>	Frequências dos fenótipos ABO, Secretor e Lewis em pacientes com sorologia reagente para a toxoplasmose, portadores e não portadores de retinocoroidite toxoplásmica (RT).....	96

### **Tabelas do Manuscrito 3.3**

<b>Tabela 1.</b>	Distribuição dos pacientes com retinocoroidite toxoplásmica (RT) e outras doenças oculares (ODO) de acordo com o resultado das análises sorológicas Reagentes e não Reagentes para anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , atendidos em ambulatório SUS da região de São José do Rio Preto, SP, Brasil.....	127
<b>Tabela 2.</b>	Valores de título, avidéz e resultados das análises por reação em cadeia da polimerase entre os pacientes com retinocoroidite toxoplásmica (RT) e outras doenças oculares (ODO).....	128
<b>Tabela 3.</b>	Valores de título, avidéz e resultados das análises por reação em cadeia da polimerase em pacientes com retinocoroidite toxoplásmica.....	129

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
cnPCR	PCR convencional
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Fuc	Fucose
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
<i>FUT1</i>	Gene H
<i>FUT2</i>	Gene Secretor
<i>FUT3</i>	Gene Lewis
FUT1	Enzima $\alpha$ -2-L-fucosiltransferase
FUTII	Enzima $\alpha$ -2-L-Fucosiltransferase
FUTIII	Enzima $\alpha$ -3/4-L-Fucosiltransferase
GTA	Enzima $\alpha$ -1,3-N-Acetilgalactosaminiltransferase
GTB	Enzima $\alpha$ -1,3-N-Galactosiltransferase
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
IFN- $\gamma$	Interferon-Gama
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgE	Imunoglobulina de classe E
IgG	Imunoglobulina de classe G

IgM	Imunoglobulina de classe M
IL-12	Interleucina 12
KCL	Cloreto de Potássio
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimol
NaCl	Cloreto de Sódio
NK	Natural Killer
nM	Nanômetro
ODO	Outras Doenças Oculares
PB	Pares de Bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição
PEF	Penetration Enhancing Factor
pM	Picomolar
RT	Retinocoroidite Toxoplásmica
SNC	Sistema Nervoso Central
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
T <sub>H</sub> 1	Linfócitos T helper 1
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
Tris-HCl	Tris Hidrocloro
UM	Unidade
UV	Ultravioleta

## Resumo

### Fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* e desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica

**Introdução:** *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infecta os seres humanos dentre outras vias, pelo trato gastrintestinal, local de expressão dos antígenos ABO por meio de interações epistáticas entre os genes ABO, Secretor e Lewis. A retinocoroidite toxoplásmica (RT), doença resultante desta infecção, é considerada a principal causa de uveíte posterior. **Objetivo:** Avaliar os fatores de risco que contribuem para infecção por *T. gondii* e desenvolvimento da RT. **Materiais e Métodos:** Após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (parecer 050/2009), amostras de sangue periférico e soro de 357 pacientes foram analisadas. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a presença (n=82) ou ausência (n=275) de diagnóstico clínico da RT. As fenotipagens ABO e Lewis foram realizadas por meio dos métodos de hemaglutinação em tubos e colunas de gel, respectivamente. Imunofluorescência indireta (IFI), ELISA e teste de avidéz foram utilizados para definir as classes (IgM e IgG), o título e a avidéz dos anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Os genótipos *FUT2* e *FUT3* foram identificados por PCR-RFLP e o DNA do parasito por PCR convencional. **Resultados:** Das 357 amostras analisadas, 74,8% foram reagentes no ELISA e 25,2% não reagentes. Não foram encontradas amostras reagentes para IgM. Títulos elevados ( $\geq 4.000$ ) foram observados em 8,1% dos pacientes com RT e em 1% daqueles com outras doenças oculares (ODO) ( $p=0,03$ ), enquanto que os índices de avidéz elevados

( $\geq 60\%$ ) foram semelhantes em ambos os grupos ( $p=0,44$ ). O PCR mostrou-se positivo em 21/62 (33,9%) com RT e em 1/101 (0,9%) daqueles com ODO, reagentes para IgG anti-*T. gondii* ( $p<0,0001$ ). Contato direto com gato e/ou cão ( $p=0.009$ ) e ingestão de carne crua ou mal cozida ( $p=0.03$ ) associaram-se à infecção por *T. gondii*, mas não a RT. O fenótipo Le(a-b+) ( $p=0.03$ ) apresentou menor risco para infecção, enquanto que o fenótipo Le(a+b-) ( $p=0.08$ ) parece favorecer o desenvolvimento da RT.

**Conclusões:** Os resultados demonstram elevada frequência de RT presumível em pacientes com doenças oculares. Além disso, revelam que a maioria dos pacientes com RT apresentam baixos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, com alta avidéz e que o *T. gondii* encontra-se no sangue circulante de aproximadamente um terço dos pacientes independente da presença de lesões oculares resultantes da toxoplasmose. A presença de cães e/ou gatos bem como ingestão de carne crua ou mal cozida eleva os riscos de infecção por *T. gondii*, mas não influenciam no desenvolvimento da RT. A elevada expressão do antígeno Le<sup>b</sup> reflete efeito protetor contra a infecção pelo *T. gondii*, assim como o antígeno Le<sup>a</sup> parece favorecer o desenvolvimento da RT.

**Palavras-chave:** Retinocoroidite Toxoplásmica, Afinidade de Anticorpos, Reação em Cadeia da Polimerase, Fatores de Risco.

## Abstract

### Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection and development of toxoplasmic retinochoroiditis

**Introduction:** *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infects humans among other ways, from the gastrointestinal tract, site of expression of ABO antigens through epistatic interactions between ABO, Secretor and Lewis genes. The toxoplasmic retinochoroiditis (TR) disease resulting from this infection is considered the main cause of posterior uveitis. **Objective:** To evaluate the risk factors that contribute to infection with *T. gondii* and development of TR. **Materials and Methods:** After obtaining informed consent (case 050/2009), peripheral blood and serum samples from 357 patients were analyzed. Patients were divided in two groups according to presence (n=82) or absence (n=275) of clinical diagnosis of TR. ABO and Lewis phenotyping were performed using the methods of hemagglutination in tubes and gel columns, respectively. Indirect immunofluorescence (IFI), ELISA and avidity test were used to define titration and avidity of the anti-*T. gondii* antibodies. The genotypes *FUT2* and *FUT3* were identified by PCR-RFLP and the parasite DNA by conventional PCR. **Results:** From the overall 357 analyzed samples, 74.8% were ELISA reagents and 25.2% were non reagent for IgG anti-*T. gondii*. IgM antibodies were not found in any samples. High titer ( $\geq 4000$ ) were observed in 8.1% of the patients with TR and 1% of those with other ocular diseases (ODO) ( $p=0.03$ ), whereas the values of high avidity ( $\geq 60\%$ ) were similar between the groups ( $p=0.44$ ). The PCR results were positive in 21/62 (33.9%) with TR and 1/101

(0.9%) among those with ODO and reagents for IgG anti-*T. gondii* ( $p < 0.0001$ ). Direct contact with cat and / or dog ( $p = 0.009$ ) and ingestion of raw or undercooked meat ( $p = 0.03$ ) were associated with infection by *T. gondii* but not the TR. The Le(a-b+) phenotype ( $p = 0.03$ ) showed a lower risk for infection, while the Le(a+b-) phenotype ( $p = 0.08$ ) seems to favor the development of TR.

**Conclusions:** The results demonstrate high frequency of presumable TR among patients with ocular diseases. Besides reveal that majority of patients with TR present low titers of IgG anti-*T. gondii*, with high avidity and that *T. gondii* can be find in the peripheral blood of approximately one third of patients independent of ocular lesions resulting from toxoplasmosis. The presence of dogs and cats as well as ingestion of raw or undercooked meat increases the risk of infection by *T. gondii*, but does not influence the development of TR. The high Le<sup>b</sup> antigen expression reflects protective effect against infection with *T. gondii*, as well as the antigen Le<sup>a</sup> seems to favor the development of TR.

**Keywords:** Toxoplasmic Retinochoroiditis, Antibody Affinity, Polymerase Chain Reaction, Risk Factors.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* é um protozoário parasito intracelular obrigatório, causador da toxoplasmose.<sup>(1-3)</sup> Pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidia, família Sarcocystidae.<sup>(4)</sup> Foi descrito em 1908 por Nicolle e Manceaux no Instituto Pasteur da Tunísia, que o identificaram no corpo do roedor norte africano *Ctenodactylus gondii*,<sup>(5,6)</sup> e por Alfonso Splendore no Brasil, ao observar tecidos de coelhos doentes e mortos “naturalmente” em seu laboratório.<sup>(6,7)</sup> Em 1909, foi proposto por Nicolle e Manceaux o nome da espécie como *T. gondii*.<sup>(8,9)</sup> São conhecidos três estágios infectantes deste parasito: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos.<sup>(1,10)</sup>

### 1.2 Toxoplasmose humana

Os primeiros casos desta doença foram descritos por Janku, (1923) em Praga o qual observou em um paciente lesões oculares que foram relacionadas à infecção por *T. gondii*. Torres, (1927) descreveu um caso semelhante no Brasil. Wolf, Cowen e Paige (1939), relataram outro caso em uma criança com encefalomielite, com característica de transmissão congênita relacionada à infecção por *T. gondii*.<sup>(11)</sup> Sabin e Feldman em 1948, desenvolveram o primeiro método sorológico para o diagnóstico da infecção, baseado na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em animais e humanos.<sup>(12,13)</sup>

*T. gondii* apresenta em humanos, alta infectividade e baixa patogenicidade.<sup>(13)</sup> Na maioria dos casos as pessoas infectadas não

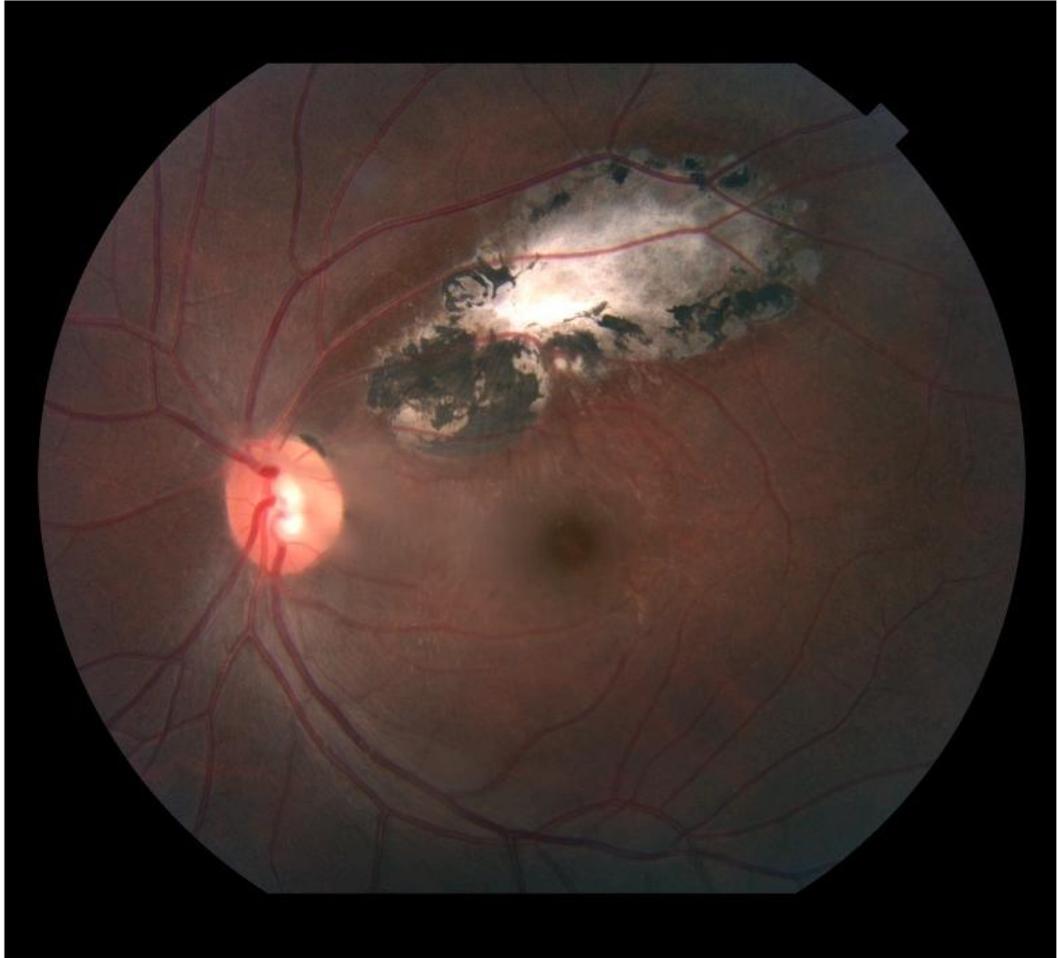
apresentam sintomas, porém a doença, quando ocorre, pode resultar em graves danos.<sup>(14)</sup> A severidade da doença está relacionada ao tipo da cepa infectante,<sup>(15)</sup> número de parasitos, rota de infecção,<sup>(16)</sup> e estado imunológico do hospedeiro.<sup>(17,18)</sup> É dada maior importância para a doença clínica confinada a alguns grupos de risco: a adquirida em pacientes imunocompetentes, a adquirida ou reativada em indivíduos imunocomprometidos, a forma congênita e a doença ocular.<sup>(19)</sup>

### 1.3 Retinocoroidite toxoplásmica

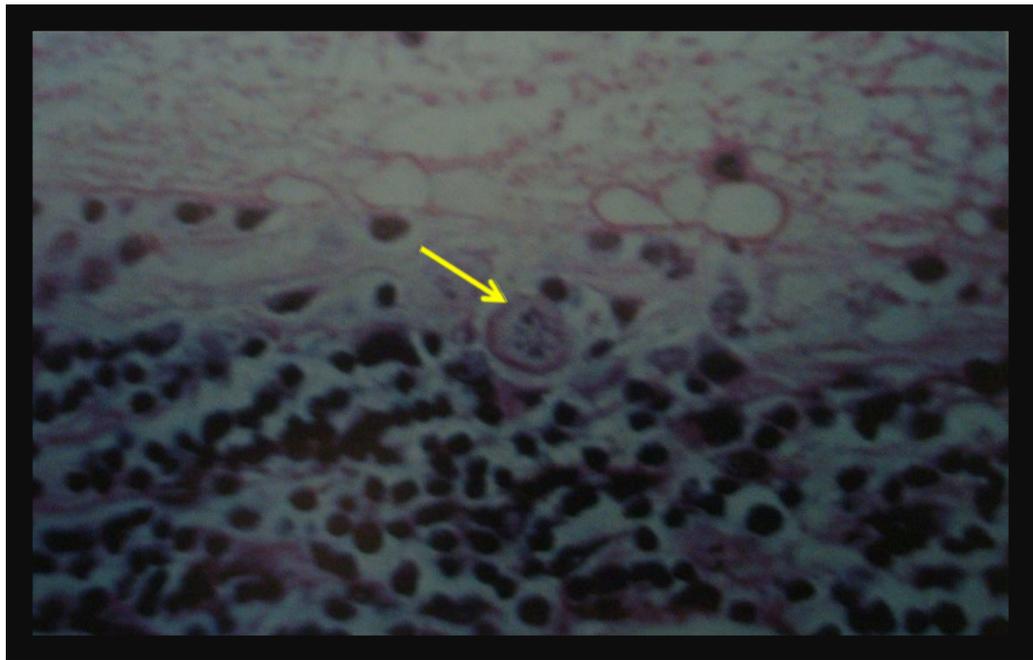
A RT é mundialmente conhecida como a principal causa de uveítes infecciosas que afetam o pólo posterior do olho.<sup>(20)</sup> Durante a manifestação ocular ocorre primeiramente o acometimento da retina e posteriormente da coróide, dando origem à uveíte posterior (retinocoroidite), a qual pode frequentemente ser acompanhada por uveíte anterior.<sup>(21)</sup> Lesões oculares causadas por *T. gondii*, são caracterizadas por retinocoroidite focal necrosante,<sup>(22)</sup> com aspecto exsudativo branco amarelado, ocasionalmente cinza e com limites mal definidos (Figura 1).<sup>(20,21)</sup>

A forma livre do parasito chega ao olho por meio de leucócitos infectados. Acredita-se que o *T. gondii* também possa atingir o olho a partir do nervo óptico, após um foco primário de infecção intracraniana.<sup>(21)</sup> O comprometimento ocular origina-se por meio da deposição de detritos inflamatórios no humor vítreo e quando existe o envolvimento da mácula ou do nervo óptico, o dano pode resultar na perda permanente da visão.<sup>(23,24)</sup>

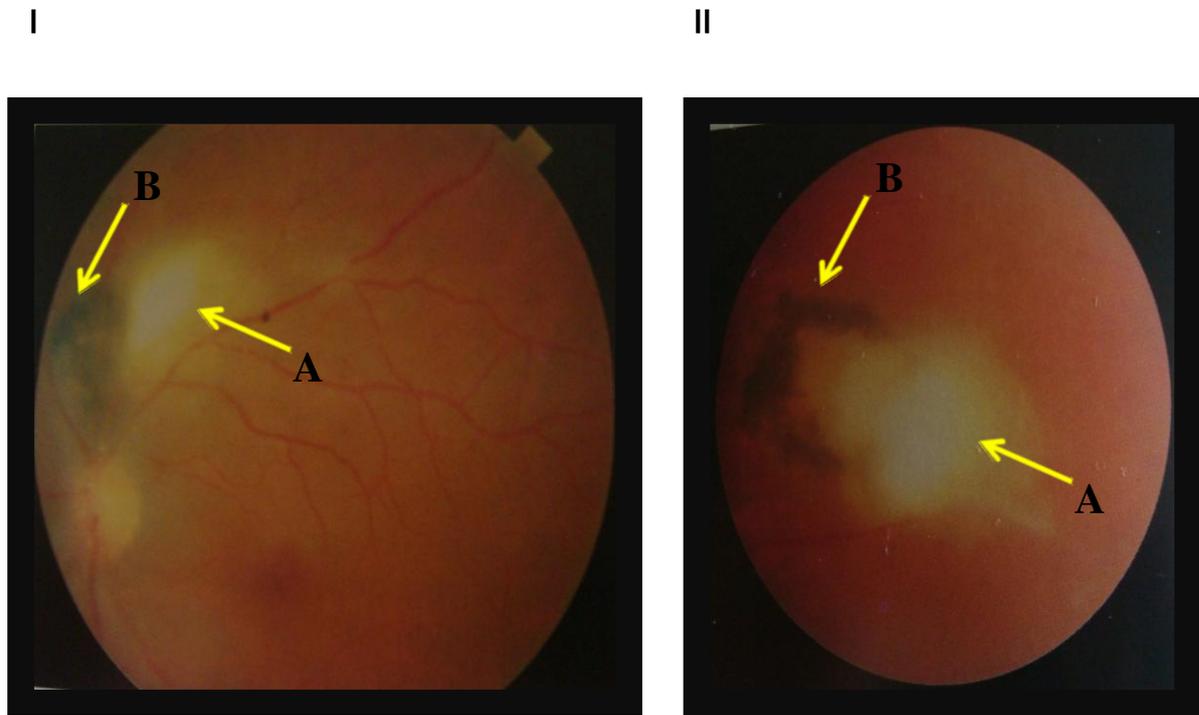
Em torno do oitavo dia de infecção são formados os cistos teciduais, contendo os bradizoítos (Figura 2). Estes podem persistir por toda a vida do hospedeiro sem induzir resposta imunológica, ou sofrerem rupturas intermitentes e causarem a recorrência da infecção.<sup>(21)</sup> A recorrência das lesões oculares pode ocorrer nas margens de lesões anteriores (lesão ativa-satélite a uma lesão cicatricial) (Figura 3),<sup>(21,25)</sup> ou o foco em atividade pode ser não satélite a lesão cicatricial (Figura 4).<sup>(21)</sup> O caráter recidivante da doença pode estar associado à ruptura dos cistos, multiplicação dos parasitos na retina, liberação do *Penetration Enhancing Factor* (PEF) e reinfecção pelo *T. gondii* dentre outros.<sup>(21)</sup>



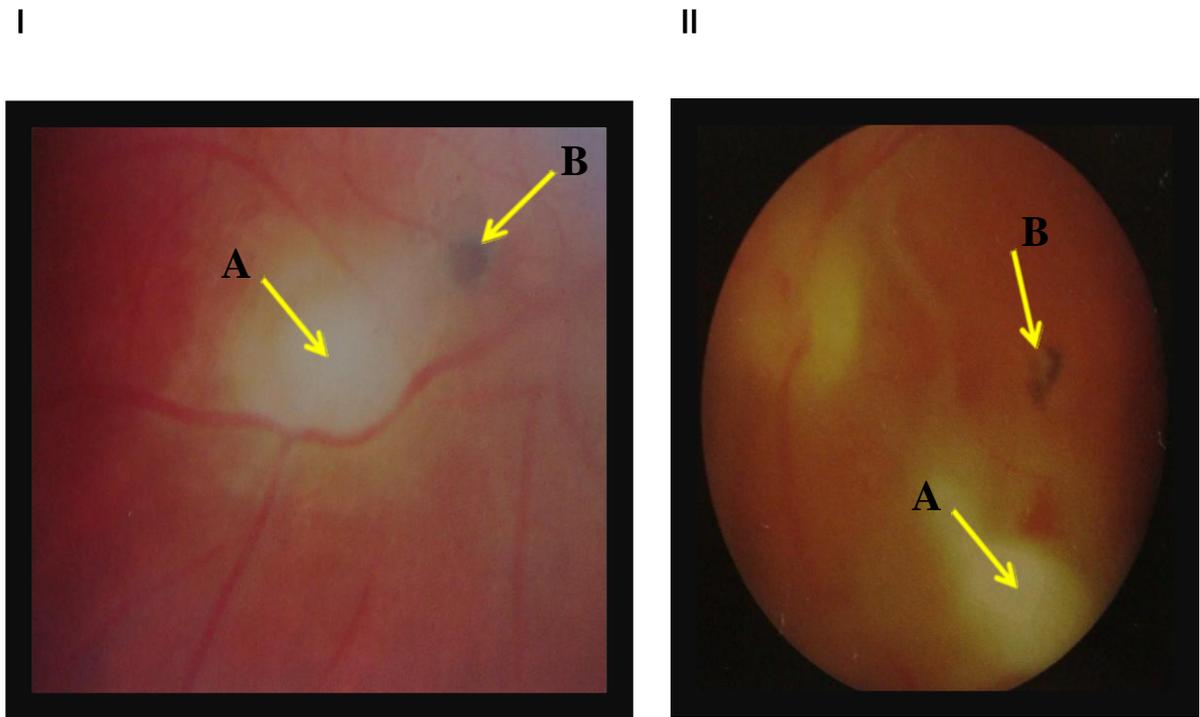
**Figura 1.** Lesão cicatricial de origem toxoplásmica em paciente atendido no Serviço de Oftalmologia do Hospital de Base de São José do Rio preto.



**Figura 2.** Cisto de *Toxoplasma gondii* implantado na retina. Adaptada de Oréfice, 2000.<sup>(21)</sup>



**Figura 3.** Lesão ativa satélite (A) a uma lesão cicatricial (B) em I e II. Adaptada de Oréfice, 2000.<sup>(21)</sup>



**Figura 4.** Lesão ativa não satélite (A) a uma lesão cicatricial (B) em I e II.

Adaptada de Oréfice, 2000.<sup>(21)</sup>

Quando a infecção é congênita a RT pode ser subdividida nas formas neonatal (quando a lesão está presente ao nascimento) ou de manifestação tardia (que pode ocorrer em qualquer época da vida, mas com prevalência na segunda ou terceira décadas de vida).<sup>(21,26)</sup> A forma de infecção adquirida subdivide-se em concomitante, quando a doença ocular ocorre junto à sistêmica, e tardia, quando ocorre um intervalo de tempo entre a doença sistêmica e a ocular.<sup>(21)</sup> Como a aquisição da infecção congênita por *T. gondii* é menor que a pós-natal, a maioria dos casos de RT diagnosticada pelos oftalmologistas parece resultar de infecções adquiridas após o nascimento.<sup>(27)</sup>

A apresentação clínica da RT varia de acordo com a faixa etária. As crianças geralmente apresentam redução da acuidade visual, estrabismo, nistagmo e leucocoria, enquanto os adolescentes e adultos têm como queixa o embaçamento da visão, baixa acuidade visual e miiodopsias (moscas volantes). Quando ocorre agravamento maior, adolescentes e adultos podem apresentar ainda fotofobia, dor e hiperemia. Junto a manifestação ocular, uma variedade de complicações tem sido descritas incluindo opacificação do corpo vítreo, catarata, descolamento de retina, glaucoma e atrofia óptica dentre outras.<sup>(21)</sup>

A prevalência da RT difere em diversas partes do mundo. Acredita-se que o risco de desenvolvimento da doença varie de 18 a 100.000 indivíduos no Reino Unido, até 382 a 100.000 indivíduos no oeste da África.<sup>(28)</sup> Além disso, estima-se que o risco de desenvolvimento de RT entre indivíduos que contraíram infecção congênita seja de 20% até os seis anos de idade.<sup>(27)</sup>

Dados levantados na região sul do Brasil demonstram que a maioria dos casos de RT são originados de toxoplasmose adquirida após o nascimento.<sup>(29)</sup> Um estudo realizado no Rio Grande do Sul encontrou prevalência de RT igual a 21,3 % em pessoas maiores de treze anos de idade e concluiu que a doença é consequência de infecção pós-natal.<sup>(30)</sup> A prevalência da RT é bastante elevada em adolescentes e adultos oriundos de diferentes regiões do país, variando de 2% na região sudeste a 25% na região sul.<sup>(30-33)</sup> No Estado de Pernambuco, foi observado que 56,2% dos casos de uveíte posterior eram devidas a presença do *T. gondii*.<sup>(34)</sup>

#### 1.4 Imunidade do hospedeiro

O sistema imunológico humano atua na defesa do organismo contra a infecção por *T. gondii* valendo-se das respostas imunes celular e humoral.<sup>(35,36)</sup> A resposta imune inata inicial desencadeia a resposta imune adaptativa celular a qual é caracterizada pela produção de citocinas expressas pelos linfócitos CD4 (T<sub>H</sub>1) e CD8.<sup>(37,38)</sup> Na fase inicial da infecção ocorre a atuação da imunidade inata (resposta não específica), a qual estimula os macrófagos, células dendríticas e neutrófilos a produzir Interleucina 12 (IL-12) e Interferon-Gama (IFN- $\gamma$ ). O IFN- $\gamma$  e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) atuam na privação de nutrientes por meio da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio inibindo a proliferação do parasito.<sup>(39)</sup> Após a redução progressiva da replicação do taquizoíto, o mesmo se diferencia em bradizoíto

dentro de cistos teciduais para se proteger da resposta imune adaptativa do hospedeiro.<sup>(40)</sup>

A imunidade humoral colabora no controle da infecção por *T. gondii*, por meio da ação das imunoglobulinas (anticorpos das classes IgM, IgG, IgA e IgE). Os anticorpos da classe IgM são os primeiros a serem expressos, seguidos por anticorpos IgG que persistem por toda a vida do hospedeiro. Os anticorpos IgM não atingem níveis plasmáticos elevados e tendem a declinar de modo rápido, em poucos meses. Os anticorpos IgA também são produzidos nas fases iniciais da infecção, mas não são detectados durante a fase crônica. Portanto, são considerados bons marcadores de infecção aguda.<sup>(41)</sup>

A resposta imune mediada por anticorpos IgE é de curta duração e por isso a presença destes anticorpos pode ser considerada como um indicador adicional de infecção recente. Todavia, em alguns casos pode-se constatar persistência de IgE por até onze meses.<sup>(42)</sup> Contudo, o aumento desta classe de anticorpos não tem a mesma importância clínica daqueles das classes IgM e IgG para a caracterização da infecção aguda e crônica, respectivamente.<sup>(43)</sup>

O olho humano é conhecido por seu privilégio imune devido ao fato do microambiente intraocular alterar a indução e a expressão da imunidade a antígenos derivados do olho.<sup>(44,45)</sup> A regulação da resposta imune ocular é de grande importância na eliminação da inflamação para a preservação da visão. Porém, ao mesmo tempo em que confere proteção ocular, este processo torna os olhos vulneráveis aos microrganismos uma vez que necessitam das células e moléculas inflamatórias para eliminar microrganismos invasores.<sup>(46)</sup> É possível

que o *T. gondii* tenha encontrado no ambiente intraocular o nicho adequado para sua proliferação devido a este comportamento *sui generis* da resposta imune ocular.<sup>(47)</sup>

### **1.5 Diagnóstico de infecção por *Toxoplasma gondii* e da retinocoroidite toxoplásmica**

Devido à presença de sintomas inespecíficos ou mesmo ausência deles, o diagnóstico da infecção por *T. gondii* é essencialmente laboratorial. Inclui métodos diretos que evidenciam o parasito, além dos indiretos, baseados na detecção de anticorpos específicos.<sup>(48-50)</sup> O ensaio imunoenzimático (ELISA) juntamente com o teste de avidéz de anticorpos IgG e a imunofluorescência indireta (IFI) estão entre os mais utilizados na caracterização da infecção por este parasito. No entanto, estes métodos não fornecem informações precisas sobre o estado imune ou a resistência do hospedeiro. A presença dos anticorpos específicos sugere apenas que o hospedeiro foi infectado, mas não indicam, via de regra, em que momento da vida a infecção ocorreu.<sup>(51)</sup>

O teste de avidéz aplicado ao diagnóstico da infecção por *T. gondii* foi demonstrado pela primeira vez por Hedman e colaboradores (1989). Este teste avalia a força com que os anticorpos da classe IgG se ligam aos antígenos do *T. gondii*. Foi observado que pacientes com infecção primária apresentavam anticorpos IgG de baixa avidéz, enquanto que os pacientes com infecção crônica apresentavam estes anticorpos com alta avidéz.<sup>(52)</sup> Embora estas evidências tenham sido confirmadas por vários estudos,<sup>(53-60)</sup> não

parecem constituir uma regra absoluta. O estudo de Press e colaboradores (2005) não encontrou relação entre o início da infecção e a baixa avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.<sup>(61)</sup> Estudos realizados com portadores de RT sugeriram que a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de alta avidéz (maior que 40%) pode estar associada a infecções que ocorreram há pelo menos cinco meses.<sup>(62)</sup>

A detecção direta do DNA genômico do parasito pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem se mostrado valiosa no diagnóstico da infecção por *T. gondii*. A PCR identifica sequências gênicas específicas deste parasito em amostras clínicas tais como sangue, urina, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano, humor aquoso e humor vítreo, entre outros.<sup>(10,63)</sup> Este método oferece maior rapidez, sensibilidade e alta especificidade na determinação da infecção.<sup>(64-70)</sup> É importante ressaltar que o diagnóstico da RT é tipicamente clínico, sendo necessário a realização do exame de fundoscopia para verificar a presença de lesões exsudativas e/ou cicatrizes retinocoroidianas. Via de regra, os testes laboratoriais são complementares ao diagnóstico clínico definitivo.<sup>(21)</sup>

### **1.6 Relação entre os glicoconjugados ABH-Lewis na infecção por *Toxoplasma gondii***

Os glicoconjugados ABH-Lewis constituem-se de oligossacarídeos ligados a proteínas e lipídeos amplamente expressos nos diferentes tecidos humanos. A expressão destas moléculas depende de interações epistáticas entre os genes *FUT2* (Secretor), *FUT3* (Lewis) e *ABO* os quais codificam as

glicosiltransferases específicas  $\alpha$ -2-L-Fucosiltransferase (FUTII),  $\alpha$ -3/4-L-Fucosiltransferase (FUTIII),  $\alpha$ -1,3-N-Acetilgalactosaminiltransferase (GTA) e  $\alpha$ -1,3-N-Galactosiltransferase (GTB), respectivamente. Estas enzimas atuam de maneira sequencial gerando perfis de glicoconjugados que variam de acordo com a presença, a ausência ou combinação dos genes *FUT2*, *FUT3* e *ABO*.<sup>(71)</sup> O quadro 1 ilustra a expressão relativa dos perfis de glicoconjugados ABH-Lewis resultantes das combinações das enzimas FUTII, FUTIII, GTA e GTB.

Alguns estudos avaliaram associações entre os glicoconjugados sintetizados pelas enzimas FUTII, FUTIII, GTA e GTB e a infecção por *T. gondii*, pois acredita-se que aquelas moléculas glicosiladas possam atuar como potenciais receptores para este parasito.<sup>(72-80)</sup> Embora os resultados tenham sido discordantes quanto à presença ou não de infecção, os diferentes perfis destes glicoconjugados ainda não foram relacionados ao desenvolvimento da RT.

**Quadro 1.** Perfis de glicoconjugados relacionados aos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis de acordo com as glicosiltransferases expressas.

Glicosiltransferases	OP	Htype1	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	A	B	ALe <sup>b</sup>	BLe <sup>b</sup>	Fenótipos
FUTII+FUTIII+GTA	(+)	(+)	+	++	++		++++		A Le(a-b-)
FUTII+FUTIII+GTB	(+)	(+)	+	++		++		++++	B Le(a-b-)
FUTII+FUTIII+GTA+GTB	(+)	(+)	+	++	++	++	++++	++++	AB Le(a-b-)
FUTII+FUTIII	(+)	(+)	+	+++++					O Le(a-b-)
FUTII+GTA	+	++			++++				A Le(a-b-)
FUTII+GTB	+	++				++++			B Le(a-b-)
FUTII+GTA+GTB	+	++			++++	++++			AB Le(a-b-)
FUTII	+	+++++							O Le(a-b-)
FUTIII+GTA	+		+++++						A Le(a+b-)
FUTIII+GTB	+		+++++						B Le(a+b-)
FUTIII+GTA+GTB	+		+++++						AB Le(a+b-)
FUTIII	+		+++++						O Le(a+b-)
	+++++								O Le(a-b-)

OP: Oligossacarídeo precursor; FUTII:  $\alpha$ -1,2-L-fucosiltransferase; FUTIII:  $\alpha$ -1,3/4-L-fucosiltransferase; GTA:  $\alpha$ -1,3-N-Acetilgalactosaminiltransferase; GTB:  $\alpha$ -1,3-N-Galactosiltransferase; (+): Quantidades variáveis.

A investigação dos diferentes perfis de glicoconjugados ABH-Lewis na infecção por *T. gondii* e no desenvolvimento desta doença ocular é atraente diante da demonstração experimental de que este parasito se liga a moléculas de N-Acetilgalactosamina (GalNAc) e Galactose (Gal) por meio de suas próprias.<sup>(81)</sup> Além disso, foi verificada a presença de antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis em vários tecidos do olho,<sup>(82)</sup> e também da molécula de adesão celular CD15, a qual é estruturalmente relacionada aos glicoconjugados do sistema Lewis, na retina de vertebrados.<sup>(83)</sup> Os monossacarídeos GalNAc e Gal e o CD15 estão presentes na estrutura oligossacarídica dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis expressos no trato gastrintestinal,<sup>(84)</sup> um local utilizado como rota de infecção por *T. gondii*.<sup>(1)</sup> Acreditamos que as moléculas de Fucose (Fuc), GalNAc e a Gal influenciam a suscetibilidade ou a resistência a infecção por *T. gondii*. Entretanto, sua influência no desenvolvimento da RT ainda não foi investigada.

O primeiro estudo que relacionou o sistema histo-sanguíneo ABO como fator de risco para a infecção por *T. gondii*, realizado por Gill (1985) na Tanzânia não encontrou associação.<sup>(72)</sup> Outro realizado na Noruega encontrou associação com o grupo sanguíneo B,<sup>(73)</sup> sendo confirmado por Salibay e colaboradores (2008) nas Filipinas.<sup>(77)</sup> Lopez e colaboradores (1993) encontraram associação deste sistema em doadores de sangue cubanos do grupo AB.<sup>(75)</sup> Outra associação com o grupo AB foi verificada em militares da República Tcheca por Kolbekova e colaboradores (2007).<sup>(76)</sup>

Estas associações foram contestadas por um estudo francês,<sup>(74)</sup> e dois brasileiros,<sup>(78,80)</sup> que avaliaram gestantes. O estudo francês,<sup>(74)</sup> e um dos brasileiros,<sup>(80)</sup> analisaram apenas os fenótipos do sistema histo-sanguíneo ABO, mas o outro brasileiro,<sup>(78)</sup> incluiu o gene *FUT2*, o qual controla a expressão dos antígenos ABH nas mucosas e nas secreções exócrinas e define os fenótipos Secretor e não Secretor.<sup>(78)</sup> Mesmo assim, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas frequências destes marcadores imunogenéticos entre as gestantes com e sem sorologia reagente para o *T. gondii*. Contudo, Nakashima e colaboradores (2010) demonstraram que o fenótipo Le(a-b-) é um potencial fator de risco para infecção por cepas RH do *T. gondii* em gestantes brasileiras.<sup>(79)</sup> Os relatos acima apresentados consideraram apenas a infecção por *T. gondii* e não a presença da RT como sendo uma das doenças resultantes desta infecção.

