



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

---

**VALQUÍRIA PARDO DE SOUSA**

**Fatores Imunogenéticos de Risco na  
Infecção por *Toxoplasma gondii* em  
Doadores de Sangue**

**São José do Rio Preto**

**2018**

Valquíria Pardo de Sousa

Fatores Imunogenéticos de Risco na Infecção  
por *Toxoplasma gondii* em Doadores de  
Sangue

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto

2018

Sousa, Valquíria Pardo

Fatores Imunogenéticos de Risco na Infecção por *Toxoplasma gondii* em Doadores de Sangue.

São José do Rio Preto, 2018.

55p

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

1. *Toxoplasma gondii*; 2. Doador de sangue; 3. Sistema histo-sanguíneo ABO; 4. Genes HLA; 5. Fatores imunogenéticos

VALQUÍRIA PARDO DE SOUSA

Fatores Imunogenéticos de Risco na Infecção  
por *Toxoplasma gondii* em Doadores de  
Sangue

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE

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

2º Examinador: Dr. Octavio Ricci Júnior

3º Examinador: Dra. Fátima Adriana Mendes  
Siqueira

Suplentes: Dra. Christiane Maria Ayo

Dra. Ana Regina Chinelato  
Fernandes

São José do Rio Preto: 28/11/18.

## Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas e Quadros.....	ix
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	02
1.2 Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	04
1.3 Sistema Histo-sanguíneo ABO.....	05
1.4 Sistema HLA.....	09
1.5 Sistema HLA associado à infecção por <i>T. gondii</i> .....	10
1.6 Objetivo geral.....	13
1.6.1 Objetivos específicos.....	13
<b>2. Casuística e Métodos.....</b>	<b>14</b>
2.1 Aspectos éticos do estudo.....	15
2.2 Seleção da Casuística.....	15
2.2.1 Coleta do sangue.....	16
2.3 Métodos .....	16
2.3.1 Identificação de anticorpos da classe IgG e IgM anti- <i>T. gondii</i> ..	16
2.3.2 Identificação dos fenótipos ABO.....	17
2.3.3 Extração do DNA genômico e genotipagem HLA .....	17

2.3.4 Análise estatística .....	18
<b>3. Resultados .....</b>	<b>19</b>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>24</b>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>34</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>50</b>
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa .....	51
<b>8. Apêndices .....</b>	<b>52</b>
Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	53
Apêndice 2 - Ficha de Dados Epidemiológicos.....	56

---

---

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho aos meus pais Laura e Francisco, meu esposo Josias e meu filho Artur...*

*Que me apoiaram, incentivaram, se preocuparam com meu sucesso e me proporcionaram mais do que eu precisei para chegar até aqui.*

*Gratidão eterna a vocês!*

## Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer a Deus, pois estive sempre diante de tudo no percorrer desse caminho. Nele encontrei a força, a perseverança, a fé, a tranquilidade e a motivação para nunca desistir.

Agradeço aos meus pais, que me deram a vida e acima de tudo proporcionaram uma excelente educação, formação de caráter, boa formação acadêmica, me ensinaram a ser uma pessoa humilde e que enfrenta a vida sempre de cabeça erguida. Eterna gratidão!

Ao meu esposo, amigo, companheiro e confidente. Obrigada pelo acolhimento e reconhecimento em todas as minhas decisões dando-me apoio e impulso em direção aos meus objetivos. Agradeço sua paciência nos períodos de estresse e quando me recolhia em longos dias de estudo e dedicação a essa dissertação. Eterna gratidão !

É preciso agradecer ele que mesmo com tão pouca idade sempre me apoiou, se orgulhou de mim, incentivou e teve muita paciência e compreensão nos momentos em que precisei me ausentar do convívio familiar para me concentrar nos estudos. Obrigada Artur meu filho amado por ser essa pessoa especial e tão carinhoso com seus pais. Amo você. Gratidão !

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos pelo exemplo de profissional, de educador, de pesquisador e ser humano incomparável. Por confiar em mim nesses anos de permanência no laboratório e fazendo com que



tudo se tornasse mais simples, objetivo, fluido e motivador. Agradeço sua paciência, apoio e compreensão nos momentos de dificuldades e imprevistos na vida pessoal que por vezes nos fazem perder a energia e o foco no trabalho. Por sua orientação, confiança e sobretudo pelo respeito e admiração que lhe tenho, agradeço hoje e sempre a oportunidade concedida.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos pela oportunidade de fazer parte deste grupo de trabalho do laboratório de Imunogenética e pelo apoio, amizade e confiança em mim. Minha gratidão, consideração e respeito.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, aos Professores, aos funcionários José Antônio, Luís Henrique e Fabiana da Secretaria deste qualificado Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pelo suporte, acolhimento e oportunidade.

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

Ao Diretor Dr. Octávio Ricci Junior e funcionários do Hemocentro de São José do Rio Preto pelo apoio, parceria e colaboração de todos os setores envolvidos durante a coleta de amostras e seleção dos participantes deste projeto.

Às funcionárias do Laboratório de Imunogenética Molecular do Hemocentro de São José do Rio Preto, Denise, Mirela e Otávia pelo auxílio, paciência e disposição em ajudar na seleção dos doadores de medula óssea bem como seus respectivos resultados de tipagem HLA.

A todos os doadores de sangue que aceitaram fazer parte deste estudo de forma voluntária contribuindo com a pesquisa científica.

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética: Cidinha pelos ensinamentos e paciência no auxílio das técnicas específicas; Márcio pelo apoio técnico, psicológico, preocupação em ajudar, pelas conversas acompanhadas de um bom café e claro, por lavar centenas de tubos deixando-os sempre limpos, organizados e; Regina a secretária e amiga que além da eficiência em seu trabalho me proporcionou momentos de boas conversas e muitas risadas. Gratidão imensa a vocês.

À colega e pesquisadora do laboratório de Imunogenética, Christiane Maria Ayo, pela inestimável colaboração durante a elaboração do artigo e desta dissertação auxiliando nos cálculos estatísticos e acima de tudo, compartilhando seu conhecimento e sua experiência. Chris, agradeço imensamente toda a atenção, dedicação, disposição em ajudar mesmo você estando atarefada com seu projeto de doutorado. Obrigada pela amizade, obrigada por tudo!

Agradeço especialmente a minha parceira na coleta das amostras e seleção dos doadores deste projeto, Natália Paduan, que se tornou uma amiga e confidente. Entre as idas e vindas constantes ao Hemocentro na trabalhosa missão de coletarmos quase mil amostras de doadores de sangue, jamais houve qualquer desentendimento ou intercorrência que colocasse em risco o andamento do nosso trabalho. Parceria, confiança, bom humor, seriedade, responsabilidade e comprometimento sempre estiveram presentes garantindo um convívio harmonioso e de respeito. Obrigada minha querida amiga. Sua companhia, apoio

e as trocas de ideias até no dia da defesa foram essenciais para o sucesso deste trabalho e com certeza esse laço de amizade será para sempre. Gratidão!

Agradeço aos colegas do Laboratório de Imunogenética que durante o trabalho intenso e diário se tornaram a minha segunda família. A convivência de 4 anos neste laboratório permitiu o contato com muitos colegas, sendo que alguns deles já se ausentaram seguindo seus caminhos. Saliento alguns que foram figuras importantes me ensinando tudo o que eu não sabia logo que ingressei ao laboratório. Fernando, Fabiana, Amanda, Ana Vitória e Cássia sou muito grata pela acolhida, paciência em ensinar e pelos momentos de descontração que tivemos juntos enquanto trabalhávamos. Muitos outros colegas entraram, permanecem até hoje e alguns chegaram recentemente. Por isso, não vou citar nomes para não correr o risco de ser injusta e deixar alguém sem mencionar. Então estendo minha gratidão, carinho e amizade a todos vocês colegas que frequentam o laboratório hoje e que de alguma forma contribuíram com este trabalho me oferecendo apoio ou mesmo uma boa conversa.

À querida Professora Dra. Lilian Castiglioni, uma pessoa amável, do bem, de um coração enorme, profissional exemplar e a responsável por eu ter alcançado meu objetivo de fazer o mestrado. Mesmo sem me conhecer, numa conversa que tivemos você se dispôs a colaborar de alguma forma para essa meta tão sonhada se realizasse. Sou e serei sempre grata pelo gesto de confiança, incentivo, carinho e pela amizade que cultivamos durante essa jornada. Gratidão eterna!

Por fim, quero agradecer a todos aqueles que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta etapa do meu aprendizado.

---

*Epigrafe*

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”*

***Paulo Freire***

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b>	Ciclo evolutivo do <i>T. gondii</i> .....	4
<b>Figura 2.</b>	Principais vias de transmissão do <i>T. gondii</i> .....	4
<b>Figura 3.</b>	Estrutura gênica do MHC humano.....	10

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1.</b> Características gerais dos doadores de sangue com (G1) e sem (G2) infecção por <i>T. gondii</i> .....	20
<b>Tabela 2.</b> Frequências dos fenótipos do grupo sanguíneo ABO em doadores de sangue com (G1) e sem (G2) infecção por <i>T. gondii</i> .....	21
<b>Tabela 3.</b> Frequências dos grupos de alelos HLA-A, -B e DRB1 em doadores de sangue de acordo com a sorologia reagente e não reagente para <i>T. gondii</i> .....	22
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos haplótipos HLA em doadores de sangue, classificados de acordo com a sorologia reagente e não reagente para <i>T. gondii</i> .....	23

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	Ensaio Imunoenzimático de Absorção
ELFA	Ensaio Imunoenzimático de Fluorescência
Et al.	E colaboradores
FUT1	Enzima $\alpha$ -2-L-fucosiltransferase
FUT2	Gene Secretor
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígenos Leucocitários Humano
IC	Intervalo de Confiança
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
Kir	Receptores <i>killer cell immunoglobulin-like</i>
MHC	<i>Complexo Principal de Histocompatibilidade</i>
ML	Mililitro
n	Número de
NaCl	Cloreto de Sódio



OR	Odds Ratio
p	Valor de p
pc	Valor de p corrigido pelo método de Bonferroni
PCR-SSOP	<i>Sequence-specific oligonucleotide probe</i>
RPM	Rotação por minuto
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa

## RESUMO

**Introdução.** O agente etiológico da toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, é um protozoário intracelular obrigatório de ampla distribuição geográfica e alta prevalência sorológica mundial que utiliza o trato gastrointestinal humano como uma das vias de infecção. Neste trato também são expressos os glicoconjugados ABH do Sistema ABO. Os genes HLA, altamente polimórficos, controlam as respostas imunes adaptativas contra o *T. gondii*. Associações entre os glicoconjugados ABH e alelos HLA despertam a atenção para suas potenciais influências na suscetibilidade e resistência à toxoplasmose humana. **Objetivo.** Investigar os glicoconjugados ABH e os alelos HLA de classe I e II como fatores imunogenéticos do hospedeiro que contribuem para o risco de infecção por *T. gondii* em doadores de sangue. **Material e Método.** Foram selecionados 1.729 doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto de ambos os sexos, aptos à doação. Os doadores de sangue foram classificados de acordo com a sorologia reagente e não reagente para anticorpos anti-*T.gondii* das classes (IgG e IgM) pelo método (ELISA). Um subgrupo com 348 doadores foi avaliado quanto aos alelos HLA de classe I e II. As fenotipagens ABO foram realizadas por método de hemaglutinação em tubos e a genotipagem HLA de classe I (HLA-A e HLA-B) e de classe II (HLA-DRB1) foi realizada pelo método PCR-SSOP (Luminex®). O teste t e o qui-quadrado foram utilizados para comparação das proporções ( $p \leq 0,05$ ). O software Arlequin (3.11) foi utilizado para análise dos alelos e haplótipos HLA. Também foram calculados os valores de Odds Ratio e o intervalo de confiança a 95%. **Resultados.** Do total de 1.729 doadores, 835 (48,3%) foram reagentes e 894 (51,7%) não reagentes para

anticorpos anti-*T. gondii*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na prevalência de infecção entre os gêneros bem como entre os quatro fenótipos ABO. As frequências dos alelos HLA de classe I e II também não diferiram quanto à sorologia reagente e não reagente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências dos alelos HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 nos grupos de doadores com e sem infecção. As frequências dos grupos alélicos se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e o alelo HLA-DRB1\*13 não se mostrou associado ao risco de infecção após a correção de Bonferroni. O haplótipo HLA-A\*02\_HLA-DRB1\*13 foi associado à presença de anticorpos anti-*T. gondii*. **Conclusões.** A frequência de infecção por *T. gondii* em doadores de sangue da região noroeste é elevada e os fenótipos ABO e os alelos HLA de classe I e II não se constituem fatores de risco para a aquisição da infecção por *T. gondii*, isoladamente. Contudo, o haplótipo HLA-A\*02\_HLA-DRB1\*13 mostrou-se associado à infecção por *T. gondii*.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, doador de sangue, sistema histossanguíneo ABO, genes HLA, fatores imunogenéticos.

## ABSTRACT

**Introduction.** The etiological agent of toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, is an obligatory intracellular protozoan with a wide geographic distribution and a high prevalence worldwide that uses the human gastrointestinal tract as one of the routes of infection. In this tract the ABH glycoconjugates of the ABO System are also expressed. The highly polymorphic HLA genes control the adaptive immune responses against *T. gondii*. Associations between ABH glycoconjugates and HLA alleles raise attention to their potential influences on susceptibility and resistance to human toxoplasmosis. **Aim.** To investigate ABH glycoconjugates and HLA class I and II alleles as host immunogenic factors that contribute to the risk of *T. gondii* infection in blood donors. **Material and Method.** A total of 1,729 blood donors, both genders, and eligible for donation from Hemocentro of São José do Rio Preto, were selected. Blood donors were classified according to reactive and non-reactive serology for anti-*T.gondii* antibodies of the classes (IgG and IgM) by the (ELISA) method. A subgroup with 348 donors was evaluated for HLA class I and II alleles. The ABO phenotypes were performed by hemagglutination method in tubes and HLA class I (HLA-A and HLA-B) and class II (HLA-DRB1) genotyping was performed by the PCR-SSOP method (Luminex®). The t-test and the chi-square test were used to compare the proportions ( $p \leq 0.05$ ). Harlequin software (3.11) was used to analyze HLA alleles and haplotypes. Odds Ratio values and the 95% confidence interval were also calculated. **Results.** Out of the 1,729 donors, 835 (48.3%) were reagents and 894 (51.7%) were non-reactive for anti-*T gondii* antibodies. No statistically significant differences were observed in the prevalence of infection between

genders as well as among the four ABO phenotypes. The frequencies of the HLA class I and II alleles also did not differ for reactive and non-reactive serology. No statistically significant differences were found between the frequencies of the HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 alleles in the donor groups with and without infection. The frequencies of the allelic groups were in Hardy-Weinberg equilibrium, and the HLA-DRB1 \* 13 allele was not associated with the risk of infection after the Bonferroni correction. The HLA-A \* 02\_HLA-DRB1 \* 13 haplotype was associated with the presence of anti-*T. gondii* antibodies.

**Conclusions.** The frequency of *T. gondii* infection in blood donors from the northwest region is high, and the ABO phenotypes and HLA class I and II alleles are not risk factors for the acquisition of *T. gondii* infection alone. However, the haplotype HLA-A \* 02\_HLA-DRB1 \* 13 was shown to be associated with *T. gondii* infection.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, blood donor, ABO histo-sanguine system, HLA genes, immunogenic factors.

# 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1 *Toxoplasma gondii*

O agente etiológico da toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, é um protozoário oportunista, intracelular obrigatório e que pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia família Sarcocystidae.<sup>(1)</sup> Em 1908 foi descrito como parasito pela primeira vez por Nicolle e Manceaux no Instituto Pasteur da Tunísia, em um roedor africano (*Ctenodactylus gondii*). Nesse ínterim, no Brasil, Splendore também isolou o parasita de um coelho no Instituto Biológico de São Paulo.<sup>(2)</sup>

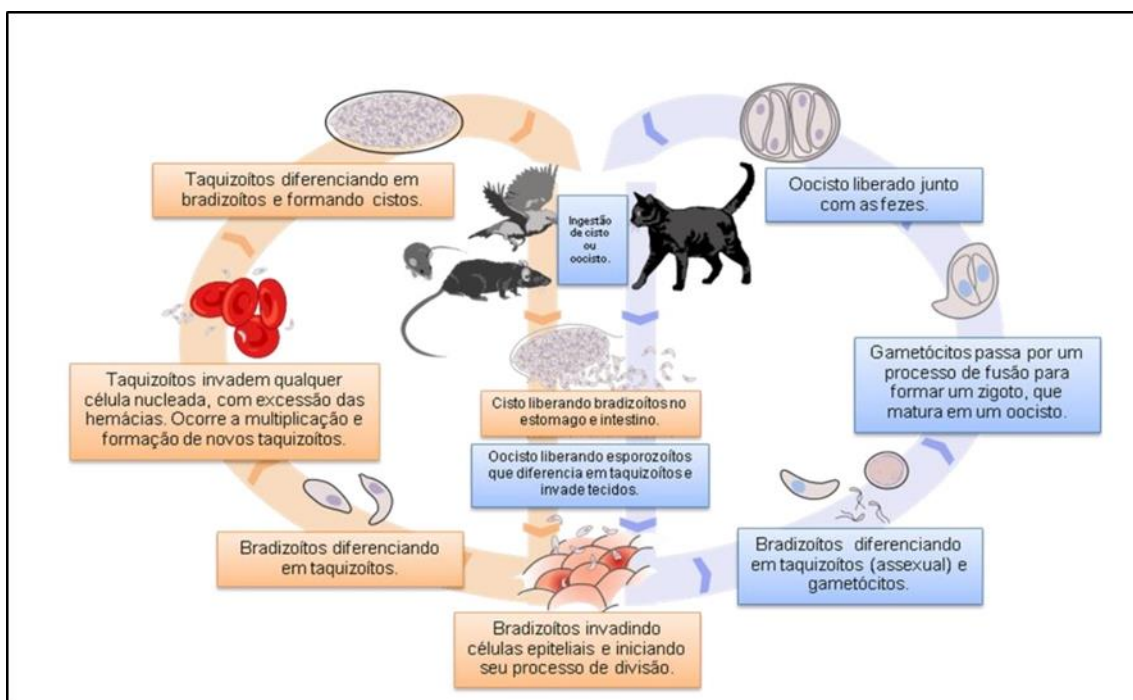
Este parasito apresenta os estágios evolutivos oocisto esporulado, taquizoíto e cisto de bradizoíto como formas infectantes para o homem. O ciclo do *T. gondii* é do tipo heteróximo, tendo os felinos como hospedeiro definitivo e vários mamíferos e aves como hospedeiro intermediário.<sup>(3)</sup>

Quando o hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão de cisto de bradizoítos que podem ser encontrados nos tecidos de hospedeiros intermediários pela predação, os parasitas penetram nos enterócitos e se multiplicam de forma assexuada. Os merozoítos formados são liberados pelo rompimento da célula parasitada e sofrem diferenciação para gameta masculino e feminino, que são as formas sexuadas. Esses gametas, após fecundados dão origem a formação dos oocistos não esporulados e liberados nas fezes do animal felino.<sup>(3)</sup> Após sofrerem o processo de esporulação no meio ambiente os oocistos passam a ser infectantes. O hospedeiro intermediário se infecta ao ingerir água ou alimentos contaminados pelos oocistos esporulados e os esporozoítos são liberados dos oocistos invadindo o epitélio intestinal. Estes oocistos se diferenciam em taquizoítos que rapidamente se replicam, desencadeiam

respostas imunológicas e se diferenciam em bradizoítos dentro de cistos teciduais.<sup>(4)</sup>

A infecção por *T. gondii* em humanos também pode ocorrer por meio do consumo de carne crua ou mal cozida de animais contaminados com cistos de bradizoítos.<sup>(5,6)</sup> Outras formas de transmissão também foram descritas através de taquizoítos na fase aguda da infecção, como em transfusões sanguíneas,<sup>(7)</sup> transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea.<sup>(8,9)</sup> A figura 1 ilustra o Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii* e a figura 2, ilustra as Principais Vias de Transmissão do *T. gondii*.