Um recente estudo realizado na população rural do município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro, investigou a associação entre o sistema histo-sanguíneo ABO e a presença de toxoplasmose ocular.<sup>(85)</sup> Os autores não encontraram evidências de associação com nenhum dos fenótipos ABO. Mesmo assim, seus resultados são inconclusivos e podem ser questionados, pois os genes *FUT2* e *FUT3*, responsáveis pela expressão integrada dos perfis de glicoconjugados ABH-Lewis não foram investigados.

Como estes glicoconjugados resultam da ação integrada das enzimas FUTII, FUTIII, GTA e GTB, as modificações oligossacarídicas estruturais que favorecem a expressão de diferentes perfis de glicoconjugados podem influenciar a aderência do *T. gondii* às células. Estas variações sempre

devem ser exploradas nos estudos que objetivam investigar associações entre estes glicoconjugados e doenças. Estas ponderações foram consideradas na etapa de planejamento e execução deste estudo.

## 1.7 Objetivo geral

O objetivo do estudo foi avaliar os fatores de risco que contribuem para infecção por *Toxoplasma gondii* e desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica.

### 1.7.1 Objetivos específicos

- ❖ Selecionar dois grupos de pacientes assim constituídos: Grupo 1 (RT) – presença de lesão exsudativa e/ou cicatriz retinocoroidiana devido a retinocoroidite toxoplásmica; Grupo 2 (ODO) – outras doenças oculares, que não sejam de origem toxoplásmica;
- ❖ Verificar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG no soro dos pacientes selecionados, como indicadores de infecção aguda ou crônica;
- ❖ Comparar os índices de título e de avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* entre os grupos;
- ❖ Obter o DNA genômico humano a partir do sangue periférico, bem como verificar a presença do DNA do parasito;

- ❖ Avaliar fatores de risco ambientais que possam estar associados à infecção por *T. gondii* e ao desenvolvimento da RT;
- ❖ Identificar os fenótipos ABO, Secretor (Secretor, não Secretor) e Lewis [Le(a+b-), Le(a-b+), Le(a-b-)] em ambos os grupos;
- ❖ Determinar os genótipos Secretor (*FUT2*) e Lewis (*FUT3*) dos pacientes fenotipados como Le(a-b-);
- ❖ Verificar se variações qualitativas e quantitativas na expressão dos antígenos ABH-Lewis estão associadas à suscetibilidade à infecção por *T. gondii* e ao desenvolvimento da RT.

---

## **Casuística e Métodos**

## **2. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **2.1 Aspectos éticos do estudo**

O projeto de pesquisa que fundamenta este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Rio Preto-FAMERP (Parecer 050/2009 de 09/03/09). Cada participante assinou o termo de consentimento livre e esclarecido após receber todas as informações sobre os objetivos e os procedimentos a serem realizados na pesquisa.

### **2.2 Casuística**

No período de Abril de 2009 a fevereiro de 2011 foram selecionados 357 pacientes consecutivos, de ambos os sexos atendidos no Ambulatório de Oftalmologia do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina (HB-FUNFARME), São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil, um hospital-escola de nível terciário, de atendimento pelo sistema público de saúde. Foram constituídos dois grupos, um com diagnóstico clínico de RT (n=82) e outro de ODO (n=275), tais como retinopatia diabética Tipo I e II, descolamento de retina, degeneração macular relacionada à idade, catarata, uveíte sem causa definida, transplante de córnea, glaucoma, alteração de mácula, lesão pós operatória, entre outras doenças oculares. Os critérios de exclusão adotados foram: idade menor que 18 anos, deficiência mental, discrasias sanguíneas e uso de anticoagulantes orais.

### **2.2.1 Diagnóstico da retinocoroidite toxoplásmica**

A avaliação clínica ocular dos pacientes foi realizada por dois profissionais experientes (FBF e GCAJr), por meio do exame de fundoscopia com o uso de oftalmoscópio binocular indireto (Binocular Ophthalmoscope ID 10, Topcon Corporation).

### **2.2.2 Coleta de sangue**

De cada paciente selecionado foram coletadas por punção venosa duas amostras de sangue periférico (5 mL), uma com e outra sem anticoagulante (EDTA). A amostra com EDTA foi utilizada para extração do DNA genômico e realização das fenotipagens ABO e Lewis e a sem anticoagulante para obtenção do soro, o qual foi estocado a -20°C até o momento do uso para a identificação dos anticorpos das classes IgM e IgG anti-*T. gondii*.

## **2.3 Métodos**

### **2.3.1 Identificação dos fenótipos eritrocitários ABO**

A identificação dos fenótipos eritrocitários ABO foi realizada pelo método de hemaglutinação em tubos (direta e reversa). Para a fenotipagem direta foi adicionada uma gota de suspensão de hemácias a 5% (preparada em solução isotônica) a três tubos devidamente identificados, contendo respectivamente uma gota dos anti-soros anti-A, anti-B e anti-A,B, cada. A

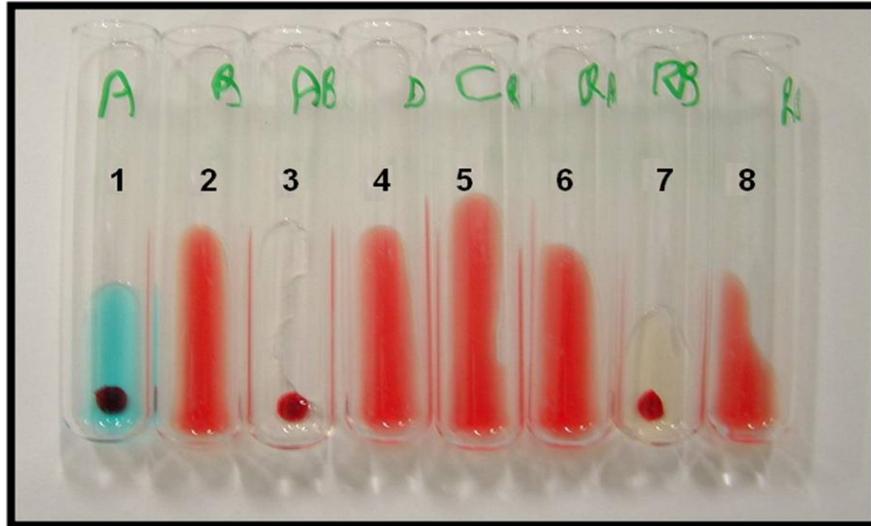
fenotipagem reversa ocorreu pela adição de uma gota de hemácias padrão A1 e B a dois tubos devidamente identificados contendo duas gotas do plasma, cada (Fresenius Kabi, Brasil). Para ambas as fenotipagens os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por cerca de 1 minuto. Os resultados foram anotados em graus de aglutinação (0, 1+, 2+, 3+ e 4+) e em todos os casos as fenotipagens direta e reversa foram absolutamente complementares e concordantes (figura 5). Assim foram identificados os fenótipos A, B, AB e O segundo o protocolo de Mattos e colaboradores (2001).<sup>(86)</sup>

### **2.3.2 Identificação dos fenótipos eritrocitários Lewis**

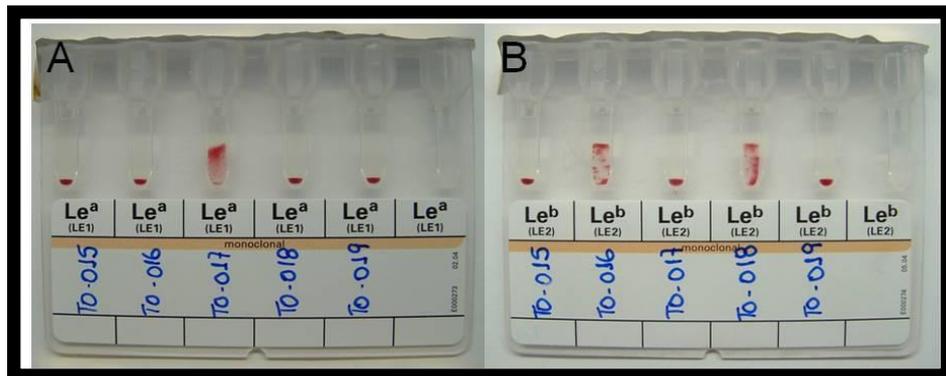
A identificação dos fenótipos eritrocitários Lewis foi realizada pelo método de hemaglutinação em colunas de gel centrifugação contendo separadamente os anticorpos anti-Le<sup>a</sup> e anti-Le<sup>b</sup> (DiaMed, Brasil). Para cada amostra foi preparada uma suspensão de hemácias a 3% em meio isotônico fornecido pelo fabricante. Um volume igual a 12 µl de cada suspensão foi adicionado as colunas de gel e centrifugados por 15 minutos a 1.000 rpm. Os resultados foram anotados em graus de aglutinação (0, 1+, 2+, 3+ e 4+), identificando-se assim os fenótipos Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-) (figura 6). Este protocolo foi validado por Cintra e colaboradores (2008).<sup>(87)</sup>

### 2.3.3 Identificação dos fenótipos Secretor e não Secretor inferidos da fenotipagem Lewis

A identificação dos fenótipos Secretor e não Secretor foi inicialmente inferida a partir das fenotipagens eritrocitárias Lewis. Os indivíduos Le(a-b+) foram considerados “Secretores” e os Le(a+b-), “não Secretores”.<sup>(71)</sup> Naqueles com o fenótipo Le(a-b-), a identificação do fenótipo Secretor ou não Secretor foi realizada por meio da identificação da mutação *G428A* do gene *FUT2* por PCR-RFLP. Como estes indivíduos não possuem a enzima FUTIII funcional devido a mutações que inativam o gene *FUT3*, não expressam os antígenos Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup>.



**Figura 5.** Ilustração da fenotipagem eritrocitária ABO pelo método em tubos. 1, 2 e 3 representam a fenotipagem direta; 4 e 5 fenotipagem Rh e 6, 7 e 8, fenotipagem reversa.



**Figura 6.** Ilustração da fenotipagem eritrocitária Lewis pelo método gel centrifugação. Em (A), a identificação do antígeno Le<sup>a</sup> e em (B), do antígeno Le<sup>b</sup>.

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

A determinação da presença ou não de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG foi realizada pelo método ELISA de acordo com o protocolo de Meira e colaboradores (2008).<sup>(88)</sup>

### **2.3.5 Determinação dos valores de avidéz**

O teste de avidéz foi realizado em todas as amostras que se mostraram reagentes para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, com uso do método ELISA conforme protocolo de Korhonen e colaboradores e Colombo e colaboradores.<sup>(89,90)</sup>

### **2.3.6 Determinação dos títulos de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii***

A determinação do título de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgM e IgG foi realizada pelo método IFI de acordo com o protocolo de Vidal e colaboradores (2004).<sup>(91)</sup>

### **2.3.7 Extração do DNA genômico de *Toxoplasma gondii***

O DNA foi extraído de amostras de sangue venoso, utilizando o kit comercial para extração por coluna de sílica (Qiamp DNA blood mini kit, Qiagen), de acordo com o protocolo de Mesquita e Colaboradores (2010).<sup>(92)</sup> As

amostras de sangue foram centrifugadas e lavadas com PBS a 2,500g por 10 minutos, o sobrenadante contendo o plasma foi descartado. Em seguida, para lise das hemácias, estas foram misturadas com três vezes o seu volume do tampão contendo: 150 mM clorato de amônio, 1 mM bicarbonato de potássio, 0.1 mM EDTA, pH 7.3, incubado por 15 minutos a temperatura ambiente sob agitação suave e centrifugado por 10 min a 3,000g. O *pellet* de sangue, contendo apenas as células nucleadas foi digerido com proteinase K (20 µg/mL) em 50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8.0, 2% dodecil sulfato de sódio e incubado por 30 min a 56°C. O *pellet* de DNA foi dissolvido em água ultrapura. Como controle positivo, foi extraído DNA de *pellet* de taquizoítos usando o mesmo kit. A pureza do DNA foi determinado por proporção de DO a 260 a 280 nm em um espectrofotômetro (NanoDrop ND100-Thermo Scientific).

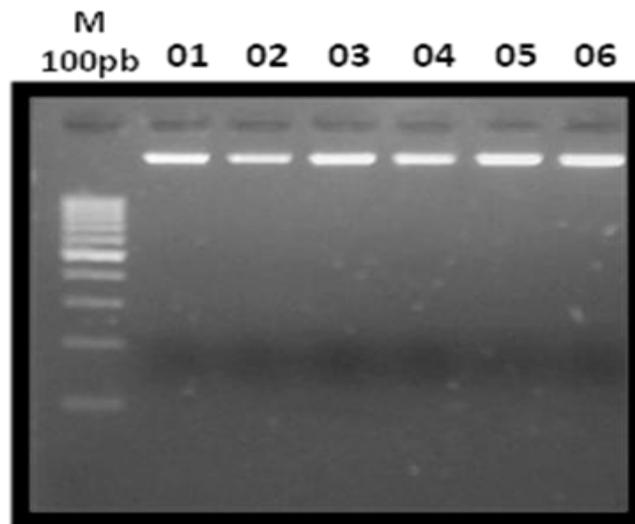
### **2.3.8 Extração do DNA genômico humano**

O DNA genômico foi extraído com o uso de kit comercial para extração por coluna de sílica (Qiamp DNA blood mini kit, Qiagen), a partir de 200 µL de sangue total colhido com EDTA.

### **2.3.9 Avaliação da qualidade do DNA genômico humano**

Utilizou-se o método de eletroforese em gel de agarose para avaliar a qualidade das amostras de DNA genômico, com a finalidade de conhecer sua integridade e o nível relativo de aparente degradação. O gel foi preparado com

agarose ultra pura na concentração de 2% (Invitrogen), dissolvida em tampão TBE 1X e corado com brometo de etídio (10mg / mL, Invitrogen). Na primeira canaleta foram aplicados 2  $\mu$ l do marcador de 100 pares de bases (pb), (Invitrogen). Nas demais, aplicou-se 5  $\mu$ l de DNA genômico adicionado a 2  $\mu$ l de azul de bromofenol. A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba horizontal (Thermo scientific – OWL Easycast™ B2) por quarenta minutos a 100 volts (Major Science – Minis-300). A figura 7 representa o perfil eletroforético de seis amostras (das 357) avaliadas. Todos os géis preparados nesta etapa foram fotografados para registro e arquivo do resultado.



**Figura 7.** Perfil eletroforético de seis amostras de DNA genômico avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 2%. M indica o marcador de 100 pb; 01 a 06 indicam as amostras de DNA genômico.

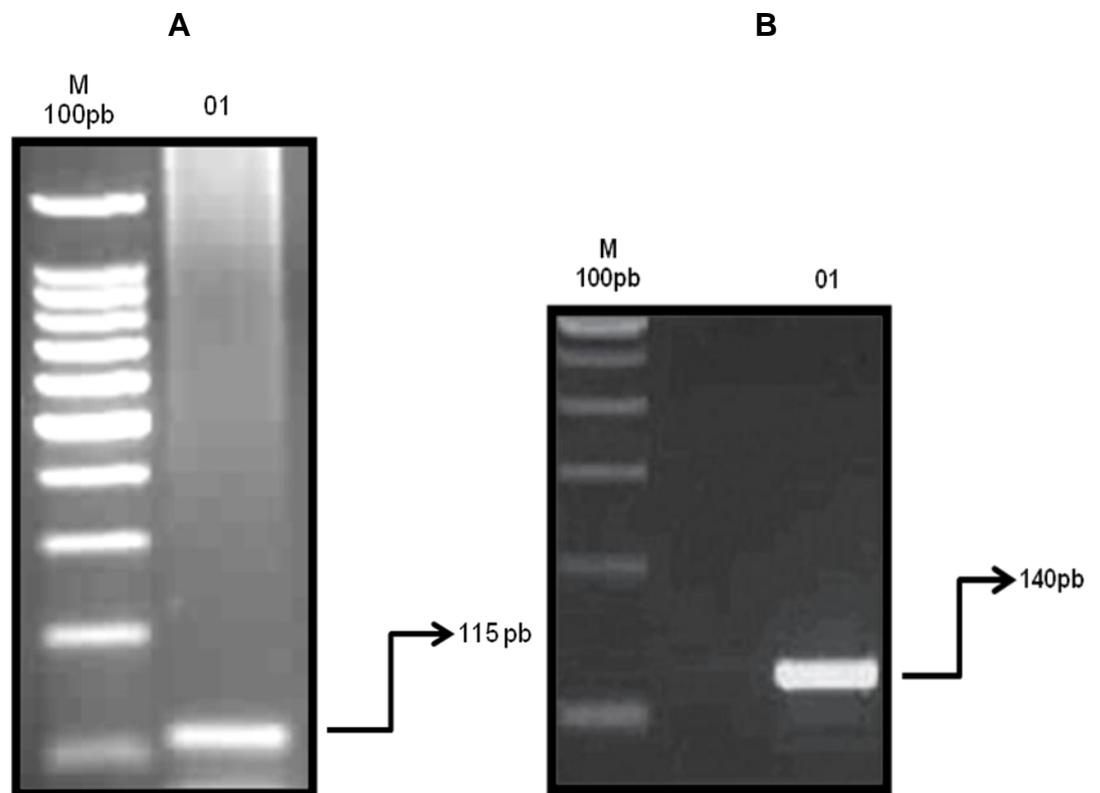
### 2.3.10 Seleção dos primers para amplificação do gene *B1* de *Toxoplasma gondii*

O par de primers utilizado na PCR convencional (cnPCR) foi o B22/B23 (5'AAC GGG CGA GTA GCA CCT GAG GAG A3' e 5'TGG GTC TAC GTC GAT GGC ATG ACA AC3'), o qual amplificou um fragmento de 115 pb de uma região repetitiva específica do gene alvo *B1* (Figura 8A).<sup>(93)</sup> Como controle interno de amplificação de cada reação da PCR foram utilizados os primers  $\beta 1/\beta 2$ ,<sup>(92)</sup> que amplificaram um fragmento de 140 pb do gene humano  *$\beta$ -globina* (Figura 8B).

### 2.3.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A cnPCR foi realizada em um termociclador LongGene, as amostras de DNA e controles (5  $\mu$ l) e 25 pM de cada primer foi adicionado em um kit da Promega (Go Taq Green Master Mix). O mix para a PCR (12,5  $\mu$ l) foi composto de 1 UN da Taq DNA polimerase, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 200 mM de cada dNTP. Para cada amostra de DNA foi realizada uma reação de amplificação gênica com volume final de 25  $\mu$ l. A execução da amplificação conteve dois controles negativos (um realizado com água ultrapura e o outro com uma amostra de DNA negativa para toxoplasmose) e um controle positivo (uma amostra de DNA extraída da cepa RH). As condições de amplificação foram: 95°C 5 min, 35 ciclos de 95°C 1 min, 62°C 1 min e 72°C 1 min. O procedimento foi completado por um ciclo final de extensão por 5 min.

O fragmento amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e visualizado por meio de iluminação UV. As imagens foram analisadas por um sistema de fotodocumentação Mini Bis Gel (BioSystematica). O tamanho dos fragmentos foi baseado por meio da comparação de um marcador (ladder) 100 pb.



**Figura 8.** Fragmento de 115 pb do gene *B1* do *Toxoplasma gondii* (A) e fragmento de 140 pb do gene  $\beta$ -globina (B), avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%. M indica o marcador de 100 pb; 01 indica a amostra amplificada. Adaptada de Mesquita et al. 2010.<sup>(92)</sup>

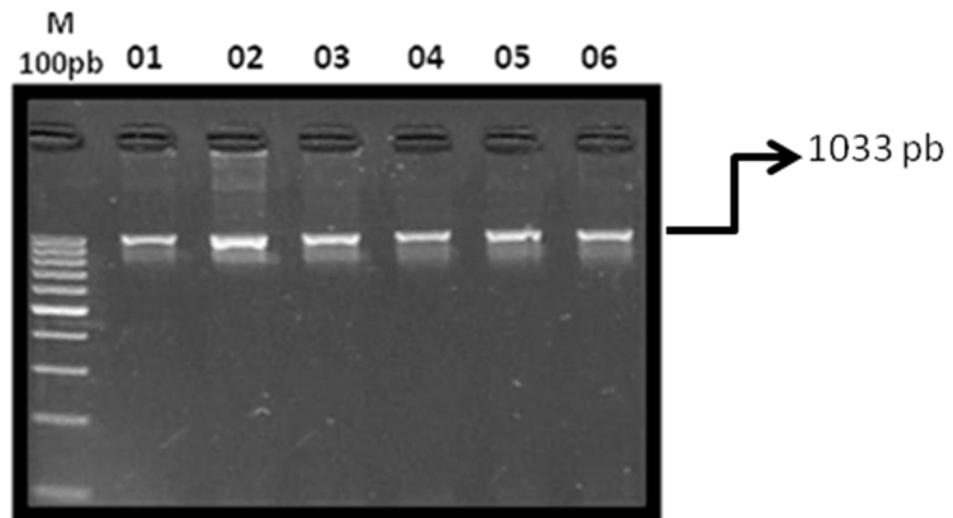
### 2.3.12 Identificação dos genótipos da substituição *G428A* do gene *FUT2*

A identificação da substituição *G428A* do gene *FUT2* foi realizada com o uso do método de PCR-RFLP, de acordo com adaptações do protocolo de Svensson e colaboradores (2000).<sup>(94)</sup>

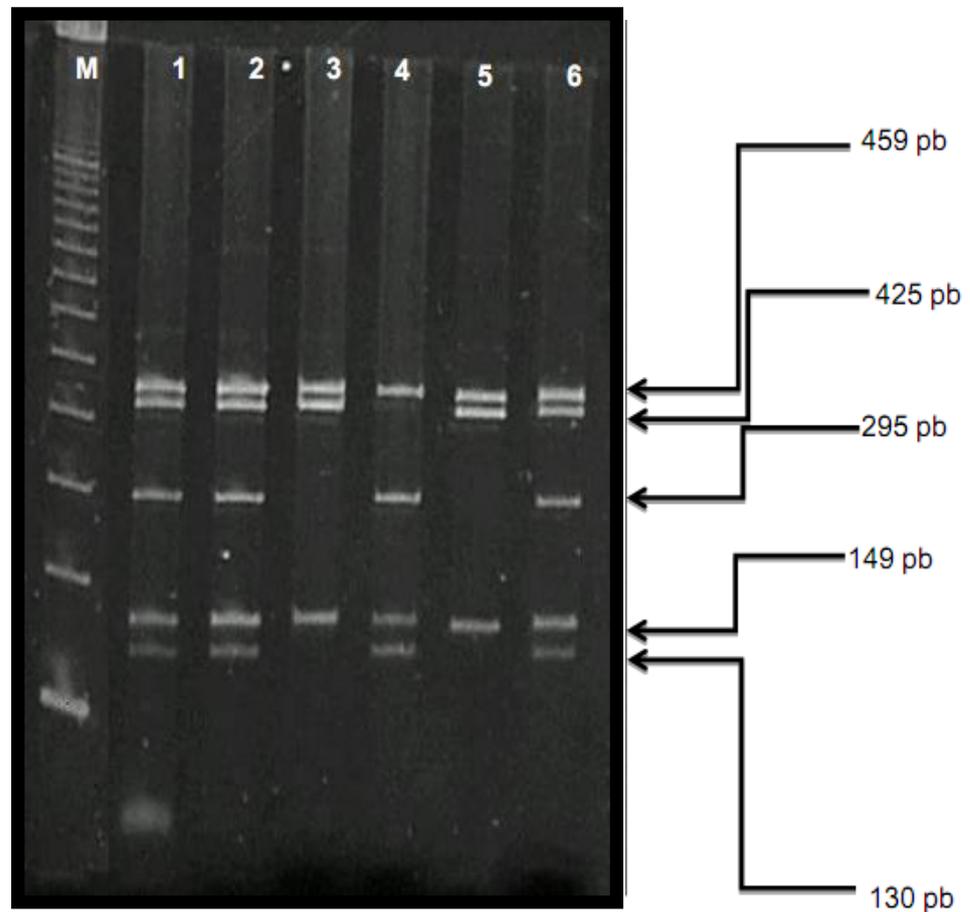
Para cada amostra de DNA genômico foi realizada uma reação de amplificação gênica com volume final de 25 µl, nas seguintes condições: 17,0 µL de água MilliQ, 2,5 µL de 10X PCR Buffer minus Mg<sup>++</sup> (200 mM TRIS-HCL, 500 mM KCl, Invitrogen), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen), 1,0 µL de dNTP (100 mM de cada dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dGTP], Invitrogen), 0,4 µL de primer *FUT2-G428A-9802s* Sense (20 pM; 5' - GCC TTT CTC CTT TCC CAT GGC CCA C - 3'), 0,4 µL de primer *FUT2-G428A-9803as* Anti-sense (20 pM; 5' - TCA AAG GAC GGG CCA GCA TTA GTG C - 3') (Integrated DNA Technologies) 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µl, Invitrogen) e 2,0 µL de DNA genômico (100 a 125 ng). Como controle interno de contaminação, foi realizado para cada mix, um tubo de reação sem adição de DNA genômico (branco). As condições de amplificação foram 94°C 2 minutos, 5 ciclos de 94°C 30 segundos, 68°C 30 segundos e 72°C 30 segundos e 25 ciclos de 94°C 30 segundos, 64°C 30 segundos e 72°C 45 segundos, permanecendo em 4°C infinito. O fragmento amplificado contendo 1033 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (Figura 9).

Uma alíquota de 15,0 µl do produto de PCR foi digerida a 37°C com 2,5 µl de água MilliQ, 2,0 µl de tampão da enzima (10x Fast Digest Green

Buffer– Fermentas) e 0,5 µl de Fast Digest *Ava* II (Fermentas) por 30 minutos. Os fragmentos foram observados em gel de agarose (Invitrogen) a 1,2% corado com brometo de etídeo, a corrida eletroforética foi por 2 horas a 90 volts. O produto de PCR referente ao genótipo *GG* foi clivado em quatro fragmentos: 459, 295, 149 e 130 pb, o genótipo *GA* foi clivado em cinco fragmentos: 459, 425, 295, 149 e 130 pb e o genótipo *AA* foi clivado em três fragmentos: 459, 425 e 149 pb. A figura 10 ilustra o perfil eletroforético do fragmento de 1033 pb do exon 2 do gene *FUT2* após digestão com a enzima *Ava* II.



**Figura 9.** Fragmento de 1033 pb do gene *FUT2*, amplificado por reação em cadeia da polimerase e avaliado por eletroforese em gel de agarose a 2%. M indica o marcador de 100 pb; 01 a 06 indicam as amostras amplificadas.



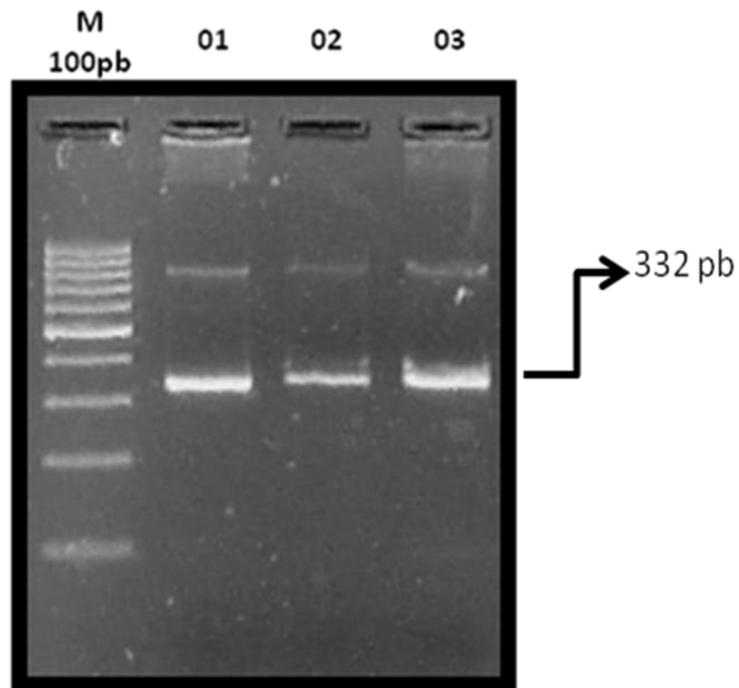
**Figura 10.** Perfil eletroforético do fragmento de 1033 pb da mutação *G428A* do gene *FUT2*, clivado com a enzima de restrição *Ava II* e avaliado por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. M indica o marcador de 100 pb; as amostras 01, 02 e 06 são do genótipo *GA*, as amostras 03 e 05 são do genótipo *AA* e a amostra 04 do genótipo *GG*. Adaptada de Mattos et al. 2008.<sup>(78)</sup>

### 2.3.13 Identificação da substituição *T202C* do gene *FUT3* dos pacientes portadores do fenótipo Le(a-b-)

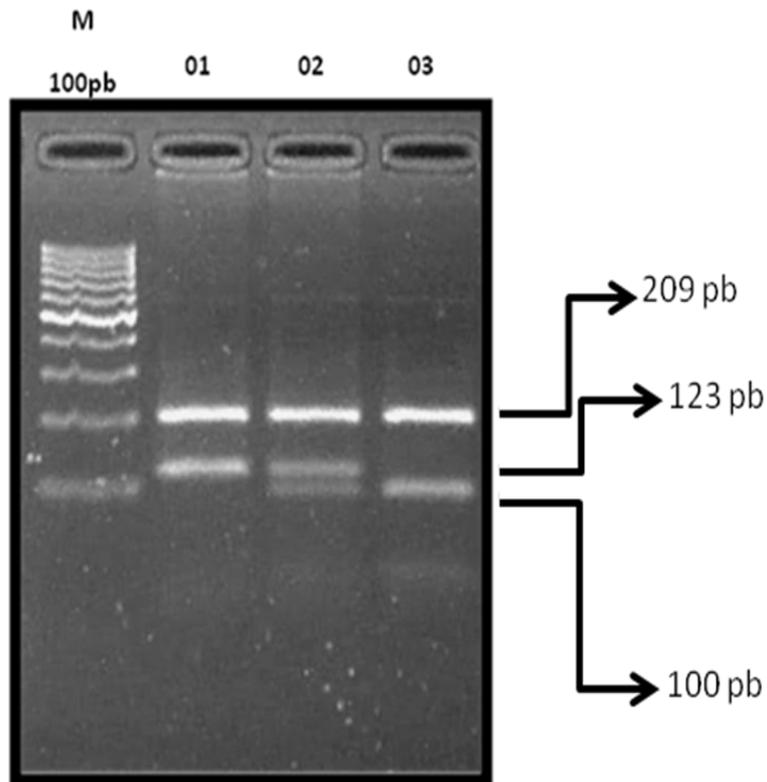
A identificação dos alelos *TT*, *TC* ou *CC* é realizada para investigar a substituição *T202C* do gene *FUT3* e foi conduzida com o uso do método de PCR-RFLP, de acordo com alterações no protocolo de Orntoft e colaboradores (1996).<sup>(95)</sup>

Para cada amostra de DNA genômico foi realizada uma reação de amplificação gênica com volume final de 25 µl, nas seguintes condições: 17,0 µL de água MilliQ, 2,5 µL de 10X PCR Buffer minus Mg<sup>++</sup> (200 mM TRIS-HCL, 500 mM KCl, Invitrogen), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen), 1,0 µL de dNTP (100 mM de cada dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dGTP], Invitrogen), 0,4 µL de primer *FUT3-T202C-VE2mms* Sense (25 pM; 5' - CCC GCC CCA CCC TCC TGA TCC TGG TA - 3'), 0,4 µL de primer *FUT3-T202C-VE3as* Anti-sense (25 pM; 5' - CGT AGG GCC TGA AGA TGT CGG AGT C - 3') (Integrated DNA Technologies), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µl, Invitrogen) e 2,0 µL de DNA genômico (100 a 125 ng). Como controle interno de contaminação, foi realizado para cada mix, um tubo de reação sem adição de DNA genômico (branco). As condições de amplificação foram 94°C 1 minuto, 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 63°C 30 segundos e 72°C 30 segundos e 1 ciclo de 72°C 1 minuto, permanecendo em 4°C infinito. O fragmento amplificado contendo 332 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (Figura 11).

Uma alíquota de 15,0 µl do produto de PCR foi incubada a 37°C com 2,5 µl de água Milliq, 2,0 µl de tampão da enzima (10x Fast Digest Green Buffer-Fermentas) e 0,5 µl de Fast Digest *Rsa* I (Fermentas) por 40 minutos. Os fragmentos foram observados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, a corrida eletroforética foi por 40 minutos a 90 volts. O produto de PCR referente ao genótipo *TT* foi clivado em dois fragmentos: um de 209 e o outro de 123 pb, o genótipo *TC* foi clivado em três fragmentos: 209, 123 e 100 pb e o genótipo *CC* foi clivado em dois fragmentos: um de 209 e outro de 100 pb. A figura 12 ilustra o perfil eletroforético do fragmento de 332 pb do exon 2 do gene *FUT3* após digestão com a enzima *Rsa* I.



**Figura 11.** Fragmento de 332 pb do gene *FUT3*, amplificado por reação em cadeia da polimerase e avaliado por eletroforese em gel de agarose a 2%. M indica o marcador de 100 pb; 01 a 03 indicam as amostras amplificadas.



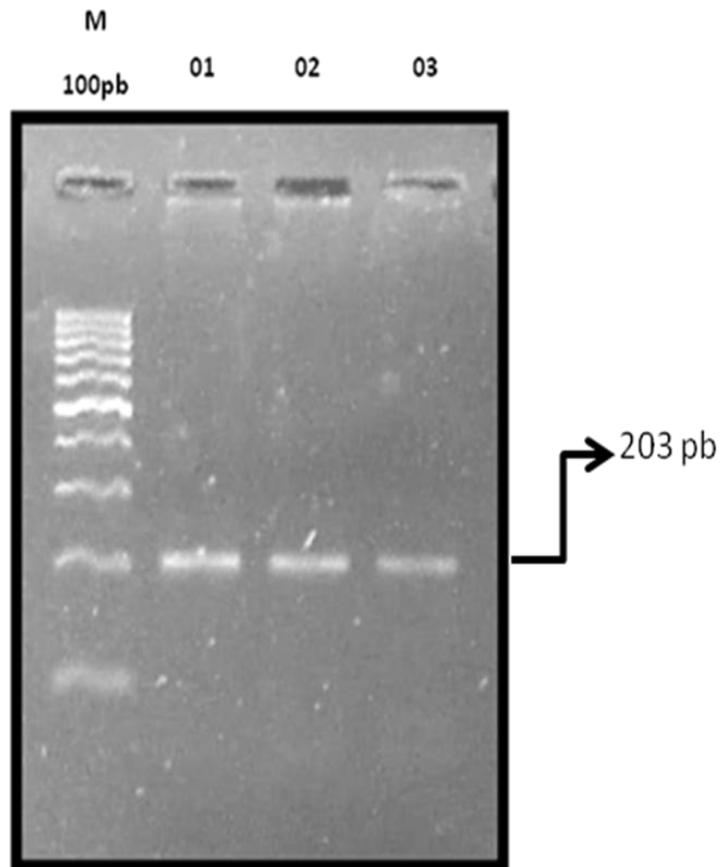
**Figura 12.** Perfil eletroforético do fragmento de 332 pb da mutação *T202C* do gene *FUT3*, clivado com a enzima de restrição *Rsa I*, avaliado por eletroforese em gel de agarose a 2%. M indica o marcador de 100 pb; a amostra 01 apresenta o genótipo *TT*, a amostra 02 apresenta o genótipo *TC* e a amostra 03 o genótipo *CC*.

### 2.3.14 Identificação da substituição *C314T* do gene *FUT3* dos pacientes portadores do fenótipo Le(a-b-)

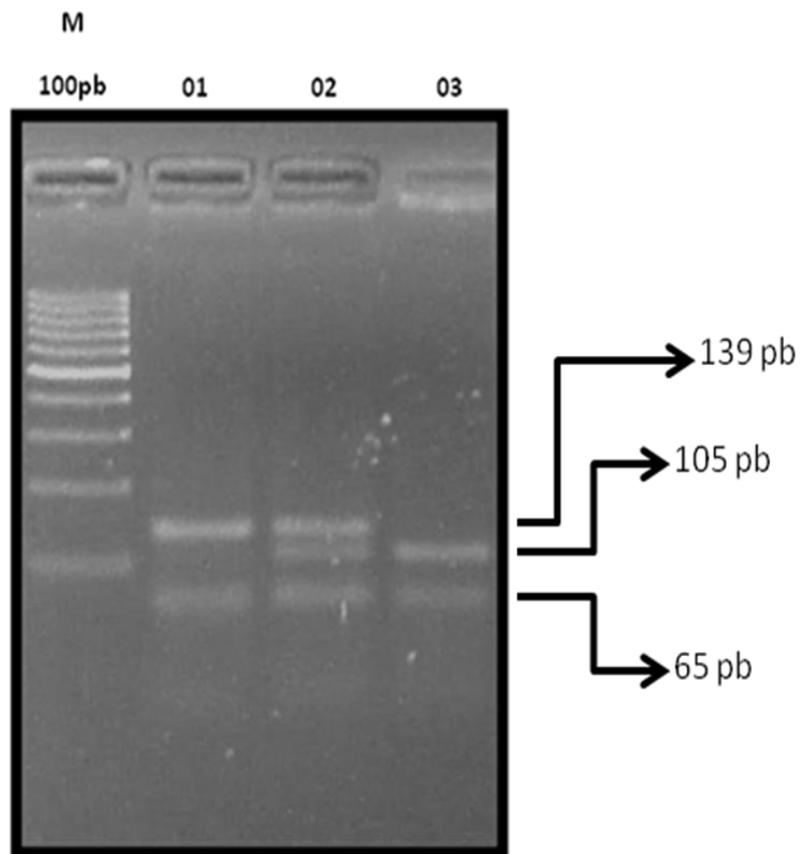
A identificação dos alelos *CC*, *CT* ou *TT* é realizada para investigar a substituição *C314T* do gene *FUT3* e foi conduzida com o uso do método de PCR-RFLP, de acordo com alterações no protocolo de Orntoft e colaboradores (1996).<sup>(95)</sup>

Para cada amostra de DNA genômico foi realizada uma reação de amplificação gênica com volume final de 25 µl, nas seguintes condições: 17,0 µL de água MilliQ, 2,5 µL de 10X PCR Buffer minus Mg<sup>++</sup> (200 mM TRIS-HCL, 500 mM KCl, Invitrogen), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen), 1,0 µL de dNTP (100 mM de cada dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dGTP], Invitrogen), 0,4 µL de primer *FUT3-C314T-EL3s* Sense (25 pM; 5' – AGT GGG TCC TCC CCG ACA GGA CAC CAC TCC - 3'), 0,4 µL de primer *FUT3-C314T-VE4as* Anti-sense (25 pM; 5' – GTT GGA CAT GAT ATC CCA GTG GTG CAC GAT - 3'), (Integrated DNA Technologies) 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µl, Invitrogen) e 2,0 µL de DNA genômico (100 a 125 ng). Como controle interno de contaminação, foi realizado para cada mix, um tubo de reação sem adição de DNA genômico (branco). As condições de amplificação foram 94°C 1 minuto, 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 63°C 30 segundos e 72°C 30 segundos e 1 ciclo de 72°C 1 minuto, permanecendo em 4°C infinito. O fragmento amplificado contendo 203 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (Figura 13).

Uma alíquota de 15,0 µl do produto de PCR foi incubada a 37°C com 2,5 µl de água Milliq, 2,0 µl de tampão da enzima (10x Fast Digest Green-Fermentas) e 0,5 µl de Fast Digest *Nla* III (Fermentas) por 40 minutos. Os fragmentos foram observados em gel de agarose (Invitrogen) a 2% corado com brometo de etídeo, a corrida eletroforética foi por 1 hora a 90 volts. O produto de PCR referente ao alelo *CC* foi clivado em dois fragmentos: um de 139 e o outro de 65 pb, o alelo *CT* foi clivado em três fragmentos: 139, 105 e 65 pb e o alelo *TT* foi clivado em dois fragmentos: um de 105 e o outro de 65 pb. A figura 14 ilustra o perfil eletroforético do fragmento de 203 pb do exon 2 do gene *FUT3* após digestão com a enzima *Nla* III.



**Figura 13.** Fragmento de 203 pb do gene *FUT3*, amplificado por reação em cadeia da polimerase e avaliado por eletroforese em gel de agarose a 2%. M indica o marcador de 100 pb; 01 a 03 indicam as amostras amplificadas.



**Figura 14.** Perfil eletroforético do fragmento de 203 pb da mutação *C314T* do gene *FUT3*, clivado com a enzima de restrição *Nla* III, avaliado por eletroforese em gel de agarose a 2%. M indica o marcador de 100 pb; a amostra 01 apresenta o genótipo *CC*, a amostra 02 apresenta o genótipo *CT* e a amostra 03 o genótipo *TT*.

### 2.3.15 Análise estatística

Os resultados foram analisados com o uso do software Graphpad, versão 3.1. O teste exato de Fisher, Odds Ratio (OR) e o Qui-quadrado foram utilizados para comparar a independência entre as proporções. Os valores médios de idade foram comparados com o uso do teste t. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando o valor de  $p \leq 0.05$  e intervalo de confiança a 95%.

---

## Resultados

### 3. RESULTADOS

**3.1 Manuscrito a ser submetido à publicação na Revista Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (Fator de Impacto 2.832; ISSN 0035-9203; Imprint: ELSEVIER).**

1 **Fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* e desenvolvimento**  
2 **da retinocoroidite toxoplásmica, Brasil**

3 **Fatores de risco para retinocoroidite toxoplásmica**

4

5 Ana Iara C Ferreira<sup>a</sup>, Cinara C Brandão de Mattos<sup>a</sup>, Fábio B Frederico<sup>b</sup>,

6 Fabiana Nakashima<sup>a</sup>, Cássia R Bernardo<sup>a</sup>, Gildásio C de Almeida Jr<sup>b</sup>, Cristina

7 S Meira<sup>c</sup>, Vera L Pereira-Chioccola<sup>c</sup>, Luiz C de Mattos<sup>a,\*</sup>

8

9 <sup>a</sup>Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular,  
10 Faculdade de Medicina de São José Rio Preto. Av. Brigadeiro Faria Lima,  
11 5416, Vila São Pedro, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil

12

13 <sup>b</sup>Ambulatório de Oftalmologia, Fundação Faculdade Regional de Medicina-  
14 Hospital de Base. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544, Vila São Pedro, 15090-000,  
15 São José do Rio Preto, SP, Brasil

16

17 <sup>c</sup>Laboratório de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 351, 8<sup>o</sup>  
18 andar, Cerqueira Cesar, 01246-000, São Paulo, Brasil

19

20 Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

21 Fone: 55 17 3201-5857

22 Fax: 55 17 3229-1777

23 [luiz.carlos@famerp.br](mailto:luiz.carlos@famerp.br)

## 24 **Resumo**

25 A manifestação da retinocoroidite toxoplásmica (RT) depende de diferentes  
26 fatores. O objetivo do estudo foi avaliar os fatores de risco que contribuem para  
27 a infecção por *Toxoplasma gondii* e para o desenvolvimento da RT. Foram  
28 selecionados 349 pacientes atendidos no Ambulatório de Oftalmologia da  
29 FUNFARME, São José do Rio Preto, SP, Brasil. O método ELISA foi utilizado  
30 para determinar a presença ou ausência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e o  
31 exame de fundoscopia para confirmar o diagnóstico da RT. Oitenta e nove  
32 pacientes (25,5%) mostraram-se não reagentes e 74,5% (n=260), reagentes,  
33 sendo 71 (27,3%) com RT e 189 (72,7%) com outras doenças oculares (ODO).  
34 A presença de gatos ou cães (p=0,009; OR: 2.22; IC: 1.24-3.98), ingestão de  
35 carne crua ou mal cozida (p=0,03; OR: 1.77; IC: 1.05-2.98) e hábito de andar  
36 descalço (p=0,06; OR: 1.69; IC: 0.98-2.92) foram associados à infecção mas  
37 não ao desenvolvimento da RT. Por outro lado menor idade (RT: 51,0±19,9 x  
38 ODO: 61,2±13,8; p<0.0001) e baixo nível de escolaridade/analbafetismo  
39 (p=0.02) foram associados à RT. Os resultados deste estudo confirmam que a  
40 presença de cães e gatos bem como ingestão de carne crua elevam os riscos  
41 de infecção, mas não influenciam o desenvolvimento da RT.

42

43 **Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmose, Retinocoroidite  
44 toxoplásmica, Anticorpos IgG, ELISA, Fatores de risco.

## 45 **Introdução**

46 A toxoplasmose, doença resultante da infecção pelo protozoário *Toxoplasma*  
47 *gondii* (*T. gondii*) pode ser de origem congênita ou adquirida.<sup>1</sup> O *T. gondii* é um  
48 parasito versátil e a prevalência da infecção varia entre diferentes países, entre  
49 as áreas geográficas de um país e entre grupos étnicos que vivem em uma  
50 mesma região.<sup>2</sup> No Brasil, o índice de infecção varia de 50 a 83% da  
51 população, de acordo com o local estudado,<sup>3</sup> incluindo a região noroeste do  
52 Estado de São Paulo<sup>4</sup> e a alta prevalência está correlacionada com fatores de  
53 risco ambientais e parâmetros socioeconômicos.<sup>5</sup>

54

55

56 Diversas são as rotas de transmissão desse parasito, sendo que grande parte  
57 das infecções adquiridas está direcionada a ingestão de cistos teciduais  
58 contidos em carne crua ou mal cozida e a ingestão de oocistos esporulados  
59 livres no ambiente.<sup>6</sup>

60

61

62 A manifestação da infecção por *T. gondii* é frequentemente subclínica, ou seja,  
63 apresenta-se assintomática ou com sintomas inespecíficos.<sup>7</sup> Dentre as  
64 manifestações da toxoplasmose a RT é comum entre ambas a infecção  
65 congênita e adquirida,<sup>8</sup> sendo a principal causa de uveíte posterior que pode  
66 provocar sequelas graves como a perda completa da visão.<sup>9</sup> A prevalência da  
67 RT varia nas diferentes regiões do mundo e no Brasil acomete  
68 aproximadamente 30% dos pacientes com doenças oculares.<sup>10,11</sup>

69 Estudos investigaram fatores de risco e a presença da toxoplasmose  
70 congênita<sup>12,13</sup>, entretanto, são escassos estudos que avaliaram esses fatores  
71 na ocorrência, gravidade e recorrência da RT. O objetivo deste estudo foi  
72 avaliar os fatores de risco que contribuem para a infecção por *T. gondii* e  
73 desenvolvimento da RT.

74

75

## 76 **Materiais e métodos**

### 77 **Seleção da casuística**

78 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de  
79 Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP (Parecer 050/2009 de 09/03/09).  
80 No período de Abril de 2009 e outubro de 2010 foram selecionados 349  
81 pacientes consecutivos, de ambos os sexos atendidos no Ambulatório de  
82 Oftalmologia do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de  
83 Medicina (HB-FUNFARME), São José do Rio Preto, Estado de São Paulo,  
84 Brasil. Cada participante assinou o termo de consentimento livre e esclarecido  
85 após receber todas as informações sobre os objetivos e os procedimentos a  
86 serem realizados na pesquisa.

87

88

### 89 **Dados epidemiológicos**

90 Uma ficha de dados epidemiológicos relacionados à infecção pelo *T. gondii* e a  
91 RT foi preenchida. Foram anotados idade, endereço residencial, zona em que  
92 mora (urbana ou rural), tipo de moradia, saneamento básico (coleta pública de

93 lixo e rede de esgoto), presença de rato, barata ou mosca em casa, consumo  
94 de carne crua ou mal cozida e água filtrada, ingestão de leite cru, ter contato  
95 direto com gato ou cão, hábito de andar descalço, transfusão de sangue, outras  
96 doenças infecto-parasitárias (co-infecção por citomegalovírus, rubéola,  
97 catapora, mononucleose, malária, herpes, leishmaniose e chagas).

98

99

#### 100 **Diagnóstico da RT**

101 A avaliação clínica ocular dos pacientes foi realizada por dois profissionais  
102 experientes (FBF e GCAJr), por meio do exame de fundoscopia com o uso de  
103 oftalmoscópio binocular indireto (Binocular Ophthalmoscope ID 10, Topcon  
104 Corporation).

105

106

#### 107 **Coleta de sangue**

108 Para obtenção do soro, de cada paciente foi coletada por punção venosa, uma  
109 amostra de sangue periférico sem anticoagulante (BD), estocado a -20°C até o  
110 momento de seu uso.

111

112

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

114 A determinação da presença ou não de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG  
115 foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) conforme descrito em  
116 Brandão de Mattos e colaboradores (2011).<sup>14</sup>

## 117 **Análise estatística**

118 Os resultados foram analisados com o uso do software Grahpad, versão 3.1. O  
119 teste exato de Fisher, Odds Ratio (OR) e o Qui-quadrado foram utilizados para  
120 comparar a independência entre as proporções. Os valores médios de idade  
121 foram comparados com o uso do teste t. Foram consideradas diferenças  
122 estatisticamente significantes quando o  $p \leq 0.05$  e intervalo de confiança a 95%.

123

124

## 125 **Resultados**

126 Do total de 349 pacientes de ambos os sexos, a média de idade foi igual a  
127  $58,2 \pm 15,7$ , 53,6% (n=187) do sexo masculino e 46,4% (n=162), feminino;  
128 98,0% (n=342) eram residentes no Estado de São Paulo, sendo que 15,5%  
129 (n=53) do município de São José do Rio Preto e 84,5% (n=289) das cidades  
130 vizinhas. Quatro pacientes (1,1%) residiam no Estado de Minas Gerais e 0,9%  
131 (n=3) eram do Estado do Mato Grosso do Sul. Ainda com base nos dados  
132 levantados, 73,4% (n=256) possuem casa própria e apenas 0,3% (n=1) reside  
133 em casa de madeira. Em algum momento da vida 14,6% relataram terem tido  
134 toxoplasmose; 0,3% citomegalovírus; 18,6% rubéola; 69,3% catapora; 6,3%  
135 malária; 18,3% herpes; 0,3% leishmaniose; 4,9% chagas. Nenhum relatou ter  
136 tido mononucleose.

137 A tabela 1 apresenta os parâmetros socioeconômicos e fatores de risco  
138 ambientais entre os pacientes com sorologia reagente e não reagente para  
139 anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

140

141

142 A tabela 2 apresenta os parâmetros socioeconômicos e fatores de risco  
143 ambientais entre os pacientes com RT e pacientes portadores de outras  
144 doenças oculares, ambos com sorologia reagente.

145

146

#### 147 **Discussão**

148 Este estudo investigou os fatores de risco para infecção por *T. gondii* e o  
149 desenvolvimento da RT. Vários estudos foram realizados para verificar fatores  
150 de risco que contribuem na infecção por *T. gondii* entre as gestantes,<sup>15-17</sup>  
151 entretanto, são escassos estudos que abordam fatores de risco para os  
152 pacientes dos serviços de oftalmologia e principalmente para aqueles que  
153 possuem a RT.

154

155

156 Para detectar os anticorpos IgG anti-*T. gondii* (indicador de infecção pregressa  
157 ou crônica) foi utilizado o método sorológico ELISA, recomendado e utilizado  
158 frequentemente para determinar se o indivíduo possui ou não anticorpos anti-*T.*  
159 *gondii*.<sup>18</sup> A verificação da presença de lesões oculares foi realizada por meio  
160 do exame de fundoscopia.

161 Este estudo encontrou índice elevado de pacientes infectados pelo *T. gondii* e  
162 é concordante com aqueles da literatura que demonstram que o percentual de  
163 infecção toxoplásmica no Brasil pode chegar a 80%.<sup>3,4,12,19,20</sup> A frequência  
164 encontrada de RT entre os pacientes reagentes, mostra que é comum a  
165 presença da doença ocular causada pelo *T. gondii* entre os pacientes com  
166 doenças oculares. Estudos relatam prevalências de lesões oculares sugestivas  
167 de toxoplasmose semelhantes e inferiores a que encontramos: 22% na cidade  
168 de São Paulo,<sup>21</sup> 17,7% no Estado do Rio Grande do Sul,<sup>22</sup> e 5,8% no Estado do  
169 Rio de Janeiro.<sup>23</sup>

170

171

172 Os parâmetros sexo, média de idade, grau de escolaridade e renda familiar  
173 foram associados ao maior risco de infecção e ao desenvolvimento de RT. O  
174 número de mulheres e homens em ambos os grupos é semelhante e não  
175 apresentou diferenças estatisticamente significantes. Este resultado era  
176 esperado, visto que o parasito não possui preferência por sexo.<sup>24</sup> No entanto, o  
177 estudo de Aleixo e colaboradores (2009) demonstrou associação entre lesões  
178 oculares sugestivas de toxoplasmose e o sexo feminino.<sup>23</sup>

179

180

181 Os resultados deste estudo não demonstraram associação entre infecção por  
182 *T. gondii*, média de idade e condição socioeconômica. Porém, estas variáveis  
183 mostraram diferenças estatisticamente significantes entre pacientes com RT e

184 portadores de outras doenças oculares, ambos reagentes para anticorpos IgG  
185 anti-*T. gondii*.

186

187

188 Os pacientes com RT apresentaram menor média de idade que aqueles com  
189 outras doenças oculares; a RT pode acometer o indivíduo em qualquer fase da  
190 vida, sendo que cerca de 70% a 90% dos casos ocorrem por infecção  
191 congênita e de 2% a 30% por infecção adquirida após o nascimento.<sup>3</sup>

192

193

194 Houve associação entre os grupos reagentes e o grau de instrução escolar de  
195 cada paciente. Verificamos que a infecção e a RT estavam presentes  
196 principalmente entre aqueles que se declararam analfabetos ou que tiveram  
197 poucos anos de estudo. Essa associação pode ser resultante do fato de que a  
198 baixa escolaridade implica em maior exposição ao risco, devido a não adoção  
199 de medidas mais apropriadas na prevenção da infecção, concordando com  
200 Varella e colaboradores.<sup>25</sup> Indivíduos com maior escolaridade possuem  
201 aparentemente menor risco de desenvolver a RT. É possível que indivíduos  
202 com grau de instrução mais elevado busquem com maior frequência o  
203 atendimento nos serviços de oftalmologia.

204

205

206 A associação observada neste estudo entre a infecção por *T. gondii* e o contato  
207 direto com gatos e/ou cães foi verificada anteriormente,<sup>13,26</sup> pois o gato é o

208 hospedeiro definitivo deste parasito e elimina junto as fezes o oocisto, que após  
209 a maturação contamina o ambiente.<sup>27</sup> Contudo, a importância de cães na  
210 transmissão do parasito ao homem ainda não está claramente definida.  
211 Acredita-se que o consumo da carne deste animal possa contribuir para a  
212 dispersão do parasito em humanos,<sup>28</sup> a exemplo do que foi demonstrado para  
213 outras doenças,<sup>29</sup> porém, não é hábito entre brasileiros o consumo de carne  
214 canina.

215

216

217 Verificamos que a infecção também está fortemente associada ao consumo de  
218 carne crua ou mal cozida,<sup>30</sup> hábito considerado como a principal rota de  
219 infecção do *T. gondii*.<sup>6</sup> Encontramos ainda um resultado limiar entre a infecção  
220 pelo *T. gondii* e o hábito de andar descalço, portanto o contato direto com o  
221 solo sugere que a infecção ocorra também dessa forma.<sup>12,30</sup>

222

223

224 Outros fatores de risco relacionados à infecção pelo *T. gondii* como a  
225 transfusão de sangue, ingestão de leite cru, lavagem correta de legumes e  
226 verduras, morar na zona rural, consumir água não filtrada, condições de  
227 saneamento básico adequadas e presença de ratos, baratas e moscas dentro  
228 do ambiente domiciliar foram avaliados no presente estudo, no entanto,  
229 nenhuma associação foi verificada. Quando analisamos os fatores de risco  
230 ambientais que se associaram ou não a infecção pelo *T. gondii* em relação ao

231 desenvolvimento da RT, não observamos diferenças estatisticamente

232 significantes.

233

234

235 Considerando que os fatores de risco para infecção não estão associados à

236 RT, é possível que o risco de se desenvolver RT seja dependente da

237 patogenicidade da cepa infectante e/ou da competência imune aliada a fatores

238 imunogenéticos determinantes de suscetibilidade do hospedeiro.

239

240

241 Em conclusão, os resultados deste estudo confirmam que a presença de cães

242 e gatos bem como ingestão de carne crua ou mal cozida elevam os riscos de

243 infecção, mas não influenciam o desenvolvimento da RT.

244 **Contribuição dos autores**

245 Este estudo foi idealizado por CCBM e LCM; AICF, FBF, CCBM, CRB, FN  
246 recrutaram os participantes e conduziram as entrevistas; FBF e GCAJ  
247 conduziram as avaliações clínicas. A coleta, gerenciamento, análise sorológica  
248 e interpretação de dados foram realizadas por AICF, CRB, CCBM, FN, CSM,  
249 VLPC e LCM. AICF, CCBM e LCM fizeram o manuscrito. Todos os autores  
250 revisaram, leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

251

252

253 **Apoio financeiro**

254 Este estudo teve apoio financeiro: (i) FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa  
255 do Estado de São Paulo, Brasil), Proc: 2009/09168-6 e 2009/17540-2); (ii)  
256 Ministério da Ciência e Tecnologia-CNPq (Conselho Nacional de  
257 Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), Proc: 473579/2009-0; (iii)  
258 Ministério da Educação-CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
259 de Nível Superior, Brasil); (iv) BAP-FAMERP e (v) Biotechnology Research  
260 Institute (Auckland University of Technology).

261

262

263 **Conflitos de interesse**

264 Nenhum declarado.

265 **Aspectos éticos do estudo**

266 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (Parecer

267 050/2009 de 09/03/09).

268 **Referências**

- 269 1. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and  
270 prevention. *Clin Microbiol Infect* 2002, **8**: 634-40. doi: 10.1046/j.1469-  
271 0691.2002.00485.x
- 272
- 273
- 274 2. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals  
275 to humans. *Int J Parasitol* 2000, **30**: 1217-58. doi:10.1016/S0020-  
276 7519(00)00124-7
- 277
- 278
- 279 3. Oréfice F, Bonfioli AA. Toxoplasmose. In: Oréfice F. Uveíte Clínica e  
280 Cirurgica: Texto e Atlas, Vol. II. 2ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica;  
281 2000, p 619-80.
- 282
- 283
- 284 4. Gonçalves MAS, Mattos CCB, Spegiorin LCJF, Oliani DCV, Oliani AH,  
285 Mattos LC. Seropositivity rates for toxoplasmosis, rubella, syphilis,  
286 cytomegalovirus, hepatitis and HIV among pregnant women receiving  
287 care at a Public Health Service, São Paulo State, Brazil. *Braz J Infect Dis*  
288 2010, **14**: 427-32. doi: 10.1590/S1413-86702010000600009

- 289 5. Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W,  
290 et al. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the maroni river:  
291 epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis*  
292 2007, **45**: 88-95. doi: 10.1086/521246  
293  
294
- 295 6. Klaren VNA, Kijlstra A. Toxoplasmosis, an overview with emphasis on  
296 ocular involvement. *Ocul Immunol Inflamm* 2002, **10**: 1-26.  
297  
298
- 299 7. Antoniazzi E, Guagliano R, Meroni V, Pezzotta S, Bianchi PE. Ocular  
300 impairment of toxoplasmosis. *Parassitologia* 2008, **50**: 35-6.  
301  
302
- 303 8. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations.  
304 *Inst J Parasitol* 2009, **39**: 895-901. doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.004  
305  
306
- 307 9. Hay J, Dutton GN. Toxoplasma and the eye. *Br Med J* 1995, **310**: 1021-  
308 2.  
309  
310
- 311 10. Matos K, Muccioli C, Belfort Jr R, Rizzo LV. Correlation between clinical  
312 diagnosis and PCR analysis of serum, aqueous, and vitreous samples in

313 patients with inflammatory eye disease. *Arq Bras Oftalmol* 2007, **70**: 109-  
314 14. doi: 10.1590/S0004-27492007000100020

315

316

317 11.Arevalo JF, Belfort Jr R, Muccioli C, Espinoza JV. Ocular toxoplasmosis  
318 in the developing world. *Int Ophthalmol Clin* 2010, **50**: 57-69. doi:  
319 10.1097/IIO.0b013e3181d26bf4

320

321

322 12.Spalding SM, Amendoeira MRR, Klein CH, Ribeiro LC. Serological  
323 screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women  
324 in South of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005, **38**: 173-7. doi:  
325 10.1590/S0037-86822005000200009

326

327

328 13.Barbosa IR, Holanda CMCX, Andrade-Neto VF. Toxoplasmosis  
329 screening and risk factors amongst pregnant females in Natal,  
330 northeastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009, **103**: 377-82.  
331 doi:10.1016/j.trstmh.2008.11.025

332

333

334 14.Mattos CCB, Meira CS, Ferreira AIC, Frederico FB, Hiramoto RM, Jr  
335 GCA, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically

- 336 suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol*  
337 *Infect Dis* 2011, **70**: 362-6. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.02.002  
338  
339
- 340 15.Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J.  
341 Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *Am J*  
342 *Epidemiol* 1996, **144**: 405-12.  
343  
344
- 345 16.Avelino MM, Campos Jr D, Parada JB, Castro AM. Risk factors for  
346 *Toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age. *Braz J Infect*  
347 *Dis* 2004, **8**: 164-74. doi: 10.1590/S1413-86702004000200007  
348  
349
- 350 17.Boyer KM, Holfels E, Roizen N, Swisher C, Mack D, Remington J, et al.  
351 Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with  
352 congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and  
353 screening. *Am J Obstet Gynecol* 2005; **192**: 564-71. doi:  
354 10.1016/j.ajog.2004.07.031  
355  
356
- 357 18.Camargo ME. Toxoplasmose. In: Ferreira AW e Ávila SLM. Diagnóstico  
358 laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes. 2ª ed. Rio  
359 de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001, p 278-88.

- 360 19. Mattos CCB, Cintra JR, Ferreira AIC, Spegiorin LCJF, Galisteu KJ,  
361 Machado RLD, et al. Lack of association between ABO histo-blood  
362 groups, secretor and non-secretor phenotypes, and anti-*Toxoplasma*  
363 *gondii* antibodies among pregnant women from the northwestern region  
364 of São Paulo State, Brazil. *Arch Med Sci* 2008, **4**: 254-8.
- 365  
366
- 367 20. Rodrigues ACF, Uezato S, Vono MB, Pandossio T, Spegiorin LCJF,  
368 Oliani AH et al. Non-association between anti-*Toxoplasma gondii*  
369 antibodies and ABO blood group system. *J Venom Anim Toxins incl Trop*  
370 *Dis* 2011, **17**: 184-9. doi: 10.1590/S1678-91992011000200009
- 371  
372
- 373 21. Gouveia EB, Yamamoto JH, Abdalla M, Hirata CE, Kubo P, Olivalves E.  
374 Causas das uveítes em serviço terciário em São Paulo, Brasil. *Arq Bras*  
375 *Oftalmol* 2004, **67**: 139-45.
- 376  
377
- 378 22. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier MJR,  
379 Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in  
380 southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 1992, **114**: 136-44.

- 381 23. Aleixo ALQC, Benchimol EI, Neves ES, Palhano CS, Coura LC,  
382 Amendoeira MRR. Frequências de lesões sugestivas de toxoplasmose  
383 ocular em uma população rural do Estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc*  
384 *Bras Med Trop* 2009, **42**: 165-9  
385  
386
- 387 24. Lynch MI, Moraes LFL, Malagueño E, Ferreira S, Cordeiro F, Oréfice F.  
388 Características clínicas de 64 indivíduos portadores de uveítis posterior  
389 activa presumivelmente toxoplásmica em Pernambuco. *Arq Bras*  
390 *Oftalmol* 2008, **71**: 43-8. doi: 10.1590/S0004-27492008000100009  
391  
392
- 393 25. Varella IS, Wagner MB, Darela AC, Nunes LM, Müller RW. Prevalência  
394 de soropositividade para toxoplasmose em gestante. *J Pediatr (Rio J)*  
395 2003, **79**: 69-74. doi: 10.1590/S0021-75572003000100012  
396  
397
- 398 26. Lopes FMR, Mitsuka-Breganó R, Gonçalves DD, Freire RL, Karigyo CJT,  
399 Wedy GF, et al. Factors associated with seropositivity for anti-  
400 *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Paraná,  
401 Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, **104**: 378-82. doi: 10.1590/S0074-  
402 02762009000200036

- 403 27. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii*  
404 tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development  
405 of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**: 267-99.  
406  
407
- 408 28. Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC, Kobilka E.  
409 Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose  
410 humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. *Rev Panam Salud*  
411 *Public* 1999, **6**: 157-63.  
412  
413
- 414 29. Wertheim HFL, Nguyen TQ, Nguyen KAT, Jong MD, Taylor WRJ, Le TV,  
415 et al. Furious rabies after an atypical exposure. *Plos Medicine* 2009, **6**:  
416 e1000044. doi:10.1371/journal.pmed.1000044.g001  
417  
418
- 419 30. Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jennum PA,  
420 et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: european  
421 multicentre case-control study. *Brit Medical J* 2000, **321**: 142-7. doi:  
422 10.1136/bmj.321.7254.142

423 Tabela 1. Parâmetros socioeconômicos e fatores de risco ambientais entre  
 424 os pacientes com sorologia reagente e não reagente para anticorpos IgG  
 425 anti-*Toxoplasma gondii*, de um serviço de oftalmologia, SP, Brasil<sup>a</sup>

	Reagente		Não Reagente		Total (n=349)		
	N	%	N	%			
	260	74,5	89	25,5			
<b>Sexo</b>					<b>OR</b>	<b>CI 95%</b>	<b>p</b>
	125-F	48,1	37-F	41,6			
	135-M	51,9	52-M	58,4	1,301	0,7997-2,117	0,3252
<b>Média de idade</b>		58,5		57,3			<b>p</b>
(SD)		16,2		14,3			0,5351
Variação		18 a 88		20 a 87			
<b>Anos na escola</b>							<b>p</b>
Analfabeta	42	16,2	11	12,4			0,8146
1-7	161	61,9	56	62,9			
8-10	24	9,2	10	11,2			
>10	33	12,7	12	13,5			
<b>Renda familiar (salários)</b>							<b>p</b>
≤ 1	82	31,5	31	34,8			0,8389
1,5-3,5	152	58,5	50	56,2			
≥ 4	26	10,0	8	9,0			
					<b>OR</b>	<b>CI 95%</b>	<b>p</b>
<b>Recebeu transfusão de sangue</b>	64	24,6	17	19,1	1,383	0,7595-2,518	0,3121
<b>Contato direto com gato e/ou cão</b>	223	85,8	65	73,0	2,225	1,242-3,988	0,0093
<b>Andar descalço</b>	93	35,8	22	24,7	1,696	0,9840-2,923	0,0672
<b>Ingestão de leite cru</b>	142	54,6	52	58,4	0,8563	0,5260-1,394	0,5398
<b>Ingestão de carne crua/mal cozida</b>	110	42,3	26	29,2	1,777	1,057-2,986	0,0324
<b>Não lavar corretamente os alimentos</b>	6	2,3	3	3,4	0,6772	0,1657-2,767	0,6985
<b>Morar na zona rural</b>	18	6,9	8	9,0	0,7531	0,3154-1,798	0,4918
<b>Consumir água da torneira</b>	134	51,5	53	59,5	0,7224	0,4433-1,177	0,2186
<b>Falta de saneamento básico</b>	26	10,0	11	12,3	0,7879	0,3721-1,668	0,5515
<b>Rato, barata ou mosca em casa</b>	94	36,15	31	34,83	1,059	0,6399-1,754	0,8983

426 <sup>a</sup> Análise univariável, IC 95%, P≤0.05

427 Tabela 2. Parâmetros socioeconômicos e fatores de risco ambientais entre os  
 428 pacientes com retinocoroidite toxoplásmica e outras doenças oculares, ambos  
 429 com sorologia reagente para anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*, SP,  
 430 Brasil<sup>a</sup>

	Retinocoroidite toxoplásmica		Outras doenças Oculares		Total (n=260)		
	N	%	N	%			
	71	27,3	189	72,7			
<b>Sexo</b>					<b>OR</b>	<b>CI 95%</b>	<b>p</b>
	35-F	49,3	90-F	47,6			
	36-M	50,7	99-M	52,4	1,069	0,6195-1,846	0,8894
<b>Média de idade</b>		51,0		61,2			<b>p</b>
(SD)		19,9		13,8			<0,0001
Variação		18 a 87		26 a 88			
<b>Anos na escola</b>							<b>p</b>
Analfabeta	7	9,9	35	18,5			0,0267
1-7	40	56,3	121	64,0			
8-10	9	12,7	13	6,9			
>10	15	21,1	20	10,6			
<b>Renda familiar (salários)</b>							<b>p</b>
≤ 1	21	29,6	61	32,3			0,4017
1,5-3,5	40	56,3	112	59,2			
≥ 4	10	14,1	16	8,5			
					<b>OR</b>	<b>CI 95%</b>	<b>p</b>
<b>Recebeu transfusão de sangue</b>	17	23,9	47	24,9	0,9511	0,5029-1,799	1,0000
<b>Contato direto com gato e/ou cão</b>	57	80,3	164	86,8	0,6206	0,3019-1,276	0,2413
<b>Andar descalço</b>	30	42,2	63	33,3	1,463	0,8361-2,561	0,1935
<b>Ingestão de leite cru</b>	38	53,5	104	55,0	0,9411	0,5443-1,627	0,8891
<b>Ingestão de carne crua/mal cozida</b>	34	47,9	76	40,2	1,366	0,7890-2,366	0,3241
<b>Não lavar corretamente os alimentos</b>	1	1,4	5	2,6	0,5257	0,06032-4,582	1,0000
<b>Morar na zona rural</b>	6	8,4	12	6,3	1,362	0,4907-3,778	0,5863
<b>Consumir água da torneira</b>	37	52,1	97	51,3	1,032	0,5978-1,782	1,0000
<b>Falta de saneamento básico</b>	10	14,1	16	8,5	1,773	0,7633-4,116	0,2443
<b>Rato, barata ou mosca em casa</b>	27	38,0	67	35,4	1,117	0,6354-1,965	0,7723

431 <sup>a</sup> Análise univariável, IC 95%, P≤0.05

**3.2 Manuscrito a ser submetido à publicação na Revista Genes and Immunity (Fator de Impacto 4.367; ISSN 1466-4879; eISSN 1476-5470).**

1 **Antígenos Lewis: potencial fator de risco para infecção por *Toxoplasma***  
2 ***gondii* e desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica**

3 **Antígeno Le<sup>a</sup> e desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica**

4 Ana Iara C Ferreira<sup>1</sup>, Cinara C Brandão de Mattos<sup>1</sup>, Fábio B Frederico<sup>2</sup>, Cássia  
5 R Bernardo<sup>1</sup>, Fabiana Nakashima<sup>1</sup>, Gildásio C Almeida Jr<sup>2</sup>, Cristina S Meira<sup>3</sup>,  
6 Vera L Pereira-Chioccola<sup>3</sup>, Luiz C Mattos<sup>1</sup>

7

8 <sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular,  
9 Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP,  
10 Brasil

11

12 <sup>2</sup>Ambulatório de Oftalmologia, Fundação Faculdade Regional de Medicina de  
13 São José do Rio Preto-Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brasil

14

15 <sup>3</sup>Laboratório de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil

16

17 Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos  
18 Laboratório de Imunogenética  
19 Departamento de Biologia Molecular  
20 Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
21 Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416  
22 15090-000 – São José do Rio Preto, SP - Brasil  
23 Fone: 55 17 3201-5857  
24 Fax: 55 17 3229-1777  
25 [luiz.carlos@famerp.br](mailto:luiz.carlos@famerp.br)

26 **Resumo**

27 *Toxoplasma gondii* infecta os seres humanos dentre outras vias, pelo trato  
28 gastrintestinal, local de expressão dos antígenos ABO por meio de interações  
29 epistáticas entre os genes ABO, Secretor e Lewis. O objetivo do estudo foi  
30 testar a hipótese de que as variações qualitativas e quantitativas na expressão  
31 dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis estão  
32 associadas à infecção por *T. gondii* e o desenvolvimento da retinocoroidite  
33 toxoplásmica (RT). Foram selecionados 348 pacientes atendidos no  
34 Ambulatório de Oftalmologia da FUNFARME, São José do Rio Preto. As  
35 fenotipagens ABO e Lewis foram realizadas por meio dos métodos de  
36 hemaglutinação em tubos e colunas de gel, respectivamente. A extração do  
37 DNA por kit comercial e as genotipagens *FUT2* e *FUT3* por PCR-RFLP.  
38 Anticorpos IgG anti-*T. gondii* foram determinados pelo método ELISA e o  
39 diagnóstico da RT pelo o exame de fundoscopia. O fenótipo Le(a-b+) (p=0,03;  
40 OR: 0.49; IC: 0.25-0.96) foi associado à infecção pelo *T. gondii*, enquanto os  
41 fenótipos não Secretor (p=0,06; OR: 0.54; IC: 0.28-1.02) e Le(a+b-) (p=0,08;  
42 OR: 1.86; IC: 0.97-3.55) apresentaram-se como possíveis fatores de riscos  
43 para o desenvolvimento da RT. Os resultados deste estudo sugerem que a  
44 elevada expressão do antígeno Le<sup>a</sup> favoreça o desenvolvimento da RT.