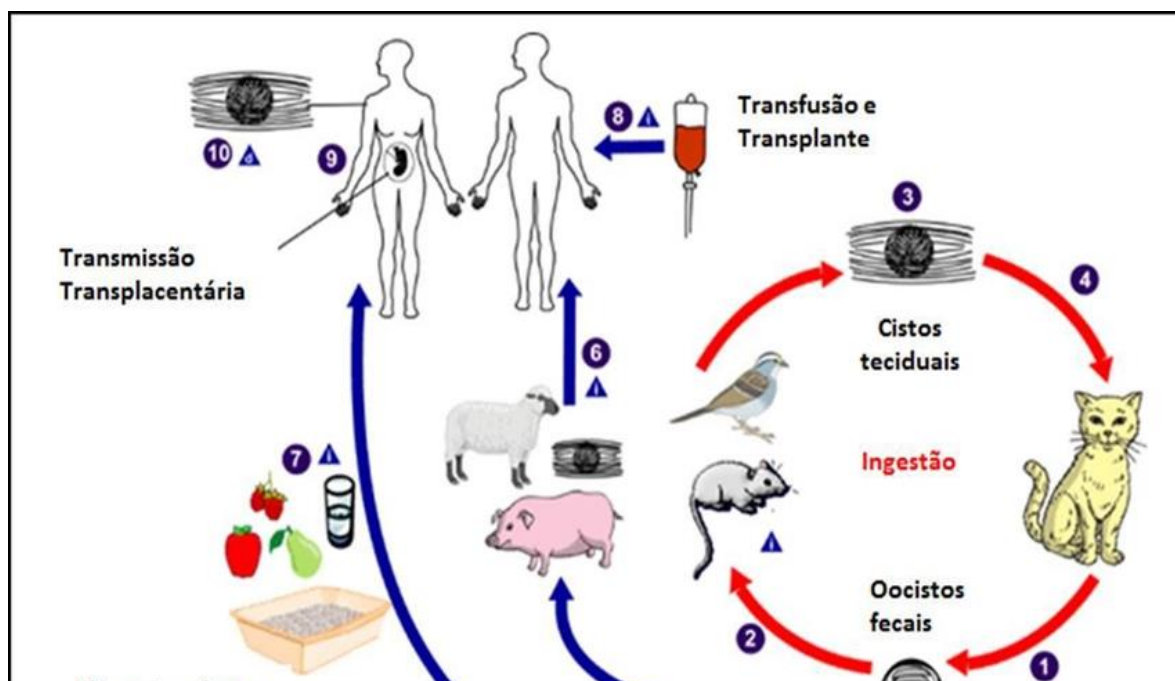




**Figura 1.** Ciclo biológico do *T. gondii*.

Adaptado de [http://commons.wikimedia.org/wiki/file:toxoplasmosis\\_life\\_cycle\\_en.s\\_vg](http://commons.wikimedia.org/wiki/file:toxoplasmosis_life_cycle_en.s_vg)

## 1.2 Infecção por *Toxoplasma gondii*



**Figura 2.** Principais vias de transmissão do *T. gondii*.

Adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>

Os índices de infecção por este parasito variam (10% - 80%) em diferentes países dependendo dos hábitos sociais e culturais, fatores geográficos, clima e rotas de transmissão.<sup>(10)</sup> No Brasil, estudos revelaram índices de infecção de 40 a 75%,<sup>(11,4)</sup> enquanto que no norte da Índia e do Egito são acima de 50%.<sup>(12,13)</sup> Por outro lado, em Taiwan, Chiang e colaboradores (2012)<sup>(14)</sup> realizaram um estudo com mais de 1700 doadores de sangue e a soroprevalência da infecção foi de 9,3%. Na região noroeste do Estado de São Paulo estudos demonstraram que aproximadamente dois terços da população de gestantes apresentam anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG.<sup>(15,16)</sup>

A infecção pelo *T. gondii* é geralmente assintomática entre pessoas imunocompetentes; no entanto pode causar doenças graves em indivíduos imunocomprometidos como pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida. A fase aguda da infecção é seguida por uma fase crônica latente que se caracteriza pela persistência, ao longo da vida, pelos cistos nos tecidos.<sup>(17,18)</sup>

### **1.3 Sistema Histo-sanguíneo ABO**

Descoberto em seres humanos em 1901 pelo austríaco Karl Landsteiner, foi também o primeiro sistema polimórfico descrito em nossa espécie.<sup>(19,20)</sup> O sistema histo-sanguíneo ABO é uma característica genética determinada por um gene no locus ABO no cromossomo 9 (9q34.1). Este sistema é caracterizado pela expressão dos antígenos (A, B e H) que são moléculas complexas de carboidratos adicionadas à superfície extracelular da membrana de glóbulos vermelhos, e pela presença de anticorpos no plasma (anti-A e anti-B).<sup>(21)</sup> Além dos eritrócitos, estes antígenos se expressam em várias células e tecidos

humanos como epitélio, neurônios sensoriais, plaquetas e endotélio vascular.<sup>(18,19)</sup>

A expressão dos antígenos ABH, também denominados glicoconjugados ABH, definem os fenótipos do sistema histo-sanguíneo ABO e é controlada por 3 genes – FUT1 (19q13.3), FUT2 (19q.13.3) e ABO (9q34.1).<sup>(22)</sup> Os alelos A e B do gene ABO codificam glicosiltransferases diferentes que agem adicionando N-Acetilgalactosamina e D-Galactose ao antígeno H, o qual é o substrato de todos os antígenos do sistema ABO, convertendo-o em antígeno A ou B, respectivamente. A expressão do antígeno H é geneticamente independente do locus ABO. Portanto, nos indivíduos do grupo O não há expressão das transferases funcionais dos grupos A e B devido a uma deleção do nucleotídeo G na posição 261 do exon. Sendo assim, o alelo O codifica uma transferase anômala que não modifica o antígeno H e portanto, esses indivíduos não apresentam os antígenos A e B na membrana das hemácias e em outros tecidos. Além disso, seus eritrócitos não aglutinam na presença dos soros anti-A, anti-B e anti-AB.<sup>(23,24)</sup>

Os alelos funcionais dos genes FUT1, FUT2 e ABO se relacionam não somente com o perfil de glicoconjugados ABH expresso em cada indivíduo, mas também com os anticorpos plasmáticos anti-A e anti-B. Esta situação não só pode ter impactado a geração, diversificação e manutenção deste sistema como também influencia a suscetibilidade ou resistência a doenças infecciosas, parasitárias e outras.<sup>(21,25,26,27)</sup>

A presença dos antígenos eritrocitários e anticorpos plasmáticos confere ao sistema histo-sanguíneo ABO uma complexidade peculiar de grande

relevância nas relações humanas com doenças e demais condições fisiológicas.<sup>(21)</sup> Alguns microrganismos, têm a capacidade de se ligarem à moléculas compostas por carboidratos de células hospedeiras, porém, este processo de ligação na invasão celular ainda é pouco esclarecido. No trato gastrointestinal humano também são expressos os glicoconjugados ABH e há evidências de que essas moléculas possam atuar como receptores para microrganismos patogênicos e não patogênicos.<sup>(28,29)</sup>

Embora vários pesquisadores tentaram demonstrar a associação entre o sistema ABO e uma variedade de doenças nos últimos 60 anos, os resultados foram controversos e alguns deles foram inconclusivos.<sup>(30)</sup> Neste sentido, estudos de associação entre o sistema histo-sanguíneo ABO e as doenças parasitárias como a toxoplasmose, são escassos no Brasil. Em 1985 na Tanzânia, um dos primeiros estudos feito com doadores de sangue revelou a frequência elevada de sorologia positiva para *T. gondii*, mas não encontraram diferenças significantes na distribuição dos grupos sanguíneos ABO.<sup>(31)</sup> Na mesma década na Noruega, foi relatada pela primeira vez a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em indivíduos do grupo B oriundos de diversas áreas do país.<sup>(32)</sup>

Já na década de 90, Lopes e colaboradores (1993)<sup>(33)</sup> também encontraram alta frequência de anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG em doadores de sangue cubanos do sexo masculino e do grupo AB. Em outro estudo na Rússia, doadores de sangue do grupo AB também apresentaram sorologia positiva com IgG anti-*T. gondii*.<sup>(34)</sup> Em 2007, um estudo feito com militares da República Tcheca encontraram associação significativa entre a sorologia positiva

para *T. gondii* e os grupos B e AB.<sup>(35)</sup> Estes estudos demonstraram a proposição de que os antígenos B e AB poderiam atuar como receptores para *T. gondii* na mucosa gastrointestinal. Entretanto, estas observações foram contestadas por outros estudos que avaliaram gestantes.<sup>(36,37,15)</sup>

No ano de 2009 no Egito, Elsheikha e colaboradores<sup>(13)</sup> em um estudo com doadores de sangue observaram pela primeira vez uma associação entre o *T. gondii* e o grupo sanguíneo O. De qualquer forma, estes resultados se mostraram inconclusivos pelos autores que alegaram a possibilidade desta associação ter ocorrido devido a uma amostragem tendenciosa ou incidental. Nos últimos 10 anos, vários estudos demonstraram a frequência de anticorpos anti-*T. gondii* e o sistema histo-sanguíneo ABO em várias regiões do mundo, porém, não encontraram evidências de associação com nenhum dos fenótipos ABO.<sup>(14,38,39,,40)</sup>

Os resultados controversos destes estudos deixam claro que a potencial associação entre o sistema histo-sanguíneo ABO e a infecção por *T. gondii* não está restrita aos fenótipos eritrocitários apenas, uma vez que, com exceção do estudo de Mattos e colaboradores em 2008,<sup>(37)</sup> todos os demais investigaram apenas os fenótipos eritrocitários mas não os fenótipos ABO em outros tecidos. Ressalta-se que o *T. gondii* infecta células nucleadas de animais de sangue quente e até o momento não há evidências de que o mesmo utilize eritrócitos como células hospedeiras. Portanto, a presença de moléculas como os glicoconjugados ABH na superfície eritrocitária não corresponde de forma absoluta aos mesmos glicoconjugados expressos em outros tecidos cujas células se constituem em potenciais hospedeiras para o *T. gondii*.<sup>(41)</sup> Neste

sentido, associar um dado antígeno presente em uma célula à infecção por um parasito que não utiliza esta célula como hospedeira, parece ser um fator que enfraquece a proposição de que um dado fenótipo eritrocitário se constitua num fator genético de influência absoluta na suscetibilidade ou na resistência a uma dada doença.