45

46 **Palavras-chave:** Retinocoroidite toxoplásmica, Anticorpos IgG, Sistemas histo-  
47 sanguíneos.

## 48 **Introdução**

49 Tem sido observado que microrganismos se ligam a moléculas da membrana  
50 das células do hospedeiro para invasão celular e dentre elas, destacam-se as  
51 compostas por carboidratos.<sup>1</sup> O processo pelo qual se dá a ligação não é  
52 totalmente compreendido, mas as variações qualitativas e quantitativas destas  
53 moléculas parecem influenciar a suscetibilidade à infecção.<sup>2</sup>

54

55

56 *T. gondii* é um parasito versátil de distribuição mundial,<sup>3</sup> capaz de infectar e se  
57 replicar em qualquer célula nucleada,<sup>4</sup> e o índice de infecção humana no Brasil  
58 pode chegar a 80% de acordo com a região.<sup>3</sup> Dentre os acometimentos da  
59 toxoplasmose, a manifestação ocular está presente em ambas as infecções  
60 congênita e adquirida,<sup>5</sup> sendo considerada a principal causa de uveíte posterior  
61 em humanos.<sup>6</sup>

62

63

64 Estudos anteriores demonstraram associação entre os fenótipos eritrocitários  
65 do sistema histo-sanguíneo ABO e infecção por *T. gondii*. Inicialmente foi  
66 proposto que o antígeno B, uma molécula glicosilada, poderia atuar como  
67 receptor para *T. gondii* na mucosa gastrintestinal.<sup>7</sup> Estas observações foram  
68 confirmadas por alguns estudos,<sup>8-11</sup> mas contestadas por outros.<sup>12-16</sup>  
69 Entretanto, estes estudos não investigaram a ação conjunta dos sistemas ABO,  
70 Secretor e Lewis na suscetibilidade à infecção por este parasito apicomplexa.

71 A expressão dos antígenos ABO em outros tecidos que não o hematopoiético  
72 depende de complexas interações epistáticas entre os genes ABO (*ABO*;  
73 9q34.1), Secretor (*FUT2*; 19q13.3) e Lewis (*FUT3*; 19p13.3).<sup>2</sup> O gene *FUT2*  
74 controla a expressão dos antígenos ABO nas mucosas e o gene *FUT3*, além  
75 de determinar a expressão dos antígenos Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup>, regula as variações  
76 qualitativa e quantitativa dos antígenos ABO.<sup>17</sup> Portanto a simples  
77 determinação dos fenótipos eritrocitários ABO não reflete o real fenótipo  
78 antigênico tecidual resultante da ação conjunta dos genes *FUT2*, *FUT3* e  
79 *ABO*.<sup>18,19</sup>

80

81

82 A combinação de métodos sorológicos e moleculares favorece a determinação  
83 dos fenótipos e dos genótipos relacionados a estes sistemas permitindo a  
84 definição do perfil antigênico tecidual. O quadro 1 ilustra as variações da  
85 expressão dos antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e  
86 Lewis. O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que as variações  
87 qualitativas e quantitativas na expressão dos antígenos carboidratos destes  
88 sistemas estão associadas à suscetibilidade à infecção por *T. gondii* e ao  
89 desenvolvimento da RT.

90

91

## 92 **Resultados**

93 Dos 348 pacientes de ambos os sexos selecionados consecutivamente, 185  
94 (53,2%) eram do sexo masculino e 163 (46,8%) do sexo feminino. A média de

95 idade geral foi igual a  $57,7 \pm 15,9$  (mínimo de 18; máximo de 87). Para o sexo  
96 masculino a média de idade foi igual a  $57,5 \pm 16,0$  (mínimo de 18; máximo de  
97 87) e para o feminino foi igual a  $57,9 \pm 15,8$  (mínimo de 18; máximo de 85)  
98 ( $p > 0,05$ ).

99

100

101 De acordo com o diagnóstico clínico oftalmológico, 23,6% ( $n=82$ ; média de  
102 idade:  $51,1 \pm 19,8$ ) apresentaram RT (21 com lesões exsudativas e 61 com  
103 cicatrizes retinocoroidianas). Os 76,4% ( $n=266$ ; média de idade:  $59,6 \pm 14,1$ )  
104 apresentaram outras doenças oculares (85 com retinopatia diabética tipo II; 40  
105 com descolamento de retina; 22 com degeneração macular relacionada à  
106 idade; 16 com retinopatia diabética tipo I; 12 com catarata; 9 com transplante  
107 de córnea; 9 com trauma ocular; 8 com glaucoma; 7 com uveíte sem causa  
108 definida; 7 com alteração de mácula; 6 com hemorragia vítrea; 45 com outras  
109 doenças oculares).

110

111

112 As diferenças entre as médias de idade dos pacientes com RT ( $51,1 \pm 19,8$ ) e  
113 outras doenças oculares ( $59,6 \pm 14,1$ ) foram estatisticamente significantes  
114 ( $p < 0,0001$ ).

115 O percentual de infecção por *T. gondii* foi elevado em ambos os grupos de  
116 pacientes, mas predominou entre aqueles com RT (77/82: 93,9% x 183/266:  
117 68,8%) ( $p < 0,0001$ ) (tabela 1).

118

119

120 As diferenças entre as frequências dos fenótipos eritrocitários ABO ( $\chi^2$ : 2.123; 3  
121 GL;  $p = 0,5474$ ) e Secretor ( $\chi^2$ : 2.494; 2 GL;  $p = 0,1142$ ) não foram  
122 estatisticamente significantes entre os pacientes reagentes e não reagentes  
123 para anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Por outro lado foi observada diferença  
124 estatisticamente significativa entre os fenótipos Lewis ( $\chi^2$ : 4.396; 2 GL) com  
125 prevalência do fenótipo Le(a+b-) entre os reagentes e do fenótipo Le(a-b+)  
126 entre os não reagentes (tabela 2).

127

128

129 Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas  
130 frequências dos fenótipos eritrocitários ABO ( $\chi^2$ : 2.432; 3 GL) entre os  
131 pacientes com RT e outras doenças oculares. Por outro lado, estes grupos de  
132 pacientes apresentaram diferenças marginais entre as frequências dos  
133 fenótipos Secretor ( $\chi^2$ : 3.616; 1 GL;  $p = 0,0572$ ), e Lewis ( $\chi^2$ : 4.800; 2 GL;  
134  $p = 0,0907$ ) com prevalência do fenótipo Le(a+b-) entre aqueles com RT (tabela  
135 3).

## 136 **Discussão**

137 O objetivo deste estudo foi verificar se os fenótipos eritrocitários ABO, Lewis e  
138 os fenótipos Secretor e não Secretor estão associados à infecção por *T. gondii*  
139 e ao desenvolvimento da RT. A proposição de que os níveis distintos de  
140 carboidratos expressos por estes sistemas histo-sanguíneos modificam a  
141 suscetibilidade e a resistência a doenças infecciosas e parasitárias,<sup>2</sup> levaram-  
142 nos a investigar sua influência nos elevados índices de infecção por *T. gondii* e  
143 no desenvolvimento da RT, em comparação a outras doenças oculares.

144

145

146 A média de idade da casuística analisada neste estudo situou-se acima dos 55  
147 anos e não diferiu entre os sexos. Esta variável foi menor entre os pacientes  
148 com diagnóstico clínico oftalmológico de RT que entre aqueles com outras  
149 doenças oculares. Não foi possível estabelecer em que período da vida se deu  
150 a infecção por *T. gondii* nos pacientes com RT e nem determinar se a mesma  
151 ocorreu de forma congênita ou adquirida após o nascimento. É possível que  
152 características epidemiológicas próprias da toxoplasmose contribuam para a  
153 manifestação precoce da RT em comparação a outras doenças oculares.<sup>20</sup>

154

155

156 A infecção por *T. gondii* pode ser congênita ou ocorrer em qualquer fase da  
157 vida e os indivíduos sem manifestação clínica de toxoplasmose ao nascimento  
158 tendem a desenvolver RT com maior frequência entre a segunda e a terceira  
159 décadas de vida.<sup>3</sup> Entretanto, isso não foi avaliado neste estudo. Outras

160 doenças oculares como retinopatia diabética, degeneração macular e catarata  
161 dentre outras, estão mais associadas ao envelhecimento e acometem  
162 pacientes com idade avançada,<sup>21</sup> é possível que a natureza epidemiológica da  
163 RT e das outras doenças oculares contribuam para as diferenças observadas  
164 neste estudo.

165

166

167 A casuística analisada apresentou elevado índice de infecção por *T. gondii* e os  
168 valores observados estão em concordância com aqueles previamente relatados  
169 para a mesma região.<sup>14,16,22</sup> É possível que hábitos alimentares e higiênicos  
170 próprios bem como a geografia da região noroeste do Estado de São Paulo  
171 favoreçam a disseminação do *T. gondii*. Tomados em conjunto, os resultados  
172 deste e dos demais estudos,<sup>14,16,22</sup> despertam a atenção para a importância da  
173 infecção por *T. gondii* e das doenças resultantes na região noroeste do Estado  
174 de São Paulo.

175

176

177 A prevalência de RT foi elevada sendo encontrada em mais de um quarto dos  
178 pacientes selecionados. Estes dados estão de acordo com aqueles publicados  
179 por Gouveia e colaboradores (2004) que demonstraram índices semelhantes  
180 em pacientes de um serviço de uveítes da cidade de São Paulo.<sup>23</sup> Os  
181 resultados conjuntos destes estudos indicam que aproximadamente um quarto  
182 dos pacientes com infecção por *T. gondii* e sem evidências clínicas de  
183 imunodeficiências estão sob risco de desenvolvimento de RT.

184 A manifestação da RT em pacientes sem evidência clínica de  
185 imunodeficiências parece ser de natureza multifatorial e depende tanto da  
186 virulência da cepa infectante bem como de fatores genéticos de suscetibilidade  
187 do hospedeiro.<sup>24,25</sup> Existem fortes evidências de que as cepas de *T. gondii* que  
188 predominam na América do Sul são mais virulentas que aquelas presentes na  
189 Europa e na América do Norte e que as diferenças entre elas contribuem para  
190 a maior gravidade da RT nos povos sul-americanos.<sup>20</sup> Embora este estudo não  
191 tenha realizado genotipagens das cepas infectantes foi possível observar que a  
192 maioria dos pacientes acometidos por RT apresentavam lesões em áreas de  
193 menor comprometimento ocular sem dano aparente do nervo óptico e da  
194 mácula.

195

196

197 As demonstrações prévias de que o sistema histo-sanguíneo ABO do  
198 hospedeiro pode influenciar a suscetibilidade à infecção por *T. gondii* em  
199 gestantes e doadores de sangue,<sup>7-11</sup> estimularam-nos a investigar a potencial  
200 associação entre os níveis de expressão de seus antígenos carboidratos com a  
201 infecção e o desenvolvimento da RT.

202

203

204 A proposição de que os carboidratos dos sistemas histo-sanguíneos ABO,  
205 Secretor e Lewis possam atuar como potenciais receptores para *T. gondii* é  
206 atraente. A expressão destes carboidratos ocorre de forma integrada em  
207 diferentes tecidos, sob controle das glicosiltransferases codificadas pelos

208 genes *FUT2*, *FUT3* e *ABO*, criando perfis distintos de oligossacarídeos.<sup>2</sup> Estas  
209 moléculas são utilizadas por diferentes microrganismos para aderirem às  
210 células da mucosa intestinal,<sup>2,26</sup> e o *T. gondii* utiliza o intestino como rota de  
211 infecção.<sup>27</sup> Estes eventos aparentemente independentes podem estar  
212 biologicamente relacionados e influenciar a suscetibilidade à infecção e ao  
213 desenvolvimento da RT. Estas ponderações não consideradas nos estudos  
214 prévios foram exploradas no presente estudo.

215

216

217 As frequências dos fenótipos eritrocitários ABO e Secretor não mostraram  
218 diferenças estatisticamente significantes entre pacientes com e sem sorologia  
219 reagente para *T. gondii* quando analisadas isoladamente ou em conjunto. Estas  
220 observações são concordantes com aquelas previamente relatadas para  
221 gestantes francesas,<sup>13</sup> e gestantes brasileiras.<sup>14,16</sup> Tomados em conjunto os  
222 resultados destes estudos indicam que a suscetibilidade á infecção por *T.*  
223 *gondii* não é influenciada pelos sistemas histo-sanguíneos. Por outro lado os  
224 resultados aqui relatados não confirmam a proposição de que os fenótipos  
225 eritrocitários ABO estão associados com a infecção por este parasito  
226 apicomplexa.<sup>7-11</sup> É possível que diferenças de natureza étnica da casuística  
227 bem como aqueles de ordem genética das cepas infectantes contribuam para  
228 as diferenças entre este e os demais estudos.

229 Por outro lado as diferenças entre as frequências do fenótipo Le(a-b+) entre  
230 pacientes com sorologia reagente e não reagente foram estatisticamente  
231 significantes. Indivíduos portadores deste fenótipo apresentam menor risco  
232 para infecção comparados àqueles com os fenótipos Le(a+b-) e Le(a-b-). A  
233 expressão do antígeno Le<sup>b</sup> ocorre em maior quantidade entre aqueles com  
234 fenótipo O e Secretores.<sup>28</sup> Análises adicionais demonstraram que a maioria dos  
235 indivíduos que não expressam o antígeno Le<sup>b</sup> possuem maior risco de  
236 infecção, destacando-se dentre eles os portadores do fenótipo Le(a+b-) que  
237 expressam altos níveis do antígeno Le<sup>a</sup>.

238

239

240 Estes antígenos são sintetizados pela mesma enzima ( $\alpha$ 3/4-L-  
241 fucosiltransferase - FUTIII) a partir de distintos oligossacarídeos precursores e  
242 não são modificados pela ação das enzimas codificadas pelo gene ABO.<sup>17,28</sup> É  
243 possível que as diferenças estruturais resultantes de sua expressão  
244 (monofucosilação em Le<sup>a</sup> e difucosilação em Le<sup>b</sup>) influenciam a suscetibilidade  
245 à infecção por *T. gondii*. Pelo conhecimento dos autores este é o primeiro  
246 relato demonstrando a influência do antígeno Le<sup>b</sup> na infecção por um parasito  
247 apicomplexa.

248

249

250 Os fenótipos dos sistemas histo-sanguíneos ABO, Secretor e Lewis foram  
251 comparados quanto ao desenvolvimento de RT e de outras doenças oculares.  
252 Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para os

253 fenótipos ABO. Por outro lado, os fenótipos não Secretor e Le(a+b-)  
254 apresentaram maior frequência entre os pacientes com RT mas as diferenças  
255 situaram-se próximas ao limite de significância. É possível que os elevados  
256 níveis de expressão do antígeno Le<sup>a</sup> favoreçam o desenvolvimento da RT em  
257 comparação a outras doenças oculares.

258

259

260 A forma pela qual os fenótipos não Secretor e Le(a+b-) influenciam o  
261 desenvolvimento da RT ainda não foi esclarecida. Portadores do fenótipo  
262 Le(a+b-) sempre são não Secretores e expressam elevados níveis do antígeno  
263 Le<sup>a</sup>.<sup>2,28</sup> Contudo, é possível que a expressão deste antígeno contribua com a  
264 suscetibilidade à RT por mecanismos distintos.

265

266

267 Após sua expressão em diferentes órgãos (fígado, intestino delgado, etc...), os  
268 antígenos Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup> são secretados para o plasma sanguíneo de onde são  
269 adsorvido à membrana eritrocitária, caracterizando os fenótipos Le(a+b-) e  
270 Le(a-b+). Desta forma estas moléculas contribuem com a geração de fenótipos  
271 eritrocitários extrínsecos em comparação àqueles intrínsecos, cujos antígenos  
272 são sintetizados nas células precursoras hematopoiéticas.<sup>17,18</sup> É possível que  
273 este mecanismo de adsorção seja utilizado por parasitos como o *T. gondii* na  
274 medida em que suas formas infectantes se encontram no intestino delgado e  
275 os taquizoítos, no plasma sanguíneo. A adsorção do antígeno Le<sup>a</sup> à membrana

276 do *T. gondii* poderia representar uma estratégia adicional de evasão do  
277 reconhecimento imune por meio da mimetização de tecidos do hospedeiro.

278

279

280 Outra contribuição do antígeno Le<sup>a</sup> na suscetibilidade à infecção por *T. gondii*  
281 poderia resultar da sua expressão em tecidos do olho. Uma isoforma de Le<sup>a</sup>  
282 chamada Le<sup>x</sup> (CD15), pertencente à lactosérie dos glicolipídeos é uma  
283 molécula de adesão celular amplamente expressa na retina de vertebrados.<sup>29</sup> A  
284 expressão do antígeno Le<sup>a</sup> na retina humana poderia favorecer a infecção das  
285 células que compõe esta estrutura ocular uma vez que o mesmo poderia atuar  
286 como potencial receptor de proteínas micronêmicas do *T. gondii*, facilitando sua  
287 invasão e permanência em áreas caracterizadas por maior suscetibilidade a  
288 lesões resultantes da infecção.

289

290

291 Alternativamente, o *T. gondii* poderia expressar o antígeno Le<sup>a</sup> como resultado  
292 da presença de um gene *FUT3*-like responsável pela expressão de uma  
293 enzima FUTIII a qual poderia favorecer a expressão do antígeno Le<sup>a</sup> em sua  
294 superfície. Esta condição foi experimentalmente demonstrada para o antígeno  
295 Le<sup>b</sup> em isolados de *H. pylori*.<sup>30</sup>

296

297

298 Os resultados deste estudo mostram que o antígeno Le<sup>a</sup> constitui um potencial  
299 fator de risco para o desenvolvimento da RT e dão suporte às observações

300 prévias de que o parasito *T. gondii* utiliza moléculas glicosiladas para invadir  
301 células nucleadas do hospedeiro. Em conclusão, a elevada expressão do  
302 antígeno Le<sup>a</sup> parece favorecer o desenvolvimento da RT.

303

304

## 305 **Material e métodos**

### 306 **Aspectos éticos do estudo e coleta de sangue**

307 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (Parecer  
308 050/2009 de 09/03/09). Os objetivos e todos os procedimentos do estudo foram  
309 devidamente esclarecidos aos pacientes para a obtenção do termo de  
310 consentimento livre e esclarecido.

311

312

### 313 **Seleção da casuística**

314 No período de Abril de 2009 e outubro de 2010 foram selecionados 348  
315 pacientes consecutivos, de ambos os sexos atendidos no Ambulatório de  
316 Oftalmologia do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de  
317 Medicina (HB-FUNFARME). São José do Rio Preto, Estado de São Paulo,  
318 Brasil.

319

320

### 321 **Diagnóstico da retinocoroidite toxoplásmica**

322 A avaliação clínica ocular dos pacientes foi realizada por dois profissionais  
323 experientes (FBF e GCAJr), por meio do exame de fundoscopia com o uso de

324 oftalmoscópio binocular indireto (Binocular Ophthalmoscope ID 10, Topcon  
325 Corporation).

326

327

### 328 **Coleta de amostras de sangue**

329 De todos os pacientes selecionados foram coletadas por punção venosa duas  
330 amostras de sangue periférico, uma com e outra sem anticoagulante (EDTA)  
331 para a identificação dos fenótipos eritrocitários ABO e Lewis. Os leucócitos  
332 foram utilizados para a extração do DNA genômico e o soro, para a  
333 identificação de anticorpos anti-*T. gondii*.

334

335

### 336 **Fenotipagem eritrocitária ABO**

337 Os fenótipos ABO foram determinados pelo método de hemaglutinação em  
338 tubos usando anti-soro monoclonal anti-A, anti-B e anti-A,B para fenotipagem  
339 direta e hemácias padrão A<sub>1</sub> e B para fenotipagem reversa (Fresenius Kabi,  
340 Brasil). Para cada amostra foi preparada uma suspensão de hemácias a 5%  
341 em solução isotônica (NaCl 0,9%), uma gota da suspensão foi misturada com  
342 uma gota de cada anti-soro anti-A, anti-B e anti-A,B para definir os antígenos  
343 eritrocitários. A adição de uma gota das hemácias padrão A<sub>1</sub> e B em dois tubos  
344 contendo duas gotas do plasma sanguíneo cada, identificou os anticorpos anti-  
345 A, anti-B e anti-A,B. Os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por cerca de 1  
346 minuto, sendo que a interpretação dos resultados foi baseada na presença ou

347 ausência de aglutinação. Em todos os procedimentos, as recomendações do  
348 fabricante dos reagentes usados foram estritamente obedecidas.

349

350

### 351 **Fenotipagem eritrocitária Lewis**

352 Os fenótipos Lewis foram determinados pelo método de hemaglutinação em  
353 colunas de gel contendo separadamente os anticorpos anti-Le<sup>a</sup> e anti-Le<sup>b</sup>.  
354 (DiaMed, Brasil) Para cada amostra foi preparada uma suspensão de hemácias  
355 a 3% em meio isotônico fornecido pelo fabricante. Um volume igual a 12 µl da  
356 suspensão foi adicionado as colunas de gel e centrifugados por 15 minutos a  
357 1.000 rpm. A interpretação dos resultados foi baseada na presença ou  
358 ausência de aglutinação. Em todos os procedimentos, as recomendações do  
359 fabricante dos reagentes usados foram estritamente obedecidas.

360

361

### 362 **Extração do DNA genômico**

363 O DNA genômico foi extraído com o uso de kit comercial para extração por  
364 coluna de sílica (Qiamp DNA blood mini kit, Qiagen), a partir de 200 µL de  
365 sangue total colhido com EDTA. O protocolo do fabricante foi rigorosamente  
366 obedecido.

367

368

### 369 **Genotipagem *FUT2***

370 Os genótipos *FUT2* resultantes da homozigose ou heterozigose da substituição  
371 *G428A* foram identificados por PCR-RFLP, de acordo com adaptações do  
372 protocolo de Svensson e colaboradores (2000).<sup>31</sup> Foram utilizadas nas reações  
373 de amplificação os primers sense 5' GCC TTT CTC CTT TCC CAT GGC CCA  
374 C 3' e antisense 5' TCA AAG GAC GGG CCA GCA TTA GTG C 3' os quais  
375 diferenciam os alelos G e A na posição 428 do gene *FUT2*. Cada reação teve  
376 um volume final de 25 µl contendo 200 mM TRIS-HCL, 500 mM KCl, 50 mM  
377 MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de cada dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dGTP], 20 pM de cada  
378 primer, 5U/µl de Taq (Invitrogen) e 2 µl de DNA genômico.

379

380

381 As condições de amplificação foram 94°C 2 minutos, seguida por 5 ciclos de  
382 94°C 30 segundos, 68°C 30 segundos e 72°C 30 segundos e 25 ciclos de 94°C  
383 30 segundos, 64°C 30 segundos e 72°C 45 segundos, permanecendo em 4°C  
384 infinito. O fragmento contendo 1033 pares de bases depois da digestão com a  
385 enzima de restrição Fast Digest Avall (Fermentas) foi clivado em um número  
386 variável de fragmentos de acordo com os alelos: 459, 295, 149 e 130 pares de  
387 base para o alelo G; e 459, 425 e 149 pares de base para o alelo A. A  
388 separação destes fragmentos foram observados por eletroforese em gel de  
389 agarose a 2% corado com brometo de etídeo e visualizados por meio de luz  
390 UV. Os indivíduos portadores dos genótipos GG e GA foram considerados  
391 Secretores e indivíduos portadores do genótipo AA não Secretores dos  
392 glicoconjugados ABH (figura 1).

### 393 **Genotipagem *FUT3***

394 Para todos os indivíduos portadores do fenótipo Le(a-b-) foi realizada a  
395 investigação das substituições *T202C* e *C314T* do gene *FUT3* por PCR-RFLP ,  
396 de acordo com alterações no protocolo de Orntoft e colaboradores (1996).<sup>32</sup>  
397 Nas reações de amplificação da substituição *T202C* foram utilizados os primers  
398 sense 5' CCC GCC CCA CCC TCC TGA TCC TGG TA 3' e antisense 5' CGT  
399 AGG GCC TGA AGA TGT CGG AGT C 3' os quais diferenciaram os alelos T e  
400 C na posição 202 do gene *FUT3*. Cada reação teve um volume final de 25 µl  
401 contendo 200 mM TRIS-HCL, 500 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de cada  
402 dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dGTP], 25 pM de cada primer, 5U/µl de Taq  
403 (Invitrogen) e 2 µl de DNA genômico.

404

405

406 As condições de amplificação foram 94°C 1 minuto, seguida por 30 ciclos de  
407 94°C 30 segundos, 63°C 30 segundos e 72°C 30 segundos e 1 ciclo de 72°C 1  
408 minuto, permanecendo em 4°C infinito. O fragmento contendo 332 pares de  
409 bases depois da digestão com a enzima de restrição Fast Digest *Rsa I*  
410 (Fermentas) foi clivado em um número variável de fragmentos de acordo com  
411 os alelos: 209 e 123 pares de bases para o alelo T; e 209 e 100 pares de bases  
412 para o alelo C (figura 2). A separação destes fragmentos foram observados por  
413 eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo e  
414 visualizados por meio de luz UV.

415 Para as reações de amplificação da substituição *C314T* foram utilizados os  
416 primers sense 5' AGT GGG TCC TCC CCG ACA GGA CAC CAC TCC 3' e  
417 antisense 5' GTT GGA CAT GAT ATC CCA GTG GTG CAC GAT 3' os quais  
418 diferenciaram os alelos C e T na posição 314 do gene *FUT3*. Cada reação teve  
419 um volume final de 25 µl contendo 200 mM TRIS-HCL, 500 mM KCl, 50 mM  
420 MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de cada dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dGTP], 25 pM de cada  
421 primer, 5U/µl de Taq (Invitrogen) e 2 µl de DNA genômico. As condições de  
422 amplificação foram 94°C 1 minuto, seguida por 30 ciclos de 94°C 30 segundos,  
423 63°C 30 segundos e 72°C 30 segundos e 1 ciclo de 72°C 1 minuto,  
424 permanecendo em 4°C infinito. O fragmento contendo 203 pares de bases  
425 depois da digestão com a enzima de restrição Fast Digest *Nla* III (Fermentas)  
426 foi clivado em um número variável de fragmentos de acordo com os alelos: 139  
427 e 65 pares de bases para o alelo C; e 105 e 65 pares de bases para o alelo T  
428 (figura 3). A separação destes fragmentos foram observados por eletroforese  
429 em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo e visualizados por  
430 meio de luz UV.

431

432

### 433 **Definição dos perfis de antígenos dos sistemas histo-sanguíneos ABO,** 434 **Secretor e Lewis**

435 Os perfis de antígenos expressos por cada indivíduo foram definidos pela  
436 combinação dos fenótipos eritrocitários ABO e Lewis e dos genótipos *FUT2*  
437 (*G428A*) e *FUT3* (*T202C* e *C314T*).

438 **Diagnóstico da infecção por *Toxoplasma gondii***

439 A determinação da presença ou não de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG  
440 foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA), conforme validado por  
441 nosso grupo.<sup>33</sup>

442

443

444 **Agradecimentos**

445 Este estudo foi conduzido por AICF, CCBM, CRB, FN, FBF, GCAJ e CSM. A  
446 coleta, gerenciamento, análise, interpretação de dados e redação do  
447 manuscrito foram realizadas por AICF, CRB, CCBM, VLPC e LCM.

448 Este estudo teve apoio financeiro: (i) FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa  
449 do Estado de São Paulo, Brasil), Proc: 2009/09168-6 e 2009/17540-2); (ii)  
450 Ministério da Ciência e Tecnologia-CNPq (Conselho Nacional de  
451 Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), Proc: 473579/2009-0; (iii)  
452 Ministério da Educação-CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
453 de Nível Superior, Brasil); (iv) BAP-FAMERP e (v) Biotechnology Research  
454 Institute (Auckland University of Technology).

455

456

457 **Conflitos de interesse**

458 Nenhum declarado.

459 **Referências**

460 1. Imberty A, Varrot A. Microbial recognition of human cell surface  
461 glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* 2008; **18**: 567-576.

462

463

464 2. Henry SM. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract  
465 glycoconjugates. A blood group related chart of microorganism receptors.  
466 *Transfus Clin Biol* 2001; **8**: 226-230.

467

468

469 3. Oréfice F, Bonfioli AA. Toxoplasmose. In: Oréfice F (ed). Uveíte clínica e  
470 cirurgica: texto e atlas, Vol. II. 2ª ed. Cultura Médica: Rio de Janeiro, 2000,  
471 pp 619-680.

472

473

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

476

477

478 5. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and  
479 prevention. *Clin Microbiol Infect* 2002; **8**: 634-640.

- 480 6. Antoniazzi E, Guagliano R, Meroni V, Pezzotta S, Bianchi PE. Ocular  
481 impairment of toxoplasmosis. *Parassitologia* 2008; **50**: 35-36.  
482  
483
- 484 7. Midtvedt T, Vaage L. Relationship between *Toxoplasma gondii* antibodies  
485 and blood group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; **8**: 575-576.  
486  
487
- 488 8. López R, Fano R, Contreras R, Font L. Anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma*  
489 *gondii* en cubanos donantes de sangre. *Rev Lat Amer Microbiol* 1993; **35**:  
490 207-210.  
491  
492
- 493 9. Zhiburt EB. The spread of antibodies to cytomegalovirus and *Toxoplasma*  
494 among donors of blood components. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*  
495 1997; **1**: 59-61.  
496  
497
- 498 10. Kolbekova P, Kourbatova E, Novotna M, Kodym P, Flegr J. New and old  
499 risk-factors for *Toxoplasma gondii* infection: prospective cross-sectional  
500 study among military personnel in the Czech Republic. *Clin Microbiol Infect*  
501 2007; **13**: 1012-1017.

- 502 11. Salibay CC, Dungca JZ, Claveria FG. Serological survey of *Toxoplasma*  
503 *gondii* infection among Urban (Manila) and Suburban (Dasmarinãs, Cavite)  
504 Residents, Philippines. *J Protozool Res* 2008; **18**: 26-33.  
505  
506
- 507 12. Gill HS. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in Tanzanian blood  
508 donors. *East Afr Med J* 1985; **62**: 585-588.  
509  
510
- 511 13. Lécolier B, Grynberg H, Freund M. Absence of relationship between  
512 *Toxoplasma gondii* antibodies and blood group in pregnant women in  
513 France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; **9**: 152-153.  
514  
515
- 516 14. Mattos CCB, Cintra JR, Ferreira AIC, Spegiorin LCJF, Galisteu KJ, Machado  
517 RLD, et al. Lack of association between ABO histo-blood groups, secretor  
518 and non-secretor phenotypes, and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies  
519 among pregnant women from the northwestern region of São Paulo State,  
520 Brazil. *Arch Med Sci* 2008; **4**: 254-258.  
521  
522
- 523 15. Elsheikha HM, Azab MS, Abousamra NK, Rahbar MH, Elghannam DM,  
524 Raafat D. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii*

525 antibodies among asymptomatic blood donors in Egypt. *Parasitol Res* 2009;  
526 **104**: 1471-1476.

527

528

529 16. Rodrigues ACF, Uezato S, Vono MB, Pandossio T, Spegiorin LCJF, Oliani  
530 AH, et al. Non-association between anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and  
531 ABO blood group system. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2011; **17**:184-  
532 189.

533

534

535 17. Schenkel-Brunner H. *Human blood groups – chemical and biochemical*  
536 *basis of antigen specificity*. Springer Wien New York: Viena, 2000.

537

538

539 18. Henry SM. Review: phenotyping for Lewis and Secretor histo-blood group  
540 antigens. *Immunohematology* 1996; **12**: 51-61.

541

542

543 19. Perry HE, Franklin RA, Bray SJ, Lo MK, Svensson LAC, Henry SM. A novel  
544 study of association between *Neisseria gonorrhoeae* and the human  
545 carbohydrate blood groups. *Immunohematology* 2007; **23**: 100-104.

546 20. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LMG, Tan HK, Wallon M,  
547 et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with  
548 Europe. *Plos* 2008; **2**: e277.

549

550

551 21. Rosenberg EA, Sperazza LC. The visually impaired patient. *Am Fam Phys*  
552 2008; **77**: 1431-1436.

553

554

555 22. Gonçalves MAS, Mattos CCB, Spegiorin LCJF, Oliani DCV, Oliani AH,  
556 Mattos LC. Seropositivity rates for toxoplasmosis, rubella, syphilis,  
557 cytomegalovirus, hepatitis and HIV among pregnant women receiving care  
558 at a Public Health Service, São Paulo State, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2010;  
559 **14**: 427-432.

560

561

562 23. Gouveia EB, Yamamoto JH, Abdalla M, Hirata CE, Kubo P, Olivales E.  
563 Causas das uveítes em serviço terciário em São Paulo, Brasil. *Arq Bras*  
564 *Oftalmol* 2004; **67**: 139-145.

565

566

567 24. Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley D. Identification of quantitative  
568 trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc Nat Acad Sci*  
569 *USA* 2002; **99**: 10753-10758.

- 570 25. Barragan A, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is  
571 linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med* 2002; **195**:1625-1633.  
572  
573
- 574 26. Karlsson KA. Animal glycolipids as attachment sites for microbes. *Chem*  
575 *Phys Lipids* 1986; **42**: 153-172.  
576  
577
- 578 27. Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. *Science*, 2004; **304**:  
579 248-253.  
580  
581
- 582 28. Oriol R. ABO, Hh, Lewis, and Secretion – serology, genetics, and tissue  
583 distribution. In: Cartron JP, Rouger P (eds). *Blood cell biochemistry:*  
584 *molecular basis of major human blood group antigens*. Plenum Press: New  
585 York, 1995, pp 37-73.  
586  
587
- 588 29. Pedal I, Wetzel C, Min JX, Daus W. ABH and Lewis immunohistochemistry  
589 of the human eye. *Forensic Sci Int* 1995; **71**: 51-55.  
590  
591
- 592 30. González-Valencia G, Muñoz-Perez L, Morales-Espinosa R, Camorlinga-  
593 Ponce M, Muñoz O, Torres J. Lewis antigen expression by *Helicobacter*

594 *pylori* strains colonizing different regions of the stomach of individual  
595 patients. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 2783-2785.

596

597

598 31. Svensson L, Petersson A, Henry SM. Secretor genotyping for A385T,  
599 G428A, C571T, C628T, 685delTGG, G849A, and other mutations from  
600 single PCR. *Transfusion* 2000; **40**: 856-860.

601

602

603 32. Orntoft TF, Vestergaard EM, Holmes E, Jakobsen JS, Grunnet N,  
604 Mortensen M, et al. Influence of Lewis a<sub>1-3/4</sub>-L-Fucosyltransferase (*FUT3*)  
605 gene mutations on enzyme activity, erythrocyte phenotyping, and circulating  
606 tumor marker sialyl-Lewis a levels. *J Biol Chem* 1996; **271**: 32260-32268.

607

608

609 33. Mattos CCB, Meira CS, Ferreira AIC, Frederico FB, Hiramoto RM, Jr GCA,  
610 et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected  
611 ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;  
612 **70**: 362-366.

613 **Quadro 1.** Perfis de glicoconjugados relacionados aos sistemas histo-  
 614 sanguíneos ABO, Secretor e Lewis de acordo com as glicosiltransferases  
 615 expressas.

Glicosiltransferases	OP	Htype1	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	A	B	ALe <sup>b</sup>	BLe <sup>b</sup>	Fenótipos
FUTII+FUTIII+GTA	(+)	(+)	+	++	++		++++		A Le(a-b-)
FUTII+FUTIII+GTB	(+)	(+)	+	++		++		++++	B Le(a-b-)
FUTII+FUTIII+GTA+GTB	(+)	(+)	+	++	++	++	++++	++++	AB Le(a-b-)
FUTII+FUTIII	(+)	(+)	+	++++++					O Le(a-b-)
FUTII+GTA	+	++			++++				A Le(a-b-)
FUTII+GTB	+	++				++++			B Le(ab-)
FUTII+GTA+GTB	+	++			++++	++++			AB Le(a-b-)
FUTII	+	+++++							O Le(a-b-)
FUTIII+GTA	+		++++++						A Le(a+b-)
FUTIII+GTB	+		++++++						B Le(a+b-)
FUTIII+GTA+GTB	+		++++++						AB Le(a+b-)
FUTIII	+		++++++						O Le(a+b-)
	++++++								O Le(a-b-)

OP: Oligossacarídeo precursor; FUTII: α-1,2-L-fucosiltransferase; FUTIII: α-1,3/4-L-fucosiltransferase; GTA: α-1,3-N-Acetilgalactosaminiltransferase; GTB: α-1,3-N-Galactosiltransferase; (+): Quantidades variáveis.

616 **Tabela 1.** Sorologia para *Toxoplasma gondii* entre pacientes com e sem  
617 retinocoroidite toxoplásmica (RT).

Diagnóstico Clínico	Reagente		Não reagente		Total	
	N	%	N	%	N	%
Com RT	77	29,6	5	5,7	82	23,6
Sem RT	183	70,4	83	94,3	266	76,4
Total	260		88		348	100,0

618 **Tabela 2.** Frequências dos fenótipos ABO, Secretor e Lewis em pacientes com  
619 e sem sorologia reagente para a toxoplasmose.

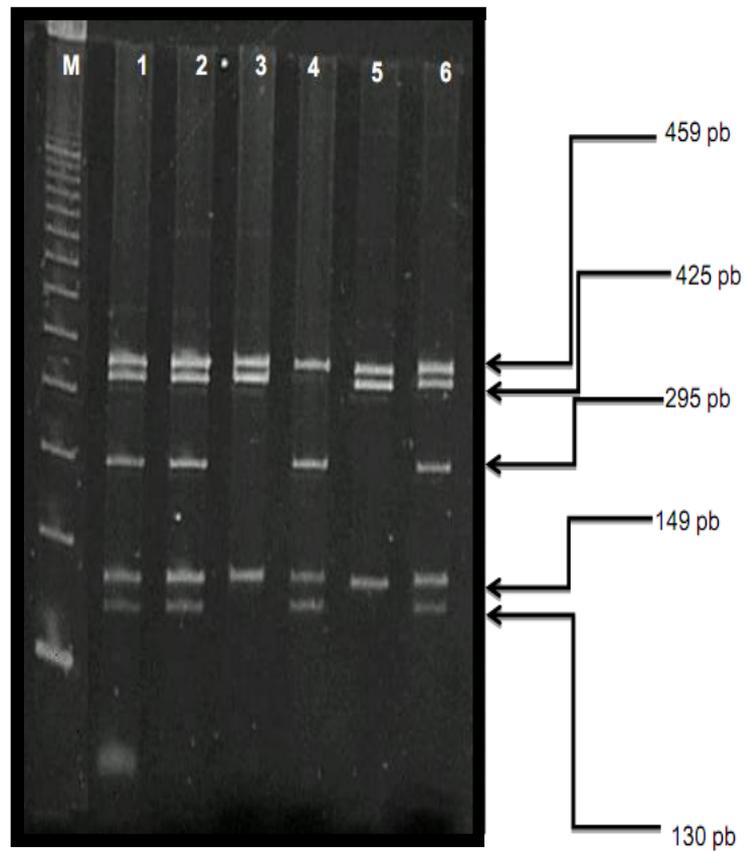
Fenótipos	Reagente		Não reagente		OR	IC 95%	p
	N	%	N	%			
<b>ABO</b>							
A	112	43,1	36	40,9	1,093	0,669-1,786	0,8032
B	29	11,2	8	9,1	1,255	0,551-2,859	0,6916
AB	5	1,9	4	4,5	0,411	0,108-1,569	0,2384
O	114	43,8	40	45,5	0,937	0,576-1,523	0,8050
<b>Secretor</b>							
Secretor	208	80,0	77	87,5	0,571	0,283-1,152	0,1488
Não Secretor	52	20,0	11	12,5			
<b>Lewis</b>							
Le(a+b-)	49	18,8	9	10,2	2,038	0,956-4,344	0,0690
Le(a-b+)	197	75,8	76	86,4	0,493	0,252-0,966	0,0368
Le(a-b-)	14	5,4	3	3,4	1,612	0,452-5,750	0,5767
Total (N=348)	260	74,7	88	25,3			

620 \*Valores calculados com o uso do teste exato de Fisher.

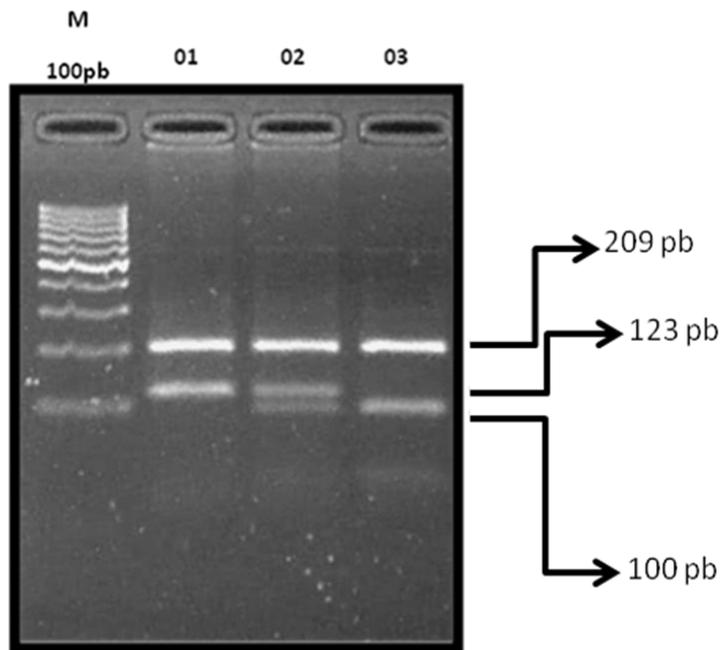
**Tabela 3.** Frequências dos fenótipos ABO, Secretor e Lewis em pacientes com sorologia reagente para a toxoplasmose, portadores e não portadores de retinocoroidite toxoplásmica (RT).

Fenótipos	Com RT		Sem RT		OR	IC 95%	P
	N	%	N	%			
<b>ABO</b>							
A	34	44,1	78	42,6	1,064	0,622-1,821	0,8911
B	8	10,4	21	11,5	0,894	0,377-2,118	1,0000
AB	3	3,9	2	1,1	3,669	0,600-22,418	0,1560
O	32	41,6	82	44,8	0,875	0,511-1,501	0,6823
<b>Secretor</b>							
Secretor	56	72,7	152	83,1	0,543	0,288-1,024	0,0634
Não Secretor	21	27,3	31	16,9			
<b>Lewis</b>							
Le(a+b-)	20	26,0	29	15,8	1,863	0,976-3,554	0,0813
Le(a-b+)	55	71,4	142	77,6	0,721	0,394-1,321	0,3416
Le(a-b-)	2	2,6	12	6,6	0,380	0,082-1,740	0,2431
Total (N=260)	77	29,6	183	70,4			

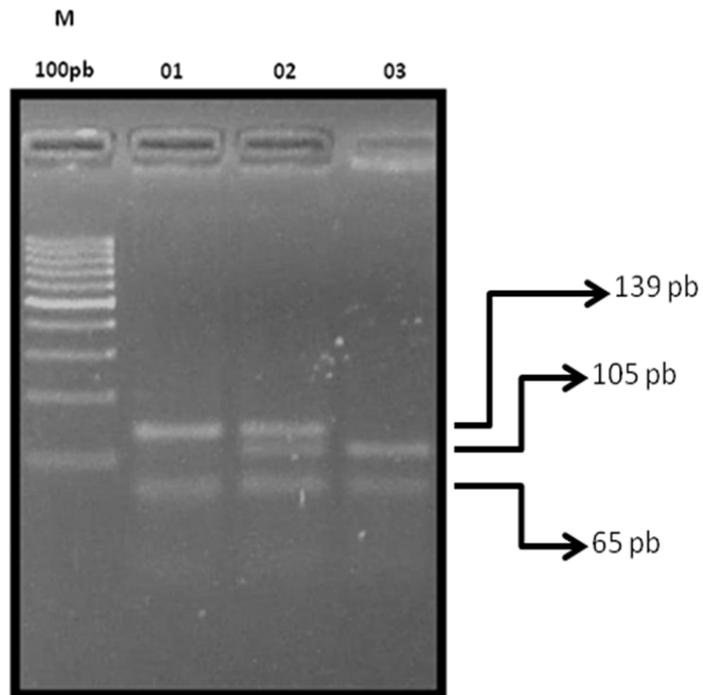
621 \*Valores calculados com o uso do teste exato de Fisher.



622 **Figura 1.** Perfil eletroforético do fragmento de 1033 pb amplificado por PCR,  
623 após digestão com a enzima de restrição *Ava II*. Genótipo GA (1,2,6), AA (3,5)  
624 e GG (4), M= marcador de 100pb. Mattos et al. 2008.<sup>14</sup>



625 **Figura 2.** Perfil eletroforético do fragmento de 332 pb amplificado por PCR,  
626 após digestão com a enzima de restrição *Rsa* I. Genótipo *TT* (1), *TC* (2) e *CC*  
627 (3), M= marcador de 100pb.



628 **Figura 3.** Perfil eletroforético do fragmento de 203 pb amplificado por PCR,  
629 após digestão com a enzima de restrição *Nla* III. Genótipo *CC* (1), *CT* (2) e *TT*  
630 (3), M= marcador de 100pb.

**3.3 Manuscrito a ser submetido à publicação na Revista Eye online (Fator de Impacto 1.860; ISSN 0950-222X; eISSN 1476-5454).**

1 **Título e avidéz de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* e PCR**  
2 **convencional em pacientes com doenças oculares**  
3 **Sorologia e PCR na retinocoroidite toxoplásmica**

4  
5 Ana Iara da Costa Ferreira<sup>1</sup>, Cinara de Cássia Brandão de Mattos<sup>1</sup>, Fábio  
6 Batista Frederico<sup>2</sup>, Cássia Rúbia Bernardo<sup>1</sup>, Fabiana Nakashima<sup>1</sup>, Gildásio  
7 Castelo de Almeida Junior<sup>2</sup>, Cristina da Silva Meira<sup>3</sup>, Vera Lúcia Pereira-  
8 Chioccola<sup>3</sup>, Luiz Carlos de Mattos<sup>1</sup>

9  
10 <sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular,  
11 Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP,  
12 Brasil

13  
14 <sup>2</sup>Ambulatório de Oftalmologia, Fundação Faculdade Regional de Medicina-  
15 Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brasil

16  
17 <sup>3</sup>Laboratório de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil

18  
19 Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

20 Laboratório de Imunogenética  
21 Departamento de Biologia Molecular  
22 Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
23 Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416  
24 15090-000 – São José do Rio Preto, SP - Brasil  
25 Fone: 55 17 3201-5857  
26 Fax: 55 17 3229-1777  
27 [luiz.carlos@famerp.br](mailto:luiz.carlos@famerp.br)

28 **Resumo**

29

30 **Objetivo** Avaliar título, avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e a presença do  
31 DNA genômico do *T. gondii* no sangue periférico de pacientes com  
32 retinocoroidite toxoplásmica e de portadores de outras doenças oculares.

33 **Métodos** Os soros foram analisados por IFI, ELISA e teste de avidéz e o DNA  
34 genômico por PCR convencional. Para análise estatística foi utilizado o teste  
35 exato de Fisher e o teste t não pareado. **Resultados** Do total de amostras,  
36 65,7% (163/248) foram reagentes no ELISA e 34,3% (85/248), não reagentes.  
37 Títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* acima de 4.000, obtidos por IFI, foram  
38 frequentes em pacientes com retinocoroidite toxoplásmica em comparação a  
39 outras doenças oculares (8,1% x 1,0%). Não foram observados anticorpos da  
40 classe IgM. Avidéz maior que 60 prevaleceu em ambos os grupos. A  
41 positividade do PCR foi maior em pacientes com retinocoroidite toxoplásmica  
42 (21/62; 33,9%) que em outras doenças oculares (1/101; 0,9%). **Conclusões** A  
43 frequência de retinocoroidite toxoplásmica é elevada entre pacientes com  
44 doenças oculares. A maioria dos pacientes com retinocoroidite toxoplásmica  
45 apresenta menores títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii* com avidéz elevada.  
46 Os resultados do PCR sugerem que *T. gondii* encontra-se no sangue circulante  
47 independente da presença de lesões oculares resultantes da toxoplasmose.

48

49

50

51 **Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, Retinocoroidite toxoplásmica, Afinidade  
52 de Anticorpos, Reação em Cadeia da Polimerase.

### 53 **Introdução**

54 A toxoplasmose é uma doença resultante da infecção por *Toxoplasma gondii*.

55 Na fase aguda os parasitos formam cistos teciduais contendo bradizoítos  
56 preferencialmente em músculo, cérebro e retina.<sup>1</sup> Grande parte da população  
57 humana com infecção primária não apresenta sintomas e entre 10 a 20% dos  
58 casos são sintomáticos, o que caracteriza a alta infectividade e a baixa  
59 patogenicidade.<sup>2-4</sup> A doença se agrava em indivíduos imunodeficientes bem  
60 como naqueles em estado de imunossupressão.<sup>5</sup>

61

62

63 A retinocoroidite toxoplásmica é comum entre indivíduos com infecção  
64 congênita ou adquirida após o nascimento.<sup>5</sup> A lesão ocular resultante  
65 caracteriza-se por retinocoroidite focal necrosante com aspecto exsudativo  
66 branco-amarelado, ocasionalmente cinza, com limites mal definidos e caráter  
67 recidivante; é a principal causa de uveítes infecciosas que afeta o pólo  
68 posterior do olho.<sup>3,6</sup>

69

70

71 O diagnóstico da retinocoroidite toxoplásmica é clínico e testes laboratoriais  
72 auxiliam no diagnóstico definitivo. Anticorpos específicos são indicadores de  
73 infecção e o título e a avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii* contribuem para  
74 esclarecer a fase da infecção.<sup>7,8</sup> Segundo Paul (1999), avidéz de anticorpos  
75 IgG anti-*T. gondii* maior que 40% associa-se à reativação de infecções  
76 congênicas. Contudo, menores índices de avidéz não são indicadores absolutos  
77 de infecção recente.<sup>9</sup>

78 A detecção do DNA do parasito por PCR auxilia no diagnóstico da infecção,<sup>10,11</sup>  
79 em amostras de humor aquoso, vítreo e sangue periférico.<sup>12-16</sup> Embora título,  
80 avidéz de IgG e PCR tenham sido amplamente investigados em gestantes e  
81 pacientes com AIDS, são escassos estudos correlacionando estes parâmetros  
82 com a retinocoroidite toxoplásmica. O objetivo deste estudo foi avaliar título,  
83 avidéz e a presença de DNA genômico de *T. gondii* no sangue periférico de  
84 pacientes com retinocoroidite toxoplásmica e de portadores de outras doenças  
85 oculares.

86

87

## 88 **Material e método**

### 89 ***Aspectos éticos do estudo***

90 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (Parecer  
91 050/2009 de 09/03/09). Cada participante assinou o termo de consentimento  
92 livre e esclarecido após receber todas as informações sobre os objetivos e os  
93 procedimentos a serem realizados na pesquisa.

94

95

### 96 ***Seleção da casuística***

97 No período de Abril de 2009 a dezembro de 2010 foram selecionados 248  
98 pacientes consecutivos, de ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de  
99 Oftalmologia do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de  
100 Medicina (HB-FUNFARME). São José do Rio Preto, Estado de São Paulo,  
101 Brasil.

102 Foram constituídos dois grupos, um com diagnóstico clínico de retinocoroidite  
103 toxoplásmica (RT; n=62) e outro com outras doenças oculares (ODO; n=186).  
104 Este último compreendeu portadores de retinopatia diabética tipo I e II,  
105 descolamento de retina, degeneração macular relacionada à idade, catarata,  
106 uveíte sem causa definida, transplante de córnea, glaucoma, alteração de  
107 mácula, lesão pós-operatória e outras doenças oculares. Os critérios de  
108 exclusão adotados foram: idade menor que 18 anos, deficiência mental,  
109 discrasias sanguíneas e uso de anticoagulantes orais.

110

111

#### 112 ***Diagnóstico clínico da retinocoroidite toxoplásmica***

113 A avaliação clínica ocular dos pacientes foi realizada por dois profissionais  
114 experientes (FBF e GCAJr), por meio do exame de fundoscopia com o uso de  
115 oftalmoscópio binocular indireto (Binocular Ophthalmoscope ID 10, Topcon  
116 Corporation).

117

118

#### 119 ***Coleta de sangue***

120 Duas amostras de sangue periférico, uma com e outra sem anticoagulante  
121 (EDTA), foram coletadas de cada paciente selecionado. A amostra com EDTA  
122 foi utilizada para extração do DNA genômico. O soro obtido da amostra sem  
123 EDTA foi estocado a -20°C até o momento de seu uso para a identificação dos  
124 anticorpos das classes IgM e IgG anti-*T. gondii*.

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

126 A determinação da presença ou não de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG  
127 foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) de acordo com o protocolo  
128 de Meira e colaboradores, 2008.<sup>17</sup>

129

130

131 ***Determinação dos valores de avidéz***

132 O teste de avidéz foi realizado em todas as amostras que se mostraram  
133 reagentes para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, com uso do método ELISA  
134 conforme protocolo de Korhonen e colaboradores<sup>18</sup> e Colombo e  
135 colaboradores.<sup>19</sup>

136

137

138 ***Determinação dos títulos de anticorpos da classe IgG anti-T. gondii***

139 A determinação dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG foi  
140 realizada com o uso do método imunofluorescência indireta (IFI) de acordo  
141 com o protocolo de Vidal e colaboradores (2004).<sup>20</sup> Não foram encontrados  
142 anticorpos da classe IgM.

143

144

145 ***Extração do DNA genômico***

146 O DNA foi extraído das amostras de sangue venoso, utilizando o kit comercial  
147 para extração por coluna de sílica (Qiamp DNA blood mini kit, Qiagen), com  
148 modificações de Mesquita e colaboradores.<sup>21</sup> As amostras de sangue foram

149 centrifugadas e lavadas com PBS a 2,500g por 10 minutos, sendo o  
150 sobrenadante descartado. As hemácias foram incubadas por 15 minutos a  
151 temperatura ambiente sob agitação suave, com o tampão ACK (150 mM clorato  
152 de amônio, 1 mM bicarbonato de potássio, 0.1 mM EDTA, pH 7.3) e  
153 centrifugadas por 10 min a 3,000g. O *pellet* contendo as células nucleadas foi  
154 digerido com proteinase K (20 µg/ml; 50 mM Tris-HCl; 25 mM EDTA; pH 8.0;  
155 2% dodecil sulfato de sódio) e incubado por 30 min a 56°C. O *pellet* de DNA foi  
156 dissolvido em água ultrapura.

157

158

159 Paralelamente, o DNA de taquizoítos foi extraído com o mesmo método para  
160 uso como controle positivo de reação. A quantificação e a pureza do DNA  
161 genômico foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop ND100,  
162 Thermo Scientific).

163

164

### 165 ***Seleção dos primers***

166 O par de *primers* utilizado para a amplificação do DNA genômico do *T. gondii*  
167 por PCR convencional (cnPCR) foi o B22 (5' - AAC GGG CGA GTA GCA CCT  
168 GAG GAG A - 3') e o B23 (5' - TGG GTC TAC GTC GAT GGC ATG ACA AC -  
169 3'), o qual amplifica um fragmento de 115 pb de uma região repetitiva  
170 específica do gene B1.<sup>22</sup> Como controle interno de reação, foram utilizados os  
171 primers  $\beta 1/\beta 2$ ,<sup>21</sup> do gene humano  $\beta$ -globina, os quais amplificam um segmento  
172 de 140 pb.

173 ***Amplificação do gene B1 do T. gondii por cnPCR***

174 O cnPCR foi realizado em um termociclador LongGene utilizando 12.5 µL do  
175 mix comercial (Promega; Go Taq Green Master Mix; 1 unidade de Taq DNA  
176 polimerase; 10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 mM de  
177 dNTP). Foram adicionados 5 µl do DNA genômico, 25 pmol de cada primer e  
178 água ultrapura até completar 25 µL. As condições de amplificação foram:  
179 desnaturação a 95°C por 5 min; 35 ciclos (95°C, 1 min; 62°C, 1 min; 72°C, 1  
180 min); extensão a 72°C por 5 min. Foram incluídos controles negativos (água  
181 ultrapura e amostra negativa para *T. gondii*) e positivos (DNA genômico da  
182 cepa RH).

183

184

185 O fragmento amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a  
186 2%, corado com brometo de etídio e visualizado por UV. As imagens foram  
187 analisadas por um sistema de fotodocumentação (Mini Bis Gel,  
188 BioSystematica) e um marcador de 100 pb foi utilizado no gel.

189

190

191 ***Análise estatística***

192 Os resultados foram analisados com o uso do software Grahpad, versão 3.1. O  
193 teste exato de Fisher foi utilizado para comparar a independência entre as  
194 proporções. Os valores médios de idade foram comparados com o uso do teste  
195 t.

196 **Resultados**

197 Dos 248 pacientes selecionados, com média de idade igual a  $57,8 \pm 16,7$ , 135  
198 (54,4%) eram do sexo masculino e 113 (45,6%), feminino. Com base no  
199 diagnóstico clínico, 25,0% (n=62) apresentaram retinocoroidite toxoplásmica,  
200 sendo 25,8% (n=16) com lesões exsudativas e 74,2% (n=46), com cicatrizes  
201 retinocoroidianas.

202

203

204 Os demais (75,0%; n=186), apresentaram outras doenças oculares (retinopatia  
205 diabética tipo II: 27,9%; descolamento de retina: 15,0%; degeneração macular  
206 relacionada à idade: 11,3%; catarata: 4,8%; uveíte sem causa definida,  
207 transplantes de córnea, retinopatia diabética tipo I, glaucoma: 3,8% cada;  
208 alteração de mácula: 3,2%; lesão pós-operatória: 2,7%; outras doenças  
209 oculares: 19,9%).

210

211

212 As diferenças entre as médias de idade de ambos os grupos foram  
213 estatisticamente significantes (retinocoroidite toxoplásmica:  $48,1 \pm 22,3$  X outras  
214 doenças oculares:  $58,8 \pm 15,5$ ;  $p < 0,0001$ ).

215

216

217 A tabela 1 apresenta os valores para gênero, média de idade e sorologia para  
218 toxoplasmose. Não foram encontrados pacientes reagentes para anticorpos  
219 IgM anti-*T. gondii*. A tabela 2 contém os valores de título, avidéz e os

220 resultados das análises por PCR dos pacientes com sorologia reagente. A  
221 tabela 3 contém os valores de título, avidéz e os resultados das análises por  
222 PCR dos 62 pacientes com retinocoroidite toxoplásmica, separados de acordo  
223 com lesão exsudativa (n=16; 25,8%) e cicatriz retinocoroidiana (n=46; 74,2%).

224

225

## 226 **Discussão**

227 A infecção por *T. gondii* desencadeia via de regra, respostas imunes inatas e  
228 adaptativas e, portanto, anticorpos específicos das classes IgM e IgG, quando  
229 presentes no soro são frequentemente utilizados como marcadores indiretos de  
230 infecção aguda e crônica, respectivamente.<sup>23</sup> Os métodos sorológicos  
231 utilizados neste estudo são recomendados como instrumentos de determinação  
232 de título e avidéz destes anticorpos, pois estes parâmetros são muitas vezes  
233 considerados indicadores de imunidade ao *T. gondii*.<sup>8</sup>

234

235

236 Entretanto, a presença de anticorpos específicos não assegura certeza  
237 absoluta de eliminação do parasito uma vez que o mesmo pode permanecer na  
238 forma cística até o final da vida. Portanto, o uso de métodos moleculares para a  
239 identificação de material genético do *T. gondii* em amostras biológicas contribui  
240 para a elucidação do diagnóstico e orientação do tratamento da retinocoroidite  
241 toxoplásmica.<sup>24</sup>

242 Para atingir os objetivos propostos neste estudo, foram selecionados dois  
243 grupos de pacientes, um com diagnóstico clínico de retinocoroidite  
244 toxoplásmica e outro, com outras doenças oculares não dependentes da  
245 infecção por *T. gondii*. Esta estratégia foi adotada para facilitar a comparação  
246 entre os parâmetros título e avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, bem como  
247 o resultado das análises por PCR, em dois grupos de pacientes expostos ao  
248 parasito da toxoplasmose.

249

250

251 Os pacientes com retinocoroidite toxoplásmica apresentaram média de idade  
252 menor que aqueles com outras doenças oculares. Estes dados são  
253 concordantes, pelo menos em parte com aqueles divulgados em um recente  
254 estudo que relatou maior frequência de lesões oculares decorrentes da  
255 toxoplasmose em indivíduos com idade variando de 21 a 30 e acima dos 60  
256 anos.<sup>25</sup> De fato, doenças como retinopatia diabética, degeneração macular e  
257 catarata além de outras, são prevalentes em pacientes com idade mais  
258 avançada e os resultados aqui relatados corroboram estas observações.<sup>26</sup> Por  
259 outro lado, a infecção por *T. gondii* pode ocorrer em idade precoce devido à  
260 forma congênita ou adquirida após o nascimento, e a manifestação da  
261 retinocoroidite toxoplásmica pode se dar em qualquer fase da vida.<sup>6</sup>

262

263

264 Aproximadamente dois terços da população da região noroeste do Estado de  
265 São Paulo possui anticorpos IgG anti-*T. gondii*,<sup>27,28</sup> e este estudo confirma esta

266 condição. Além disso, demonstra que lesões exsudativas e cicatrizes  
267 retinocoroidianas típicas de retinocoroidite toxoplásmica são comuns em  
268 pacientes com doenças oculares. Estas observações são concordantes com  
269 aquelas previamente relatadas em um inquérito realizado no estado de  
270 Pernambuco, Brasil.<sup>29</sup> A retinocoiroidite toxoplásmica é o dano ocular mais  
271 comum que resulta da infecção por *T. gondii*.<sup>29-31</sup> Pode-se presumir que as  
272 lesões e cicatrizes oculares observadas nos pacientes selecionados para este  
273 estudo são decorrentes da infecção por *T. gondii*.

274

275

276 Variações nos níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* geralmente não estão  
277 relacionadas à sintomatologia na retinocoroidite toxoplásmica.<sup>6</sup> Tem sido  
278 sugerido que títulos maiores ou iguais a 4.000 podem ser indicadores de  
279 infecção recente.<sup>32</sup> Este estudo encontrou maior número de pacientes com  
280 títulos de IgG anti-*T. gondii* maiores ou iguais a 4.000 entre aqueles com  
281 retinocoroidite toxoplásmica comparados a outras doenças oculares. Mas, não  
282 observou diferenças estatisticamente significantes para este parâmetro entre  
283 pacientes com lesão exsudativa ou cicatriz retinocoroidiana.

284

285

286 Dentre os pacientes com outras doenças oculares, apenas um apresentou  
287 título de anticorpos IgG acima de 4.000 e o resultado do cnPCR negativo. É  
288 possível que neste caso o elevado título de anticorpos IgG anti-*T. gondii* tenha  
289 contribuído para a rápida eliminação do parasito do sangue periférico,

290 dificultando a manifestação da retinocoroidite bem como contribuindo para  
291 negatividade do cnPCR.

292

293

294 A presença de lesões exsudativas é sugestiva de fase aguda da doença,<sup>6</sup> e foi  
295 observada em um quarto dos pacientes com retinocoroidite toxoplásmica. É  
296 possível inferir que esta condição, mesmo quando resultante de infecção  
297 primária, re-infecção ou reativação, contribua para elevar os níveis séricos de  
298 anticorpos específicos para o *T. gondii*. Minot e colaboradores (2011) (dados  
299 não publicados) sugerem que a infecção crônica por determinada cepa não  
300 oferece proteção contra a reinfecção por outras cepas distintas.<sup>33</sup>

301

302

303 Os índices de avidéz dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* foram semelhantes entre  
304 pacientes com retinocoroidite toxoplásmica e com outras doenças oculares  
305 bem como entre aqueles com lesões exsudativas e cicatrizes retinocoroidianas.  
306 A maioria dos humanos expostos ao *T. gondii* tende a produzir anticorpos IgG  
307 de alta avidéz como resultado dos estímulos imunes determinados pelas  
308 formas infectantes deste parasito.<sup>34</sup> Este índice parece aumentar com a idade  
309 mesmo que os indivíduos não venham a manifestar quadro clínico de  
310 toxoplasmose.<sup>35</sup> Há evidências de que índices elevados de avidéz se  
311 correlacionam com episódios de infecção por *T. gondii* que tenham ocorrido há  
312 pelo menos cinco meses.

313 A alta frequência de infecção por *T. gondii* na região onde o estudo foi  
314 conduzido, aliada à média de idade dos pacientes com retinocoroidite  
315 toxoplásmica e com outras doenças oculares, permitem inferir que o tempo  
316 transcorrido desde a aquisição da infecção é maior que cinco meses e,  
317 portanto, compatível com os índices de avidéz relatados neste estudo. É  
318 conceito corrente que indivíduos com anticorpos IgG de alta avidéz são imunes  
319 à toxoplasmose, mas, esta condição não é suficiente para eliminar o *T. gondii*.  
320 Dada a diversidade gênica do *T. gondii* no Brasil, pode ser que essa condição  
321 imune não proteja os humanos contra infecção por cepas distintas.<sup>33,36,37</sup> O  
322 estudo de Ferreira e colaboradores (2011)<sup>38</sup> demonstrou uma alta frequência  
323 do genótipo #65 de *T. gondii* em amostras de pacientes com toxoplasmose  
324 cerebral e AIDS, toxoplasmose aguda, retinocoroidite toxoplásmica e  
325 toxoplasmose congênita. Estes dados sugerem que o genótipo #65 está  
326 diretamente relacionado com a toxoplasmose em pacientes do Estado de São  
327 Paulo, Brasil.

328

329

330 Métodos moleculares são capazes de detectar porções do genoma do parasito  
331 em tecidos e em fluídos biológicos e seus resultados, aparentemente não são  
332 influenciados pela sorologia.<sup>23</sup> Anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii* são bons  
333 marcadores laboratoriais de fase da doença mas o perfil sorológico resultante  
334 de sua presença nem sempre concorda com o resultado obtido com o uso do  
335 método PCR.<sup>39</sup>

336 Este estudo observou que um terço dos pacientes com retinocoroidite  
337 toxoplásmica e menos de 1% daqueles com outras doenças oculares, todos  
338 com sorologia reagente, apresentaram resultado positivo no PCR. Diferentes  
339 fatores contribuem para estas discordâncias. É possível que a variabilidade  
340 genética das cepas infectantes modifique a especificidade dos *primers*  
341 utilizados. Além disso, o tipo de amostra biológica, o volume de material  
342 utilizado na extração do DNA genômico e o número de parasitos circulantes na  
343 amostra podem influenciar o resultado do método PCR em relação aos  
344 métodos sorológicos.<sup>40</sup> Estes detectam moléculas de anticorpos específicos  
345 que se encontram em grande número mesmo em pequenas alíquotas de  
346 material biológico.

347

348

349 O método PCR é referido como tendo alta sensibilidade e especificidade na  
350 detecção de material genético de microrganismos em fluidos biológicos  
351 humanos.<sup>15,23</sup> Um estudo recente observou índices de sensibilidade de 75% e  
352 50% e de especificidade iguais a 100% e 93,7% em amostras de humor  
353 aquoso e vítreo, respectivamente.<sup>41</sup> Estes autores analisaram fluidos coletados  
354 do olho enquanto que este estudo utilizou o sangue periférico como material  
355 biológico para extração do DNA genômico do parasito. Os resultados deste  
356 estudo e o de Matos e colaboradores,<sup>41</sup> são concordantes quanto à  
357 sensibilidade e à especificidade do PCR.

358 É possível que o pequeno número de parasitos no sangue periférico da maioria  
359 dos pacientes com retinocoroidite toxoplásmica contribua para a baixa  
360 sensibilidade do método PCR. Além disso, a eficácia da resposta imune na  
361 produção de anticorpos IgG de maior avidéz contribui para o *clearence* do  
362 parasito do sangue circulante. Os fatores acima comentados podem contribuir  
363 para a discordância entre os índices dos resultados do método sorológico e do  
364 PCR utilizado neste estudo.

365

366

367 Contudo, a presença de DNA genômico do *T. gondii* foi observada no sangue  
368 periférico de pacientes com infecção aguda, com retinocoroidite toxoplásmica  
369 recorrente, com cicatriz retinocoroidiana, e sem lesões oculares, mas contendo  
370 anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Estas observações corroboram com dados  
371 publicados anteriormente,<sup>14,15</sup> atestando que o parasito pode circular pelo  
372 corpo.

373

374

375 Dentre os pacientes com outras doenças oculares foi observado um caso de  
376 uveíte sem causa definida, cujo resultado do PCR foi positivo, o título menor  
377 que 4.000 e avidéz acima de 60%. Neste caso é possível que tenha ocorrido  
378 reativação da infecção ou mesmo reinfecção, conforme proposto por Minot et  
379 al., 2011 (dados não publicados),<sup>33</sup> porém a manifestação ocular não é  
380 característica de retinocoroidite toxoplásmica.

381 Tomados em conjunto, os resultados deste estudo e dos demais confirmam  
382 que o *T. gondii* está presente no sangue circulante na fase aguda, crônica e  
383 também na ausência de manifestações oculares típicas da toxoplasmose.

384

385

386 Em conclusão, o estudo demonstra elevada frequência de retinocoroidite  
387 toxoplásmica entre pacientes com doenças oculares, atendidos em São José  
388 do Rio Preto, SP, Brasil. Além disso, indicam que a maioria dos pacientes com  
389 retinocoroidite toxoplásmica apresentam baixos títulos de anticorpos IgG anti-*T.*  
390 *gondii*, com alta avidéz e que o *T. gondii* encontra-se no sangue circulante de  
391 aproximadamente um terço dos pacientes independente da presença de lesões  
392 oculares resultantes da toxoplasmose.

393

394

### 395 **Agradecimentos**

396 Este estudo foi conduzido por AICF, CCBM, CRB, FN, FBF, GCAJ e CSM. A  
397 coleta, gerenciamento, análise, interpretação de dados e redação do  
398 manuscrito foram realizadas por AICF, CRB, CCBM, VLPC e LCM. Este estudo  
399 teve apoio financeiro: (i) FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado  
400 de São Paulo, Brasil) # 2009/17540-2); (ii) Ministério da Ciência e Tecnologia-  
401 CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil)  
402 # 473579/2009-0; (iii) Ministério da Educação-CAPES (Coordenação de  
403 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil); (iv) BAP-FAMERP e (v)

404 Apoio Parcial do Biotechnology Research Institute (Auckland University of  
405 Technology).

406 **Referências**

407

408 1. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii*  
409 tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and  
410 development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 267-299.

411

412

413 2. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and  
414 prevention. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 634-640.

415

416

417 3. Antoniazzi E, Guagliano R, Meroni V, Pezzotta S, Bianchi PE. Ocular  
418 impairment of toxoplasmosis. Parassitologia 2008; 50: 35-36.

419

420

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

423

424

425 5. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations.  
426 Inst J Parasitol 2009; 39: 895-901.

- 427 6. Oréfice F, Bonfioli AA. Toxoplasmose. In: Oréfice F, (ed). Uveíte  
428 clínica e cirurgica: texto e atlas, Vol. II. 2ª ed. Cultura Médica: Rio de  
429 Janeiro; 2000. pp 619-680.  
430  
431
- 432 7. Garweg JG, Groot-Mijnes JDF, Montoya JG. Diagnostic approach to  
433 ocular toxoplasmosis. Ocul Immunol Inflamm 2011; 19: 255-261.  
434  
435
- 436 8. Hedman K, Lappalaineu M, Seppaia I, Makela O. Recent primary  
437 toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. J Infect  
438 Dis 1989; 159: 726-739.  
439  
440
- 441 9. Paul M. Immunoglobulin G avidity in diagnosis of toxoplasmic  
442 lymphadenopathy and ocular toxoplasmosis. Clin Diagn Lab Immunol  
443 1999; 6: 514-518.  
444  
445
- 446 10. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards and  
447 integrated approach to molecular detection and identification of  
448 *Toxoplasma gondii*. Parasitology 2010; 137: 1-11.

- 449 11. Su C, Dubey JP. Toxoplasma. In: Liu D, (ed). Molecular detection of  
450 foodborne pathogens. CRC Press: Boca Raton; 2010. pp 741-753.  
451 <http://hdl.handle.net/101113/35050>  
452  
453
- 454 12. Rothova A, Boer JH, Dam-van Loon NH, Postma G, Visser L,  
455 Zuurveen SJ, et al. Usefulness of aqueous humor analysis for the  
456 diagnosis of posterior uveitis. Ophthalmology 2008; 115: 306-311.  
457  
458
- 459 13. Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance  
460 of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. J  
461 Infect Dis 2001; 184: 633-639.  
462  
463
- 464 14. Silveira C, Vallochi AL, Silva UR, Muccioli C, Holland GN, Nussenblatt  
465 RB, et al. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with  
466 acute and chronic toxoplasmosis. Br J Ophthalmol 2011; 95: 396-400.  
467  
468
- 469 15. Mattos CCB, Ferreira AIC, Meira CS, Frederico FB, Hiramoto RM,  
470 Almeida Jr GC, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing  
471 clinically suspected ocular toxoplasmosis in brazilian patients. Diagn  
472 Microbiol Infect Dis 2011; 70: 362-366.