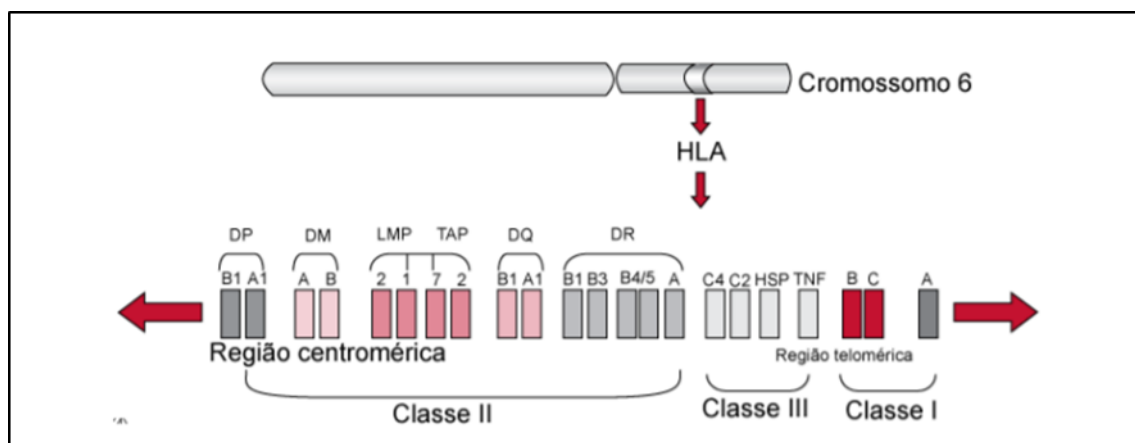
#### **1.4 Sistema HLA**

O Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano (MHC), também conhecido como Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), codifica as principais moléculas mediadoras da apresentação antigênica, que expõe na superfície das células infectadas por vírus e Células Apresentadoras de Antígenos (APC), peptídeos derivados de microorganismos endógenos e exógenos. Os antígenos HLA são altamente polimórficos e constitui um dos sistemas imunogenéticos humanos mais estudados em humano.<sup>(42)</sup> Este sistema se compõe de um conjunto de loci gênicos localizados no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) que codificam moléculas funcionalmente envolvidas na resposta imune adaptativa.<sup>(43)</sup>

O HLA contém três classes de genes: I, II e III. A classe I localiza-se próximo ao telômero em comparação às demais, e contém os genes clássicos HLA-A, HLA-B e HLA-C, além de outros genes não clássicos.<sup>(44)</sup> As moléculas de classe I medeiam a apresentação de peptídeos endógenos às células T citotóxicas (CD8). Estas moléculas são expressas em todas as células nucleadas que compõe tecidos cujas células são potencialmente hospedeiras de vírus e outros parasitas intracelulares.<sup>(45,46)</sup>

As moléculas da classe II clássicas, denominadas HLA-DQ, HLA-DP e HLA-DR, são codificadas por genes localizados em uma região próxima ao centrômero, em comparação às demais e medeiam a apresentação de peptídeos exógenos às células T auxiliares (CD4 TH1 e CD4 TH2). Estas moléculas são expressas essencialmente em células com função imunológica como por exemplo, as APC, as quais exercem função fagocitária com consequente processamento e apresentação antigênica de peptídeos derivados de parasitas extracelulares.<sup>(45,46)</sup>

A classe III localiza-se entre as classes I e II, e contém genes que codificam outras moléculas responsáveis por diferentes funções imunes, mas que não atuam como moléculas de histocompatibilidade. Dentre elas, destacam-se os componentes do sistema Complemento C2, C4A e C4B e a citocina TNF- $\alpha$ .<sup>(47)</sup>



**Figura 3** - Estrutura gênica do MHC humano. Fonte: SILVA et al.,2008<sup>(48)</sup>

### 1.5 Sistema HLA associado à infecção por *T. gondii*

Os genes HLA são os mais polimórficos do genoma humano, com milhares de alelos descritos. Portanto, é de grande interesse médico conhecer o

papel do HLA nas respostas imunes adaptativas, pois o mesmo influencia a suscetibilidade e resistência a algumas doenças infecciosas.<sup>(49,44)</sup>

Desde o primeiro relato sobre a associação entre o antígeno HLA-B27 e a espondilite anquilosante,<sup>(50)</sup> vários estudos foram realizados para mais de 500 doenças distintas. Portanto, investigar a associação dos genes deste sistema com doenças é importante para definir a contribuição na suscetibilidade para doenças específicas, determinar marcadores imunogenéticos de proteção, avaliação de risco e decisões terapêuticas.<sup>(51)</sup>

A toxoplasmose é uma das mais importantes causas de uveíte posterior no mundo. A forma ocular desta doença no Brasil é responsável por aproximadamente 50% do total de uveítes.<sup>(52)</sup> Na região noroeste do estado de São Paulo, foi demonstrado que a toxoplasmose ocular acomete 27% dos pacientes com doenças oculares.<sup>(53)</sup> Os mecanismos que influenciam a ocorrência, a gravidade e a recorrência da toxoplasmose ocular não são bem compreendidos. Porém, podemos destacar os fatores genéticos do hospedeiro associados às respostas imunes.<sup>(54,55)</sup> O envolvimento dos genes HLA de classe I e II na susceptibilidade e resistência à toxoplasmose ocular tem sido investigado em alguns estudos, porém com resultados contraditórios.<sup>(56,57,58)</sup>

Diferentes estudos investigaram associação entre genes HLA de classe I e II e infecção por *T. gondii* bem como com algumas doenças resultantes (toxoplasmose ocular, gestacional e neurotoxoplasmose). Os estudos iniciais que investigaram associação entre diferentes formas clínicas da toxoplasmose e HLA datam da década de 70. Um dos primeiros relatos não encontrou



diferenças estatisticamente significantes nas frequências dos antígenos HLA-A e HLA-B entre pacientes com retinocoroidite toxoplásmica e controles sem doença.<sup>(56)</sup> Em outro, publicado na década de 90, objetivando verificar se gestantes com toxoplasmose ocular apresentam predisposição imunogenética para transmissão da toxoplasmose congênita, foi observada elevada frequência do antígeno HLA-Bw62 nas pacientes com toxoplasmose ocular.<sup>(57)</sup> Ainda nesta mesma década, Mack e colaboradores encontraram elevada frequência do gene HLA-DQ3 em crianças com toxoplasmose congênita e hidrocefalia, em comparação a crianças com toxoplasmose congênita sem hidrocefalia bem como em controles normais.<sup>(58)</sup>

Em 2005, Habegger de Sorrentino e colaboradores<sup>(59)</sup> estudaram pacientes HIV-positivos com ou sem neurotoxoplasmose. A genotipagem de HLA-DR e HLA-DQ realizada por técnicas de biologia molecular, revelou que os alelos HLA-DQB1\*04:02 e HLA-DRB1\*08 foram associados a um maior risco de desenvolvimento de neurotoxoplasmose. Além disso, tais resultados mostraram que estes alelos podem ter um papel essencial em determinar a natureza da resposta imune contra *T. gondii*. Em outro estudo,<sup>(60)</sup> avaliaram a progressão rápida da AIDS associada ao desenvolvimento de retinocoroidite toxoplásmica em pacientes brasileiros por meio de marcadores HLA. A associação encontrada com o alelo HLA-B35 sugere maior predisposição à progressão para a AIDS e a esta doença ocular. Ayo e colaboradores demonstraram que os genes KIR ativadores e inibidores podem influenciar o desenvolvimento da toxoplasmose ocular.<sup>(61)</sup> Estes estudos, embora tenham procurado esclarecer as potenciais contribuições dos genes HLA na gênese das diferentes formas da toxoplasmose,

apresentaram resultados discordantes. Portanto, este assunto ainda carece de investigações com vistas a esclarecer a potencial contribuição dos genes, alelos, haplótipos e genótipos HLA na suscetibilidade ou resistência às diferentes formas clínicas da toxoplasmose.

## **1.6 Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo foi investigar os fatores imunogenéticos do hospedeiro que contribuem para o risco de infecção por *T. gondii* em doadores de sangue.

### **1.6.1 Objetivos específicos**

- Realizar a triagem sorológica para anticorpos anti-*T. gondii* (IgM e IgG) nestes doadores para identificar os perfis sorológicos [(IgM não reagente; IgG não reagente); (IgM reagente; IgG não reagente); (IgM reagente; IgG reagente); (IgM não reagente; IgG reagente)].
- Identificar os fenótipos ABO e HLA de classe I e II em doadores de sangue com e sem sorologia reagente.
- Comparar as frequências destes fatores em doadores com e sem evidência sorológica de infecção por *T. gondii*.

## **2. CASUÍSTICA E MÉTODO**

---

## 2.1 Aspectos éticos do estudo

Este projeto é uma extensão do projeto que foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (parecer 006/2011 de 03/01/2011) em atendimento às diretrizes da resolução 196/96 de 10/10/1996 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo 1). Todos os doadores selecionados receberam explicações detalhadas sobre os objetivos do estudo e sobre todos os procedimentos que seriam realizados com suas amostras de sangue. A seguir foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1), onde consta a informação que suas amostras de sangue serão utilizadas apenas para a execução deste estudo.

## 2.2 Seleção da casuística

Um total de 1.729 doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto de ambos os sexos, foram selecionados logo após a triagem convencional, onde se mostraram aptos à doação. Todos os participantes responderam a um formulário de dados epidemiológicos contendo questões que levantavam informações sobre história clínica de doenças, hábitos de vida e em seguida foram submetidos à coleta de sangue periférico para a investigação da infecção por *T. gondii* por meio sorológico (Apêndice 2). Os doadores foram classificados em dois grupos: um composto por aqueles que possuíam sorologia positiva e o outro sorologia negativa para anticorpos anti-*T. gondii*.

Dentre os 1.729 doadores de sangue que participaram deste estudo foram selecionados 348 que também se cadastraram como doadores voluntários de medula óssea. De acordo com a presença ou ausência de anticorpos anti-*T.*

*gondii* os doadores voluntários de medula foram divididos em dois grupos: G1 - doadores IgM e/ou IgG reagentes; G2 doadores IgM e IgG não reagentes. O Hemocentro de São José do Rio Preto realiza como procedimento de rotina a coleta de sangue periférico e posterior tipagem HLA destes doadores voluntários de medula. Para que pudéssemos realizar nossos estudos, os resultados destas tipagens HLA foram fornecidas pelo Laboratório de Imunogenética do Hemocentro.

Embora os participantes deste estudo tenham se autodeclarados como branco, preto ou pardo, devido à elevada miscigenação existente no Brasil (Parra et al., 2003)<sup>(62)</sup>, a casuística foi considerada como pertencente a uma população de etnia mista.

### **2.2.1 Coleta do sangue**

As coletas foram realizadas por profissionais do Hemocentro de São José do Rio Preto em duas amostras de sangue periférico, sendo uma sem (5 mL) e outra com o anticoagulante EDTA (4 mL). A amostra com anticoagulante foi utilizada para realização das fenotipagens ABO e a sem anticoagulante, após a 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 de anticorpos da classe IgG e IgM anti-*T. gondii***

A investigação de anticorpos anti-*T. gondii* foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) (Diasorin, Itália) com kits comerciais e respeitando as instruções do fabricante. Os anticorpos IgM anti-*T. gondii* foram confirmados com

o uso do método Eletrofluorescência (ELFA), quando necessário. Foram utilizados os equipamentos Robonick, leitora Epoch, BioTeck (ELISA) e o Sistema VIDAS (ELFA).

### **2.3.2 Identificação dos fenótipos eritrocitários ABO**

A determinação dos grupos sanguíneos ABO foi realizada pelo método de hemaglutinação em tubos (direta e reversa). Para a fenotipagem direta usou-se anti-soros comerciais e para a fenotipagem reversa hemácias-padrão comerciais. Após o preparo de 1 gota de suspensão de hemácias a 5% em solução estéril (NaCl 0,9%) para cada amostra, adicionou-se 1 gota de anti-soros anti A, anti B e anti AB. Para a fenotipagem reversa misturou-se 2 gotas de plasma sanguíneo de cada amostra a 1 gota das suspensões de hemácias-padrão a 5% A1 e B. Os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm por aproximadamente 1 minuto. Os resultados foram interpretados pela presença ou ausência de hemaglutinação na identificação dos fenótipos A, B, AB e O.

### **2.3.3 Extração do DNA genômico e genotipagem HLA**

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico utilizando kits comerciais por coluna sílica (PureLink™, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Todas as recomendações do fabricante foram rigorosamente obedecidas. A genotipagem HLA dos alelos HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 foi realizada no Laboratório de Imunogenética do Hemocentro de São José do Rio Preto pelo método PCR-SSOP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probes) de baixa/média resolução, utilizando a tecnologia Luminex® (One Lambda, Canoga Park, CA, USA). A hibridização foi verificada

por meio de um citômetro de fluxo (LABScan™ 100 flowanalyzer) e os dados foram interpretados por um programa computacional (HLA Fusion 3.4 Research, One Lambda).

#### **2.3.4 Análise estatística**

Para comparação das médias de idade e gênero dos doadores de sangue foi utilizado o test-t. Os valores de Odds Ratio e intervalo de confiança a 95% também foram calculados. O teste qui-quadrado e Odds Ratio foram aplicados para verificar a associação entre os fenótipos ABO e a infecção por *T. gondii*. O software usado para estas análises foi o GraphPad (versão 3.1).

O programa computacional ARLEQUIN versão 3.11 foi usado para calcular as frequências alélicas e haplotípicas e verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, enquanto que as frequências genótípicas foram obtidas por contagem direta. O desequilíbrio de ligação relativo ( $\Delta'$ ) foi obtido de acordo com o método de Imanishi. As comparações entre os grupos foram calculadas pelo teste X<sup>2</sup> com correção de Yates ou teste exato de Fisher e o risco de associação foi avaliado por Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) utilizando o programa Open Epi versão 2.3.1 (<http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm>). Os valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes e a correção de Bonferroni ( $P_c$ ) foi utilizada para múltiplas comparações.

## **3. RESULTADOS**

---



Do total de 1.729 doadores de sangue analisados neste estudo e que se apresentaram de forma voluntária ao Hemocentro de São José do Rio Preto entre março de 2011 e outubro de 2015, foram detectados anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgG e IgM em 835, o que corresponde a soroprevalência de 48,3%. O grupo composto pelos não reagentes apresentou prevalência sorológica de 51,7% (n= 894).

As características gerais dos doadores estão na Tabela 1. Entre as amostras positivas verifica-se que os doadores reagentes apresentam em média, idade mais elevada do que os não reagentes ( $p < 0,0001$ ). Também foi observada prevalência de infecção entre os doadores do gênero masculino, porém, as diferenças não foram estatisticamente significantes ( $p = 0,077$ ).

**Tabela 1.** Características gerais dos doadores de sangue com (G1) e sem (G2) infecção por *T. gondii*.

Valores	G1 48,3%		G2 51,7%		p <sup>b</sup>
	(n=835)		(n=894)		
Média de idade(±DP) <sup>a</sup>	37,4±11,0		31,8±11,1		<0,0001
Mínima	16		16		
Máximo	73		69		
Mediana	37		30		
<b>Gênero</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
Feminino	273	32,7	329	36,8	0,077
Masculino	562	67,3	565	63,2	

<sup>a</sup>DP= Desvio padrão; <sup>b</sup>calculado pelo teste t Student ;  $p \leq 0,05$

A maioria dos doadores apresentou perfil sorológico não reagente. Na tabela 2, verifica-se que os anticorpos anti - *T. gondii* IgG mostraram-se comuns nos doadores, demonstrando que a prevalência de infecção crônica é elevada

na região. Porém, a prevalência anticorpos anti - *T. gondii* IgM apenas (infecção aguda) e também combinado com IgG, mostrou-se reduzida.

**Tabela 2.** Frequências dos perfis sorológicos para anticorpos IgM e IgG anti – *T. gondii* em doadores de sangue de acordo com o gênero masculino e feminino.

Perfis	Doadores		Femininos		Masculinis	
	n	%	n	%	n	%
G1: IgM(-)/IgG(-)	894	51,7	329	54,6	565	50,1
G2: IgM(+)/IgG(+)	30	1,7	4	0,7	26	2,3
G3: IgM(+)/IgG(-)	08	0,5	3	0,5	5	0,4
G4: IgM(-)/IgG(+)	797	46,1	266	44,2	531	47,2
Total	1.729	100,0	602	100,0	1.127	100,0

Observou-se que as frequências dos quatro fenótipos ABO não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com sorologia reagente (G1) e não reagente (G2). (Tabela 3).

**Tabela 3.** Frequência dos fenótipos do grupo sanguíneo ABO em doadores de sangue com (G1) e sem (G2) infecção por *T. gondii*.

Sistemas	G1 48,3%(n=835)		G2 51,7%(n=894)		<sup>a</sup> OR	<sup>b</sup> IC 95%	<sup>c</sup> p
	n	%	n	%			
ABO							
A (N= 618)	298	35,7	320	35,7	0,997	0,901 -1,105	1,00
B (N= 185)	94	11,2	91	10,1	1,059	0,910 -1,231	0,48
AB (N= 56)	28	3,4	28	3,4	1,037	0,793 -1,353	0,90
O (N= 870)	415	49,7	455	50,8	0,975	0,884 -1,076	0,63
Total (N= 1729)							

<sup>a</sup>OR = Odds Ratio; <sup>b</sup>IC = Intervalo de Confiança; <sup>c</sup>Valores calculados com o teste Qui-quadrado com correção de Yates; p ≤ 0,05

### Frequência dos alelos e haplótipos HLA-A, -B e -DRB1

Na tabela 4, estão apresentadas as frequências dos grupos de alelos HLA. Verifica-se que as frequências dos grupos alélicos estão em equilíbrio de

Hardy-Weinberg ( $P > 0.05$ ). Foi observada associação entre o alelo HLA-DRB1\*13 ao maior risco de infecção por *T. gondii*, porém, esta associação desapareceu após a correção para múltiplas comparações ( $p=0.05$ ;  $p_c=0.7$ ;  $OR=1.58$ ;  $IC=1.01-2.45$ ).

**Tabela 4.** Frequências dos grupos de alelos HLA-A, -B e -DRB1 em doadores de acordo com sorologia reagente (G1) e não reagente (G2) para *T. gondii*.

Alelos	G1=312		G2=384		Alelos	G1=312		G2=384		Alelos	G1=312		G2=384	
	n	%	n	%		n	%	n	%		n	%	n	%
A*01	28	8.9	37	9.7	B*07	19	6	20	5.1	DRB1*01	24	7.6	19	10.2
A*02	84	26.9	96	25.1	B*08	12	3.8	15	3.8	DRB1*03	34	10.8	41	10.6
A*03	25	8.0	42	11.0	B*13	12	3.8	6	1.5	DRB1*04	39	12.4	47	12.2
A*11	12	3.8	26	6.9	B*14	14	4.4	16	4.2	DRB1*07	45	14.3	53	13.8
A*23	15	4.8	18	4.6	B*15	23	7.3	36	9.4	DRB1*08	12	3.7	18	4.8
A*24	37	11.8	37	9.6	B*18	20	6.4	26	6.8	DRB1*09	9	2.8	5	1.2
A*25	1	0.3	5	1.2	B*20	0	0.0	1	0.2	DRB1*10	2	0.5	9	2.3
A*26	15	4.8	12	3	B*24	0	0.0	1	0.2	DRB1*11	39	12.6	48	12.5
A*29	17	5.4	26	6.9	B*27	2	0.6	6	1.5	DRB1*12	6	1.8	8	2.0
A*30	18	5.7	20	5.1	B*35	38	12.1	47	12.3	*DRB1*13	50	16.1	41	10.7
A*31	12	3.8	18	4.6	B*37	4	1.2	8	2	DRB1*14	14	4.4	18	4.6
A*32	6	1.9	9	2.4	B*38	9	2.8	6	1.5	DRB1*15	25	7.9	43	11.2
A*33	12	3.8	6	1.5	B*39	6	1.9	10	2.5	DRB1*16	16	5.2	15	3.8
A*34	1	0.3	2	0.5	B*40	15	4.8	15	4.0					
A*36	3	0.9	2	0.5	B*41	6	1.9	8	2.0					
A*66	3	0.9	1	0.2	B*42	6	1.9	4	1.0					
A*68	21	6.7	22	5.8	B*44	25	8	45	11.7					
A*69	0	0	2	0.5	B*45	9	2.8	11	2.8					
A*74	3	0.9	2	0.5	B*46	1	0.2	1	0.2					
A*80	1	0.3	2	0.5	B*47	2	0.6	0	0.0					
					B*48	2	0.6	3	0.7					
					B*49	6	1.9	13	3.5					
					B*50	11	3.5	11	2.8					
					B*51	32	10.2	34	8.9					
					B*52	7	2.2	6	1.5					
					B*53	14	4.4	6	1.5					
					B*54	2	0.6	0	0.0					
					B*55	0	0.0	4	1.0					
					B*56	2	0.6	1	0.2					
					B*57	8	2.5	17	4.4					
					B*58	8	2.5	10	2.7					

G1(N=312); G2(N=384); <sup>a</sup>P = 0.05; P<sub>c</sub> = 0.7; OR=1.58; IC=1.01-2.45

A tabela 5 contém os cinco haplótipos mais frequentes para cada combinação haplotípica e aqueles que apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos G1 e G2. Entretanto, após a correção de  $p$  a significância estatística se manteve apenas para HLA-A\*02\_HLA-DRB1\*13. Um valor de desequilíbrio de ligação relativo significativo não foi observado para este haplótipo ( $\Delta' = 0,013$ ;  $p = 0.70$ ).