- 473 16. Switaj K, Master A, Borkowski PK, Skrzypczak M, Wojciechowicz J,  
474 Zaborowski P. Association of ocular toxoplasmosis with type I  
475 *Toxoplasma gondii* strains: direct genotyping from peripheral blood  
476 samples. J Clin Microbiol 2006; 44: 4262-4264.  
477  
478
- 479 17. Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IMR, Hiramoto RM,  
480 Pereira-Chiocola VL. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma*  
481 *gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis  
482 in human immunodeficiency virus-infected patients. J Med Microbiol  
483 2008; 57: 845-850.  
484  
485
- 486 18. Korhonen MH, Brunstein J, Haario H, Katnikov A, Rescaldani R,  
487 Hedman K. A new method with general diagnostic utility for the  
488 calculation of immunoglobulin G avidity. Clin Diagn Lab Immunol  
489 1999; 6: 725-728.  
490  
491
- 492 19. Colombo FA, Vidal JE, Oliveira ACP, Hernandez AV, Bonasser-Filho  
493 F, Nogueira RS, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS  
494 patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods  
495 using peripheral blood samples. J Clin Microbiol 2005; 43: 5044-5047.

- 496 20. Vidal JE, Colombo FA, Oliveira ACP, Focaccia R, Pereira-Chiocola.  
497 PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral  
498 toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. J Clin Microbiol 2004; 42:  
499 4765-4768.  
500  
501
- 502 21. Mesquita RT, Ziegler AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chiocola  
503 VL. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of  
504 Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. J Med  
505 Microbiol 2010; 59: 641-647.  
506  
507
- 508 22. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive  
509 detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by  
510 polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989; 27: 1787-1792.  
511  
512
- 513 23. Arevalo JF, Belfort Jr R, Muccioli C, Espinoza JV. Ocular  
514 toxoplasmosis in the developing world. Int Ophthalmol Clin 2010; 50:  
515 57-69.  
516  
517
- 518 24. Furtado JM, Smith JR, Belfort Jr R, Gattley D, Winthrop K.  
519 Toxoplasmosis: a global threat. J Glob Infect Dis 2011; 3: 281-284.

- 520 25. Aleixo ALQC, Benchimol EI, Neves ES, Palhano CS, Coura LC,  
521 Amendoeira MRR. Frequências de lesões sugestivas de retinocoroidite  
522 toxoplásmica em uma população rural do Estado do Rio de Janeiro.  
523 Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42: 165-169  
524  
525
- 526 26. Rosenberg EA, Sperazza LC. The visually impaired patient. Am Fam  
527 Phys 2008; 77: 1431-1436  
528  
529
- 530 27. Mattos CCB, Cintra JR, Ferreira AIC, Spegiorin LCJF, Galisteu KJ,  
531 Machado RLD, et al. Lack of association between ABO histo-blood  
532 groups, secretor and non-secretor phenotypes, and anti-*Toxoplasma*  
533 *gondii* antibodies among pregnant women from the northwestern  
534 region of São Paulo State, Brazil. Arch Med Sci 2008; 4: 254-258.  
535  
536
- 537 28. Gonçalves MAS, Mattos CCB, Spegiorin LCJF, Oliani DCV, Oliani AH,  
538 Mattos LC. Seropositivity rates for toxoplasmosis, rubella, syphilis,  
539 cytomegalovirus, hepatitis and HIV among pregnant women receiving  
540 care at a Public Health Service, São Paulo State, Brazil. Braz J Infect  
541 Dis 2010; 14: 601-605.

- 542 29. Lynch MI, Moraes LFL, Malag'ueño E, Ferreira S, Cordeiro F, Oréfica  
543 F. Características clínicas de 64 indivíduos portadores de uveítis  
544 posterior activa presumivelmente toxoplásmica em Pernambuco. Arq  
545 Bras Oftalmol 2008; 71: 43-48.
- 546  
547
- 548 30. Perkins ES. Ocular toxoplasmosis. Br J Ophthalmol 1973; 57: 1-17.
- 549  
550
- 551 31. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier MJR,  
552 Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis  
553 in Southern Brazil. Am J Ophthalmol 1992; 114: 136-144.
- 554  
555
- 556 32. Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC, Kobilka E.  
557 Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose  
558 humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. Rev Panam  
559 Salud Public 1999; 6: 157-163.
- 560  
561
- 562 33. Minot S, Cordeiro C, Melo MB, Lu D, Niedelman W, Polite M, et al.  
563 Whole-genome sequencing uncovers the extent and directionality of  
564 recombination in *Toxoplasma* and a mechanism that explains  
565 differences in diversity between north and south american strains. In:

- 566 11<sup>th</sup> International Congress on Toxoplasmosis, 2011, Ottawa. Abstract  
567 Book 2011: 40.  
568  
569
- 570 34. Montoya JG, Liesenfeld O, Kinney S, Press C, Remington JS. Vidas  
571 test for avidity of *Toxoplasma*-specific immunoglobulin G for  
572 confirmatory testing of pregnant women. J Clin Microbiol 2002; 40:  
573 2504-2508.  
574  
575
- 576 35. Latkany P. Ocular disease due to *Toxoplasma gondii*. In: Weiss LM,  
577 Kim K, (eds). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan:  
578 perspectives and methods. Elsevier/ Academic Press: Amsterdam;  
579 2007. pp 1-17.  
580  
581
- 582 36. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LMG, Tan HK, Wallon  
583 M, et al. Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil  
584 compared with Europe. Plos 2008; 2: e277.  
585  
586
- 587 37. Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and  
588 mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int J Parasitol 2008;  
589 38: 561-569.

- 590 38.Ferreira IMR, Vidal JE, Mattos CCB, Mattos LC, Qu D, Su C, et al.  
591 *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from  
592 human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes.  
593 Exp Parasitol 2011; 129: 190-195.  
594  
595
- 596 39.Mesquita RT, Ziegler AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chioccola  
597 VL. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of  
598 brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. J Med  
599 Microbiol 2010; 59: 641-647.  
600  
601
- 602 40.Ajzenberg D. Is PCR testing on blood samples useful or not in the  
603 diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis?. Trans R Soc Trop Med Hyg  
604 2010; 104: 569-570.  
605  
606
- 607 41.Matos K, Muccioli C, Belfort Jr R, Rizzo LV. Correlation between  
608 clinical diagnosis and PCR analysis of serum, aqueous, and vitreous  
609 samples in patients with inflammatory eye disease. Arq Bras Oftalmol  
610 2007; 70: 109-114.

611 **Tabela 1.** Distribuição dos pacientes com retinocoroidite toxoplásmica (RT) e  
 612 outras doenças oculares (ODO) de acordo com o resultado das análises  
 613 sorológicas Reagentes e não Reagentes para anticorpos IgG anti-*Toxoplasma*  
 614 *gondii*, atendidos em ambulatório SUS da região de São José do Rio Preto, SP,  
 615 Brasil.

	Reagente		Não Reagente		OR	CI 95%	p
Gênero (M/F)	86/77		49/36		0,8206	0,4835 – 1,393	0,5032
Média idade	58,2±16,9		57,2±14,2				0,6316
	N	%	N	%			
RT	62	38,0	0	0,0	105,30	6,413 – 1728,8	<0,0001
ODO	101	62,0	85	100,0			
Total (n=248)	163	65,7	85	34,3			

616 **Tabela 2.** Valores de título, avidéz e resultados das análises por reação em  
617 cadeia da polimerase entre os pacientes com retinocoroidite toxoplásmica (RT)  
618 e outras doenças oculares (ODO).

Característica	RT (n=62)		ODO (n=101)		OR	CI 95%	p
	N	%	N	%			
Título							
≥ 4000	5	8,1	1	1,0	2,295	1,518 – 3,471	0,0301
< 4000	57	91,9	100	99,0			
Avidéz							
≥ 60 (alta)	50	80,6	75	74,2	1,444	0,6674 – 3,126	0,4459
< 60 (baixa)	12	19,4	26	25,8			
PCR							
Positivo	21	33,9	1	0,9	51,220	6,665 – 393,62	<0,0001
Negativo	41	66,1	100	99,1			

619 **Tabela 3.** Valores de título, avidéz e resultados das análises por reação em  
 620 cadeia da polimerase em pacientes com retinocoroidite toxoplásmica.

Característica	Lesão (n=16)		Cicatriz (n=46)		OR	CI 95%	p
	N	%	N	%			
Título							
≥ 4000	3	18,8	2	4,3	5,077	0,7642 – 33,728	0,1032
< 4000	13	81,2	44	95,7			
Avidéz							
≥ 60 (alta)	15	93,7	35	76,1	4,714	0,5574 – 39,874	0,1599
< 60 (baixa)	1	6,3	11	23,9			
PCR							
Positivo	5	31,2	16	34,8	0,8523	0,2518 – 2,884	1,0000
Negativo	11	68,8	30	62,2			

---

## **Conclusões**

#### 4. Conclusões

- ❖ Este estudo demonstra elevada frequência de RT entre pacientes com doenças oculares. Além disso, indicam que a maioria dos pacientes com RT apresentam baixos títulos de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, com alta avidéz. *T. gondii* encontra-se no sangue circulante independente da presença de lesões e/ou cicatrizes resultantes da toxoplasmose;
- ❖ A presença de cães e/ou gatos bem como ingestão de carne crua ou mal cozida eleva os riscos de infecção por *T. gondii*, mas não influenciam no desenvolvimento da RT;
- ❖ A elevada expressão do antígeno Le<sup>b</sup> atua como efeito protetor contra a infecção pelo *T. gondii*, assim como o antígeno Le<sup>a</sup> parece favorecer o desenvolvimento da RT;
- ❖ Os fatores de risco abordados neste estudo auxiliam na adoção de medidas preventivas contra a infecção por *T. gondii*. E a identificação de fatores imunogenéticos relacionados à infecção por este protozoário e ao desenvolvimento da RT são de extrema importância para a compreensão da epidemiologia, do diagnóstico e da fisiopatologia da RT, mesmo tendo em mente que a infecção por este parasito apicomplexa é influenciada por múltiplos fatores.

---

## Referências

## 5. Referências

1. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998;11(2):267-99.
2. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev 2000;64(3):607-23.
3. Klaren VNA, Kijlstra A. Toxoplasmosis, an overview with emphasis on ocular involvement. Ocul Immunol Inflamm 2002;10(1):1-26.
4. Kawazoe U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP editor. Parasitologia Humana. 11ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 149-56.
5. Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. Acad Sci 1908;147:763-6.

6. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Inst J Parasitol* 2009;39:895-901.
  
7. Splendore A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti puntil il Kala-azar dell'uomo. *Rev Soc Scient São Paulo* 1908;3:109-12.
  
8. Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Seances Acad Sci* 1909;148:369-72.
  
9. Ferguson DJP. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104(2):133-48.
  
10. Su C, Dubey JP. *Toxoplasma*. In: Liu D, editor. *Molecular detection of foodborne pathogens*. Boca Raton: CRC Press; 2010. p. 741-53. <http://hdl.handle.net/10113/35050>.

11. Dubey JP. The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss LM, Kim K, editores. *Toxoplasma gondii: The model apicomplexan: perspectives and methods*. Amsterdam: Elsevier/ Academic Press; 2007. p. 1-17.
12. Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Dardé ML, Disko R, et al. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull World Health Organ* 1999;77(11):929-35.
13. Oréfice F, Cunha-Filho R, Barbosa AL, Oréfice JL, Calucci D. Toxoplasmose ocular adquirida – toxoplasmose ocular pós-natal. *Rev Bras Oftalmol* 2010;69(3):184-207.
14. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:634-40.
15. Su C, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley D. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002;99(16):10753-8.

16. Liesenfeld O. Immune responses to *Toxoplasma gondii* In the gut. Immunobiology 1999;201(2):229-39.
17. Barragan A, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. J Exp Med 2002;195(12):1625-33.
18. Carruthers VB, Suzuki Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. Schizoph Bull 2007;33(3):745-51.
19. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 2000;30:1217-58.
20. Antoniazzi E, Guagliano R, Meroni V, Pezzotta S, Bianchi PE. Ocular impairment of toxoplasmosis. Parassitologia 2008;50:35-6.
21. Oréfice F, Bonfioli AA. Toxoplasmose. In: Oréfice F, editor. Uveíte clínica e cirurgica: texto e atlas, 2ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2000. p. 619-80.

22. Atmaca LS, Simsek T, Batioglu F. Clinical features and prognosis in ocular toxoplasmosis. *J Ophthalmol* 2004;48:386-91.
23. Hay J, Dutton GN. Toxoplasma and the eye. *Br Med J* 1995;310:1021-2.
24. Scherrer J, Iliev ME, Halberstadt M, Kodjikian L, Garweg JG. Visual function in human ocular toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 2007;91:233-6.
25. Garweg JG, Jacquier P, Boehnke M. Early aqueous humor analysis in patients with human ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):996-1001.
26. Sroka S, Bartelheimer N, Winter A, Heukelbach J, Ariza L, Ribeiro H, et al. Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83(3):528-533.
27. Gilbert RE, Stanford MR. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection?. *Br J Ophthalmol* 2000;84:224-6.

28. Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, Murray PI, Pavesio CE, Gormley PD, et al. Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. *Epidemiol Infect* 1999;123:283-289.
  
29. Melamed J. Contributions to the history of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104(2):358-363.
  
30. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier MJR, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 1992;114(2):136-44.
  
31. Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC, Kobilka E. Soroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. *Rev Panam Salud Public* 1999;6(3):157-63.
  
32. Silveira C, Belfort Jr R, Muccioli C, Abreu MT, Martins MC, Victora C, et al. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 2001;131(3):351-4.

33. Portela RWD, Bethony J, Costa MI, Gazzinelli A, Vitor RWA, Hermeto FM, et al. A multihousehold study reveals a positive correlation between age, severity of ocular toxoplasmosis, and levels of glycoinositolphospholipid-specific immunoglobulin A. *J Infect Dis* 2004;190:175-83.
  
34. Lynch MI, Moraes LFL, Malagueño E, Ferreira S, Cordeiro F, Oréfice F. Características clínicas de 64 indivíduos portadores de uveítis posterior activa presumivelmente toxoplásmica em Pernambuco. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71(1):43-8.
  
35. Derouin F. Pathogeny and immunological control of toxoplasmosis. *Braz J Med Biol Res* 1992;25(12):1163-9.
  
36. Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 2002;3(11):1041-7.
  
37. Sibley LD, Mordue D, Howe DK. Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis. *Immunobiology* 1999;2001(2):210-24.

38. Dzierszinski FS, Hunter CA. Advances in the use of genetically engineered parasites to study immunity to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 2008;30:235-44.
39. Sibley LD, Mordue DG, Su C, Robben PM, Howe DK. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii* *Phil Trans R Soc Lond B* 2002;357:81-8.
40. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(4):569-88.
41. Chardés T, Bourguin I, Mevelec MN, Dubremetz JF, Bout D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect Immun* 1990;58(5):1240-6.
42. Ashburn D, Joss AW, Pennington TH, Ho-Yen DO. Specificity and usefulness of an IgE immunosorbent agglutination assay for toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 1995;48:64-9.

43. Geller M, Geller M, Flaherty DK, Capanema de Souza AP. Serum IgE levels in toxoplasmosis. *Ann Allergy* 1980;45(4):251-2.
44. Cousins SW, Trattler WB, Streilein JW. Immune privilege and suppression of immunogenic inflammation in the anterior chamber of the eye. *Curr Eye Res* 1991;10(4):287-97.
45. Streilein JW, Wilbanks GA, Cousins SW. Immunoregulatory mechanisms of the eye. *J Neuroimmunol* 1992;39:185-200.
46. Streilein JW. Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Prog Retin Eye Res* 1999;18(3):357-70.
47. Feron EJ, Klaren VNA, Wierenga EA, Verjans GMGM, Kijlstra A. Characterization of *Toxoplasma gondii*-specific T cells recovered from vitreous fluid of patients with ocular toxoplasmosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(13):3228-32.
48. Camargo ME. Serodiagnosis of toxoplasmosis in pregnancy. *AMB Rev Assoc Med Bras* 1975;21:341-4.

49. Frenkel JK. Toxoplasmose. In: Veronesi R, Focaccia R, editores. Tratado de infectologia. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 1290-1304.
50. Dzitko K, Staczek P, Gatkowska J, Dlugonska H. *Toxoplasma gondii*: serological recognition of reinfection. 2006;112:134-7.
51. Camargo ME. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editores. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-Imunes. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 278-88.
52. Hedman K, Lappalainen M, Seppä I, Makela O. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. J Infect Dis 1989;159(4):736-40.
53. Johnson DH, Payne RA, Rawal BK. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. J Clin Pathol 1990;43:1032-3.
54. Marcolino PT, Silva DAO, Leser PG, Camargo ME, Mineo JR. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of

- immunoglobulin G avidity by western blotting. Clin Diagn Lab Immunol 2000;7(3):384-9.
55. Beghetto E, Buffolano W, Spadoni A, Pezzo MD, Cristina MD, Minenkova O, et al. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. J Clin Microbiol 2003;41(12):5414-8.
56. Lappalainen M, Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. Ann Ist Super Sanità 2004;40(1):81-8.
57. Petersen E, Borobio MV, Guy E, Liesenfeld O, Meroni V, Naessens A, et al. European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG avidity index. J Clin Microbiol 2005;43(4):1570-4.
58. Araújo PRB, Ferreira AW. Avidity of IgG antibodies against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis. Rev Soc Bras Med Trop 2008;41(2):142-7.

59. Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Clin Infect Dis 2008;47:554-66.
60. Rossi CL, Nascimento FS, Barros-Mazon S, Dias DF, Vigorito AC, Souza CA. Serological monitoring of a *Toxoplasma* infection after hematopoietic stem cell transplantation. Rev Inst Med Trop São Paulo 2010;52(4):225-7.
61. Press C, Montoya JG, Remington JS. Use of a single serum sample for diagnosis of acute toxoplasmosis in pregnant women and other adults. J Clin Microbiol 2005;43(7):3481-3.
62. Paul M. Immunoglobulin G avidity in diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy and ocular toxoplasmosis. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6(4):514-8.
63. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. Parasitology 2010;137:1-11.

64. Brézin AP, Eqwuagu CE, Silveira C, Thulliez P, Martins MC, Mahdi RM, et al. Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis. *N Engl J Med* 1991;324:699.
65. Bhalla M, Johnson JD, Holliman RE, Savva D. Misdiagnosis of toxoplasma infection by PCR: fears unfounded. *J Clin Pathol* 1999;52:468-70.
66. Lee PYC, Mangan J, Holliman RE, Butcher PD. Quantitation of *Toxoplasma gondii* DNA in a competitive nested polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1999;52:61-4.
67. Montoya JG, Parmley S, Liesenfeld O, Jaffe GJ, Remington JS. Use of the polymerase chain reaction for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology* 1999;106:1554-63.
68. Yamamoto JH, Vallochi AL, Silveira C, Filho JK, Nussenblatt RB, Cunha-Neto E, et al. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *J Infect Dis* 2000;181:2018-22.

69. Ferreira IMR, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, Oliveira ACP, et al. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR–RFLP markers. *Exp Parasitol* 2008;118:221-7.
70. Mattos CCB, Meira CS, Ferreira AIC, Frederico FB, Hiramoto RM, Jr GCA, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:362-6.
71. Daniels G. ABO, Hh, and Lewis blood group systems. In: Human blood groups. 1<sup>a</sup> ed. USA: Cambridge University Press; 1995. p. 8-93.
72. Gill HS. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in Tanzanian blood donors. *East Afr Med J* 1985;62(8):585-8.
73. Midtvedt T, Vaage L. Relationship between *Toxoplasma gondii* antibodies and blood group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:575-6.

74. Lécolier B, Grynberg H, Freund M. Absence of relationship between *Toxoplasma gondii* antibodies and blood group in pregnant women in France. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990;9:152-3.
75. López R, Fano R, Contreras R, Font L. Anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en cubanos donantes de sangre. Rev Lat Amer Microbiol 1993;35:207-10.
76. Kolbekova P, Kourbatova E, Novotna M, Kodym P, Flegr J. New and old risk-factors for *Toxoplasma gondii* infection: prospective cross-sectional study among military personnel in the Czech Republic. Clin Microbiol Infect 2007;13:1012-7.
77. Salibay CC, Dungca JZ, Claveria FG. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection among Urban (Manila) and Suburban (Dasmarinãs, Cavite) Residents, Philippines. J Protozool Res 2008;18:26-33.
78. Mattos CCB, Cintra JR, Ferreira AIC, Spegiorin LCJF, Galisteu KJ, Machado RLD, et al. Lack of association between ABO histo-blood groups, secretor and non-secretor phenotypes, and anti-*Toxoplasma gondii* antibodies among

pregnant women from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. Arch Med Sci 2008;4(3):254-8.

79. Nakashima F. Fenótipo Lewis negative: potencial fator de risco para infecção por cepa RH do *Toxoplasma gondii* em gestantes [dissertação]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2010.
80. 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.
81. Carvalho L, Souto-Padrón T, Souza W. Localization of lectin-binding sites and sugarbinding proteins in tachyzoites to *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 1991;77(1):156-61.
82. Pedal I, Wetzel C, Min JX, Daus W. ABH and Lewis immunohistochemistry of the human eye. Forensic Sci Int 1995;71:51-5.

83. Andressen C, Mai JK. Localization of the CD15 carbohydrate epitope in the vertebrate retina. *Vis Neurosci* 1997;14:253-62.
84. Schenkel-Brunner H. Human blood groups – chemical and biochemical basis of antigen specificity. Viena: Springer Wien New York; 2000.
85. Albuquerque MC, Cotias PM, Aleixo ALQC, Nicolau JL, Vicente RT, Costa T, et al. Toxoplasmose ocular: correlação com grupos sanguíneos ABO. *NewsLab* 2009;95:96-101.
86. Mattos LC, Sanchez FE, Cintra JR, Salles ABCF, Bonini-Domingos CR, Moreira HW. Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. *Rev bras hematol hemoter* 2001;23:15-22.
87. Cintra JR, Godoy MF, Mattos LC. Falta de associação entre o sistema Lewis e obstrução coronariana. *Rev bras hematol hemoter* 2008;30:124-31.
88. Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IMR, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola VL. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-

secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol* 2008;57:845-50.

89. Korhonen MH, Brunstein J, Haario H, Katnikov A, Rescaldani R, Hedman K. A new method with general diagnostic utility for the calculation of immunoglobulin G avidity. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(5):725-8.

90. Colombo FA, Vidal 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.

91. Vidal JE, Colombo FA, Oliveira ACP, Focaccia R, Pereira-Chioccola. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2004;42(10):4765-8.

92. Mesquita RT, Ziegler AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chioccola VL. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol* 2010;59:641-7.

93. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989;27(8):1787-92.
94. Svensson L, Petersson A, Henry SM. Secretor genotyping for *A385T*, *G428A*, *C571T*, *C628T*, *685delTGG*, *G849A*, and other mutations from single PCR. *Transfusion*, 2000;40:856-60.
95. Orntoft TF, Vestergaard EM, Holmes E, Jakobsen JS, Grunnet N, Mortensen M, et al. Influence of Lewis a<sub>1-3/4</sub>-L-Fucosyltransferase (*FUT3*) gene mutations on enzyme activity, erythrocyte phenotyping, and circulating tumor marker sialyl-Lewis a levels. *J Biol Chem* 1996;271:32260-8.

---

**Anexos**

## Anexos

## Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

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

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

Parecer n.º 050/2009

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O Protocolo n.º 1980/2009 sob a responsabilidade de Luiz Carlos de Mattos, com o título "Associação entre a toxoplasmose ocular e o perfil de 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 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido



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



#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

Para participar como voluntário(a) nessa pesquisa será necessário:

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

Você será informado(a) 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 informado(a).

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

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

Declaração do sujeito da pesquisa

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

....., ..... de ..... de .....

-----  
Responsável pela discussão do  
consentimento livre e esclarecido

-----  
Assinatura do sujeito da pesquisa  
ou seu representante legal

-----  
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)**



---

## **Apêndices**

## Apêndices

### Apêndice 1. Morfologia e ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* é capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves,<sup>(1)</sup> uma característica típica dos microrganismos apicomplexas.<sup>(2)</sup> Este protozoário desenvolve o ciclo heteroxeno no qual os felídeos, inclusive o gato doméstico, são os hospedeiros definitivos e os animais de sangue quente, os hospedeiros intermediários.<sup>(3)</sup> O parasito apresenta três estágios infectantes: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos,<sup>(4)</sup> os quais apresentam organelas citoplasmáticas características de seu filo e que formam o complexo apical (conóide, anéis polares, microtúbulos subpeliculares, róptrias, micronemas e grânulos densos).<sup>(5)</sup>

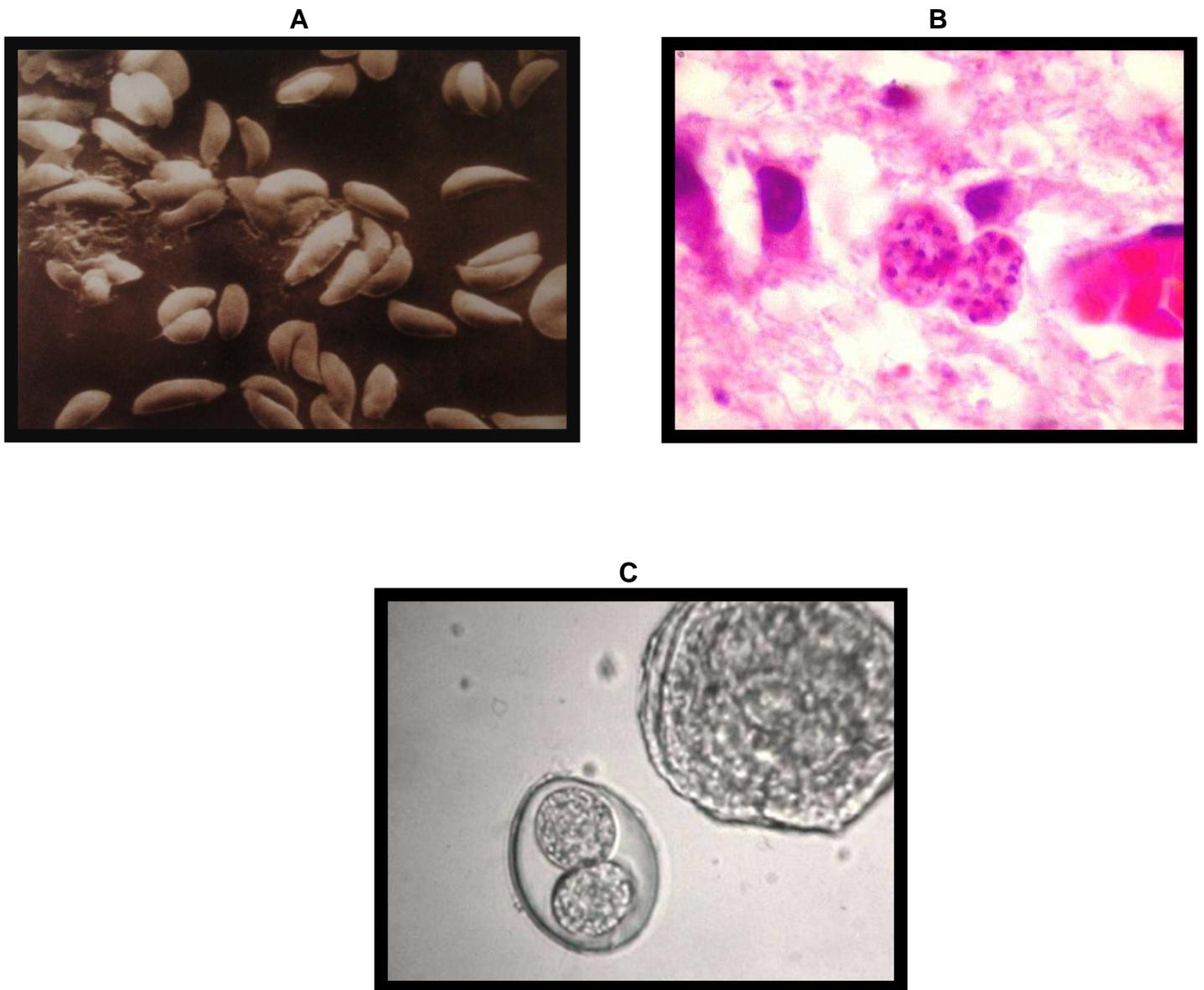
O termo “taquizoíto” foi utilizado por Frenkel em 1973, para descrever o estágio de rápida multiplicação do parasito. Esta presente em quaisquer células do hospedeiro intermediário e nas células do epitélio não intestinal do hospedeiro definitivo. É encontrado na fase aguda da infecção dentro do vacúolo parasitóforo de várias células tais como hepáticas, pulmonares, nervosas e musculares dentre outras. Apresenta-se na forma de um arco e mede cerca de 2 µm de largura por 6 µm de comprimento (Figura 15A).<sup>(4)</sup>

Os bradizoítos se encontram dentro de cistos teciduais e ao contrário dos taquizoítos possuem multiplicação lenta. Alguns tipos de cepas de bradizoítos também são vistas durante a fase aguda da infecção e no momento em que se torna crônica, geralmente presente nos tecidos nervoso e muscular. O tamanho do cisto depende da célula parasitada e do número de

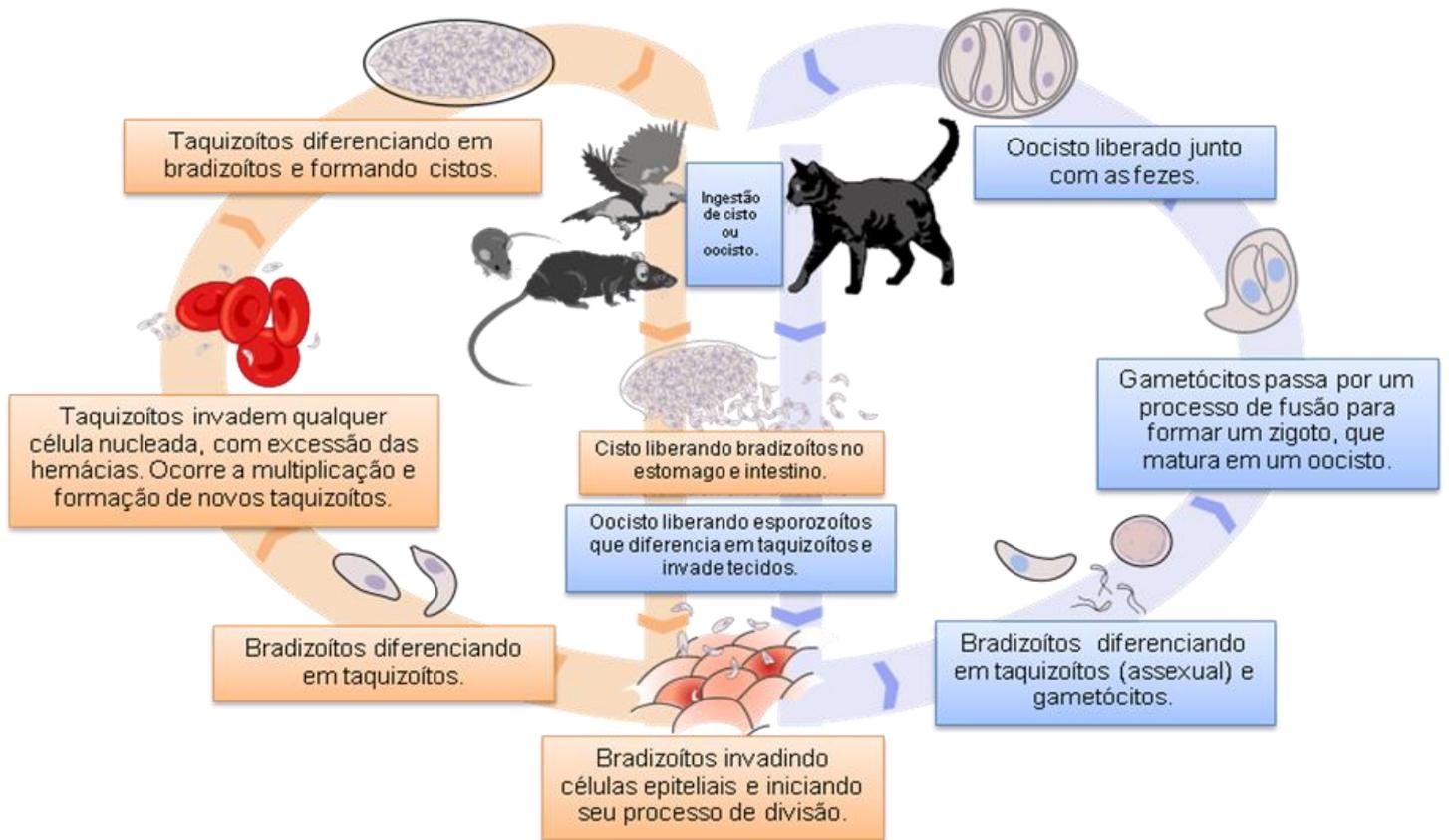
bradizoítos presentes podendo atingir cerca de 200  $\mu\text{m}$ . Podem permanecer viáveis por vários anos (Figura 15B).<sup>(4)</sup>

Os esporozoítos estão contidos dentro de oocistos, os quais representam a forma de resistência produzida nas células intestinais dos felídeos não imunes, sendo eliminados imaturos junto com as fezes. São esféricos, medem cerca de 12,5  $\mu\text{m}$  de largura por 11,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e se tornam infectantes após esporulação que ocorre entre três a cinco dias de acordo com as condições ambientais. Cada oocisto esporulado contém dois esporocistos que abrigam em seu interior quatro esporozoítos (Figura 15C).<sup>(4)</sup>

É nos hospedeiros definitivos que o *T. gondii* consegue realizar todo o seu complexo ciclo de vida. Isso ocorre geralmente quando um gato jovem se alimenta de outros animais (camundongos e aves) que apresentam infecção aguda ou crônica, ou por oocistos maduros presentes no ambiente. Após a infecção aparecem em suas fezes oocistos imaturos e sua eliminação pode durar cerca de um mês. Entretanto, podem ser encontrados até um ano após a infecção no intestino de gatos infectados. Este processo é derivado da fase sexuada (união de macro e microgametas para formar um zigoto). A disseminação da forma infectante (taquizoíto) ocorre por meio da invasão de células do hospedeiro durante a fase assexuada, a qual recebe o nome de endodigenia ou endogenia, devido à rápida multiplicação do protozoário (Figura 16).<sup>(5)</sup>



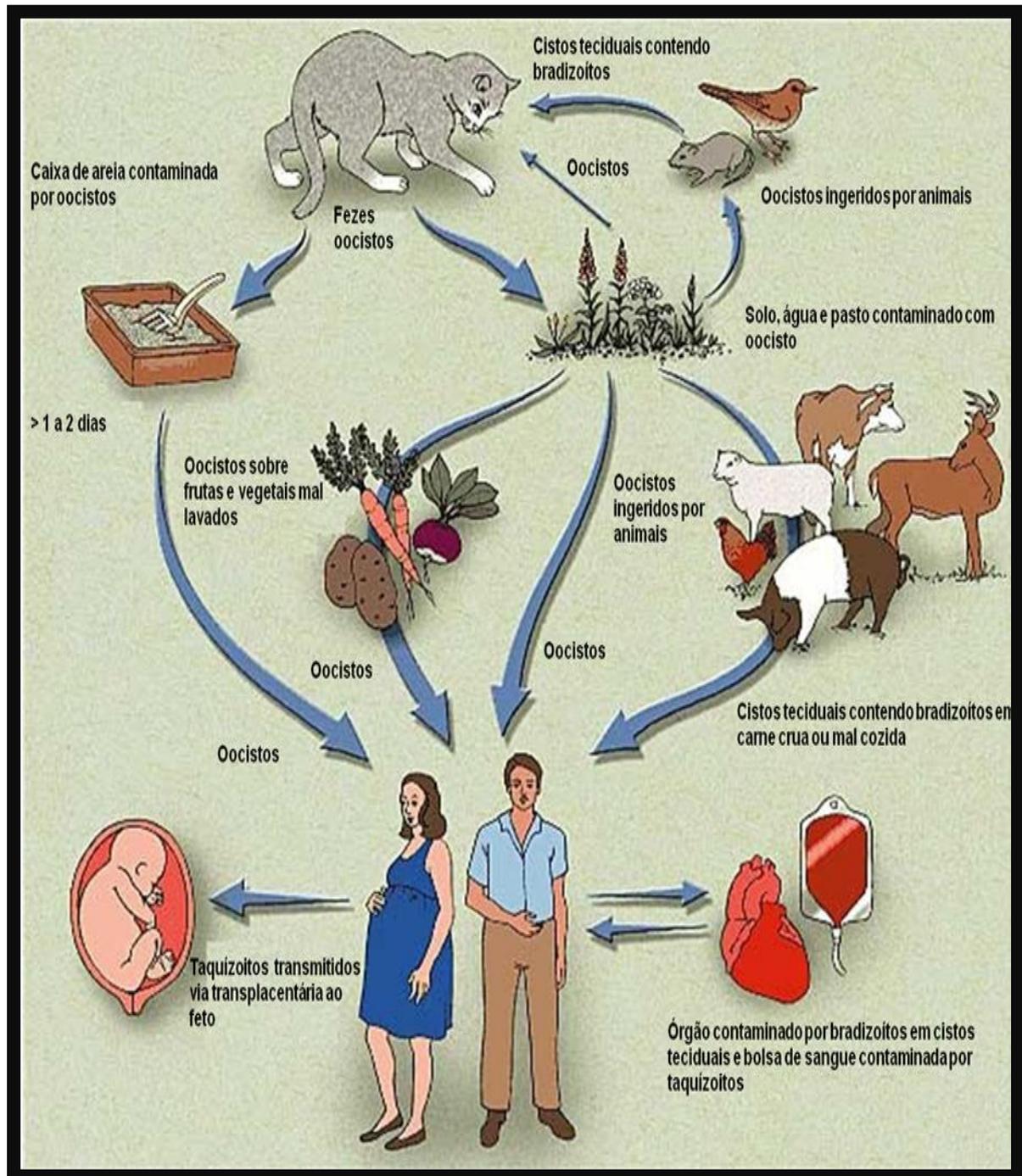
**Figura 15.** Formas infectantes do *T. gondii*. (A) Taquizoítos livres, adaptada de Oréface F, 2000, (B) bradizoítos em pseudocistos, adaptada de <http://anatpat.unicamp.br/lamneuro10.html> e (C) oocisto esporulado, adaptada de [www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2000/toxo/oocisto.html](http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2000/toxo/oocisto.html).