**Tabela 5.** Distribuição dos haplótipos HLA em doadores, classificados de acordo com sorologia reagente e não reagente para *T. gondii*.

Haplótipos	G1		G2		<sup>a</sup> OR	<sup>b</sup> IC 95%	<sup>c</sup> $p$	<sup>d</sup> $pc$
	n= 312		n= 384					
	N	%	n	%				
HLA-A*02_HLA-B*35	15	4.8	7	1.9				
HLA-A*02_HLA-B*44	10	3.2	14	3.7				
HLA-A*02_HLA-B*51	11	3.6	14	3.9				
HLA-A*24_HLA-B*35	10	3.2	7	1.8				
HLA-A*29_HLA-B*44	1	0.4	15	3.9				
HLA-A*02_HLA-DRB1*04	15	4.7	10	2.6				
HLA-A*02_HLA-DRB1*07	19	6.2	22	5.6				
HLA-A*02_HLA-DRB1*13	16	5.1	0	0.0	43.46	2.59-727.87	<0.0001	0.003
HLA-A*02_HLA-DRB1*11	3	1.0	20	5.1				
HLA-A*03_HLA-DRB1*11	9	3.0	5	1.4				
HLA-B*08_HLA-DRB1*03	8	2.5	11	2.8				
HLA-B*14_HLA-DRB1*01	7	2.4	0	0.0	19.17	1.10-337.26	0.003	0.09
HLA-B*35_HLA-DRB1*11	9	2.8	6	1.5				
HLA-B*44_HLA-DRB1*07	6	2.0	18	4.6				
HLA-B*51_HLA-DRB1*07	11	3.5	18	4.6				
HLA-A*01_HLA-B*08_HLA-DRB1*03	6	1.9	9	2.3				
HLA-A*02_HLA-B*35_HLA-DRB1*04	7	2.2	0	0.0	19.17	1.10-337.26	0.003	0.19
HLA-A*02_HLA-B*44_HLA-DRB1*07	5	1.6	8	2.2				
HLA-A*02_HLA-B*51_HLA-DRB1*07	3	1.1	0	0.0	13.96	0.76-253.78	0.01	0.64
HLA-A*02_HLA-B*51_HLA-DRB1*11	2	0.6	7	1.7				

<sup>a</sup>OR = Odds Ratio; <sup>b</sup>IC = Intervalo de Confiança; <sup>c</sup> $p \leq 0,05$ ; <sup>d</sup> $pc$  = Correção de Bonferroni

## **4. DISCUSSÃO**

---

O objetivo geral deste estudo foi investigar os fatores imunogenéticos do hospedeiro que contribuem para o risco de infecção por *T. gondii* em doadores de sangue. Esses marcadores imunogenéticos foram analisados em 1.729 doadores de sangue aptos à doação. Aproximadamente metade dos doadores apresentaram evidências sorológicas de infecção por *T. gondii* caracterizadas pela presença de anticorpos específicos das classes IgG e IgM. Estes dados estão em concordância com aqueles presentes na literatura brasileira pertinente.<sup>(10,4)</sup>

Nossos resultados também mostraram que a média de idade dos doadores com sorologia reagente é maior que daqueles com sorologia não reagente. É possível que os indivíduos mais velhos sejam mais expostos ao parasito em comparação aos mais jovens. Além disso, a manifestação da forma clínica da doença pode se mostrar ausente quando estes indivíduos sofrem estímulos ou reinfecção pelo *T. gondii*.<sup>(9)</sup> Este fato pode contribuir para aumento da prevalência de infecção na medida em que a idade aumenta.<sup>(15,16,35,39,63)</sup>

Os dados deste estudo revelaram que a prevalência de infecção não diferiu entre os gêneros masculino e feminino nos grupos analisados. Estes dados são compreensíveis uma vez que o *T. gondii* é um parasito Apicomplexa e parece não ter preferência por um ou outro gênero.<sup>(17,39,40,64,65)</sup> Entretanto, alguns estudos demonstraram que a soroprevalência foi significativamente maior em mulheres do que em homens.<sup>(17,66)</sup> Na opinião destes autores essa diferença pode ser atribuída ao fato de que as mulheres executam trabalhos domésticos diários e preparam alimentos que podem estar contaminados, podendo contribuir para uma maior chance de contato com os oocistos e cistos teciduais. Outro fator

se refere à elegibilidade das mulheres que também é discutida em alguns estudos apontando a presença de anemia, gravidez, menstruação, restrições culturais e sociais como impedimentos para a doação de sangue.<sup>(67,48)</sup> Em contrapartida, a prevalência sorológica elevada no gênero masculino foi demonstrada no estudo de Coêlho e colaboradores (2003)<sup>(10)</sup> com 79% dos homens infectados. Esta mesma observação foi relatada no Japão<sup>(68)</sup> onde os homens são considerados maiores consumidores de carnes cruas fora de sua moradia.

As frequências dos fenótipos ABO foram semelhantes entre os grupos analisados, reforçando a visão de que a expressão dos antígenos deste sistema de grupos sanguíneos não influencia a suscetibilidade à infecção por *T. gondii* em doadores de sangue e são concordantes com outros estudos.<sup>(14,38,39,40,41)</sup> Em contrapartida, nossos dados se opõem a alguns estudos os quais verificaram que os fenótipos B , AB e O respectivamente, contribuem para maior risco de infecção por *T. gondii*.<sup>(69,33,13)</sup> As razões que fundamentam estas divergências não estão esclarecidas. Contudo, é possível que os critérios de seleção da casuística, o método escolhido para a detecção dos anticorpos anti-*T. gondii*, saneamento básico, exposição a fatores de risco ambientais ou mesmo a região geográfica em que o estudo foi realizado contribuam para as divergências observadas.

Kolbekova e colaboradores (2007)<sup>(35)</sup> que encontraram associação entre o grupo sanguíneo AB e a infecção por *T. gondii*, utilizaram critérios distintos na seleção de seus doadores os quais eram constituídos por homens jovens militares e saudáveis da República Checa. Portanto, é fato que estes recrutas

forneceram uma amostra representativa da população masculina Checa, porém, esta limitação na casuística pode representar um viés neste estudo quando comparado a achados de outras populações.

Salibay e colaboradores (2008)<sup>(70)</sup>, em seu estudo mostraram associação do grupo sanguíneo B com infecção por *T. gondii* e utilizou nas análises sorológicas o teste de aglutinação em látex o qual apresenta menor sensibilidade na detecção de anticorpos anti-*T. gondii*.

Os antígenos que caracterizam o sistema ABO são compostos por carboidratos e, além dos eritrócitos podem ser expressos no trato gastrintestinal de cerca de 80% dos humanos (secretores).<sup>(69)</sup> Entretanto, a presença de galactose na estrutura do antígeno do grupo AB não parece contribuir com a suscetibilidade à infecção por *T. gondii*, conforme demonstrado por Mattos e colaboradores (2008),<sup>(37)</sup> os quais avaliaram a potencial contribuição do gene FUT2 (secretor) na expressão dos antígenos ABO no intestino de indivíduos infectados e não infectados por *T. gondii*. Embora *Toxoplasma gondii* seja um parasito intracelular que infecta células nucleadas de animais de sangue quente, o processo de invasão celular por este parasito não parece ser dependente dos carboidratos que constituem os diferentes antígenos do Sistema ABO.

Este estudo, no que concerne aos genes, alelos, haplótipos e genótipos HLA, encontrou resultados inéditos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências dos alelos HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 nos grupos de doadores com e sem infecção por *T. gondii*. Contudo, no que se refere ao HLA-DRB1\*13, foi verificada diferença estatisticamente



limiar em suas frequências em ambos os grupos estudados, porém esta diferença não se manteve após o uso da correção para múltiplas comparações (correção de Bonferroni). Portanto, presume-se que este alelo, mesmo apresentando maior frequência em doadores infectados, não desempenha papel relevante isoladamente, na suscetibilidade à infecção por *T. gondii*. Salientamos que a escassez de estudos desta natureza com este marcador imunogenético dificulta a comparação com outros estudos sobre suas potenciais contribuições na infecção por este parasito.

As análises dos haplótipos HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 em ambos os grupos estudados também apresentaram resultados inéditos. Foi verificado que a maioria das combinações haplotípicas não se associa com a infecção por *T. gondii*. Contudo, o haplótipo HLA-A\*02\_HLA-DRB1\*13 mostrou-se presente apenas nos doadores com infecção por *T. gondii*. As análises comparativas realizadas neste estudo sugerem que este háplótipo se constitui num marcador de risco para aquisição da infecção por *T. gondii*. Esta associação se mantém mesmo após a aplicação do teste para múltiplas comparações. Entretanto, faz-se necessário salientar que diante da difícil demonstração do parasito no hospedeiro, a infecção por *T. gondii* é, via de regra, demonstrada pela presença de anticorpos específicos (IgM, IgG, IgA).<sup>(71)</sup>

A menção acima referida requer interpretação cautelosa, pois sua presença em doadores sororeagentes não significa, necessariamente, que tais doadores apresentam predisposição para infecção. Tendo-se em mente que os genes HLA de classe II (HLA-DRB1, HLA-DQB1 e HLA-DPB1) desempenham importante papel no controle da resposta imune adaptativa humoral, com

consequente expressão de anticorpos das classes IgM e IgG, além de IgA e IgE. A presença do haplótipo HLA-A\*02\_HLA-DRB1\*13 nos doadores infectados pode constituir evidência de competência imune voltada à expressão de anticorpos específicos para *T. gondii*.

De fato, o estudo experimental de Remesh e colaboradores (2017)<sup>(72)</sup> demonstrou que o antígeno de histocompatibilidade codificado pelo alelo HLA-A\*02 é capaz de ligar e apresentar peptídeos oriundos de *T. gondii* e apresentá-los aos linfócitos T. Além disso, estes mesmos autores sugerem que parte destes peptídeos podem ser apresentados aos linfócitos T por meio de antígenos de histocompatibilidade da classe II (HLA-DRB1, por exemplo). Estes dados experimentais suportam os resultados de nosso estudo de que os alelos que compõe o haplótipo HLA-A\*02\_HLA-DRB1\*13 influenciam positivamente a resposta imune humoral contra *T. gondii*.

São escassos entre as publicações brasileiras e internacionais, estudos que avaliaram a contribuição do sistema HLA na infecção por *T. gondii* em doadores de sangue. Um estudo recente, realizado com pacientes portadores de doença celíaca, explorou as potenciais contribuições de haplótipos HLA na infecção por *T. gondii*.<sup>(73)</sup> Estes autores observaram que a maioria dos pacientes com esta doença e infectados por *T. gondii* eram portadores do haplótipo HLA-DQ2, mas não souberam explicar qual a contribuição deste fator imunogenético na infecção por este parasito.