**Figura 16.** Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Adaptada de [http://commons.wikimedia.org/wiki/file:toxoplasmosis\\_life\\_cycle\\_en.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/file:toxoplasmosis_life_cycle_en.svg)

Nos humanos (hospedeiros intermediários) a infecção pode ocorrer ainda durante a gestação, momento em que a mãe transmite taquizoítos ao feto por via transplacentária (transmissão vertical). Também pode ser adquirida ao longo do tempo (transmissão horizontal). As principais formas de infecção ocorrem por meio do consumo de água e verduras contaminadas com oocistos esporulados e pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo pseudocistos ou cistos teciduais de bradizoítos. Embora rara, a transmissão se dá por meio de transfusão de sangue, hemoderivados e transplante de órgãos (Figura 17).<sup>(6,7)</sup>

Neste grupo de hospedeiros o parasito só consegue se reproduzir assexuadamente. Durante a infecção por bradizoítos ou esporozoítos os mesmos se convertem em taquizoítos os quais se reproduzem rapidamente até a lise das células infectadas. Esse processo faz com que os taquizoítos invadam outras células dando origem a fase aguda da doença.<sup>(5)</sup>



**Figura 17.** Vias de contaminação por *Toxoplasma gondii*. Adaptada de Lynfield e Guerina, 1997.<sup>(8)</sup>

## Apêndice 2. Toxoplasmose em imunocompetentes

Em indivíduos saudáveis a infecção aguda é usualmente assintomática ou com poucos sintomas.<sup>(9)</sup> No momento em que a doença se manifesta o principal quadro que se observa é o de linfadenopatia, que pode ser associada a febre, fadiga, dor muscular, dor de garganta e dor de cabeça.<sup>(7)</sup>

## Apêndice 3. Toxoplasmose em imunocomprometidos

O curso da doença se agrava em indivíduos imunocomprometidos, principalmente pacientes transplantados que necessitam de terapia imunossupressora e portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Indivíduos com AIDS desenvolvem frequentemente neurotoxoplasmose resultante de danos ao sistema nervoso central (SNC), possivelmente devido a reativação ou ruptura de cistos presentes no cérebro.<sup>(10)</sup> *T. gondii* é um dos principais microrganismos oportunistas que infectam estes indivíduos devido a disfunção imune.<sup>(11)</sup>

## Apêndice 4. Toxoplasmose congênita

A transmissão vertical do *T. gondii* ocorre por meio da multiplicação de taquizoítos nas células da placenta. Eventualmente, alguns destes parasitos atravessam a placenta, atingem a circulação e infectam os tecidos fetais.<sup>(12)</sup> A toxoplasmose congênita ocorre principalmente quando a mãe adquire a

infecção primária durante a gestação. Entretanto, pode ocasionalmente resultar da infecção pré concepcional ou da reativação de infecção latente em mulheres apresentando imunodeficiência grave.<sup>(13,14)</sup>

Quando a infecção fetal é adquirida durante o primeiro trimestre oferece maior risco que quando adquirida no segundo e terceiro trimestres da gestação.<sup>(7)</sup> As crianças infectadas podem manifestar desde um quadro de retinocoroidite branda até desenvolver a Tétrade de Sabin caracterizada por retinocoroidite, hidrocefalia, convulsões e calcificação cerebral.<sup>(7,15)</sup> Esta téttrade pode levar ao abortamento mas nos casos de gestação a termo o recém nascido apresenta com maior frequência lesões oculares.<sup>(7)</sup>

### **Apêndice 5. Sistema histo-sanguíneo ABO**

A descoberta do sistema histo-sanguíneo ABO ocorreu no ano de 1900 quando Karl Landsteiner observou que o plasma sanguíneo de alguns indivíduos aglutinava os eritrócitos de outros.<sup>(16-18)</sup> Landsteiner denominou de aglutinogênios (antígenos) A e B as substâncias presentes nos eritrócitos e de aglutininas (anticorpos) anti-A e anti-B, aquelas presentes no plasma.<sup>(18-21)</sup> Assim foi possível classificar o sangue humano inicialmente em três grupos sanguíneos A, B e C, sendo este último conhecido modernamente como grupo O. O quarto grupo mais raro, denominado AB, foi descrito dois anos após por seus colaboradores Decastello & Sturli.<sup>(18,20-22)</sup>

O quadro 2 ilustra o modelo clássico de Landsteiner de acordo com a presença ou ausência dos antígenos e dos anticorpos do sistema histo-

sanguíneo ABO.<sup>(22)</sup> A presença dos antígenos eritrocitários e dos anticorpos plasmáticos confere ao sistema histo-sanguíneo ABO um grau de complexidade peculiar que é de grande importância nas relações dos seres humanos com doenças e outras condições fisiológicas.<sup>(21)</sup>

Embora os antígenos ABH tenham sido originariamente identificados em eritrócitos, são expressos em uma variedade de tecidos determinando diferentes perfis de glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídeos).<sup>(23)</sup> Desse modo a expressão “sistema histo-sanguíneo” reflete de maneira apropriada os vários aspectos desse sistema, que foi inicialmente proposto apenas como sistema ABO.<sup>(20,24)</sup> Estes antígenos que definem os fenótipos do sistema histo-sanguíneo ABO, são formados pela adição sequencial de monossacarídeos específicos em cadeias precursoras dissacarídicas terminais.<sup>(19,21,25)</sup>

De acordo com as leis mendelianas o sistema histo-sanguíneo ABO é de natureza autossômica com os genes *A* e *B* manifestando-se codominantes entre si e dominantes sobre o gene *O*.<sup>(18,25)</sup> A expressão dos antígenos ABH nos eritrócitos, secreções e mucosas é controlada por três genes *FUT1* (19q13.3), *FUT2* (19q13.3) e *ABO* (9q34.1) cujos alelos funcionais codificam glicosiltransferases específicas responsáveis pela glicosilação de diferentes oligossacarídios precursores (OP).<sup>(20,26)</sup> A quadro 3 representa as estruturas lineares dos OP dos antígenos do sistema histo-sanguíneo ABO.<sup>(21)</sup>

**Quadro 2.** Grupos sanguíneos do sistema ABO segundo o modelo clássico de Landsteiner.

<b>Fenótipos</b>	<b>Antígenos eritrocitários</b>	<b>Anticorpos séricos</b>
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A e B	-
O	H	Anti-A, Anti-B, Anti-A,B

Adaptada de Beiguelman, 2003.<sup>(22)</sup>

**Quadro 3.** Representação das estruturas lineares dos oligossacarídeos precursores dos antígenos do sistema histo-sanguíneo ABO. A letra “R” indica ceramídio ou proteína.

Tipos	Estrutura Terminal	Formas Expressas
1	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	Glicoproteínas, glicolipídios
2	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	Glicoproteínas, glicolipídios
3	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{R}$	Glicolipídios
4	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	Glicolipídios
5	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	Estrutura sintética
6	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	Glicoproteínas, glicolipídios

Adaptada de Henry e Samuelsson, 2000.<sup>(21)</sup>

## Apêndice 6. Biossíntese dos antígenos ABH nos eritrócitos

Morgan e Watkins (1948) demonstraram que o então denominado antígeno O é de fato a estrutura precursora dos antígenos A e B e que modernamente é denominado antígeno H.<sup>(18)</sup> Esse antígeno possui como monossacarídeo imunodominante a Fuc.<sup>(21)</sup> O gene *H* (*FUT1*; 19p13.3) codifica a enzima  $\alpha$ -2-L-fucosiltransferase (FUT1) a qual adiciona uma molécula de Fuc à Gal terminal do OP tipo 2 originando o antígeno H tipo 2.<sup>(25)</sup> O OP do tipo 2 é a substância precursora dos antígenos ABH na superfície dos eritrócitos.<sup>(22,27)</sup>

O gene *A* codifica a enzima GTA a qual transfere uma molécula de GalNAc ao resíduo galactosil fucosilado do antígeno H para originar o antígeno eritrocitário A. O produto do gene *B* é a enzima GTB responsável pela transferência de uma molécula de Gal para a Gal fucosilada do antígeno H na formação do antígeno eritrocitário B.<sup>(21,25,28)</sup> Dessa maneira, a expressão dos antígenos ABH nos eritrócitos, depende da interação entre os genes *FUT1* (*H*) e *ABO*.<sup>(22,25)</sup>

A ausência da enzima FUT1 impede a expressão do antígeno H tipo 2 e mesmo que seus portadores apresentem as enzimas GTA e/ou GTB são incapazes de formar os antígenos ABH nos eritrócitos. Estes indivíduos, identificados como portadores do genótipo *hh* são denominados fenótipo Bombaim. Os mesmos são classificados como pertencentes ao grupo sanguíneo O, não expressam os antígenos ABH nos eritrócitos, mas contém os anticorpos anti-A, anti-B, anti-A,B e anti-H no plasma.<sup>(22)</sup>

## Apêndice 7. Secretores e não Secretores dos glicoconjugados ABH

A expressão dos antígenos ABH não se restringem aos eritrócitos mas se dá na forma de glicolipídios e glicoproteínas em todos os tecidos com exceção do sistema nervoso central.<sup>(22,25,29-31)</sup>

O fenótipo Secretor, caracterizado pela presença dos glicoconjugados ABH em secreções exócrinas dos tratos gastrintestinal, geniturinário e respiratório, é controlado por dois alelos do gene *FUT2* (19q13.3) denominado *Se* e *se*.<sup>(19,25)</sup> O alelo dominante codifica a enzima FUTII, a qual transfere uma molécula de Fuc ao OP do tipo I, resultando no antígeno H tipo 1. Este antígeno é o precursor dos antígenos A e B tipo 1. Na presença do genótipo *sese* não ocorre a expressão dos antígenos ABH tipo 1 embora aqueles do tipo 2 sejam expressos normalmente nos eritrócitos.<sup>(18,25)</sup> Substituições de nucleotídeos no gene *FUT2*, além de comprometer a expressão da enzima FUTII, podem modificar a suscetibilidade ou resistência a doenças infecciosas,<sup>(32)</sup> e imunológicas.<sup>(33)</sup> No manuscrito **Antígenos Lewis: potencial fator de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* e desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica** foi investigada a substituição *G428A* presente no exon dois do gene *FUT2*, a qual tem se mostrado a maior responsável pelo fenótipo não Secretor em todas as populações.<sup>(34,35)</sup>

## Apêndice 8. Sistema histo-sanguíneo Lewis

No ano de 1946, Mourant descobriu o sistema histo-sanguíneo Lewis a partir da caracterização de um anticorpo irregular denominado anti-

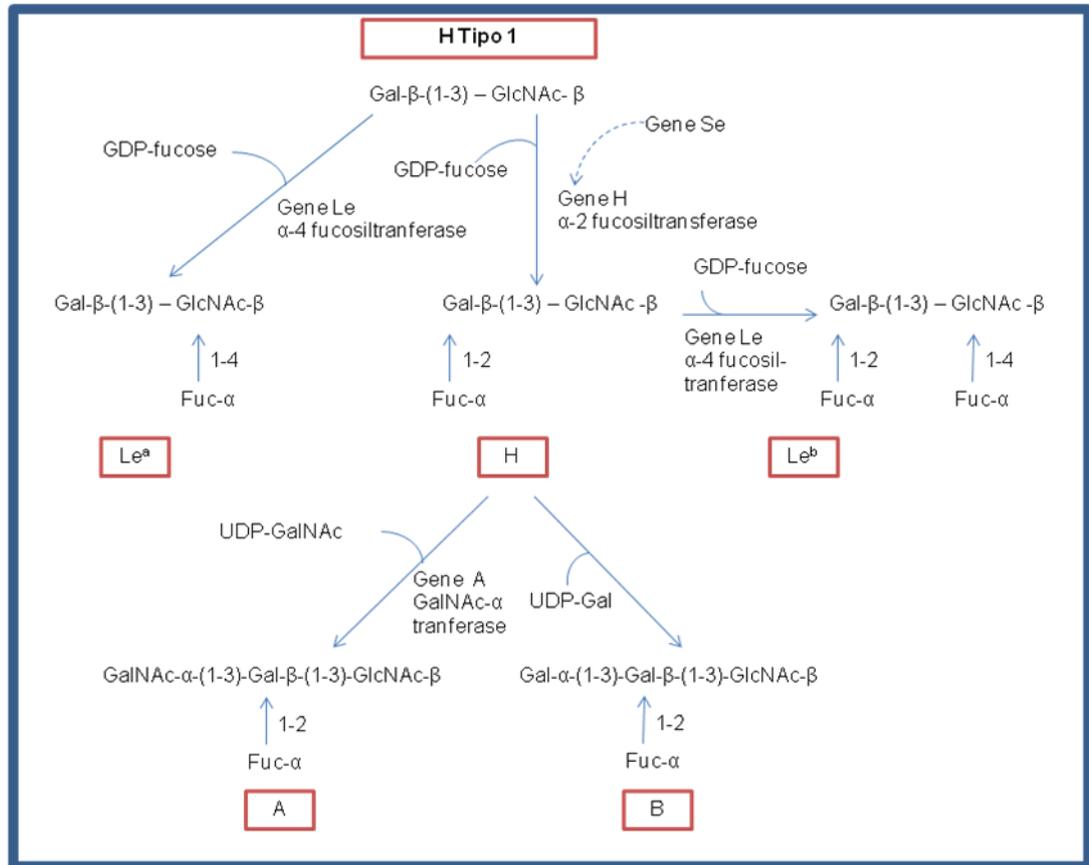
Lewis a ( $Le^a$ ). Um segundo anticorpo descrito por Andresen (1948), denominado anti-Lewis b ( $Le^b$ ) contribuiu para a caracterização dos fenótipos eritrocitários Lewis.<sup>(18,22,36-38)</sup> Este sistema não é propriamente eritrocitário, pois seus antígenos são sintetizados no trato gastrintestinal e liberados na forma de glicolipídeos neutros para o plasma. Daí são adsorvidos à membrana dos eritrócitos e de outras células do sangue, caracterizando os fenótipos  $Le(a+b-)$ ,  $Le(a-b+)$ ,  $Le(a+b+)$  e  $Le(a-b-)$ .<sup>(18,22,39,40)</sup>

A expressão dos antígenos  $Le^a$  e  $Le^b$  é controlada pelo gene *FUT3* (19q13.3) o qual possui dois principais alelos: *Le* e *le*.<sup>(25)</sup> O alelo funcional *Le* codifica a enzima FUTIII a qual é capaz de adicionar moléculas de Fuc a diferentes estruturas precursoras. Além disso, interage com o gene *FUT2* no controle da expressão dos antígenos  $Le^a$  e  $Le^b$ . A FUTIII transfere uma molécula de Fuc ao OP do tipo 1 para formar o antígeno  $Le^a$ . O antígeno  $Le^b$  é sintetizado a partir da adição de uma molécula de Fuc ao antígeno H tipo 1 produzido sob ação da FUTII. Portanto a expressão do antígeno  $Le^b$  é dependente de interação entre a FUTII e FUTIII. Estes antígenos não serão sintetizados na ausência da FUTIII mesmo que a FUTII esteja presente, caracterizando o fenótipo  $Le(a-b-)$ .<sup>(37,41-43)</sup> A figura 18 ilustra a biossíntese dos antígenos ABH-Lewis a partir do OP do tipo 1.

Portadores do fenótipo fraco Secretor ( $Se^wSe^w$  ou  $Se^wse$ ) expressam a FUTII com baixa atividade e por sintetizarem quantidades equivalentes dos antígenos  $Le^a$  e  $Le^b$  apresentam o fenótipo  $Le(a+b+)$ .<sup>(41,44)</sup> As frequências dos fenótipos eritrocitários Lewis variam de acordo com os grupos étnicos analisados. De maneira geral o fenótipo  $Le(a+b-)$  é encontrado em 22% dos

caucasianos, o Le(a-b+) em 72% e o Le(a-b-) em 6%. Este último é raro em asiáticos mas atinge percentuais de 20 a 25% em negros e afro descendentes.<sup>(22)</sup>

As interações entre as glicosiltransferases dos sistemas histo-sanguíneos ABO (GTA e GTB), Secretor (FUTII) e Lewis (FUTIII) resultam na expressão de diferentes perfis de glicoconjugados nas secreções exócrinas e outros tecidos.<sup>(21)</sup> Estes perfis variam desde aqueles que expressam todos os tipos de glicoconjugados (AB, Secretor, Le(a+b+)) até os que expressam apenas o OP (O, não Secretor, Le(a-b-)).<sup>(26)</sup> A ação da FUTIII sobre os antígenos A e B tipo 1 os convertem em ALe<sup>b</sup> e BLe<sup>b</sup> respectivamente.<sup>(46)</sup> O gene *FUT3* apresenta mutações pontuais (*T59G*, *G508A*, *T1067A*, *T202C*, *C314T*, *C445T*, *G484A*, *G667A*, *G808A*, *G760A*, *G13A*, *G1022T* e *G47C*), as quais além de inativar ou reduzir a atividade da FUTIII, contribui para a expressão do fenótipo Le(a-b-).<sup>(43,46)</sup> No manuscrito **Antígenos Lewis: potencial fator de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* e desenvolvimento da retinocoroidite toxoplásmica** foram analisadas as mutações *T202C* e *C314T* comuns em caucasianos,<sup>(40,43)</sup> tendo sido inclusive encontradas em nossa região.<sup>(35)</sup>



**Figura 18.** Biossíntese dos antígenos ABH-Lewis a partir do oligossacarídeo precursor do Tipo 1. Sheinfeld et al. 1989.<sup>(45)</sup>

Apêndice 9. Artigo completo publicado no periódico **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 70 (2011) 362–366

DIAGNOSTIC  
MICROBIOLOGY  
AND INFECTIOUS  
DISEASE

[www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)

## Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients<sup>☆</sup>

Cinara C.B. Mattos<sup>a</sup>, Cristina S. Meira<sup>b</sup>, Ana I.C. Ferreira<sup>a</sup>, Fábio B. Frederico<sup>c</sup>, Roberto M. Hiramoto<sup>b</sup>, Gildásio C. Almeida Jr<sup>c</sup>, Luiz C. Mattos<sup>a</sup>, Vera L. Pereira-Chioccola<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

<sup>c</sup>Ambulatório de Oftalmologia, Fundação Faculdade Regional de Medicina-Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brazil

Received 24 November 2010; accepted 7 February 2011

### Abstract

This prospective study evaluated the value of laboratorial diagnosis in ocular toxoplasmosis analyzing peripheral blood samples from a group of Brazilian patients by immunologic and molecular methods. We analyzed blood samples from 184 immunocompetent patients with ocular disorders divided into 2 groups: Group I, composed of samples from 49 patients with ocular toxoplasmosis diagnosed by clinical features; Group II, samples from 135 patients with other ocular diseases. Samples were assayed by conventional polymerase chain reaction (cnPCR), real-time PCR (qPCR) for *Toxoplasma gondii*, indirect immunofluorescence reaction (IF), avidity test (crude tachyzoite lysate as antigen), and excreted–secreted tachyzoite proteins as antigen (ESA-ELISA). cnPCR and qPCR profiles were concordant in all samples. Positive PCR was shown in 40.8% of group I patients. The majority of the positive blood samples (75%) were taken from patients with toxoplasmic retinochoroiditis scars, and the others (25%), from patients with retinal exudative lesions. Despite that 86 of the 135 patients from Group II had asymptomatic toxoplasmosis, all DNA blood samples had negative PCR. Concordant results were shown in the data obtained by serologic methods. Around 24% of the patients with ocular toxoplasmosis had high antibody titers determined by ESA-ELISA and IF. Anti-ESA antibodies are shown principally in patients with active infection. Collectively, these data demonstrate the presence of tachyzoites in the blood of patients with chronic infection, supporting the idea of recurrent disease. Circulating parasites in blood of immunocompetent individuals may be associated with the reactivation of the ocular disease.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Ocular toxoplasmosis; ESA-ELISA; Molecular and serologic diagnosis; PCR

## Apêndice 10. Artigo completo publicado no periódico São Paulo Medical Journal

### SHORT COMMUNICATION

# Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em gestantes e seus neonatos na região de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

Cinara de Cássia Brandão de Mattos<sup>1</sup>, Ligia Cosentino Junqueira Franco Spegiorin<sup>2</sup>, Cristina da Silva Melra<sup>3</sup>, Thais da Costa Silva<sup>4</sup>, Ana Iara da Costa Ferrelra<sup>5</sup>, Fabiana Nakashima<sup>6</sup>, Vera Lúcia Perelra-Chioccola<sup>7</sup>, Lutz Carlos de Mattos<sup>8</sup>

Immunogenetics Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

<sup>1</sup>MSc. Doctoral student in Health Sciences, Immunogenetics Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Md, MSc. Doctoral student in Health Sciences, Department of Gynecology and Obstetrics, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), Hospital de Base, Fundação Faculdade Regional de Medicina (Furam), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>MSc. Doctoral student in Sciences, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.

<sup>4</sup>MSc. Immunogenetics Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>5</sup>PhD. Scientific Researcher, Laboratory of Molecular Biology of Parasites, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.

<sup>6</sup>PhD. Full Professor, Immunogenetics Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

#### KEY WORDS:

*Toxoplasma gondii*.  
Serologic tests.  
Pregnancy, high-risk.  
Prenatal diagnosis.  
Neonatal screening.

#### PALAVRAS-CHAVE:

*Toxoplasma gondii*.  
Testes sorológicos.  
Gravidez de alto risco.  
Diagnóstico pré-natal.  
Triagem neonatal.

#### ABSTRACT

**CONTEXT AND OBJECTIVE:** Toxoplasmosis transmission during pregnancy can cause severe sequelae in fetuses and newborns. Maternal antibodies may be indicators of risk or immunity. The aim here was to evaluate seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* (anti-*T. gondii*) Immunoglobulin M (IgM) and Immunoglobulin G (IgG) antibodies and IgG avidity in pregnant women and their newborn infants.

**DESIGN AND SETTING:** Cross-sectional study in a high-risk pregnancy outpatient clinic.

**METHODS:** Serum samples from pregnant women (n = 87) and their respective newborns (n = 87) were evaluated for anti-*T. gondii* antibodies using Indirect Immunofluorescence (IF) (IgM and IgG), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (IgG) and an avidity test.

**RESULTS:** Anti-*T. gondii* antibodies were identified in 64.4% of the serum samples from the mothers and their infants (56/87). Except for two maternal serum samples (2.3%), all others were negative for anti-*T. gondii* IgM antibodies, using IF. The results showed that 92.9% of the pregnant women had high IgG avidity indexes (> 30%) and four samples had avidity indexes between 16 and 30%. Two women in the third trimester of pregnancy were positive for anti-*T. gondii* IgM antibodies; their babies had avidity indexes between 16 and 30%. The avidity indexes of serum from the other 83 newborns were similar to the results from their mothers.

**CONCLUSIONS:** The results showed that 2% of the pregnant women were at risk of *T. gondii* transmission during the gestational period. These data seem to reflect the real situation of gestational toxoplasmosis in the northwestern region of the state of São Paulo.

#### RESUMO

**CONTEXTO E OBJETIVOS:** A toxoplasmose, quando transmitida durante a gestação, pode causar graves sequelas em fetos e neonatos. Anticorpos maternos podem ser indicadores de risco ou de imunidade. O objetivo foi avaliar a positividade dos anticorpos das classes imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) anti-*Toxoplasma gondii* (anti-*T. gondii*), bem como a avididade de IgG em gestantes e seus neonatos.

**TIPO DE ESTUDO E LOCAL:** Estudo transversal em ambulatório de gestação de alto risco.

**MÉTODOS:** Anticorpos anti-*T. gondii* foram avaliados em amostras de soro de gestantes (n = 87) e seus respectivos neonatos (n = 87) com o uso dos métodos imunofluorescência indireta (IFI) (IgM e IgG), ensaio imunoenzimático (ELISA) (IgG) e avididade.

**RESULTADOS:** Anticorpos anti-*T. gondii* foram identificados em 64,4% das amostras de soro das mães e seus bebês (56/87). Com exceção de duas amostras de soro materno (2,3%), todas as demais foram negativas anticorpos IgM anti-*T. gondii* determinado pela IFI. Os resultados mostraram que 92,9% das gestantes tinham índices elevados de avididade de IgG (> 30%) e 4 amostras apresentaram índices de avididade entre 16-30%. Duas gestantes no terceiro trimestre da gravidez eram positivas IgM anti-*T. gondii*; seus bebês apresentaram índices de avididade entre 16 e 30%. Os índices de avididade dos soros dos outros 83 recém-nascidos foram semelhantes àqueles encontrados nas amostras maternas.

**CONCLUSÕES:** Os resultados mostraram que 2% das gestantes estavam sob risco de transmissão de *T. gondii* durante o período gestacional. Estes dados parecem refletir a real situação da toxoplasmose gestacional na região noroeste do Estado de São Paulo.

Apêndice 11. Resumo apresentado e premiado em 1º lugar na apresentação em forma de pôster durante a III Jornada de Ginecologia e Obstetrícia da SOGESP – Região Noroeste/Sudoeste, Centro de Convenções da UNIP, São José do Rio Preto, SP, 2009.

### INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* E FENÓTIPOS DO SISTEMA HISTO-SANGUÍNEO LEWIS: RESULTADOS PRELIMINARES

Nakashima F<sup>1,2</sup>, Mattos CCB<sup>2</sup>, Ferreira AIC<sup>2</sup>, Cintra JR<sup>2</sup>, Spegorin LCJF<sup>3</sup>, Oliani DCM<sup>3</sup>, Oliani AH<sup>3</sup>, Mattos LC<sup>2\*</sup>

1 – Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE–UNESP

2\* – Laboratório de Imunogenética – Departamento de Biologia Molecular – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

3 – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

\* Laboratório de Imunogenética Departamento de Biologia Molecular – FAMERP – Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 - 15090-000 - São José do Rio Preto - SP

e-mail: luiz.carlos@famerp.br

**Introdução:** O *Toxoplasma gondii* infecta os seres humanos utilizando como rota de infecção o trato gastrointestinal humano. Há evidências de que este parasito utiliza moléculas glicosiladas expressas pelo hospedeiro como potenciais receptores para aderir ao epitélio gastrointestinal. O sistema histo-sanguíneo Lewis também se expressa no trato gastrointestinal sob controle dos genes *FUT2* e *FUT3*, por meio da síntese dos antígenos glicosilados Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup>, os quais definem os fenótipos Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-). Estes eventos aparentemente independentes ocorrem no mesmo órgão e podem estar relacionados entre si. Portanto, é possível que a infecção por *T. gondii* seja influenciada pela variabilidade de moléculas resultantes da glicosilação do trato gastrointestinal pelo sistema histo-sanguíneo Lewis. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi investigar a associação entre a infecção por *T.gondii* e o sistema histo-sanguíneo Lewis. **Metodologia:** Duzentas e onze amostras de DNA genômico coletadas de gestantes caucasianas e não caucasianas foram analisadas. As mutações *G428A* do gene *FUT2* e *C314T* do gene *FUT3*, identificadas por PCR-

RFLP e PCR-SSP respectivamente, foram utilizadas para inferir os fenótipos Lewis. A detecção de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii* foi realizada pelo método hemaglutinação indireta. **Resultados:** Das 211 gestantes investigadas 115 (54,5%) mostraram-se reagentes e 96 (45,5%) não reagentes. Das 115 gestantes reagentes, 31 (24%) eram Le(a+b-), 79 (69%) eram Le(a-b+) e 5 (4%) eram Le(a-b-); das 96 não reagentes, 20 (21%) eram Le(a+b-) e 76 (79%), Le(a-b+). Estas diferenças não foram estatisticamente significantes na presença e na ausência de infecção por *T. gondii* ( $p=0,056$  pelo teste exato de Fisher). **Conclusão:** Os resultados parecem indicar ausência de associação entre a infecção por *T. gondii* e o sistema histo-sanguíneo Lewis embora o valor  $p$  tenha se mostrado próximo ao limite de significância para o fenótipo Le(a-b-) em relação aos demais fenótipos Lewis [Le(a+b-) e Le(a-b+)]. É possível que a ocorrência de outras mutações no gene *FUT3*, ainda não investigadas neste trabalho, possam influenciar a relação entre a infecção por *T. gondii* e o sistema histo-sanguíneo Lewis.

Apoio: BAP/FAMERP; CAPES-DS

**Apêndice 12 – Resumo apresentado e premiado em 2º lugar na apresentação em forma de pôster durante a III Jornada de Ginecologia e Obstetrícia da SOGESP – Região Noroeste/Sudoeste, Centro de Convenções da UNIP, São José do Rio Preto, SP, 2009.**

**PREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE GESTACIONAL/CONGÊNITA EM MÃES E SEUS RECÉM-NASCIDOS DE UM HOSPITAL ESCOLA (SUS)**

Spegiorin LCJF; Brandão de Mattos CC; Ferreira AIC; Nakashima F; Meira CS; Gomes AHS; Oliani AH; Pereira-Chioccola VL; Mattos LC

Departamento de Biologia Molecular – FAMERP  
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FAMERP  
Instituto Adolfo Lutz – IAL-SP

Este estudo avaliou a prevalência da toxoplasmose congênita em um grupos de gestantes de baixa renda, atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco, Hospital de Base (FUNFARME). **Material e Método:** em um período de 15 meses foram coletadas 174 amostras de soro de 87 de gestantes com suspeita de infec o por *Toxoplasma gondii* e 87 de sangue de cordão umbilical de seus recém-nascidos. Para a determina o de anticorpos IgM anti-*T. gondii* no soro materno foi utilizado a imunofluorescência indireta (IFI). Todas as amostras foram avaliadas pelo método ELISA e para o teste de avides para IgG. Do total, 13 encontravam-se no 1  trimestre, 35 no 2  trimestre e 38 no 3  trimestre de gravidez. **Resultados:** Do total analisado, 56 gestantes e seus neonatos apresentaram IgG anti-*T. gondii*. Em 40 destas gestantes e seus recém-nascidos, o teste de avides para IgG foi maior que 40%, sugerindo infec o crônica no início da gravidez; em 16 gestantes os valores de avides situaram-se entre 15-39%, sugerindo infec o aguda. Não foram observados resultados com avides abaixo de 15%, possivelmente devido ao encaminhamento tardio ao serviço de gesta o de alto risco (durante ou depois do 2  trimestre. Apenas duas gestantes apresentaram sorologia IgM positiva determinada pelo método IFI. **Conclusão:** O uso de métodos de boa sensibilidade e especificidade em fase gestacional precoce   grande importância para o avalia o dos riscos de transmissão congênita do *T. gondii*.

Palavras-chaves: toxoplasmose congênita; prevalência; gestantes de alto risco;

*Toxoplasma gondii*

Apoio: BAP-FAMERP, CAPES & FAPESP

**Apêndice 13 – Resumo apresentado em forma de pôster durante o XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – MEDTROP 2010 – Foz do Iguaçu, PR, 2010.**

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Toxoplasma gondii* EM PACIENTES ATENDIDOS EM UM AMBULATÓRIO DE OFTALMOLOGIA DA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO.**

Ana Iara C Ferreira<sup>1</sup>; Cinara CB Mattos<sup>1</sup>; Fábio B Frederico<sup>2</sup>; Gildásio C Almeida Junior<sup>2</sup>; Fabiana Nakashima<sup>1</sup>; Daniela PT Nunes<sup>1</sup>; Cristina S Meira<sup>3</sup>; Vera L Pereira-Chiocola<sup>3</sup>; Luiz C de Mattos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética – Departamento de Biologia Molecular – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP;

<sup>2</sup>Ambulatório de Oftalmologia – Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto – FUNFARME;

<sup>3</sup>Instituto Adolfo Lutz – IAL – São Paulo.

Apoio financeiro: CNPq (473579/2009-0); FAPESP (08/09311-0), CAPES-DS.

**Introdução**

A toxoplasmose ocular é uma das mais importantes causas de uveítes posteriores, resultante da infecção por *Toxoplasma gondii*, podendo ser congênita ou adquirida. Suas manifestações clínicas podem ser precoces ou tardias, causando lesões graves e irreversíveis, portanto, o diagnóstico precoce é fundamental para que se aplique a intervenção adequada.

**Objetivo**

Verificar a prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em pacientes atendidos em um Ambulatório de Oftalmologia.

**Material e métodos**

Após esclarecimento e obtenção do termo de consentimento, foram entrevistados 198 pacientes de ambos os sexos e de diferentes faixas etárias, atendidos no Ambulatório de Oftalmologia da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto, serviço público de saúde (SUS) da região noroeste paulista. No período de abril a novembro de 2009, foram coletadas amostras de sangue periférico para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.gondii*; os testes foram feitos em microplacas de ELISA, sensibilizadas com antígenos específicos para cepa RH produzidos “in-house”.

**Resultados**

Dos pacientes selecionados 100 eram do sexo masculino e 98 do sexo feminino e a média de idade foi igual a 56,7 anos (SD ±15,8). Do total de 198 amostras analisadas, 77,8% (154/198) mostraram-se reagentes e 22,2% (44/198) não reagentes para anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

**Conclusão**

Os resultados mostram que a prevalência de sorologia reagente para *T. gondii* é elevada entre os pacientes selecionados e que a mesma pode estar relacionada à infecção congênita ou adquirida da infecção por este parasito Apicomplexa.

**Apêndice 14 – Resumo apresentado em forma de pôster durante o XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – MEDTROP 2010 – Foz do Iguaçu, PR, 2010.**

**FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM PACIENTES ATENDIDOS EM UM AMBULATÓRIO DE OFTALMOLOGIA, (SUS) DA “REGIÃO DOS GRANDES LAGOS”, NOROESTE PAULISTA.**

Ana Iara C Ferreira<sup>1</sup>; Cinara CB Mattos<sup>1</sup>; Fábio B Frederico<sup>2</sup>; Gildásio C Almeida Junior<sup>2</sup>; Vera L Pereira-Chioccola<sup>3</sup>; Luiz C de Mattos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunogenética – Departamento de Biologia Molecular – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP;

<sup>2</sup>Ambulatório de Oftalmologia – Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto – FUNFARME;

<sup>3</sup>Instituto Adolfo Lutz – IAL – São Paulo.

Apoio financeiro: CNPq (473579/2009-0); FAPESP (08/09311-0), CAPES-DS.

**Introdução**

*Toxoplasma gondii*, o agente etiológico da toxoplasmose, além de infectar grande número de indivíduos, pode afetar a retina dando origem a toxoplasmose ocular. A forma de infecção pode ser adquirida ou congênita. A região noroeste paulista é também conhecida como “Região dos Grandes Lagos”, pelo grande número de lagos artificiais, naturais e rios.

**Objetivo**

Relatar os fatores de risco para a infecção por *T. gondii* de pacientes de um ambulatório de oftalmologia.

**Material e métodos**

Foram entrevistados 198 pacientes atendidos no Ambulatório de Oftalmologia da FUNFARME, hospital escola (SUS), anotados fatores de risco, num período de 8 meses. Para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.gondii* foi utilizado o teste de ELISA em microplaca.

**Resultados**

Apresentaram sorologia reagente 77,8% (154/198) e 22,2% (44/198) não reagente. Relataram história prévia de transfusão de sangue 20,2% (40/198); 36,9% (73/198) ingerir carne crua ou mal cozida; 50,5% (100/198) ingerir leite cru; 96,5% (191/198) afirmaram lavar corretamente os alimentos e 46,5% (92/198) fazer o uso de água filtrada; 79,3% (157/198) possuir algum tipo de animal doméstico; 94,4% (187/198) residir na zona urbana, entretanto, desses 33,2 % (62/187) alegaram já ter morado na zona rural. Quanto ao tipo de moradia: 99,5% (197/198) vivem em casa de alvenaria; 73,7% (146/198) possuem casa própria; 93,9% (186/198) usufruem de saneamento básico; 27,3% (54/198) têm o hábito de andar descalço no solo e 23,7% (47/198) relataram a presença de rato, barata ou mosca em suas residências.

**Conclusão**

Os fatores de risco descritos esclarecem os hábitos populacionais e despertam a atenção para a necessidade de um trabalho educacional de prevenção para os habitantes desta região.

**Apêndice 15 – Resumo apresentado em forma de pôster durante o V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia – Guarulhos, SP, 2010.**



4, (Esp. 1), 2010

**CORIORRETINITE TOXOPLÁSMICA E SISTEMAS HISTO-SANGUÍNEOS ABO E DUFFY.**

ANA IARA C FERREIRA<sup>1</sup>; CINARA C BRANDÃO DE MATTOS<sup>1</sup>; FÁBIO B FREDERICO<sup>2</sup>; GILDÁSIO C ALMEIDA JUNIOR<sup>2</sup>; CRISTINA S MEIRA<sup>3</sup>; VERA L PEREIRA-CHIOCCOLA<sup>3</sup>; LUIZ C DE MATTOS<sup>1</sup>.

A coriorretinite toxoplásmica, doença resultante da infecção por *Toxoplasma gondii*, caracteriza-se pela presença de necroses retinianas e edema coroidal. A sorologia reagente para *T. gondii* pressupõe que os indivíduos afetados tenham sido expostos a este parasito apicomplexa. Recentes estudos sugeriram que o *T. gondii* utiliza moléculas glicosiladas como potenciais receptores para a invasão celular. O objetivo deste estudo foi investigar se há associação entre a coriorretinite toxoplásmica e os sistemas histo-sanguíneos ABO e Duffy, os quais se caracterizam pela expressão de antígenos glicosilados nos eritrócitos e em outros tecidos. Cento e noventa pacientes atendidos no Ambulatório de Oftalmologia da FUNFARME foram selecionados e divididos em dois grupos de acordo com a presença (G1; n=44) ou ausência (G2; n=146) de lesão e/ou cicatriz coriorretiniana. Todos apresentavam anticorpos IgG anti-*T. gondii* da cepa RH determinados por ELISA. Após receberem explicações detalhadas sobre os objetivos do estudo, todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Uma amostra de sangue foi coletada de cada paciente. A identificação dos fenótipos eritrocitários ABO e Duffy foram realizadas pelos métodos em tubo e gel centrifugação (Diamed, Brasil), respectivamente. O teste qui-quadrado foi usado para comparar as frequências dos fenótipos entre os grupos. As frequências dos fenótipos eritrocitários A, B, AB e O foram iguais a 52,3% (n=23), 4,5% (n=2), 2,3% (n=1) e 40,9% (n=18) para G1 e 41,1% (n=60), 13,0% (n=19), 1,4% (n=2) e 44,5% (n=65) para G2 ( $\chi^2$ : 3,436; p=0,3292; GL 3), respectivamente. As frequências dos fenótipos eritrocitários Fy(a+b+), Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a-b-) foram iguais a 36,4% (n=16), 25,0% (n=11), 31,8% (n=14) e 6,8% (n=3) para G1 e 35,6% (n=52), 22,6% (n=33), 36,3% (n=53) e 5,5% (n=8) para G2 ( $\chi^2$ : 0,3866; p=0,9430; GL 3), respectivamente. Os resultados demonstram que não há associação entre a coriorretinite toxoplásmica e os fenótipos eritrocitários ABO e Duffy. Palavras-chave: Toxoplasmose ocular; *Toxoplasma gondii*; sistema ABO, sistema Duffy, grupos sanguíneos humanos; coriorretinite toxoplásmica. Suporte: CNPq 473579/2009-0; CAPES e FAPESP 2009/17540-2.

**Apêndice 16 – Resumo apresentado e premiado em 3º lugar na apresentação em forma de pôster durante o V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia – Guarulhos, SP, 2010.**



4, (Esp. 1), 2010

### **AUSÊNCIA DOS ANTÍGENOS Lea E Leb NO TRATO GASTRINTESTINAL ESTÁ ASSOCIADA À INFECÇÃO POR TOXOPASMA GONDII DA CEPA RH EM GESTANTES**

FABIANA NAKASHIMA<sup>1</sup>; CINARA C. BRANDÃO DE MATTOS<sup>1</sup>; ANA IARA C. FERREIRA<sup>1</sup>;  
LÍGIA C. J. F. SPERGIORIN<sup>2</sup>; CRISTINA S. MEIRA<sup>3</sup>; VERA L. PEREIRA-CHIOCCOLA<sup>3</sup>; LUIZ C. DE MATTOS<sup>4</sup>

A interação entre os genes FUT2 (19q13.3) e FUT3 (19p13.3) resulta na síntese dos antígenos Lea e Leb, os quais determinam os fenótipos Le(a+b-), Le(a+b+) e Le(a-b-) do sistema histo-sanguíneo Lewis no trato gastrointestinal. Este local é utilizado por *Toxoplasma gondii* como rota de infecção. Considerando tais eventos, este trabalho investigou a associação entre os fenótipos Lewis e a infecção por *T. gondii* da cepa RH. Dois grupos (reagentes [n=116] e não reagentes [n=79]) de gestantes foram constituídos de acordo com os resultados concordantes dos testes hemaglutinação indireta e ELISA, utilizados na identificação de anticorpos IgG anti-*T. gondii* da cepa RH. A determinação dos fenótipos Lewis foi inferida a partir da genotipagem das mutações G428A do gene FUT2 e T202C e C314T do gene FUT3 por PCR-RFLP e PCR-SSP, respectivamente. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparação das frequências dos fenótipos Lewis entre os grupos analisados. No grupo reagente, 18 (100%) apresentaram o fenótipo Le(a-b-), 30 (71,4%) o Le(a+b-) e 68 (50,4%), Le(a+b+); no grupo não reagente, 12 (28,6%) eram Le(a+b-) e 67 (49,6%) Le(a+b+). As frequências dos fenótipos Lewis apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ( $p < 0,0001$ ;  $\chi^2 = 19,400$ ; 2 GL). O fenótipo Le(a-b-) mostrou-se associado à presença de infecção por *T. gondii* da cepa RH em comparação aos demais fenótipos Lewis [Le(a-b-) VS Le(a+b-),  $p = 0,0118$ ; Le(a-b-) VS Le(a+b+),  $p = 0,0001$ ]. O percentual de infecção também foi maior no fenótipo Le(a+b-) que no Le(a+b+) [Le(a+b-) VS Le(a+b+),  $p = 0,0206$ ]. Os resultados demonstram que o fenótipo Le(a-b-) está fortemente associado à infecção por *T. gondii* da cepa RH e é possível que a ausência dos antígenos Lea e Leb neste fenótipo favoreça a infecção em gestantes. Além disso, as variações estruturais dos antígenos Lewis podem estar relacionadas à suscetibilidade diferencial à infecção nas gestantes portadoras dos fenótipos Le(a+b-) e Le(a+b+). Apoio: BAP-FAMERP; CAPES; CNPq e FAPESP

**Apêndice 17 – Resumo apresentado em forma de pôster durante o V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia – Guarulhos, SP, 2010.**



4, (Esp. 1), 2010

**AVALIAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO DE PACIENTES COM TOXOPLASMOSE OCULAR PROVENIENTES DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

CRISTINA S. MEIRA<sup>1</sup>, CINARA C. BRANDÃO DE MATTOS<sup>2</sup>, ANA IARA C. FERREIRA<sup>2</sup>,  
ROBERTO M. HIRAMOTO<sup>1</sup>, FÁBIO B. FREDERICO<sup>3</sup>, GILDÁSIO C. ALMEIDA JR.<sup>3</sup>,  
LUIZ C. DE MATTOS<sup>2</sup>, VERA LUCIA PEREIRA-CHIOCCOLA<sup>1</sup>

A toxoplasmose ocular é resultante de infecção congênita ou adquirida por *Toxoplasma gondii*. Cerca de 20% dos casos de infecção adquirida evoluem para retinocoroidite. O diagnóstico laboratorial auxilia o diagnóstico clínico principalmente quando o quadro é atípico. Os níveis de anticorpos podem ser baixos mesmo na ocorrência da doença ocular grave, sendo os testes sorológicos utilizados para confirmar a exposição prévia ao parasita ou excluir a doença. Este estudo avalia o perfil sorológico de pacientes com toxoplasmose ocular da região de São José do Rio Preto-SP, empregando-se diferentes metodologias e antígenos de *T. gondii*. Foram analisados 38 soros de pacientes com diagnóstico clínico de toxoplasmose ocular. Os imunoenaios para avaliar IgG anti-*T. gondii* foram: i. RIFI, com antígenos de taquizoítos íntegros formalizados em lâminas; ii. ELISA, utilizando antígeno de lisado bruto de taquizoítos (TCL); iii. Teste de avidéz, por ELISA em quadruplicata e tratado com uréia 6M; e iv. ESA-ELISA, utilizando como antígeno as proteínas excretadas-secretadas de taquizoítos (ESA), obtidos de sobrenadantes de culturas de tecidos infectadas com taquizoítos, que diferenciam a infecção ativa. ESA-ELISA foi expressa por valores relativos (VR= DO amostra/DOcut-off) e o teste de avidéz em porcentagem. ELISA e teste de avidéz mostraram que todos os pacientes foram positivos, com altos índices de avidéz (60 a 97%) indicando estarem na fase crônica de infecção. A RIFI mostrou que maioria dos pacientes 47,4% (N=18) apresentou títulos baixos (16); títulos intermediários (32-512) foram observados em 34,2% (N= 13) e títulos altos (>1024) em 18,4% (N=7) dos pacientes. ESA-ELISA foi negativa em 10 (26,3%) pacientes. Valores intermediários (VR até 6) foram observados em 23 (60,5%) e altos (VR acima de 7) em 5 pacientes (13,2%). Estes dados mostram que a maioria dos pacientes com toxoplasmose ocular apresenta baixos títulos de anticorpos séricos e baixa parasitemia como determinada pela ESA-ELISA. Suporte: FAPESP (processos: 2008/09311-0, 2009/09168-6 e 2009/17540-2); CNPq (processo: 473579/2009-0) e CAPES.

**Apêndice 18 – Resumo apresentado e premiado em 2º lugar na apresentação em forma de pôster durante o V Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia – Guarulhos, SP, 2010.**



4, (Esp. 1), 2010

**GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE *TOXOPLASMA GONDII*  
PROVENIENTES DE PACIENTES COM TOXOPLASMOSE OCULAR RESIDENTES  
EMSÃO JOSE DO RIO PRETO, SÃO PAULO, BR**

ISABELLE M. R. FERREIRA,<sup>1</sup> CINARA C. BRANDÃO DE MATTOS<sup>2</sup>,  
ANA IARA C FERREIRA<sup>2</sup>, FÁBIO B. FREDERICO<sup>3</sup>, GILDÁSIO C. ALMEIDA JR.<sup>3</sup>,  
LUIZ C. DE MATTOS<sup>2</sup>, VERA LUCIA PEREIRA-CHIOCCOLA<sup>1</sup>

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo *Toxoplasma gondii*, apresentando diferentes formas clínicas dentre elas a ocular. Esta forma é uma das mais importantes causas mundiais de uveítes posteriores (retinocoroidite). Pode ser de origem congênita com manifestações clínicas precoces ou tardias, ou ainda ser adquirida após o nascimento. A manifestação ocular mais comum é a retinocoroidite granulomatosa necrotizante que pode vir acompanhada de outras alterações oculares. As análises genéticas de populações de *T. gondii* são de extrema importância médica tais como, compreender padrões epidemiológicos, diferentes manifestações da doença e servir de suporte para novas estratégias como vacinação, tratamento e diagnóstico. Este estudo investigou as características genéticas de 10 amostras clínicas provenientes de pacientes com toxoplasmose ocular. Todos foram provenientes pacientes da região de São Jose do Rio Preto, no estado de São Paulo. As amostras de DNA extraídas de sangue foram previamente encaminhadas para o laboratório para realizar o diagnóstico molecular da toxoplasmose e apresentaram resultados positivos na PCR, utilizando-se os iniciadores B22 e B23 do gene B1 de *T. gondii*. As genotipagens foram determinadas por PCR-RFLP utilizando 11 marcadores genéticos: SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2 e Apico. Os produtos de PCR foram digeridos com enzimas de restrição e analisados em gel de agarose por eletroforese. Foram utilizadas 9 cepas como controle (GTI, RH, PTG, ME49, CTG, VEG, COUGAR, MAS, TgCatBr5) com padrões genotípicos conhecidos. As análises genéticas mostraram que os 10 pacientes albergavam cepas polimórficas, embora duas delas apresentaram um único genótipo em 9 loci genéticos. Estes dados indicam uma elevada taxa de recombinação entre os arquétipos I, II e III. Tais características podem estar correlacionadas com a severidade da doença observada em pacientes brasileiros. Financiamentos FAPESP- Processos nº 2008/09311-0 e 2009/05505-8; CNPq - Proc 301531/2009-9.

Apêndice 19 – Resumo apresentado na forma oral durante XII th International Congress of Parasitology 2010 – Melbourne, Austrália.

206

**HLA-DRB1\*01 AND HLA-DRB1\*03 ALLELES AS RISK FACTORS TO TOXOPLASMIC RETINOCHOROIDITIS**

**L. C. De Mattos<sup>1</sup>, J. R. Cintra<sup>1</sup>, A. I.C. Ferreira<sup>1</sup>, C. C. Brandão De Mattos<sup>1</sup>, F. B. Frederico<sup>2</sup>, G. C. Almeida Jr<sup>2</sup>, V. L. Pereira-Chioccola<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Molecular Biology Department / Immunogenetics Laboratory, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil*

<sup>2</sup>*Ophthalmology Outpatient Clinic, Fundação Faculdade Regional de Medicina - FUNFARME, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil*

<sup>3</sup>*Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz - IAL, São Paulo, São Paulo, Brazil*

The HLA class I and II genes control the immune response and influence the susceptibility and resistance to infectious/parasitic diseases. The toxoplasmic retinochoroiditis (TR), a disease characterized by ocular sequelae, is linked to the *Toxoplasma gondii* infection and seems to be dependent on the infecting strains and the genetic traits of the hosts. This study aimed to verify if HLA-DRB1 alleles are risk factors for TR. Three groups of individuals were enrolled: 40 patients with TR (G1), 48 patients without ocular lesions (G2), and 196 bone marrow voluntary donors (G3). G1 and G2 received medical attention in the Ophthalmology Outpatient Clinic of the teaching Hospital de Base (FUNFARME) and all of them had ELISA IgG anti-*T. gondii* reagent specific for RH strain. G3 presented no clinical evidences of ocular lesions. The diagnosis of TR was performed in a routine ophthalmoscopic examination by an expert ophthalmologist (FBF) taking into account the retina visualization and the description of the characteristic, the site and the size of lesions. The HLA DRB1 genotyping was assayed by PCR-SSOP low resolution method using the genomic DNA extracted from white blood cells. The Exact Fisher's test was used to assess the significance of the proportions among the groups ( $p \leq 0.05$ ). The frequency of HLA-DRB1\*01 allele was associated with high risk to develop TR in G1 when compared with G2 (OR: 2,934; IC 95%: 1,132-7,607;  $p=0.0375$ ) and G3 (OR: 2,687; IC 95%: 1,374-5,256;  $p=0.0061$ ). On the other hand, the frequency of HLA-DRB1\*03 was associated with low risk to develop TR in G2 when compared with G3 (OR: 0.4382; IC 95%: 0.2365-0.8119;  $p=0.0108$ ). These results suggest that the HLA-DRB1\*01 and HLA-DRB1\*03 alleles could affect the nature of the immune response to *T. gondii* RH strains modifying the susceptibility and resistance for the development of TR, respectively.

Partially supported: CNPq (grant 473579/2009-0); CAPES and FAPESP (grant 2009/17540-2).

Apêndice 20 – Resumo apresentado em forma de pôster durante XII  
th International Congress of Parasitology 2010 – Melbourne, Austrália.

1530

**VALUE OF THE LABORATORIAL DIAGNOSIS OF OCULAR TOXOPLASMOSIS IN BRAZILIAN PATIENTS**

C. C.B. Mattos<sup>2</sup>, C. S. Meira<sup>1</sup>, A. I.C. Ferreira<sup>2</sup>, F. B. Frederico<sup>3</sup>, R. M. Hiramoto<sup>1</sup>, G. C. Almeida Jr<sup>3</sup>, L. C. Mattos<sup>2</sup>, V.L. Pereira-Chioccola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz, Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil*

<sup>2</sup>*Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Laboratório de Imunogenética, São José do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil*

<sup>3</sup>*Fundação Faculdade Regional de Medicina-Hospital de Base, Ambulatório de Oftalmologia, São José do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil*

The chronic form of toxoplasmosis exists in up to one-third of the human population. Only 10-20% of cases of *T. gondii* infection are symptomatic and most of them result in retinochoroiditis. In Brazil, the ocular form is responsible for 50-80% of the cases. We have shown that PCR and ESA-ELISA (using excreted-secreted tachyzoite proteins as antigen) were able to distinguish patients with the active infection as in cerebral toxoplasmosis from those sera-positive individuals. This study evaluated the value of the laboratorial diagnosis in ocular toxoplasmosis, including the molecular and the serological tests using peripheral blood samples. We prospectively analyzed blood samples from 184 patients with ocular disorders divided into two groups. The Group I was composed of samples from 49 patients with ocular toxoplasmosis diagnosed by clinical features. The Group II was formed with samples from 135 patients with other ocular diseases. Samples were assayed using conventional and real-time PCR for *T. gondii*; indirect immunofluorescence (IF); ELISA-avidity test (crude tachyzoite lysate as antigen); and ESA-ELISA. Conventional and Real-Time PCR were concordant in all samples. Sensitivity and specificity for both methodologies for diagnosis of ocular toxoplasmosis in blood were 38.8% and 100% respectively. All sera from Group I had anti *T. gondii* IgG antibodies. High titles were shown in 22.4% (11 patients) of them. Additionally, high antibody titles determined by ESA-ELISA, which could be correlated with active infection, were shown in 12 patients (24.5%). Out of the 135 patients of the Group II, 86 (63.7%) were sera-positive for toxoplasmosis, but none had active infection (detected by ESA-ELISA and PCR). ELISA-avidity test detected anti-*T. gondii* IgG antibodies with high avidity in 100% of the sera (both groups). These findings showed that the serological and molecular diagnosis, determined in blood, had low value for the diagnosis of ocular toxoplasmosis, since the majority of patients present low titers of anti-*T. gondii* IgG antibodies. However, 20-40% of them had parasite in the blood, which could be associated with the reactivation of the ocular disease.

Support: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo, Brazil). Proc-2008/09311-0, 2009/17540-2, Brazil); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 301531/2009-9, 473579/2009-0, 453012/2010-8, Brazil) and CAPES.

Apêndice 21 – Resumo apresentado em forma de pôster durante XII  
th International Congress of Parasitology 2010 – Melbourne, Austrália.

917

**LE(A-B-) PHENOTYPE IS ASSOCIATED TO *TOXOPLASMA GONDII* RH STRAIN INFECTION IN BRAZILIAN PREGNANT WOMEN.**

F. Nakashima<sup>1</sup>, C. C. Brandão De Mattos<sup>1</sup>, A. I.C. Ferreira<sup>1</sup>, L. C.J. Spegiorin<sup>2</sup>, C. S. Meira<sup>3</sup>, V. L. Pereira-Chioccola<sup>3</sup>, L. C. De Mattos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology / Immunogenetics Laboratory, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Department of Gynecology and Obstetrics Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP / Hospital de Base - FUN, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, São Paulo, Brazil

FUTIII enzyme coded by *FUT3* gene (19p13.3) synthesizes Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup> antigens in the gastro intestinal tract, a usual route of infection by *Toxoplasma gondii*. The adsorption of these antigens to erythrocytes determines the phenotypes Le(a+b-) and Le(a-b+), but the lack of them allows the expression of Le(a-b-). This study aimed to verify if the Lewis phenotypes are associated with infection by *T. gondii* RH strain among Brazilian pregnant women. 195 pregnant women who received medical attention at the High Risk Pregnancy Outpatient Clinic of the teaching Hospital de Base (FUNFARME) were enrolled. They were separated according to the presence (G1: n=116) and the absence (G2: n=79) of anti-*T. gondii* antibodies specific for RH strain. Only cases with concordant results determined by indirect hemagglutination and ELISA were considered for analysis. The Lewis phenotypes were inferred from the genotyping of *FUT2* gene (G428A SNP) and *FUT3* gene (T202C and C314T SNPs) using PCR-RFLP and PCR-SSP, respectively. The chi-square, the exact Fisher test and the Odds Ratio values were used to compare the frequencies between the groups. The frequencies of the Lewis phenotypes in G1 were: Le(a-b-) 15.5% (n=18), Le(a+b-) 25.9% (n=30) and Le(a-b+) 58.6% (n=68); in G2 were Le(a-b-) 0% (n=0); Le(a+b-) 15.2% (n=12) and Le(a-b+) 84.8% (n=68) ( $\chi^2$  19,400; p<0,0001; DF 2). The differences in the frequencies of Le(a-b-) were statistically significant when compared with Le(a+b-) [p=0,0118; OD=15.165; IC 95%=0,8463-271.710] and Le(a-b+) [p=0,0001; OD=36.460; IC 95%=2.152-617.680]. The results show that the Le(a-b-) is associated with the presence of anti-*T. gondii* RH strain antibodies. It can be presumed that the absence of Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup> antigens increases the risk of infection by *T. gondii* RH strain among Brazilian pregnant women.

Key words: Lewis histo-blood group system; *Toxoplasma gondii*; toxoplasmosis; *FUT3*; *FUT2*; pregnancy.

Financial support: BAP-FAMERP; CAPES; CNPq

**Apêndice 22 – Resumo apresentado em forma de pôster durante The Eleventh International Congress on Toxoplasmosis 2011 – Ottawa, Canada.**

**A23. High expression of Le<sup>a</sup> antigen is associated with toxoplasmic retinochoroiditis**

Ferreira AIC<sup>1</sup>, Frederico FB<sup>2</sup>, Bernardo CR<sup>1</sup>, Brandão de Mattos CCB<sup>1</sup>, Almeida Jr GC<sup>2</sup>, Meira CS<sup>3</sup>, Pereira-Chiocola VL<sup>3</sup>, Mattos LC<sup>1\*</sup>.

1. Immunogenetics Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.
2. Ophthalmology Outpatient Clinic, Fundação Faculdade Regional de Medicina – Hospital de Base - FUNFARME, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.
3. Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, São Paulo, Brazil.

*Toxoplasma gondii* is a worldwide parasite infecting warm-blooded animals including humans. To penetrate the intracellular environment *T. gondii* releases micronemal proteins which bind carbohydrates expressed by the host cell. The Lewis a antigen (Le<sup>a</sup>), a monofucosylated oligosaccharide, is highly expressed by individuals carrying both the G428A SNP in the *FUT2* gene (19q13.3) and a functional  $\alpha$ 3/4-fucosyltransferase (FUTIII) coded by *FUT3* gene (19p13.3). This antigen belongs to the lactoseries of carbohydrates which are expressed in the vertebrate retinal. Besides, Le<sup>a</sup> has been mentioned as receptor for some microorganisms. This study aimed to verify if the Le<sup>a</sup> antigen is associated with TR. 256 patients who have received medical attention at Ophthalmology Outpatient Clinic from FUNFARME were enrolled. TR diagnosis was performed in a routine ophthalmoscopic examination by an expert ophthalmologist taking into account the retina visualization and the description of the characteristic, the site and the size of lesions. From the overall, 71 patients presented active lesions and or retinal scars (Group 1) and 185, other ocular diseases no related to *T. gondii* infection (Group 2). All of them had ELISA IgG anti-*T. gondii* reagent. The identification of Le<sup>a</sup> antigen was assayed by gel centrifugation test and the G428A SNP of the *FUT2* gene (AA genotype) was identified by PCR-RFLP. The exact Fisher test was used to assess the significance of the proportions between the groups ( $p \leq 0.05$ ). The high expression of Le<sup>a</sup> antigen was modestly associated with the risk for development of TR (OR: 2.049; CI 95%: 1.057-3.971;  $p=0.0461$ ). The results indicate a border line effect of the high expression of Le<sup>a</sup> antigen for TR. Maybe the expression of this antigen in retinal cells could facilitate the binding of micronemal proteins allowing the infection by *T. gondii* and giving additional contribution towards development of TR.

**Financial support:** Brazilian Ministry of Science and Technology – CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) grant #473579/2009-0, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) grant #2009/17540-2 and Brazilian Ministry of Education – CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) PhD scholarship

**Apêndice 23 – Resumo apresentado em forma de pôster durante The Eleventh International Congress on Toxoplasmosis 2011 – Ottawa, Canada.**

**A13. Epidemiological data from 5 patients with toxoplasmic retinochoroiditis and infected by toxodb#65 strain**

Brandão de Mattos CCB<sup>1</sup>, Frederico FB<sup>2</sup>, Ferreira AIC<sup>1</sup>, Bernardo CR<sup>1</sup>, Ferreira IMR<sup>3</sup> Pereira-Chiocola VL<sup>3</sup>, Mattos LC<sup>1\*</sup>.

1. Immunogenetics Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.
2. Ophthalmology Outpatient Clinic, Fundação Faculdade Regional de Medicina – Hospital de Base – FUNFARME, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
3. Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, São Paulo, Brazil

Toxoplasmic retinochoroiditis (TR) is the most common ocular lesion caused by *Toxoplasma gondii* and may occur after the congenital/acquired infection immediately or lately by reactivation. The lesions are often necrotic destroying the architecture of the neural retina and sometimes involving the choroid. It has been reported as more severe in Brazil than in Europe. Here we report epidemiological findings from 5 Brazilian patients (3 women and 2 men) with TR living in a country region of São Paulo State. Serological and molecular diagnosis were made. Next, multilocus PCR-RFLP was used to genotype the *T. gondii* DNA isolates, using the genetic markers SAG1, SAG2 (5'-and 3') newSAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, c29-2, L358, PK1 and Apico. Epidemiological data like age, education, eating habits, pets, among others were collected. All of them were positive for anti-*T. gondii* IgG antibodies, determined by ELISA and indirect immunofluorescence; and for PCR, using a specific region from gene B1as target. The isolates were characterized as toxodb#65 strain, a usual Brazilian *T. gondii* genotype. The patients lived in small cities nearby São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil, in urban areas with sewage and reported drinking tap water. Among them, 4 received less than 2 minimum wages and 1 was unemployed; in some moment of his lives, 2 received blood transfusion, 4 had pets (cats and dogs), 2 usually barefoot, 3 drank crude milk, 2 ate undercooked or raw meat, 1 had higher education and 4 had less than 8 years of schooling. These results show that TR in the country region of Sao Paulo affecting mainly low income community and low school level. Besides, it confirms that eating habits and pets are associated with the infection by *T. gondii*.

Support: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Proc 2008/09311-0, 2009/17540-2, Brazilian Ministry of Science and Technology – CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) Proc 301531/2009-9, 473579/2009-0 and Brazilian Ministry of Education – CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) PhD scholarship.

**Apêndice 24 – Resumo apresentado na forma oral durante The Eleventh International Congress on Toxoplasmosis 2011 – Ottawa, Canada.**

**8C. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients**

Cinara CB Mattos<sup>1\*</sup>, *Cristina S Meira*<sup>2</sup>, Ana IC Ferreira<sup>1</sup>, Fábio B Frederico<sup>3</sup>, Roberto M Hiramoto<sup>2</sup>, Gildásio C Almeida-Júnior<sup>3</sup>, Luiz C Mattos<sup>1</sup>, Vera L Pereira-Chioccola<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Immunogenetics Laboratory, Department of Molecular Biology, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto. <sup>2</sup>Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz - São Paulo. <sup>3</sup>Ophthalmology Outpatient Clinic, Fundação Faculdade Regional de Medicina – Hospital de Base, São José do Rio Preto. São Paulo, Brazil. E. mail: [mattosci@gmail.com](mailto:mattosci@gmail.com)

This prospective study evaluated the value of laboratorial diagnosis in ocular toxoplasmosis analyzing peripheral blood samples from a group of Brazilian patients by immunological and molecular methods. We analyzed blood samples from 184 immune competent patients with ocular disorders divided into two groups: Group I, composed of samples from 49 patients with ocular toxoplasmosis diagnosed by clinical features; Group II, samples from 135 patients with other ocular diseases. Samples were assayed by conventional PCR (cnPCR); real-time PCR (qPCR) for *T. gondii*; indirect immunofluorescence reaction (IF); avidity test (crude tachyzoite lysate as antigen); and ESA-ELISA (excreted-secreted tachyzoite proteins as antigen). cnPCR and qPCR profiles were concordant in all samples. Positive PCR was shown in 40.8% of group I patients. The majority of the positive blood samples (75%) were taken from patients with toxoplasmic retinochoroiditis scars; and the others (25%), from patients with retinal exudative lesions. Despite that 86 of the 135 patients from Group II had asymptomatic toxoplasmosis, all DNA blood samples had negative PCR. Concordant results were shown in the data obtained by serological methods. Around 24% of the patients with ocular toxoplasmosis had high antibody titers determined by ESA-ELISA and IF. Anti-ESA antibodies are shown principally in patients with active infection. Collectively, these data demonstrate the presence of tachyzoites in the blood of patients with chronic infection, supporting the idea of recurrent disease. Circulating parasites in blood of immune competent individuals may be associated with the reactivation of the ocular disease.

Support: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Proc 2008/09311-0, 2009/09168-6, 2009/17540-2); CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Proc 301531/2009-9, 473579/2009-0) and BAP-FAMERP.

---

## **Referências dos Apêndices**

## 6. Referências dos apêndices

1. Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64(3):607-23.
2. Morrissette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66(1):21-38.
3. Speer CA, Dubey JP. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology* 1998;116:35-42.
4. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(2):267-99.
5. Rey L. Toxoplasmose. In:\_\_\_\_\_ Bases de parasitologia médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 102-11.
6. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363(9425):1965-76.

7. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect 2002;8:634-40.
8. Lynfield R, Guerina NG. Toxoplasmosis. Pediatr Rev 1997;18:75-83.
9. Dubey JP. Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis. Vet Parasitol 2004;126:57-72.
10. Ferreira MS. Infections by protozoa in immunocompromised hosts. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;95 Sup I:159-62.
11. Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Tropica 2002;81(2):111-22.
12. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 2000;30:1217-58.

13. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis* 1994;18:853-62.
14. Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med* 2005;118:212-6.
15. Jones J, Lopez A, Wilson M. Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Phys* 2003;67(10):2131-8.
16. Greenwell P. Review – Blood group antigens: molecules seeking a function?. *Glycoconj J* 1997;14:159-73.
17. Owen R. Karl Landsteiner and the first human marker locus. *Genetics* 2000;155:995-8.
18. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med* 2001;11:243-65.

19. Oriol R. ABO, Hh, Lewis, and Secretion – serology, genetics, and tissue distribution. In: Cartron JP, Rouger P, editores. Blood cell biochemistry: molecular basis of major human blood group antigens. New York: Plenum Press; 1995. p. 37-73.
  
20. Garratty G. Association of blood groups and disease: do blood group antigens and antibodies have a biological role?. *Hist Phil Life Sci* 1996;18:321-44.
  
21. Henry S, Samuelsson B. ABO Polymorphisms and their putative biological relationships with disease. In: King MJ, editor. Human blood cells – consequences of genetic polymorphisms and variations. London: Imperial College Press; 2000. p. 15-103.
  
22. Beiguelman B. O sistema ABO, a secreção de substâncias ABH e o sistema Lewis. In: Duarte FAM, Jong D, editores. Os sistemas sanguíneos eritrocitários. Ribeirão Preto: Funpec; 2003. p. 43-83.
  
23. Nydegger EU, Tevaeearai H, Berdat P, Rieben R, Carrel T, Mohacsi P, et al. Histo-blood group antigens as allo-and autoantigens. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:40-51.

24. Clausen H, Hakomori SI. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* 1989;56:1-20.
25. Daniels G. ABO, Hh, and Lewis blood group systems. In: *Human blood groups*. 1<sup>a</sup> ed. USA: Cambridge University Press; 1995. p. 8-93.
26. Henry SM. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood group related chart of microorganism receptors. *Transfus Clin Biol* 2001;8(3):226-30.
27. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990;345:229-33.
28. Yamamoto F, Hakomori S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J Biol Chem* 1990;265:19257-62.

29. Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* 2000;108(1):1-28.
30. Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Ruvoen N, Clement M, et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 2001;83(7):565-73.
31. Campi C, Escovich L, Valdés V, Borrás SG, Racca L, Racca A, et al. Secretor status and ABH antigens expression in patients with oral lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12(6):E431-4.
32. Carlsson B, Kindberg E, Buesa J, Rydell GE, Lidón MF, Montava R, et al. The *G428A* nonsense mutation in *FUT2* provides strong but not absolute protection against symptomatic GII.4 norovirus infection. *Plos One* 2009;4:e5593.
33. Chen YL, Chen JC, Lin TM, Huang TJ, Wang ST, Lee MF, et al. ABO/secretor genetic complex is associated with the susceptibility of childhood asthma in Taiwan. *Clin Exp Allergy* 2005;35(7):926-32.

34. Svensson L, Petersson A, Henry SM. Secretor genotyping for *A385T*, *G428A*, *C571T*, *C628T*, *685delTGG*, *G849A*, and other mutations from single PCR. *Transfusion*, 2000;40:856-60.
  
35. Cintra JR, Mattos LC. Frequência relativa da substituição *G428A* no gene *FUT2*. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2006;28:335.
  
36. Andresen PH. Relations between the ABO, secretor/non-secretor, and Lewis systems with particular reference to the Lewis system. *Am J Med Genet* 1961;13(4):396-412.
  
37. Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang* 1995;69(3):166-82.
  
38. Ameno S, Kimura H, Ameno K, Zhang X, Kinoshita H, Kubota T, et al. Lewis and secretor gene effects on Lewis antigen and postnatal development of Lewis blood type. *Biol Neonate* 2001;79(2):91-6.

39. Henry SM, Oriol R, Samuelsson BE. Detection and characterization of Lewis antigens in plasma of Lewis-negative individuals evidence of chain extension as a result of reduced fucosyltransferase competition. *Vox Sang* 1994;67(4):387-96.
  
40. Salomaa V, Pankow J, Heiss G, Cakir B, Eckfeldt JH, Ellison RC, et al. Genetic background of Lewis negative blood group phenotype and its association with atherosclerotic disease in the NHLBI family heart study. *J Internal Med* 2000;247(6):689-98.
  
41. Mollicone R, Reguigne I, Kelly RJ, Fletcher A, Watt J, Chatfield S, et al. Molecular basis for Lewis alpha(1,3/1,4)-fucosyltransferase gene deficiency (FUT3) found in Lewis-negative Indonesian pedigrees. *J Biol Chem* 1994;269:20987-94.
  
42. Nishihara S, Narimatsu H, Iwasak H, Yazawa S, Akamatsu S, Ando T, et al. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. *J Biol Chem* 1994;269:29271-8.

43. Soejima M, Koda Y. Molecular mechanisms of Lewis antigen expression. *Leg Med* 2005;7(4):266-9.
  
44. Kudo T, Iwasaki H, Nishihara S, Shinya N, Ando T, Narimatsu I, et al. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. *J Biol Chem* 1996;271:9830-7.
  
45. Sheinfeld J, Schaeffer AJ, Cordon-Cardo C, Rogatko A, Fair WR. Association of the Lewis blood-group phenotype with recurrent urinary tract infections in women. *N Engl J Med* 1989;320(12):773-7.
  
46. Henry SM. Review: phenotyping for Lewis and secretor histo-blood group antigens. *Immunohematology* 1996;12(2):51-61.