Dentre os poucos estudos publicados que investigaram a potencial influência do sistema HLA na infecção por *T. gondii* e em algumas formas clínicas

da toxoplasmose, os resultados encontrados foram controversos. Em um deles, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na frequência do HLA-A em 20 pacientes com toxoplasmose ocular e em controles normais.<sup>(56)</sup> Em outro estudo, os autores investigaram os antígenos HLA de classe I e II em pacientes com toxoplasmose ocular (N=52) e suas mães (N=47).<sup>(57)</sup> Não observaram diferenças estatisticamente significantes em ambos os grupos. Entretanto, relataram que o antígeno HLA-Bw62 estava associado à severidade desta doença. Como estes estudos abordaram aspectos das formas clínicas da toxoplasmose, seus resultados não são totalmente adequados para comparação com doadores de sangue, haja vista este último grupo de indivíduos não apresentar evidências clínicas de toxoplasmose no ato da doação bem como potenciais indícios desta doença (febre, mal estar, por exemplo), nos 30 dias anteriores à doação, conforme determina as resoluções do Ministério da Saúde para a hemoterapia (Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde, setembro de 2017).<sup>(74)</sup>

Os resultados deste estudo, quanto ao sistema ABO, são concordantes com a maioria das publicações que demonstraram que este sistema não modifica a suscetibilidade à infecção por *T. gondii*. Por outro lado e pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que investigou os genes, genótipos e haplótipos HLA de classe I e II em doadores de sangue como potenciais fatores de risco para a infecção por *T. gondii*. Estes últimos resultados podem oferecer background para novas investigações sobre a infecção por este parasito. Em primeiro lugar, o fato de o haplótipo HLA-A\*02\_HLA-DRB1\*13 estar presente em doadores de sangue portadores de anticorpos IgG anti-*T. gondii* desperta a

atenção para a possível contribuição deste haplótipo na apresentação de peptídeos endógenos e exógenos oriundos deste parasito, às células T CD8 e CD4, favorecendo assim o desenvolvimento das respostas imunes adaptativas celular e humoral, o que constitui um importante fator de proteção contra as formas intracelulares e extracelulares deste parasito. Em segundo lugar, estes resultados despertam a atenção para investigações que visem isolar e caracterizar os potenciais peptídeos endógenos e exógenos deste parasito com vistas ao seu uso em vacinas úteis na imunização de populações sob maior risco de infecção, especialmente gestantes, pacientes com indicação de transplantes de órgãos sólidos bem como aqueles que necessitam alguma forma de tratamento (quimioterapia, por exemplo) que gere comprometimento imune temporário, e mesmo pacientes que serão submetidos à esplenectomia. Estas proposições se alinham aos resultados observados em modelos experimentais relatados por Cong e colaboradores (2011)<sup>(75)</sup>, McMurtrey e colaboradores (2016)<sup>(76)</sup> e Remesh e colaboradores (2017).<sup>(72)</sup>

## **5. CONCLUSÕES**

---

- Com base nos perfis sorológicos observados, a frequência de infecção por *T. gondii* em doadores de sangue da região noroeste mostrou-se elevada.
- Os fenótipos ABO não se constituem fatores de risco para a aquisição da infecção por *T. gondii*.
- O haplótipo HLA-A\*02\_HLA-DRB1\*13 está associado à presença de anticorpos anti-*T. gondii*.

## **6. 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* 1998; 11(2): 267–299.
  
2. Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 2008; 55: 467-75.
  
3. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(10): 634-640.
  
4. Vaz RS, Guimarães ATB, Bonanato LD, Thomaz-Soccol V. Technical evaluation of serological screening tests for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies to prevent unnecessary transfusion risks. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008; 30(4): 277-280.
  
5. Kawazoe U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves D, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. *Parasitologia Humana*. 11<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu 2005.
  
6. Dubey JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 2004; 126: 57-72.



7. Singh G, Sehgal R. Transfusion-transmitted parasitic infections. *Asian J Transfus Sci* 2010;4(2):73–7.
8. Cavattoni I, Ayuk F, Zander AR, Zabelina T, Bacher A, Cayroglu E, et al. Diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection after allogeneic stem cell transplant can be difficult and requires intensive scrutiny. *Leuk Lymphoma* 2010;51(8):1530-5.
9. Frank SA. *Immunology and evolution of infectious diseases*. New Jersey: Princeton University Press; 2002.
10. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(2):264–96.
11. Coêlho RAL, Kobayashi M, Carvalho LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; 45: 229-31.
12. Sundar P, Mahadevan A, Jayshree RS, Subbakrishna DK, Shankar SK. *Toxoplasma* seroprevalence in healthy voluntary blood donors from urban Karnataka. *Indian J Med Res* 2007;126(1):50–5.

13. Elsheikha HM, Azab MS, Abousamra NK, Rahbar MH, Elghannam DM, Raafat D. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* antibodies among asymptomatic blood donors in Egypt. *Parasitol Res* 2009;104(6):1471-6.
14. Chiang TY, Hsieh HH, Kuo MC, Chiu KT, Lin WC, Fan CK, et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* Infection among healthy blood donors in Taiwan. *PLoS One*. 2012;7(10):e48139.doi:10.1371/journal.pone.0048139. Epub 2012 Oct 25.
15. Rodrigues A, Uezato S, Vono M, Pandossio T, Spegiorin L, Oliani A, 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.
16. Gonçalves MAS, Mattos CCB, Spegiorin LCJF, Oliani DCMV, Oliani AH, Mattos LC. Seropositivity rates for toxoplasmosis, rubella, syphilis, cytomegalovirus, hepatitis and HIV among pregnant women receiving care at a public health service, São Paulo state, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2010;14(6):601-5.
17. Mahmoudvand H, Sheibani V, Keshavarz H, Shojaee S, Esmaeipour K, Ziaali N. Acetylcholinesterase Inhibitor Improves Learning and Memory

Impairment Induced by *Toxoplasma gondii* Infection. Iranian Journal of Parasitology 2016;11(2):177-185.

18. Derouin F, Pelloux H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 1089–1101.

19. Landsteiner K. On Agglutination of Normal Human Blood. Transfusion 1961; 1:5–8.

20. Owen, R. Karl Landsteiner and the first human marker locus. Genetics 2000 v.155,p.995-998.

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. Daniels, G. ABO, Hh, Lewis blood groups system. In: Human blood groups. Cambridge University Press 1995; p.8-120.

23. Schenkel-Brunner H. Human Blood Groups. Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity. 2th ed.springer Wien New York, 2000.
  
24. Batissoco AC, Novaretti MCZ. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2003;25:47-58.
  
25. Henry, S. M. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood group related chart microorganism receptors. Transfus. Clin. Biol 2001; v.8, p.226-230.
  
26. Belamy, R. Susceptibility to infectious diseases: the importance of host genetics. New York: Cambridge University Press, 2004.
  
27. Mielke, J. H. et al. Human biological variation. New York: Oxford University Press, 2006.
  
28. Hooper, L. V.; Gordon, J. I. Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. Glycobiology 2001; v.11, n.1R- 10R.

29. Hooper, L. V. et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; v.291, p.881-884.
  
30. Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood* 2010;115: 4635–43.
  
31. Gill, H. S. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in Tanzanian blood donors. *East Afr. Med. J* 1985 v.62, n.8, p.585-588.
  
32. Midtvedt, T.; Vaage, L. Relationship between *Toxoplasma gondii* antibodies and blood group. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis* 1989, v.8, n.6, p.575-576.
  
33. Lopes R, Fano R, Contreras R, Font L. Anticuerpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* en Cubanos donantes de sangre. *Rev Latinoam Microbiol* 1993; 35(2):207-210.
  
34. Zhiburt, E. B. et al. The spread of antibodies to cytomegalovirus and *Toxoplasma* among donors of blood components. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol* 1997; v.1, p.9- 61.

35. 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(10):12-7.
36. Lecolier, B. et al. Absence of relationship between *Toxoplasma gondii* antibodies and blood group in pregnant women in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 1990; v.9, n.2, p.152-153.
37. 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: 254-258.
38. Chiang T-Y, Kuo M-C, Chen C-H, Yang J-Y, Kao C-F, et al. Risk Factors for Acute *Toxoplasma gondii* Diseases in Taiwan: A Population-Based CaseControl Study. *PLoS ONE* 2014; 9(3): e90880. doi:10.1371/journal.pone.0090880.

39. Sarkari B, Shafiei R, Zare M, Sohrabpour S, Kasraian L. Seroprevalence and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection among blood donors in southern Iran. *J Infect Dev Ctries* 2014;8: 543–7.
40. Modrek MJ. *Toxoplasma gondii* Seroprevalence Among Blood Donors in Zahedan , Southeastern Iran 2014; (1):1–4.
41. Henry, S. M. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood group related chart microorganism receptors. *Transfus. Clin. Biol* 2001; 8:226-230.
42. Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. *Einstein (Sao Paulo)* 2015; 13:153–6.
43. Mahdi BM. A glow of HLA typing in organ transplantation. *Mahdi Clinical and Translational Medicine* 2013; 2:6.
44. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013;14:301-23.

45. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*, 8ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
46. Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*, 8ª ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.
47. Rees L, Kim JJ. HLA sensitisation: can it be prevented? *Pediatr Nephrol*. 2014;30(4):577–87.
48. SILVA, M. E. R. DA; MORY, D.; DAVINI, E. Marcadores genéticos e auto-  
imunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2008; v. 52, n. 2, p. 166–180.
49. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE. The IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: D1222–7.
50. Schlosstein L; Terasaki PI; Bluestone R & Pearson CM. High association of an HL-A antigen, w27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288: 704-706.



51. Ahn S, CHOI HB, KIM TG. HLA and disease associations in Koreans. *Immune Netw.* 2011; v. 11, n. 6, p. 324-335.
  
52. Souza W, Belfort Jr R. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2014.
  
53. Ferreira AI, De Mattos CC, Frederico FB, Meira CS, Almeida GC Jr, Nakashima F, et al. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiol Infect* 2014;142:142-8.
  
54. Maenz M, Schlüter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U, Pleyer U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 39 2014; 77e106.
  
55. Ayo CM, Camargo AV, Frederico FB, Siqueira RC, Previato M, Murata FH, et al. MHC class I chain-related gene polymorphisms and linkage disequilibrium with HLA-B and HLA-C alleles in ocular toxoplasmosis. *PLoS One* (2015) 10:e0144534. doi:10.1371/journal.pone.0144534.
  
56. Ohno S, O'Connor GR, Kimura SJ. HLA antigens and toxoplasmic retinochoroiditis. *Tohoku J Exp Med* 1977;123:91-4.

57. Meenken C, Rothova A, de Waal LP, van der Horst AR, Mesman BJ, Kijlstra A. HLA typing in congenital toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol* 1995;79:494-7.
58. Mack DG, Johnson JJ, Roberts F, Roberts CW, Estes RG, David C, et al. HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol* 1999;29:1351-8.
59. Habegger de Sorrentino A, López R, Motta P, Marinic K, Sorrentino A, Iliovich E, Rubio AE, Quarleri J, Salomón H.. HLA class II involvement in HIV-associated toxoplasmic encephalitis development. *Clin Immunol* 2005;115:133-7.
60. Demarco AL, Rodrigues Mde L, Figueiredo JF, Deghaide NH, de Menezes MB, Demarco LA, et al. Susceptibility to toxoplasmic retinochoroiditis is associated with HLA alleles reported to be implicated with rapid progression to AIDS. *Dis Markers* 2012;33:309-12.

61. Ayo CM, et al. Ocular toxoplasmosis: susceptibility in respect to the genes encoding the KIR receptors and their HLA class I ligands. *Sci Report* 2016; 6:36632.
  
62. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2003; 100:177–182.
  
63. - Martin-Hernandez I, Garcya-Izquierdo SM. Prevalence of IgG antibodies to *Toxoplasma gondii* in Cuban blood donors. *Rev Biomed.* 2003;14:247-51.
  
64. Alvarado-Esquivel C, Mercado-Suarez MF, Rodríguez-Briones A, FalladTorres L, Ayala-Ayala JO, Nevarez-Piedra LJ, et al. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in healthy blood donors of Durango, Mexico. *BMC Infect Dis* 2007;7:75.
  
65. Tappeh K.H, Musavi J, Safa M.B, Galavani H, Hamid Alizadeh H. Prevalence of IgG and IgM anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Blood Donors at Urmia Blood Transfusion Organization, Iran. *Turkiye Parazitol Derg* 2017; 41: 1-4.

66. Elhence P, Agarwal P, Prasad KN, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in North Indian blood donors: Implications for transfusion transmissible toxoplasmosis. *Transfus Apher Sci.* 2010; 43(1): 37-40.
  
67. Siransy L, Dasse SR, Dou Gonat SP, Legbedji A, N'guessan K, Kouacou PA, et al. Immunity Status of Blood Donors Regarding *Toxoplasma gondii* Infection in a Low-Income District of Abidjan, Côte d'Ivoire, West Africa. *J Immunol Res* 2016; 2016:6830895.
  
68. Konishi E. & Takahashi J. Some epidemiological aspects of *Toxoplasma* infections in a population of farmers in Japan. *Int J Epidem* 1987;16:277-81.
  
69. Mahmoudvand H, Dezaki ES, Soleimani S, Reza M, Kheirandish F, Ezatpour B, et al. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among healthy blood donors in southeast of Iran. *Parasite Immunol* 2015; 37:362-7.
  
70. Salibay CC, Dungca JZ, Claveria FG. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection among Urban (Manila) and Suburban (Dasmarinās, Cavite) Residents, Philippines. *J Protozool Res* 2008; 18: 26-33.

71. Murata, F.H.A.; Ferreira, M.N.; Pereira-Chiocola, V.L.; Spegiorin, L.C.J.F.; Meira-Strejevitch, C.D.S.; Gava, R.; FAMERP Toxoplasma Research Group; Silveira-Carvalho, A.P.; de Mattos, L.C.; Brandão de Mattos, C.C. Evaluation of serological and molecular tests used to identify *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women attended in a public health service in São Paulo state, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 2017, 89, 13–19.

72. Remesh, S. G., Andreatta, M., Ying, G., Kaefer, T., Nielsen, M., McMurtrey, C., Hildebrand, W., Peters, B., and Zajonc, D. M. Unconventional peptide presentation by major histocompatibility complex (MHC) class I allele HLA-A\*02:01: BREAKING CONFINEMENT. *J. Biol. Chem* 2017; 292, 5262–5270.

73. Rostami-Nejad M1, Hejazi SH2, Peña AS3, Asadzadeh-Aghdaei H4, Rostami K5, Volta U6, Zali MR1. Contributions of HLA haplotypes, IL8 level and *Toxoplasma gondii* infection in defining celiac disease's phenotypes. *BMC Gastroenterol* 2018 May 18;18(1):66.

74. Portaria de Consolidação no 5, de 28 de Setembro de 2017 - Ministério da Saúde. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde, 2017. Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/MatrizesConsolidacao/Matriz-5-Programas.html>. Acesso em: 10 set.2018.

75. Cong H, Mui EJ, Witola WH et al. Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis: Protective *Toxoplasma gondii* eptopes restricted by HLA-A\*0201. *Vaccine* 2011; 29(4), 754–762.

76. McMurtrey, C., T. Trolle, T. Sansom, S. G. Remesh, T. Kaeffer, W. Bardet, K. Jackson, R. McLeod, A. Sette, M. Nielsen, et al. *Toxoplasma gondii* peptide ligands open the gate of the HLA class I binding groove. *ELife* 2017; 5: 246.

## **7. ANEXO**

---



## 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 006/2011

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 6531/2010 sob a responsabilidade de **Luiz Carlos de Mattos**, com o título "Investigação sorológica e molecular de *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue" está de acordo com a Resolução do 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, 03 de janeiro de 2011.



**Prof. Dr. Fernando Batigália**  
Coordenador do CEP/FAMERP



## **8. APÊNDICES**

---

## APÊNDICE 1

### **FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa denominada **Investigação sorológica e molecular de *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue**, avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – da Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto (parecer 06/2011). *Toxoplasma gondii* é o parasita que causa a toxoplasmose e essa doença pode ser transmitida aos seres humanos pela transfusão de sangue, acarretando problemas oculares (danos na visão).

Essa pesquisa tem como objetivos identificar os fatores que favorecem ou não a transmissão do *T. gondii* por meio da transfusão de sangue. Os resultados desta pesquisa poderão ajudar na compreensão dos fatores a toxoplasmose poderão beneficiar você e muitas outras pessoas.

Se os resultados desta pesquisa que os riscos de transmissão transfusional deste parasito fatores são importantes, eles poderão ajudar na adoção de medidas que possam reduzir os riscos de se transmitir este parasito por meio do sangue e para a orientação de programas de esclarecimento, educação, prevenção e mesmo tratamento da toxoplasmose. Se o resultado de seu exame for positivo (reagente) para a toxoplasmose, não haverá necessidade de aconselhamento genético, pois esta doença é causada por um parasito e não é trasmitida de pais para filhos.

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. Você poderá ter acesso a todos os seus dados coletados para esta pesquisa bem como aos resultados de todos os exames realizados nas amostras de seu sangue e terá também o direito de retirar a amostra ou quaisquer de seus dados de nosso banco de armazenamento de dados no momento em que você desejar. Em hipótese alguma seus dados serão divulgados de forma individual.

Para participar como voluntário 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 duas amostras de seu sangue para exames da toxoplasmose. 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 e será estocado em um banco de amostras do Laboratório de Imunogenética, podendo ser utilizado para novas pesquisas, dentro de no máximo cinco anos. Quaisquer análises adicionais a serem realizadas em sua amostra de sangue deverão obrigatoriamente estar vinculadas ao presente projeto. 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.

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

Caso ocorra danos de qualquer natureza durante a coleta de sua amostra de sangue, você receberá toda assistência médica gratuitamente.

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 "**Investigação sorológica e molecular de *Toxoplasma gondii* em doadores de sangue**". Autorizo a estocagem da amostra de meu sangue no banco de amostras do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e sua utilização para novas pesquisas vinculada a este projeto, desde que seja mantido o sigilo absoluto das informações por mim prestadas. 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.

( ) Desejo saber os resultados de meus exames      ( ) Não desejo saber os resultados de meus exames

....., ..... 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)**

## APÊNDICE 2

## FICHA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Data da coleta:		Código da amostra:		Registro do Doador no Hemocentro:				
Nome:								
Local de Nascimento:						Idade:		
Endereço atual:						Nº:		
Cidade:			Estado:		Telefone:			
Você contraiu algumas dessas doenças infecto-parasitárias?								
	Si m	Não		Sim	Não		Sim	Não
HTLV I/II			Malária			Sarampo		
Sífilis			Citomegalovírus			Catapora		
Chagas			Toxoplasmose			Outras:		
Hepatite viral			Rubéola			Outras:		
Dados clínicos:				<b>S</b>	<b>N</b>			
Você tem hábito de tomar leite cru?						Qual?		
Você carne crua ou mal passada de qualquer animal?						Qual?		
Você lava bem os legumes e as verduras?								
Você tem o hábito de andar descalço no solo?								
Você tem ou já teve animal doméstico?						Qual?		
Você já recebeu transfusões sanguíneas?						Quando? Por quê?		
Há quanto tempo você é doador de sangue?								
Você já fez algum tipo de cirurgia?						Qual?		
Você faz uso de algum tipo de medicamento?						Qual? Quanto tempo?		
Você viajou nos últimos seis meses?						Onde?		
Você ficou resfriado nos últimos seis meses?								
Você sabe seu tipo sanguíneo e seu fator Rh?						Qual?		
Você teve gravidez anterior?						Quantas?		
Você teve filho prematuro?						Quando?		
Você teve filho com algum tipo de síndrome?						Qual?		
Você teve algum aborto?						Quantos?		
Dados ambientais:								
Você mora em zona: ( ) urbana ( ) rural								
Qual tipo de moradia: ( ) alvenaria ( ) madeira ( ) outro <small>especificar</small>								
( ) própria ( ) alugada ( ) cedida ( ) outro <small>especificar</small>								
Tem rede de esgoto: ( ) sim ( ) não. Se não qual tipo? ( ) fossa ( ) outro <small>especificar</small>								
Você bebe água: ( ) filtrada ( ) fervida ( ) torneira								
Qual é o destino do lixo: ( ) coleta pública ( ) outro <small>especificar</small>								
Onde você mora tem: ( ) ratos ( ) baratas ( ) moscas								
Qual é o seu nível de escolaridade?								
Qual é a renda familiar em salários mínimos? ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) acima de 4.								
Etnia: Paciente:		Pai:			Mãe:			

Obs: