



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

FABIANA NAKASHIMA

**Fenótipo Lewis negativo: potencial fator de risco para
infecção por cepa RH de *Toxoplasma gondii* em
gestantes**

São José do Rio Preto

2010

FABIANA NAKASHIMA

**Fenótipo Lewis negativo: potencial fator de risco para
infecção por cepa RH de *Toxoplasma gondii* em
gestantes**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto

2010

Nakashima, Fabiana.

Fenótipo Lewis negativo: potencial fator de risco para infecção por cepa RH de *Toxoplasma gondii* em gestantes / Fabiana Nakashima. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2010.

96f. : il.; 30 cm.

Orientador: Luiz Carlos de Mattos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Imunogenética. 2. *Toxoplasma gondii*. 3. Toxoplasmose - Gestantes. 4. Grupos sanguíneos. 5. Fenótipo Lewis negativo. I. Mattos, Luiz Carlos de. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 575

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Fabiana Nakashima

**Fenótipo Lewis negativo: potencial fator de risco para infecção por cepa RH de
Toxoplasma gondii em gestantes**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
Orientador

Prof. Dr. Wilson Baleotti Junior
Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA

Prof^a. Dr^a. Marilanda Ferreira Bellini
IBILCE-UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 23 de Fevereiro de 2010.

**“Dedico este trabalho ao meu pai Etsuo Nakashima
e minha mãe Maria Célia Narciso”**

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

A Deus;

Ao Ministério da Educação – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida;

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP;

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto;

Ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo – IAL;

A Auckland University of Technology pelo acesso *on line* à Biblioteca;

Aos membros da banca, Prof. Dr. Wilson Baleotti Junior, Prof^a. Dra. Marilanda Ferreira Bellini, Prof^a. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos, Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira pelo aceite para a composição da banca;

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética Prof^a. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos;

Ao Professor Dr. Luiz Carlos de Mattos pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, pela paciência e por tudo que me ensinou durante este período;

À Cinara de Cássia Brandão de Mattos por ter ajudado na realização deste trabalho, por ter cedido às amostras objetos de estudo desta pesquisa, pelas discussões e conselhos;

A Prof^a. Dra. Vera Lúcia Pereira-Chioccola pela colaboração e o apoio concedido durante a execução deste trabalho;

À Daniela Prudente Teixeira Nunes por ser uma amiga presente, por me ajudar a superar todas as dificuldades e desafios encontrados durante o desenvolvimento desta pesquisa e na minha vida pessoal. Por escutar, incentivar, corrigir e discutir os assuntos relacionados a este trabalho. Pelas risadas, palhaçadas e as festas que deixaram minha vida mais prazerosa;

À Ana Iara Costa Ferreira que colaborou no desenvolvimento deste trabalho. Pelas brincadeiras, conversas, conselhos e pela amizade que tanto aprecio;

À Juliana, Denise e Giselda, pela amizade, valiosas discussões e pela disponibilidade em ajudar;

À Aline Sumitani Murakami que sempre me escutou e esclareceu dúvidas sobre o curso. Pelas risadas e crises que compartilhamos juntas;

À minha irmã Fabrícia Nakashima D'errico, meu cunhado Tiago de Jesus Leite D'errico e o meu irmão Fabio Nakashima pelo apoio e confiança;

À minha família que sempre esteve disposta a escutar meus desabafo;

Aos colegas de Mestrado, principalmente para Márcia Maria Urbanin Castanhole, Ana Luíza;

Pela amizade e companheirismo da Joana Ribeiro de Oliveira, da Clélia Kimura Teixeira, do Lucas Trevizani Rasmussen e da Eloísa Lourenço Sampaio que mesmo longe torcem por mim.

Resumo

Introdução: A infecção por *Toxoplasma gondii* em gestantes associa-se aos riscos de transmissão congênita. Este protozoário infecta os humanos utilizando como rota de infecção o trato gastrointestinal, onde se dá a síntese dos antígenos fucosilados Le^a e Le^b que determinam os fenótipos do sistema histo-sanguíneo Lewis [Le(a+b-), Le(a+b+) e Le(a-b-)]. A expressão destes fenótipos resulta de interações epistáticas entre os genes *FUT2* (Secretor) e *FUT3* (Lewis) que codificam as fucosiltransferases FUTII e FUTIII, respectivamente. Mutações no gene *FUT3* determinam a ausência de fucosilação dos oligossacarídeos precursores do tipo 1 resultando na expressão do fenótipo Le(a-b-). A infecção por *T. gondii* e a expressão dos antígenos Lewis ocorrem no mesmo órgão e, embora aparentemente independentes, podem estar relacionadas entre si. **Objetivo:** Investigar a associação o sistema histo-sanguíneo Lewis e a infecção por *T. gondii* da cepa RH. **Material e Métodos:** Foram selecionadas 209 amostras de soro e de DNA genômico estocadas no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, coletadas de gestantes atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto – FUNFARME. Uma triagem para detecção dos anticorpos anti-*T. gondii* foi realizada nas amostras de soro pelo método hemaglutinação indireta (HAI). O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi empregado para identificar os anticorpos específicos da classe IgG contra a cepa RH. Cento e noventa e cinco amostras de soro que apresentaram resultados concordantes entre os dois testes foram selecionadas para compor os grupos “reagente” e “não reagente”. Para inferir os fenótipos do sistema histo-sanguíneo Lewis, as amostras de DNA genômico correspondentes foram genotipadas para as mutações *G428A* do gene *FUT2*, *T202C* e *C314T* do gene *FUT3* por PCR-RFLP e PCR-SSP, respectivamente. Os dados foram analisados utilizando o teste exato de Fisher e o nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** Dentre as 195 amostras concordantes nas técnicas de HAI e ELISA, 116 (59,5%) apresentaram-se reagentes e 79 (40,5%) não reagentes. Entre as reagentes, 30 (25,86%) apresentaram o fenótipo Le(a+b-), 68 (58,62%) Le(a+b+) e 18 (15,52%) Le(a-b-). Os valores encontrados para as não reagentes foram iguais a 12 (15,19%) para Le(a+b-

) e 67 (84,81%) para Le(a+b+). As diferenças entre as frequências dos fenótipos Lewis foram estatisticamente significantes para Le(a-b-) [p=0,0001; OR: 29.863; IC 95%: 1.771-503.630], Le(a+b+) [p=0,0001; OR: 0,2537; IC 95%: 0,1239-0,5198] mas não para Le(a+b-) [p=0,0795; OR: 1.948; IC 95%: 0,9275-4.090]. Além destas, encontramos diferenças estatisticamente significantes quando comparamos a frequência de cada fenótipo Lewis: Le(a-b-) Vs Le(a+b-) [p=0,0118; OR: 15.165; IC 95%: 0,8463 – 271.710]; Le(a-b-) Vs Le(a+b+), [p=0,0001; OR: 36.460; IC 95%: 2.152-617.680] Le(a+b-) Vs Le(a+b+), p=0,0206; OR: 2.463; IC 95%: 2.463-5.214].
Conclusão: O fenótipo Le(a-b-) inferido a partir das genotipagens *FUT2* e *FUT3* está associado á infecção por cepas RH de *T. gondii*.

Palavras-chave: sistema histo-sanguíneo Lewis; *FUT3*; *FUT2*; *Toxoplasma gondii*; toxoplasmose; gestante.

Abstract

Introduction: *Toxoplasma gondii* Infection in pregnant women is associated with risks of congenital transmission. This protozoa infects humans using as infection route the gastro intestinal tract, where occur the synthesis of fucosylated Le^a and Le^b antigens which determine Lewis histo-blood group phenotypes [Le(a+b-), Le(a+b+), Le(a-b-)]. The expression of these phenotypes results from epistatic interactions between *FUT2* (Secretor) and *FUT3* (Lewis) genes which codes both the FUTII and FUTIII fucosyltransferases, respectively. Single nucleotide polymorphisms affecting *FUT3* gene determine the absence of type 1 oligosaccharide precursor fucosylation and the expression of Le(a-b-) phenotype. The entrance of *T. gondii* and the expression of Lewis histo-blood group system occur in the same organ, probably there is some link between them. **Objective:** The aim of this study was to test the hypothesis that the Lewis histo-blood group system is associated with infection by *T. gondii*. **Material e Method:** A total of 209 serum sample and genomic DNA sample stored at the Immunogenetics Laboratory from the Molecular Biology Department of Medicine School in São José do Rio Preto – FAMERP, obtained from pregnant women who attended in the High-Risk Pregnancy Clinic of Hospital de Base were enrolled in this study. Anti-*T. gondii* antibodies were screened by indirect hemagglutination test. ELISA assays were used to identify specific IgG antibodies to RH strain. One hundred and ninety-five serum samples, with identical results between both tests were selected to compose the groups “reagent” and “non reagent”. To infer the Lewis histo-blood group system phenotypes, genomic DNA samples corresponding to the serum sample were genotyped for the *G428A* mutation of the *FUT2* gene and *T202C* and *C314T* of *FUT3* gene by PCR-RFLP and PCR-SSP assays, respectively. The data were analyzed by Fisher’s exact test and the level of significance was 5%. **Results:** Of the 195 selected serum samples, 116 (59,5%) were reagents and 79 (40,5%) were non reagents. Among those reagents, 30 (25,86%) were phenotype as Le(a+b-), 68 (58,62%) as Le(a-b+) and 15 (15,52%) as Le(a-b-). The values found for the no reagents were equal to 12 (15.19%) for Le(a+b-) and 67 (84.81%) for Le(a+b+). The differences between the frequencies of the Lewis phenotypes were statistically significant for Le(a-b-) [p=0,0001; OD: 29.863; IC 95%: 1.771-503.630], Le(a+b+) [p=0,0001 OD: 0,2537; IC 95%: 0,1239-

0,5198] but not to Le(a+b-) [p=0,0795 OD: 1.948; IC 95%: 0,9275-4.090]. Besides these, we found statistically significant differences when comparing the frequency of each phenotype Lewis: Le(a-b-) Vs Le(a+b-) [p=0,0118; OR: 15.165; IC 95%: 0,8463-271.710]; Le(a-b-) Vs Le(a+b+), [p=0,0001; OR: 36.460; IC 95%: 2.152-617.680]; Le(a+b-) Vs Le(a+b+) [p=0,0206; OR: 2.463; IC 95%: 2.463-5.214].

Conclusion: The Le(a-b-) phenotype inferred by genotyping of the genes *FUT2* and *FUT3* is associated with infection by RH strain of *T. gondii*.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Soroprevalência encontrada em gestantes de diversos lugares do mundo	22
Figura 2	Formas infectantes do <i>Toxoplasma gondii</i> . Oocisto esporulado (A), taquizoíto (B) e cisto tecidual (C)	25
Figura 3	Estruturas e organelas do taquizoíto	26
Figura 4	Vias de contaminação por <i>Toxoplasma gondii</i>	28
Figura 5	Invasão e replicação do <i>Toxoplasma gondii</i> nas células hospedeiras	29
Figura 6	Representação esquemática da síntese dos antígenos Lewis	34

Figuras do Artigo

Figura 1	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 7,5% do fragmento de 1033 pares de bases do gene <i>FUT2</i> digerido com a enzima <i>AVA II</i> , ilustrando os genótipos GA (1, 2 e 6); AA (3 e 5); GG (4). M representa o marcador de 100 pares de bases	61
Figura 2	Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% dos genótipos <i>TT</i> (A), <i>TC</i> (B) e <i>CC</i> (C) do gene <i>FUT3</i> , mutação <i>T202C</i> . M representa o marcador de 100 pares de bases	62

Figura 3 Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% dos genótipos *CC* (D), *CT* (E) e *TT* (F) do gene *FUT3*, mutação *C314T*. M representa o marcador de 100 pares de bases

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Genes, alelos, fucosiltransferases, oligossacarídeo precursor e antígenos dos sistemas histo-sanguíneos Secretor e Lewis	33
Quadro 2	Combinações das formas ativas e inativas das fucosiltransferases FUTII e FUTIII na expressão dos antígenos e dos fenótipos Lewis no trato gastrintestinal e nos eritrócitos.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados das genotipagens <i>G428A</i> do gene <i>FUT2</i> e <i>T202C</i> e <i>C314T</i> do gene <i>FUT3</i> e os fenótipos Lewis inferidos para o trato gastritnestinal	64
Tabela 2	Valores absolutos e percentuais dos resultados reagente (R) e não reagente (NR) das 195 amostras de soro avaliadas por HAI e ELISA, de acordo com os fenótipos Lewis inferidos para o trato gastrintestinal (TGI) e, o valor p calculado pelo teste exato de Fisher. Os valores de Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) a 95%	65
Tabela 3	Valor p calculado pelo teste exato de Fisher para as comparações entre os fenótipos Lewis. Os valores de Odds Ratio (OR) e do intervalo de confiança (IC) a 95%.....	66
Tabela 4	Frequência dos fenótipos Lewis inferidos de acordo com os grupos reagente e não reagente	67

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

μ l	Microlitro
cDNA	Ácido Dexorribonucleico Complementar
dATP	Deoxinucleotídio Trifosfatado de Adenina
dCTP	Deoxinucleotídio Trifosfatado de Citosina
dGTP	Deoxinucleotídio Trifosfatado de Guanina
dNTP	Deoxinucleotídio Trifosfatado
DO	Densidade Ótica
dTTP	Deoxinucleotídio Trifosfatado de Timina
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Fuc	Fucose
<i>FUT2</i>	Gene Secretor
<i>FUT3</i>	Gene Lewis
FUTII	α -2-L-fucosiltransferase
FUTIII	α -3/4-L-fucosiltransferase
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
Gal	Galactose
GlcNAc	N-Acetilglicosamina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HGH 1s	Primer sense referente ao gene do hormônio do crescimento
HGH 2 as	Primer anti-sense referente ao gene do hormônio de crescimento
IAL	Instituto Adolfo Lutz de São Paulo
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgE	Imunoglobulina de classe E
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
IL-12	Interleucina -12

MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimol
Ng	Nanograma
NK	Natural Killer
OP	Oligossacarideo Precursor
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Reação em cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
PCR-SSP	Reação em cadeia da Polimerase – <i>Primers</i> de sequência específica
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TBE	Tris (Tris hidroximetil aminometano), Ácido Bórico e EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
TGI	Trato Gastrintestinal
A	Alfa

Sumário

Introdução

Toxoplasmose.....	19
<i>Toxoplasma gondii</i>	23
Ciclo Biológico do <i>Toxoplasma gondii</i>	27
Imunidade do Hospedeiro	30
Diagnóstico de Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> e da Toxoplasmose	31
Sistema Histo-Sanguíneo Lewis	31
Biosíntese dos Antígenos Le ^a e Le ^b	32
Sistema Histo-Sanguíneo Lewis como Fator de Risco para infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	37

Objetivos

Geral.....	39
Específicos.....	39

Resultados

Manuscrito a ser submetido à publicação à Revista <i>Blood</i>	40
--	----

Conclusões

68

Referências Gerais

69

Apêndice

APÊNDICE A - 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 UNIP, São José do Rio Preto, SP, 2009	81
--	----

APÊNDICE B - 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 UNIP, São José do Rio Preto, SP, 2009	83
APÊNDICE C - Resumo apresentado em forma de pôster durante o XI Simpósio de Genética & I Simpósio IMC-IBILCE Células-Tronco..	84
APÊNDICE D - Resumo apresentado em forma de pôster durante o 55º Congresso de Genética da Sociedade Brasileira de Genética	86
APÊNDICE E - Resumo apresentado em forma de pôster durante o XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia II Encontro de Parasitologia do Mercosul da Sociedade Brasileira de Parasitologia.	88
APÊNDICE F - Resumo apresentado em forma de pôster durante o 54º Congresso de Genética da Sociedade Brasileira de Genética.....	89
APÊNDICE G - Resumo apresentado em forma de pôster durante V Congresso Científico da UNIRP	91

Anexo

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP .	93
ANEXO B – Resumo do Artigo Publicado no Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases – Original paper - ISSN 1678-9199. V. 16, n 1, p. 87- 95, 2010.....	94
Autorização para reprodução	96

Introdução

Toxoplasmose

Toxoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (CARRUTHERS, 2002; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Nos humanos, a infecção pode ocorrer de duas formas: congênita ou pós-natal. Na forma congênita, a mãe infectada transmite o protozoário via placentária para o feto (HILL; DUBEY, 2002). As infecções pós-natais ocorrem na maioria dos casos por meio da ingestão de alimentos (frutas, verduras e carnes de origem animal) ou água contaminados por *T. gondii* e, em menor frequência, por transfusão de componentes sanguíneos, transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea (HILL; DUBEY, 2002; GIFFONI, 2007).

Uma característica importante deste parasito é a capacidade de resistir às respostas imunológicas desenvolvidas pelo organismo infectado. Nestes casos, o hospedeiro permanece cronicamente infectado, mas não apresenta evidências da doença (ABBAS et al., 2008). Entretanto, pode ocorrer a reativação da infecção dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Esta situação tem sido observada em pacientes submetidos a terapias imunossupressoras comumente utilizadas no transplante de órgãos sólidos e de medula óssea. As fontes de reinfecção podem ser órgãos e tecidos ou mesmo o enxerto do doador (CARRUTHERS, 2002; HILL; DUBEY, 2002).

A infecção por *T. gondii* é mundialmente disseminada entre os animais e o homem. Sua prevalência varia de um país para outro, oscila entre as áreas geográficas de um mesmo país e depende das condições ambientais, dos hábitos culturais, da higiene e da idade do hospedeiro (REY; RAMALHO, 1999; CAMARGO, 2001; CARRUTHERS, 2002; HILL; DUBEY, 2002; GIFFONI, 2007). Estima-se que entre 16% a 40% da população dos Estados Unidos e do Reino Unido esteja infectada. Na América Central, na América do Sul e no continente Europeu, estes valores variam de 50% a 80% (HILL; DUBEY, 2002). Estudos realizados no Brasil mostraram que a prevalência de infecção por este protozoário é

alta, variando entre 40 a 75% (CANTOS et al., 2000; COELHO et al., 2003; VAZ et al., 2008).

Apesar de alta em todo o mundo, a prevalência de infecção por *T. gondii* e sua evolução para a toxoplasmose depende principalmente do estado imunológico do hospedeiro (FERREIRA, M et al., 2007), da virulência da cepa, do número de parasitos infectantes e da rota de infecção (DIAS; FREIRE, 2005). Dentre as cepas identificadas do *T. gondii*, observaram que a cepa RH é frequentemente isolada de infecções humanas (SOARES, 2004; VALLOCHI et al., 2005; FERREIRA, I et al., 2008).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção aguda é assintomática na maioria dos casos (GUIMARÃES et al., 1993; CARRUTHERS, 2002), mas em casos de infecções sintomáticas, os sintomas clínicos mais comuns são as linfadenopatias, febre, fadiga, dores musculares, dor de garganta e dor de cabeça (HILL; DUBEY, 2002).

A toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos pode ser grave e muitas vezes fatal. De acordo com Hill e Dubey (2002), 10% dos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) nos Estados Unidos, e 30% na Europa morrem de toxoplasmose. De acordo com os estudos de Passos e colaboradores (2000), no Estado de São Paulo a taxa de mortalidade por toxoplasmose nos anos de 1988 e 1991 foi de 25,4% nos pacientes com SIDA. Embora o protozoário consiga invadir quaisquer órgãos e tecidos, o sistema nervoso central (SNC) é o local mais afetado nestes indivíduos, causando graves danos ao paciente (HILL; DUBEY, 2002). Um estudo realizado no SNC de pacientes com SIDA nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo mostrou que a infecção oportunista mais frequente é por *T. gondii* (34,1%), seguida pela criptococose (13,5%) (CHIMELLI et al., 1992).

As gestantes constituem um grupo especial de risco em relação à toxoplasmose devido ao fato de que a transmissão congênita do *T. gondii* pode ocorrer se houver infecção aguda durante o período gestacional (CAMARGO, 2001), ou se infecções crônicas forem reativadas (DETANICO; BASSO, 2006). O risco e a gravidade desta forma de transmissão dependem do período gestacional em que a mulher se infecta (AJZENBERG et al, 2002), sendo que a infecção durante o primeiro trimestre é mais grave do que no segundo e no terceiro (GIFFONI, 2007). Quando a infecção por *T. gondii* atinge os fetos pode levar ao desenvolvimento da

Tétrade de Sabin, caracterizada por hidrocefalia, retinocoroidite, calcificações cerebrais e retardo mental ou perturbações neurológicas (GUIMARÃES et al., 1993). Como a infecção por este parasito pode se dar em qualquer período da gestação, é recomendável que se faça triagem sorológica a cada quatro ou cinco semanas, utilizando testes sensíveis e de rápida execução (CAMARGO, 2001).

O estudo realizado por Pappas e colaboradores (2009), indica que a prevalência de infecção em gestantes é alta em diversas áreas no mundo (Figura 1). Estudos realizados no Brasil mostraram prevalência de infecção de 67% no norte do Paraná (REICHE et al., 2000), 74% em Rio Verde – Goiás (GIFFONI, 2007), 60% em Botucatu – São Paulo (OLBRICH; MEIRA, 2004) e 57,3 % na região noroeste paulista (GALISTEU et al., 2007). Segundo Carruthers (2002), estima-se que a infecção por *T. gondii* atinge um dentre 1000 recém-nascidos nos Estados Unidos. Camargo Neto e colaboradores (2000) estimam que a prevalência de infecção congênita no Brasil seja de um caso para cada 3000 recém-nascidos.

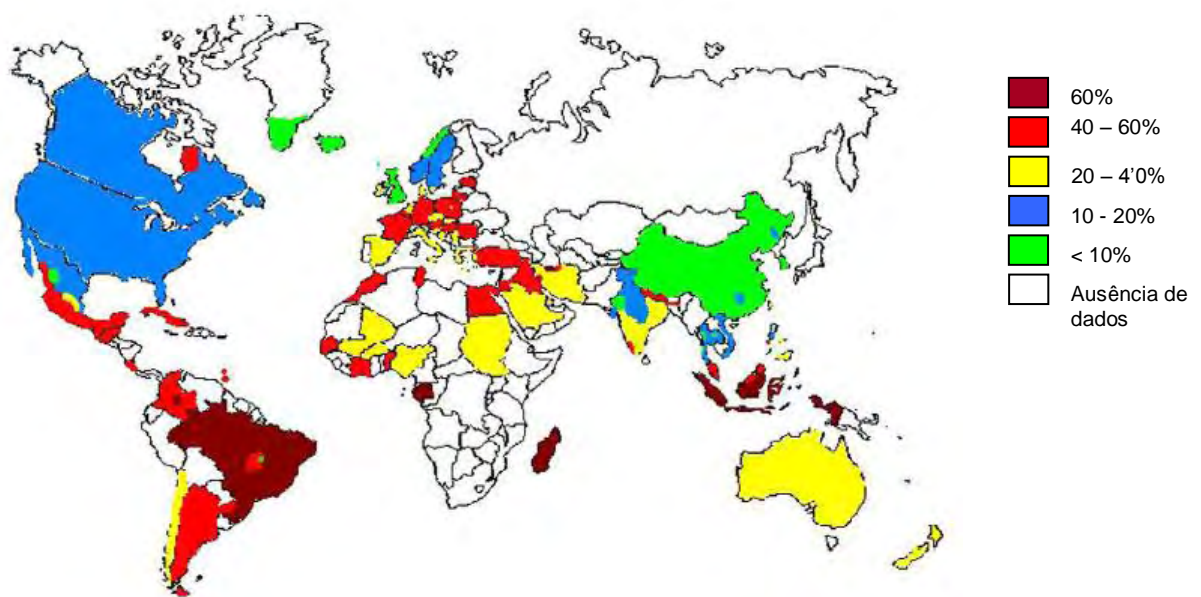


Figura 1. Soroprevalência encontrada em gestantes de diversos lugares do mundo. Adaptada de Pappas, 2009.

Toxoplasma gondii

O agente etiológico da toxoplasmose é um parasito intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae, gênero *Toxoplasma*, espécie *Toxoplasma gondii*. Existem três formas infectantes para o homem denominadas esporozoítos (oocistos), taquizoítos e bradizoítos (REY, 2008) (Figura 2).

Os oocistos são liberados nas fezes dos gatos domésticos e, portanto, são encontrados no meio ambiente, podendo contaminar alimentos como frutas, verduras e água de consumo humano. Esta forma é resistente a várias condições ambientais e permanece infectante por até 18 meses. Além disso, resiste a temperaturas que variam de 10°C negativos à 54°C por até 106 dias (DUBEY et al., 1998; TENTER et al., 2000; REY, 2008).

Os bradizoítos são encontrados em cistos teciduais que podem permanecer viáveis por toda a vida do hospedeiro (DUBEY et al., 1998). Estes cistos se alojam em tecidos musculares de animais de consumo humano como bovinos, suínos e aves. Foi demonstrado por meio de ensaios laboratoriais que estas formas são resistentes ao aquecimento (50°C por 10 minutos e 60°C por quatro minutos) e refrigeração (1°C a 4°C por mais de três semanas e - 1°C e - 8 °C por mais de uma semana) (MILLAR, 2005). No homem, a infecção crônica por bradizoíto pode ocorrer em qualquer órgão, mas acomete preferencialmente o miocárdio, o sistema nervoso central e os músculos esqueléticos (COSTA, 2007).

Os taquizoítos são encontrados livres em diversos fluídos corporais (saliva, leite, urina, lágrima e sêmen) durante a fase aguda (MILLAR, 2005). Estes dependem de um habitat intracelular para se replicar e, portanto não resistem muito tempo fora das células hospedeiras. A multiplicação deste parasito dentro do citoplasma celular é rápida e caracterizada pela formação de rosetas que provocam a ruptura da célula hospedeira, liberando os taquizoítos para invadir outras células (Figura 2B) (COSTA, 2007). Esta forma infectante está intimamente relacionada à transmissão congênita, pois é a única capaz de atravessar a placenta e se alojar no feto (MILLAR, 2005).

Estas três formas apresentam em comum estruturas especializadas que consistem em conóide, anel polar, microtúbulos subpeliculares e organelas

secretoras conhecidas como micronemas, roptrias e grânulos densos (DUBEY et al., 1998) (Figura 3). O protozoário ainda exibe locomoção dependente de actina e miosina, conhecida como “gliding motility”, que favorece sua migração e invasão das células hospedeiras (TOMLEY; SOLDATI, 2001; CARRUTHERS, 2002).

A invasão das células hospedeiras é rápida (menos de 10 segundos) e depende de processos sequenciais tais como: **1.** contato entre o pólo apical do parasito com a membrana das células alvo; **2.** protrusão do conóide; **3.** modificação da membrana celular do hospedeiro; **4.** secreção do conteúdo das organelas (JOINER; DUBREMETZ, 1993; ORTEGA-BARRIA; BOOTHROYD, 1999).

Os micronemas atuam no reconhecimento e na adesão facilitando a penetração do parasito na célula hospedeira, enquanto as roptrias agem no processo de invaginação celular criando o vacúolo parasitóforo, e os grânulos densos estão envolvidos com a aquisição de nutrientes da célula hospedeira (CARRUTHERS et al., 1999; COSTA, 2007; MEIRA, 2008).

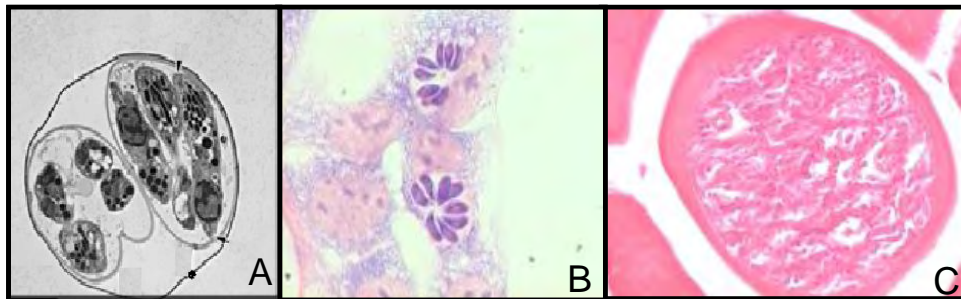


Figura 2. Formas infectantes do *Toxoplasma gondii*. Oocisto esporulado (A), taquizoíto (B) e cisto tecidual (C). Figura A Adaptada de <http://tp/www.ipec.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=55&infoid=69>; Figuras B e C de: <http://www.biof.ufrj.br/laminario.html> (10/08/2009)

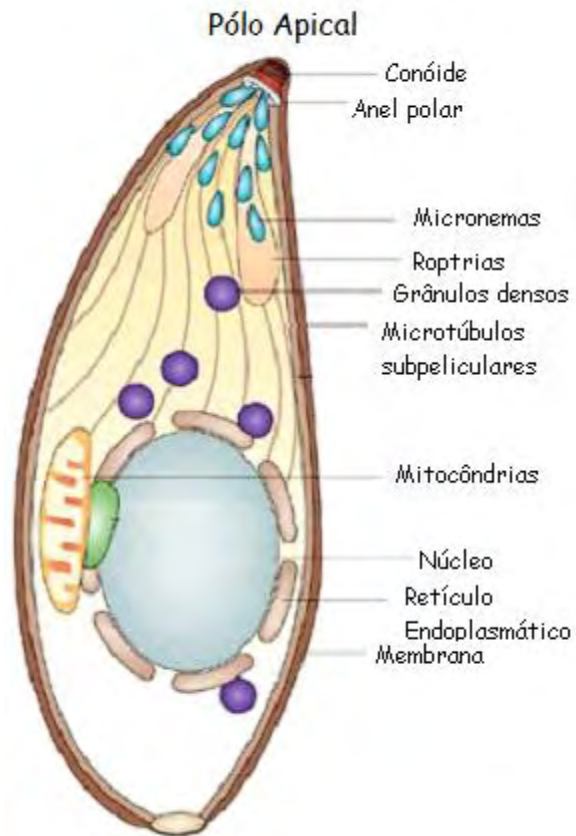


Figura 3. Estruturas e organelas do taquizoíta. Adaptada de Baum, 2006.

Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*

O ciclo evolutivo do *T. gondii* é heteroxeno, sendo o gato doméstico e outros felídeos silvestres os hospedeiros definitivos, pois neles ocorre tanto a fase sexuada quanto a assexuada (Figura 4) (SPEER; DUBEY, 1998). A infecção por *T. gondii* nestes hospedeiros se dá principalmente pela ingestão de cistos teciduais ou oocistos (GIFFONI, 2007).

Quando a infecção se dá pela ingestão de cistos teciduais, os bradizoítos liberados pela ação enzimática do estômago e do intestino delgado invadem as células intestinais do duodeno, iniciando o desenvolvimento de ciclos assexuais (DUBEY et al., 1998). Na fase sexuada, os gametas masculinos e femininos se unem gerando o zigoto que é envolto por uma parede cística, denominado de oocisto não esporulado, o qual é liberado nas fezes do hospedeiro (MILLAR, 2005). Os oocistos esporulam dentro um a cinco dias tornando-se infectantes (DUBEY et al., 1998).

Os humanos são infectados ao ingerir esta forma, pois os esporozoítos contidos nos oocisto são liberados no intestino, onde conseguem invadir as células intestinais. Nesta fase os esporozoítos passam à forma de taquizoítos, os quais são recobertos com vacúolos e se replicam rapidamente levando à lise da célula infectada e liberando mais taquizoítos, que invadem outras células na fase aguda (Figura 5) (GIFFONI, 2007).

Na fase crônica, os bradizoítos segregam em microcistos e assumem formas císticas de resistência que caracterizam a fase de latência, assim permanecendo por toda a vida do hospedeiro (CAMARGO, 2001; CARRUTHERS et al., 2000).

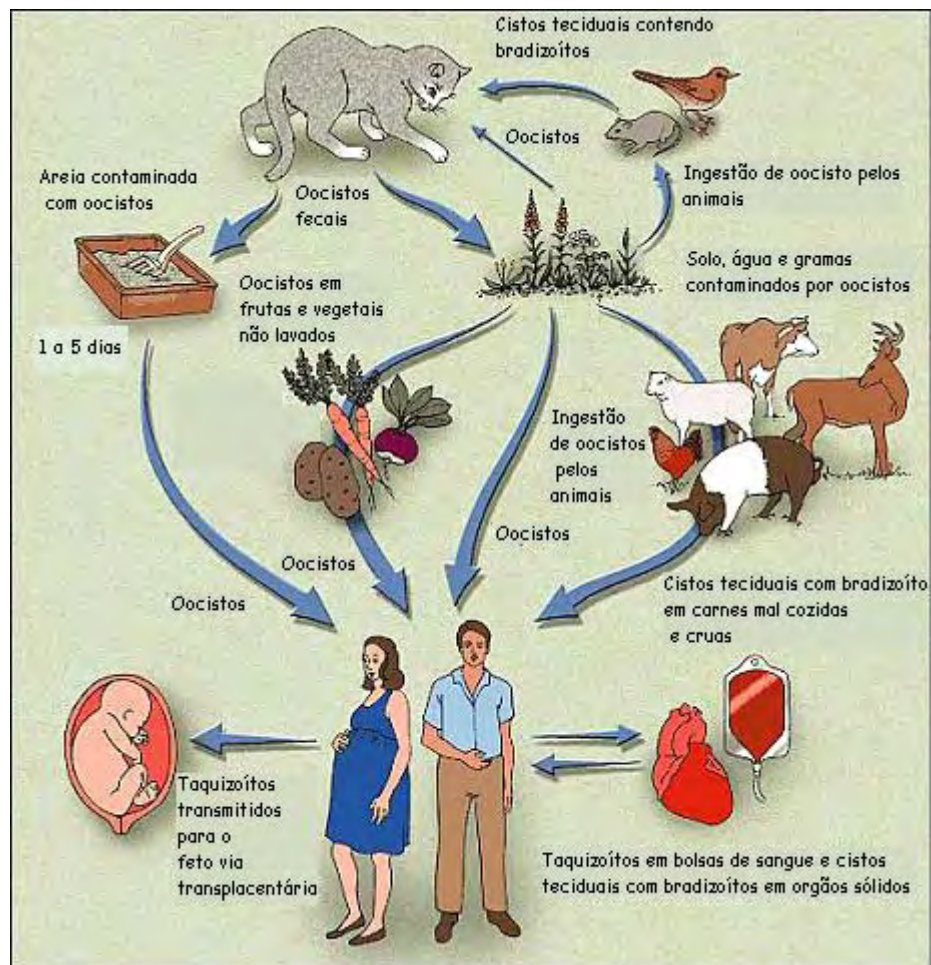


Figura 4. Vias de contaminação por *T. gondii*. Adaptada de Lynfield e Guerina, 1997.

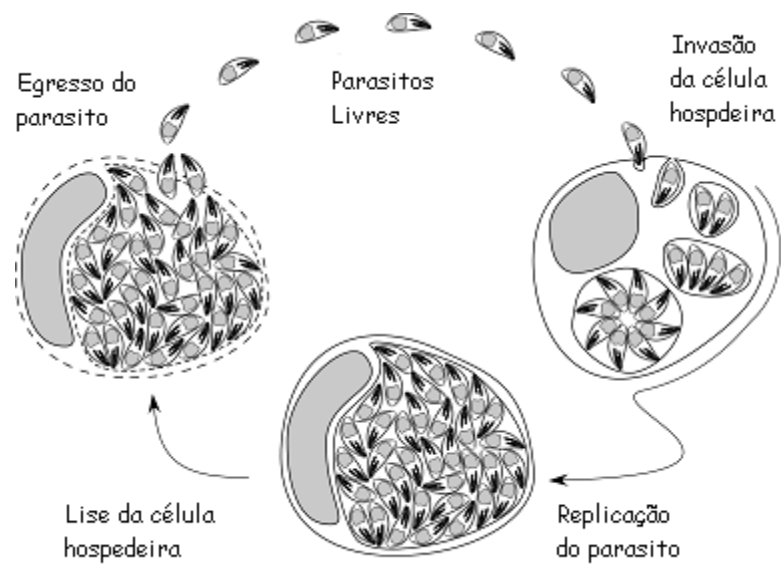


Figura 5. Invasão e replicação do *Toxoplasma gondii* nas células hospedeiras. Adaptada de <http://www2.bc.edu/~gubbelsj/Toxoplasma.html> (14/07/2009).

Imunidade do Hospedeiro

A fase aguda da infecção acontece entre os primeiros oito a doze dias, quando o taquizoíto se replica rapidamente em diferentes tecidos (CARRUTHERS, 2002). A infecção estimula a síntese da citocina IL-12 e interferon- γ que por sua vez ativam os linfócitos T CD4, CD8 e a célula Natural Killer (NK) impedindo a disseminação do parasito (LIEBERMAN; HUNTER, 2002; MILLER et al., 2008). Com isso se dá a redução progressiva da replicação do taquizoíto, que se diferencia para a forma bradizoíto dentro de cistos teciduais para se proteger dentro da célula hospedeira (COSTA, 2007).

Desde que não haja inflamação ou infiltração de células imunes, os cistos teciduais permanecem invisíveis nos tecidos. Em casos de deficiência dos linfócitos T, da célula NK e do interferon- γ , o bradizoíto pode se reverter em taquizoíto, o qual se replica rapidamente gerando regiões esféricas de necrose tecidual que são visíveis nas imagens tomadas por tomografia computadorizada e ressonância magnética (CARRUTHERS, 2002).

A imunidade humoral contra o *T. gondii* é caracterizada pela produção de anticorpos das classes IgM (Imunoglobulina de classe M), IgG, IgA e IgE (CHARDÉS et al., 1990). Os anticorpos 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 (CHARDÉS et al., 1990). A resposta imune ao *T. gondii*, mediada por anticorpos IgE é de curta duração e por isso a presença desses anticorpos pode ser considerada como mais um indicador de infecção recente. Todavia, em alguns casos pode-se constatar persistência de IgE por até onze meses (ASHBURN et al., 1995).

Diagnóstico de Infecção por *Toxoplasma gondii* e da Toxoplasmose

Devido à presença de sintomas inespecíficos ou mesmo ausência deles, o diagnóstico de infecção por *T. gondii* e da toxoplasmose é essencialmente laboratorial, incluindo métodos diretos que evidenciam o parasito além dos indiretos, baseados na detecção de anticorpos específicos (CAMARGO, 1975; FRENKEL, 1996). Normalmente os métodos sorológicos são aplicados na rotina laboratorial para detecção de anticorpos das classes IgM e IgG (HILL; DUBEY, 2002). O ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI) estão entre os mais utilizados. No entanto, estes métodos não fornecem informações precisas sobre o estado imune ou a resistência do hospedeiro. A presença dos anticorpos específicos sugere que o hospedeiro foi infectado em algum momento da sua vida. Anticorpos IgM anti-*T. gondii* são considerados marcadores de infecção aguda, enquanto IgG estão relacionadas com a fase crônica (CAMARGO, 2001).

Sistema Histo-Sanguíneo Lewis

O sistema histo-sanguíneo Lewis, assim denominado por apresentar seus antígenos tanto nos eritrócitos como em outros tecidos, é controlado pelo gene *FUT3* (19p13.3). O isolamento do cDNA deste gene mostrou uma região codificadora de 1083 pb capaz de expressar uma proteína de 361 aminoácidos, conhecida como FUTIII (α -3/4-L-fucosiltransferase) (KUKOWSKA-LATALLO et al., 1999). Os alelos do gene *FUT3* são representados, na genética clássica, por *Le* (gene funcional) e *le* (gene não funcional), e portanto os possíveis genótipos podem ser: *LeLe*, *Lele* e *lele* (DANIELS, 1995).

A enzima FUTIII atua na expressão fenotípica do sistema Lewis por meio da fucosilação de oligossacarídeos precursores (OP) do tipo 1 (Gal β 1 \rightarrow 3NAcGlc β 1-R) e do tipo 2 (Gal β 1 \rightarrow 4NAcGlc β 1-R). Estes precursores apresentam uma extremidade terminal livre e não reduzida à qual podem ser adicionadas moléculas de fucose, e uma outra oposta, que pode ser ligada carboidratos, lipídeos ou proteínas (DANIELS, 1995; HENRY et al., 1995; ORIOL, 1995; SCHENKEL-BRUNNER, 2000).

A fucosilação do OP do tipo 1 permite a expressão dos antígenos Le^a e Le^b, os quais podem ser expressos nos tecidos de origem endodérmica. Por outro lado, a fucosilação do OP do tipo 2 leva à produção dos antígenos Le^x e Le^y em tecidos de origem mesodérmica como o endotélio vascular (Quadro 1) (DANIELS, 1995). Portanto, a expressão destes antígenos depende do tipo do oligossacarídeo disponível no tecido (RAVN; DABELSTEEN, 2000). Como os OPs dos tipos 1 e 2 podem ser glicosilados por diferentes glicosiltransferases, o sistema Lewis apresenta relações bioquímicas, genéticas e imunológicas com os sistemas histo-sanguíneos ABO e Secretor (HENRY; SAMUELSSON, 2000).

Biosíntese dos Antígenos Le^a e Le^b

A síntese dos antígenos glicolipídicos Le^a e Le^b resulta da interação dos genes *FUT3* (19p.13.3) e *FUT2* (19q13.3). O gene *FUT3* codifica a fucosiltransferase FUTIII, a qual fucosila o OP tipo 1 para formar o antígeno Le^a. Paralelamente, a fucosiltransferase FUTII, codificada pelo gene *FUT2*, fucosila o mesmo precursor para formar o antígeno H tipo 1. A posterior fucosilação desse antígeno pela FUTIII dá origem ao antígeno Le^b (Quadro 1; Figura 6) (MOLLICONE et al., 1994; NISHIHARA et al., 1994; DANIELS, 1995; SCHENKEL-BRUNNER, 2000).

Os indivíduos que expressam as formas ativadas das fucosiltransferases FUTII e FUTIII sintetizam os antígenos Le^a e Le^b no trato gastrintestinal, são classificados como secretores positivos e apresentam o fenótipo eritrocitário Le(a-b+). Aqueles que possuem apenas a FUTIII também sintetizam o antígeno Le^a no trato gastrintestinal, são classificados como secretores negativos e seu fenótipo eritrocitário será Le(a+b-). Por outro lado, os indivíduos que não possuem a FUTIII expressam o fenótipo eritrocitário Le(a-b-) e poderão ser secretores positivos ou negativos, na dependência de possuírem ou não a FUTII (SCHENKEL-BRUNNER, 2000). O quadro 2 mostra os fenótipos Lewis que resultam das combinações das formas ativas e inativas das FUTII e FUTIII no trato gastrintestinal (TGI) e nos eritrócitos.

Genes	Alelos	Fucosiltransferases	OP	Antígenos
<i>FUT2</i> (<i>Se</i>)	<i>Se</i>	α -2-L-fucosiltransferase (FUTII)	Tipo 1	H tipo 1
	<i>se</i>	Inativa	-	-
<i>FUT3</i> (<i>Le</i>)	<i>Le</i>	α -3/4-L-fucosiltransferase (FUTIII)	Tipo 1	Le ^a ; Le ^b
			Tipo 2	Le ^x ; Le ^y
	<i>le</i>	Inativa	-	-

Quadro 1. Genes, alelos, fucosiltransferases, oligossacarídeo precursor e antígenos dos sistemas histo-sanguíneos Secretor e Lewis.

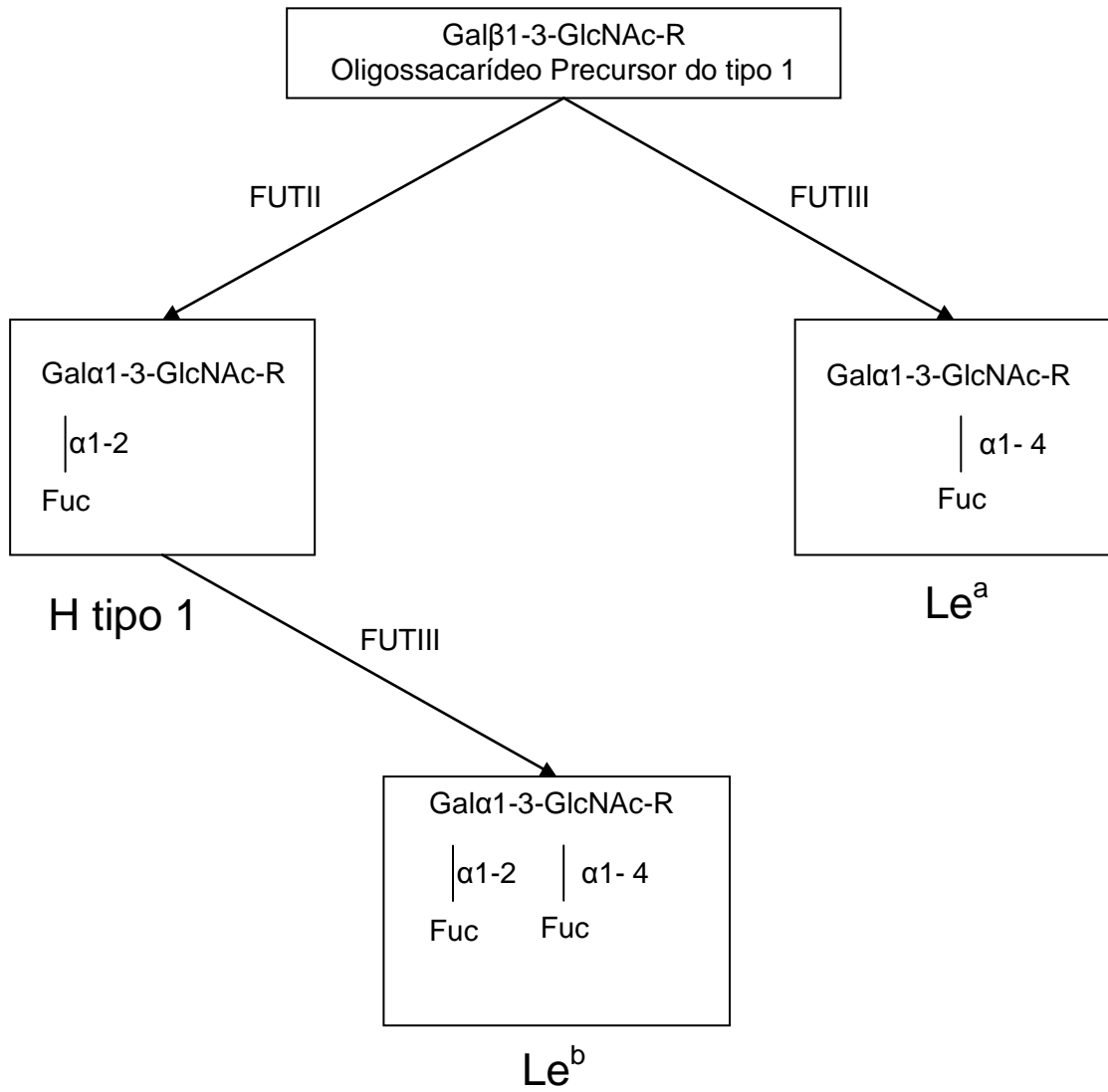


Figura 6. Representação esquemática da síntese dos antígenos Lewis.

FUTII	FUTIII	Antígenos Lewis	Fenótipo no TGI	Fenótipo eritrócitário
Ativa	Ativa	Le ^a e Le ^b	Le(a+b+)	Le(a-b+)
	Inativa	-	Le(a-b-)	Le(a-b-)
Inativa	Ativa	Le ^a	Le(a+b-)	Le(a+b-)
	Inativa	-	Le(a-b-)	Le(a-b-)

Quadro 2 . Combinações das formas ativas e inativas das fucosiltransferases FUTII e FUTIII na expressão dos antígenos e dos fenótipos Lewis no trato gastrintestinal e nos eritrócitos.

Os antígenos do sistema Lewis são expressos principalmente em tecidos de origem endodérmica como as glândulas salivares, mucosa gástrica, células intestinais e pâncreas. Estes antígenos circulam no plasma com ajuda das lipoproteínas e são adsorvidos passivamente pelos eritrócitos, linfócitos e plaquetas (HENRY et al., 1995). No geral, estes antígenos são encontrados nas secreções, principalmente na forma de glicoproteína e no plasma como glicolípido (MOLLICONE et al., 1994).

A frequência destes fenótipos varia entre as diferentes populações. Em caucasianos, a frequência do fenótipo Le(a+b-) é de 22%, Le(a-b+) 72% e Le(a-b-) 6%. Em japoneses, o fenótipo Le(a-b-) não chega a atingir 2% enquanto nos negróides a frequência varia entre 20 e 25% (BEIGUELMAN, 2003).

A expressão do fenótipo Le(a-b-) resulta de mutações que inativam o gene *FUT3*, levando à expressão da FUTIII não funcional. Até o momento, foram encontradas treze mutações em ponto responsáveis pela expressão deste fenótipo (*T59G*, *G508A*, *T1067A*, *T202C*, *C314T*, *C445T*, *G484A*, *G667A*, *G808A*, *G760A*, *G13A*, *G1022T* e *G47C*) (SOEJIMA; KODA, 2005). Vários estudos demonstraram que as mutações *T202C* e *C314T* são frequentes em caucasianos e estão relacionadas ao fenótipo Le(a-b-) (SALOMAA et al., 2000; SOEJIMA; KODA, 2005). No Brasil foram encontrados valores iguais a 24% e 13,7% (CINTRA; MATTOS, 2006) e 17,7% e 16,9% (GRADELLA, 2007) para as mutações *T202C* e *C314T*, respectivamente.

A mutação frequentemente encontrada no gene *FUT2*, em caucasianos, consiste na substituição de uma base G por outra A no nucleotídeo 428 do exon 2. Esta alteração inibe a expressão da forma funcional da FUTII e, portanto, seus portadores são incapazes de sintetizar o antígeno H tipo 1. Como consequência, não podem expressar o antígeno Le^b mesmo na presença da forma ativa da FUTIII (SCHENKEL-BRUNNER, 2000).

Nos indivíduos Lewis e secretor positivos, a FUTII é altamente ativa sob a cadeia precursora do tipo 1 em relação à FUTIII. Assim, ocorre a produção maior do antígeno H tipo 1, que posteriormente, é fucosilado pela FUTIII, transformando-o no antígeno Le^b. Isso não significa que não ocorre a produção dos antígenos Le^a, mas como a FUTII é mais competitiva, ocorre produção de maior quantidade do antígeno Le^b do que o antígeno Le^a, levando ao fenótipo eritrocitário Le(a-b+) (MOLLICONE et al., 1994).

O fenótipo eritrocitário Le(a+b+) é comum em aborígenes australianos, japoneses, chineses e polinésios. Este fenótipo resulta da presença de um alelo *FUT2* (Se^w: Weak), que expressa uma enzima de baixa atividade, permitindo que grande parte do oligossacarídeo precursor tipo 1 seja transformado no antígeno Le^a (MOLLICONE et al., 1994).

Os fenótipos do sistema Lewis nos eritrócitos podem ser alterados em casos de doenças e outras condições. Isso pode acontecer pelo fato de que os antígenos do sistema Lewis são adsorvidos nos eritrócitos no plasma. Este fenômeno foi observado em pacientes com cânceres do pâncreas, estômago, ducto biliar, cólon, mama e bexiga. Além destes, também há indícios de que, em gestantes, cirrose alcoólica, pancreatites alcoólicas, infecções virais e parasitárias, podem alterar os fenótipos Lewis. Assim, a fenotipagem eritrocitária do sistema Lewis não é suficiente, isoladamente, para determinar e caracterizar a expressão dos antígenos deste sistema no trato gastrointestinal. A genotipagem *FUT3* constitui uma estratégia de maior confiabilidade para se inferir os fenótipos Lewis tanto nos eritrócitos como em outros tecidos e secreções (HENRY et al., 1995).

Sistema Histo-Sanguíneo Lewis como Fator de Risco para Infecção por *Toxoplasma gondii*

Devido ao grande impacto epidemiológico e clínico da infecção por *T. gondii* em pacientes com imunodeficiências, portadores de lesão ocular, gestantes e neonatos, estudos vem sendo desenvolvidos. Como este protozoário consegue invadir vários tipos celulares e atravessa as barreiras hematoencefálica e transplacentária, sugere-se que seja capaz de reconhecer componentes abundantes da matriz extracelular ou moléculas de superfície amplamente distribuídas como receptores (ORTEGA-BARRIA; BOOTHROYD, 1999; CARRUTHERS et al., 2000; CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004; BARRAGAN, et al., 2005).

Crane e Dvorak (1982) estudaram a influência de diferentes tipos de monossacarídeos na infecção da cepa RH do *T. gondii* em células de músculo esquelético de embrião bovino e verificaram que carboidratos influenciam o índice de penetração. Maior índice foi observado na presença de concentração de 50 mM de

fucose. Estudo *in vitro* realizado por de Carvalho e colaboradores (1991) também mostrou que os taquizoítos aderem a membrana das células alvo reconhecendo as moléculas de N-Acetilglicosamina (GlcNAc) e galactose (Gal) conjugadas à albumina marcada com partículas de ouro. Curiosamente, os monossacarídeos acima referidos estão presentes na estrutura dos oligossacarídeos precursores do tipo 1 que dão origem aos antígenos histo-sanguíneos ABO, H e Le^a e Le^b no trato gastrointestinal, local utilizado como rota de infecção por *T. gondii*. É possível que a fucose, a GlcNAc e a Gal influenciam a suscetibilidade ou a resitência à infecção por *T. gondii*.

Estudos relacionando o sistema sanguíneo ABO como fator de risco para infecção por *T. gondii* encontraram prevalência de infecção no tipo sanguíneo B (MIDTVEDT; VAAGE, 1989; SALIBAY et al., 2008) e no grupo AB (LÓPEZ et al., 1993; ZHIBURT et al., 1997; KOLBEKOVA et al., 2007). Nestes estudos, a determinação dos fenótipos ABO foi baseada na pesquisa dos antígenos eritrocitários apenas, o que não se reflete no trato gastrointestinal, local utilizado pelo *T. gondii* para infectar o hospedeiro humano. Recentemente, nosso grupo de estudo não encontrou diferenças estatisticamente significantes entre a presença de anticorpos anti-*T. gondii*, o sistema ABO e o os fenótipos Secretor positivo e negativo em 367 gestantes da região noroeste do Estado de São Paulo (Mattos et al., 2008). O sistema histo-sanguíneo Lewis não foi explorado em nenhum dos estudos supracitados, sendo de fundamental importância, uma vez que seus antígenos fucosilados contribuem para a diversificação dos glicoconjugados ABO e Secretor expressos no trato gastrointestinal (DANIELS, 1995; HENRY et al., 1995; SCHENKEL-BRUNNER, 2000).

Objetivos

Geral:

Testar a hipótese de que o sistema histo-sanguíneo Lewis está associado à infecção por *T. gondii* da cepa RH.

Específicos

1. Definir dois grupos de amostras de soro de gestantes: “reagente” – presença de anticorpos anti-*T. gondii*, e “não reagente” – ausência de anticorpos anti-*T. gondii*;
2. Verificar em cada um dos grupos a presença de anticorpos anti-*T. gondii* de classe IgG específicos para cepa RH;
3. Identificar as mutações G428A do gene *FUT2*, T202C e C314T do gene *FUT3* em ambos os grupos;
4. Inferir os fenótipos Lewis do trato gastrintestinal a partir das genotipagens *FUT2* e *FUT3*;
5. Verificar a associação entre os fenótipos Lewis e a presença de anticorpos anti-*T. gondii* da cepa RH.

Resultados

Manuscrito a ser submetido à publicação à revista *Blood*, fator de impacto 10.43, Qualis A1.

Fenótipo Lewis negativo: Potencial fator de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* da cepa RH em gestantes

Nakashima, F¹; Brandão de Mattos, C. C²; Ferreira A. I. C²; Spegiorin, L. C. J. F³; Pereira-Chioccola, V⁴; Meira, C. S⁴; Mattos, L. C²

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/ Hospital de Base – FUNFARME

4- Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo – IAL-SP

Resumo

A transmissão congênita do *Toxoplasma gondii* é de grande importância clínica devido às graves consequências que podem afetar a saúde do feto. Os genes *FUT3* (19p.13.3) e *FUT2* (19q.13.3) codificam as enzimas FUTIII e FUTII respectivamente. A fucosilação dos oligossacarídeos precursores tipo 1 (β -Galactose1 \rightarrow 3 β N-Acetilglicosamina1-R) por estas enzimas resulta na síntese dos antígenos Le^a e Le^b, os quais determinam os fenótipos Le(a+b-), Le(a+b+) e Le(a-b-) do sistema histossanguíneo Lewis no trato gastrointestinal. Considerando que o *T. gondii* utiliza como rota de infecção o trato gastrointestinal, e que os antígenos do sistema histossanguíneo Lewis são expressos neste órgão, o objetivo deste trabalho foi investigar a associação entre estes dois eventos. Para tanto, foram selecionadas 209 amostras de soro e de DNA genômico estocadas no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, coletadas de gestantes atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto - FUNFARME. Nas amostras de soro, uma triagem para detectar anticorpos anti-*T. gondii* foi realizada com o método de hemaglutinação indireta (HAI). Nestas amostras foram também pesquisados os anticorpos IgG anti-*T. gondii* da cepa RH com o método ensaio imunoenzimático (ELISA). Dentre as 209 amostras, 195 (93,3%) apresentaram resultados concordantes entre as técnicas HAI e ELISA e, por isso, foram selecionadas para compor os grupos: “reagente” e “não reagente”. Para inferir os fenótipos do sistema histossanguíneo Lewis, as amostras de DNA genômico correspondentes às de soro foram genotipadas para as mutações *G428A* do gene *FUT2*, *T202C* e *C314T* do gene *FUT3* por PCR-RFLP e PCR-SSP, respectivamente. Os dados foram analisados utilizando o teste exato de Fisher e o nível de significância adotado foi de 5%. Das 195 amostras, 116 (59,5%) apresentaram-se reagentes e 79 (40,5%) não reagentes. Entre as não reagentes, 12 (15,19%) apresentavam o fenótipo Le(a+b-) e 67 (84,81%) Le(a+b+). No grupo reagente foram encontrados 30 (25,86%) Le(a+b-), 68 (58,62%) Le(a+b+) e 18 (15,52%) Le(a-b-). As frequências obtidas entre os grupos reagente e não reagente apresentaram diferenças estatisticamente significantes para Le(a+b+) [p=0,0001; OR: 0,2537; IC 95%: 0,1239-0,5198] e Le(a-b-) [p=0,0001; OR: 29.863; IC 95%:

1.771-503.630], mas não para Le(a+b-) [p=0,0795; OR: 1.948; IC 95%: 0,9275-4.090]. Diferenças estatisticamente significante também foram observadas quando se comparou as frequências de cada fenótipo isoladamente: Le(a-b-) Vs Le(a+b-) [p=0,0118; OR: 15.165; IC 95%: 0,8463 - 271.710]; Le(a-b-) Vs Le(a+b+) [p=0,0001; OR: 36.460; IC 95% 2.152 - 617.680]; Le(a+b-) Vs Le(a+b+) [p=0,0206; OR: 2.463; IC 95%: 2.463 - 5.214]. Com este estudo concluímos que o fenótipo Le(a-b-) inferido a partir das genotipagens *FUT2* e *FUT3* está associado à infecção por cepas RH de *T. gondii*.

Palavras-chave: sistema histo-sanguíneo Lewis; *Toxoplasma gondii*; *FUT2*; *FUT3*; toxoplasmose; gestantes.

Introdução

Toxoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (CARRUTHERS, 2002; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). A doença apresenta alta taxa de mortalidade em indivíduos imunocomprometidos (CHIMELLI et al., 1992; HILL; DUBEY, 2002) e é responsável por abortos (PAPPAS et al., 2009) e pelo desenvolvimento da Tétrade de Sabin nos recém-nascidos (GUIMARÃES et al., 1993). Em virtudes dos riscos da transmissão congênita que podem ocorrer quando a gestante se encontra na fase aguda da doença (CAMARGO, 2001), ou quando infecções crônicas são reativadas neste período (DETANICO; BASSO, 2006), a infecção por este protozoário é de grande importância epidemiológica e clínica.

No Brasil, a prevalência de infecção por *T. gondii* em gestante é alta, chegando a atingir 67% no norte do Paraná (REICHE et al., 2000), 74% em Rio Verde – Goiás (GIFFONI, 2007), 60% em Botucatu – São Paulo (OLBRICH; MEIRA, 2004) e 57,3% no noroeste paulista (GALISTEU et al., 2007).

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório que invade vários tipos celulares e é capaz de atravessar as barreiras hematoencefálica e a placentária. Alguns estudos sugerem que esta habilidade de invasão está relacionada à capacidade do protozoário reconhecer e aderir moléculas amplamente distribuídas no hospedeiro (ORTEGA-BARRIA; BOOTHROYD, 1999; CARRUTHERS et al., 2000; CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004; BARRAGAN et al., 2005).

No final dos anos 80 foi proposto que o grupo B do sistema ABO representa um potencial fator de risco para a infecção por *T. gondii* (MIDTVEDT; VAAGE, 1989) sendo confirmado por alguns estudos subsequentes (LÓPEZ et al., 1993; ZHIBURT et al., 1997; KOLBEKOVA et al., 2007; SALIBAY; CLAVERIA, 2005). Entretanto, outros relatos demonstraram resultados discordantes (GILL, 1985; LECOLIER et al., 1990), mesmo quando o *status* Secretor foi considerado (MATTOS et al., 2008).

O sistema histo-sanguíneo Lewis caracteriza-se pela expressão de moléculas glicosiladas no trato gastrintestinal (ORIOU, 1995), um local frequentemente utilizado pelo *T. gondii* para invadir os seres humanos (REY, 2008).

Este sistema é controlado pelos genes *FUT2* (19q.13.3) e *FUT3* (19p.13.3) os quais regulam a síntese dos antígenos Le^a e Le^b por meio da expressão da fucosiltransferases FUTII e FUTIII (SCHENKEL-BRUNNER, 2000). As combinações entre estes antígenos determinam diferentes fenótipos Lewis no trato gastrointestinal, os quais podem ser inferidos a partir da genotipagem *FUT2* e *FUT3* (HENRY et al., 1995; HENRY, 1996).

Pelo fato do *T. gondii* utilizar o trato gastrointestinal como rota de infecção e pelas evidências de que carboidratos e outras moléculas glicosiladas constituem potenciais receptores para microrganismos, este trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que o sistema histo-sanguíneo Lewis está associado à infecção por cepas RH deste parasito.

Material e Métodos

Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP sob parecer número 089/2005.

Amostras analisadas

Foram selecionadas 209 amostras de soro e de DNA genômico estocadas no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia da FAMERP, coletadas de gestantes atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto – FUNFARME.

*Sorologia para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* e genotipagem da substituição G428A do gene *FUT2**

A pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* e a genotipagem da substituição G428A do gene *FUT2* foram previamente realizadas nas amostras de acordo dados publicados em Mattos e colaboradores (2008). A sorologia foi realizada pelo método de Hemaglutinação indireta (HAI) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (IMUNO-HAI-TOXO-Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil) e a identificação da substituição G428A do gene *FUT2* foi realizada com o uso do método de Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), de acordo com o protocolo de Svensson e colaboradores (2000).

*Pesquisa de IgG anti- *Toxoplasma gondii* da cepa RH*

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para pesquisar os anticorpos específicos da classe IgG contra a cepa RH, a qual prevalece na população do estado de São Paulo (FERREIRA et al., 2008; VALLOCHI et al., 2005). O protocolo desenvolvido foi o mesmo aplicado rotineiramente pelos pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL), padronizado por Meira (2008). Em primeiro momento, os antígenos cultivados pelo IAL, foram diluídos em tampão bicarbonato de sódio 0,1 M pH 8.5 na concentração de 1 µg/mL para sensibilizar os orifícios das microplacas de poliestireno utilizadas. No segundo momento, as amostras de soro foram diluídas 1:200 na solução leite desnatado-PBS a 5% e distribuídas em duplicata às microplacas posteriormente incubadas por 50 minutos a 37°C. Em seguida 50 µL do anticorpo anti-IgG humana conjugada a peroxidase diluído 1:20.000 em PBS-Leite desnatado a 5% (Sigma) foram adicionados as placas que foram incubadas por mais 50 minutos a 37° C. Com adição de 100 µL do substrato enzimático (0,5 mg/mL de o-fenilenodiamina diluído em fosfato de sódio dibásico 0,1M pH 4.5, ácido cítrico 0,1M; H₂O₂ 0,1%) as placas

foram incubadas novamente em câmara escura por 30 minutos, a 37°C. A reação foi interrompida após adicionar 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N a cada orifício.

O valor de Densidade Ótica (DO) de cada amostra testada em duplicatas foi obtido pelo espectrofotômetro (Labsystems Multiskan) em comprimento de onda de 492 nm. Ao final, a média aritmética das DO de cada amostra foi calculada e utilizada para comparação com o valor de referência (*cut-off*).

O valor do *cut-off* foi obtido pelo cálculo da média aritmética das DO de 20 amostras de soro previamente identificadas como não reagentes, acrescido de duas vezes o valor de desvio-padrão. Quando as médias de DO das amostras testadas em duplicata apresentaram valores de DO maior que do *cut-off* foram consideradas reagentes (presença de anticorpos anti-*T. gondii*) e quando menores que este valor, não reagentes (ausência de anticorpos anti-*T. gondii*).

Genotipagem do gene *FUT3*

A identificação das substituições *T202C* e *C314T* do gene *FUT3* foi realizada com o uso do método de Reação em Cadeia da Polimerase – Primers de sequência específica (PCR-SSP), de acordo com o protocolo de Grahn et al (2001). Para cada substituição duas reações de amplificação foram preparadas com: 7,7 µL de água MilliQ, 1,5 µL do PCR Buffer 10X, 0,8 µL de MgCl₂ (50 Mm), 1 µL de dNTP a 20mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP - Invitrogen), 0,5 U DNA polimerase (Invitrogen), 3 µL de DNA genômico a 100 ng/mL. Em cada tubo de reação foram incluídos 0,2 µL a 20 mM dos *Primers* sense (s) e anti-sense (as) (HGH1s - 5'-GCCTTCCCAACCATTCCTT-3') (HGH2as - 5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3') do controle interno de amplificação e o *primer* 55as (5'-TTCTGGAGGGGAGAGGCT-3'). Além destes, foram adicionados na reação 0,2 µL a 20 mM dos *Primers* específicos para cada substituição analisada [*T202C* (50s - 5'-CCCTCCTGATCCTGCTATG-3' ou 49s - 5'-ACCCTCCTGATCCTGCTAC-3'); *C314T* (52s - 5'-GTACCCACAGGCAGACACG-3' ou 51s - 5'-TGTAACCCACAGGCAGACAT-3')] totalizando o volume final de 15 µL.

Ambas as reações diferiram entre si pela adição de *Primers sense* específicos utilizados para cada substituição. Em uma das reações foi adicionado o

Primer sense específico para o alelo selvagem [*T202C* (50s) ou *C314T* (52s)] e na outra foi adicionado o *Primer sense* específico para o alelo mutante [*T202C* (49s) ou *C314T* (51s)].

As condições de amplificação para a identificação da substituição *T202C* foram de 96°C 60 segundos (s), cinco ciclos de 96°C 20 s, 70°C 45 s, 72°C 25 s, 21 ciclos de 96°C 25 s, 65°C 50 s, 72°C 30 s, quatro ciclos de 96°C 30 s, 55°C 60 s, 72°C 90 s, 72°C 60 s e - 4°C infinito.

Para a mutação *C314T* as condições de amplificação foram de 96 °C por 60 s, cinco ciclos de 96°C 20 s, 70°C 45 s, 72°C 25 s, 21 ciclos de 96°C 25 s, 67°C 50 s, 72°C 30 s, quatro ciclos de 96°C 30 s, 55°C 60 s, 72°C 90 s e - 4°C infinito.

Após a amplificação, os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Os tempos de corridas eletroforéticas foram de 60 minutos para a mutação *T202C* e de 30 minutos para a *C314T*, a 120 volts.

O tamanho dos fragmentos correspondentes ao alelo selvagem e o alelo mutante da substituição *T202C* foi de 1045 e 1044 pares de bases, enquanto que para a mutação *C314T* foi de 932 e 933 pares de bases, respectivamente. O fragmento correspondente ao controle interno de amplificação continha 428 pares de bases.

Análise estatística

Para calcular as diferenças das proporções dos fenótipos Lewis inferidos entre os grupos “reagente” e “não reagente” foi utilizado o teste exato de Fisher e o nível de significância adotado foi igual a 5%.

Resultados

Dentre as 209 amostras, 195 (93,3%) foram selecionadas para este estudo por apresentarem resultados concordantes entre as técnicas HAI e ELISA. Deste total, 116 (59,5%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* e 79 (40,5%) mostraram-se não reagentes. As figuras de 1 a 3 ilustram os perfis eletroforéticos dos fragmentos amplificados por PCR-RFLP e PCR-SSP para as mutações *G428A* (*FUT2*), *T202C* e *C314T* (*FUT3*). A tabela 1 contém os resultados das genotipagens *FUT2* e *FUT3* e os fenótipos Lewis inferidos para o trato gastrointestinal.

Na tabela 2 estão os valores absolutos e percentuais dos resultados reagente e não reagente das amostras de acordo com o fenótipo Lewis inferido, bem como o valor *p* obtido pelo teste exato de Fisher.

A frequência do fenótipo Le(a-b-) mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparada com às dos fenótipos Le(a+b-) e Le(a+b+) em conjunto (Tabela 2), e separadamente (Tabela 3). As frequências dos fenótipos Lewis inferidos de acordo com os grupos reagente e não reagente estão ilustrados na tabela 4.

Discussão

Relatos prévios sugerindo associação entre o sistema histo-sanguíneo ABO e a infecção por *T. gondii* (MIDTVEDT; VAAGE, 1989; LECOLIER et al., 1990; LÓPEZ et al., 1993; ZHIBURT et al., 1997; ANGSTROM et al., 2004; SALIBAY; CLAVEIRA, 2005; KOLBEKOVA, 2007), estimularam-nos a investigar este fenômeno em relação ao sistema histo-sanguíneo Lewis. Este sistema, que expressa no trato gastrointestinal os antígenos Le^a e Le^b sob ação das fucosiltransferases FUTII e FUTIII, além de contribuir para a glicosilação de diferentes moléculas e para a diversificação das cadeias oligossacarídicas ligadas a proteínas e lipídeos, interage com o sistema histo-sanguíneo ABO (ORIOU, 1995; HENRY, 2001).

A importância dos antígenos Le^a e Le^b bem como de outros carboidratos dos sistemas histo-sanguíneos como receptores para microrganismos que colonizam o trato gastrintestinal vem sendo explorada (BOREN et al., 1993; HENRY, 2001; IMBERTY; VARROT, 2008). Além do *T. gondii* utilizar o trato gastrintestinal como rota de infecção em humanos, há evidências de que suas roptrias ligam moléculas glicosiladas como parte do processo de invasão celular (de CARVALHO et al., 1991; ORTEGA-BARRIA; BOOTHROYD, 1999; CARRUTHERS et al., 2000). Estes dados fundamentaram nossa hipótese.

Para investigar a associação entre o sistema histo-sanguíneo Lewis e a infecção por pela cepa RH do *T. gondii*, selecionamos amostras de soro e DNA genômico de gestantes com e sem anticorpos de classe IgG para este parasito, identificados com o uso do método hemaglutinação indireta, previamente analisadas por nosso grupo (MATTOS et al., 2008). Estas amostras foram re-avaliadas pelo método ELISA validado por Meira e colaboradores (2008), os quais demonstraram sua adequada sensibilidade e especificidade na investigação de anticorpos específicos para a cepa RH. Apenas as amostras com resultados “reagente” e “não reagente” concordantes por hemaglutinação indireta e ELISA foram utilizada para a composição dos grupos. Optamos por estes dois métodos sorológicos para compor os grupos, pois os mesmos são rotineiramente empregados em laboratório de análises clínicas e apresentam os parâmetros de sensibilidade e especificidade adequados para o diagnóstico da toxoplasmose (CONCUERA et al., 1981 *apud* PINTO et al., 2009).

O percentual de infecção em gestantes por *T. gondii* é elevado nas diferentes áreas do Brasil (REICHE et al., 2000; OLBRICH; MEIRA, 2004; GIFFONI, 2007; PAPPAS, 2009), incluindo a região noroeste paulista (GALISTEU et al., 2007). Entretanto, estes estudos não identificaram anticorpos específicos para a cepa RH, mas é possível que a mesma seja prevalente na região de origem das amostras analisadas neste estudo, visto que recentes relatos demonstraram sua predominância em aidéticos e não aidéticos do Estado de São Paulo (FERREIRA et al., 2008; VALLOCHI et al., 2005). Portanto, os resultados encontrados neste estudo refletem os índices de infecção pela cepa RH no noroeste paulista.

As frequências dos fenótipos Lewis inferidos a partir da genotipagem *FUT2* e *FUT3*, independente da presença ou não de anticorpos IgG, foram similares àquelas descritas para a população brasileira (BEIGUELMAN, 2003). Portanto, as

amostras selecionadas, embora oriundas apenas de gestantes, é representativa da região noroeste do Estado de São Paulo.

O uso da genotipagem *FUT2* e *FUT3* para inferir os fenótipos Lewis em mulheres grávidas é justificado. A síntese dos antígenos Le^a e Le^b ocorre durante a gestação, mas a expressão dos fenótipos eritrocitários Le(a+b-) e Le(a-b+) sofre variações devido às alterações fisiológicas comuns na gravidez. Há demonstrações de que mulheres fenotipadas como Le(a+b-) e Le(a-b+) expressam o fenótipo Le(a-b-) durante a gravidez (HAMMAR et al., 1981). Portanto, a fenotipagem eritrocitária não se constitui em um procedimento confiável para a investigação do sistema Lewis em gestantes e torna-se necessário o uso de métodos moleculares (HENRY et al., 1995).

A escolha pela genotipagem das mutações *G428A* do gene *FUT2*, *T202C* e *C314T* do gene *FUT3* para inferir os fenótipos Lewis [Le(a+b-); Le(a+b+); Le(a-b-)] no trato gastrointestinal baseou-se em estudos que demonstraram prevalência destas substituições na população brasileira (CINTRA; MATTOS, 2006a; CINTRA; MATTOS, 2006b; GRADELLA, 2007). A mutação *T59G* do gene *FUT3* também é frequente na população brasileira (GRADELLA, 2007), porém não foi considerada neste estudo uma vez que nem sempre está relacionada ao fenótipo Lewis negativo genuíno (NISHIHARA et al., 1999; SOEJIMA; KODA, 2005).

Neste estudo, o fenótipo Le(a+b-) foi inferido a partir da combinação da homozigose para a mutação *G428A* do gene *FUT2* com os alelos selvagens *T202C* e *C314T* do gene *FUT3*, pois foi observado que estas mutações são comuns na região noroeste do Estado de São Paulo (CINTRA; MATTOS, 2006a). O fenótipo Le(a+b+) foi inferido da presença dos alelos selvagens de ambos os genes. Este último fenótipo aparece nos eritrócitos como Le(a-b+) mas de fato, seus portadores expressam os antígenos Le^a e Le^b no trato gastrointestinal (HENRY et al., 1995; HENRY, 1996). Portanto, a notação Le(a+b+) reflete o real fenótipo Lewis neste local utilizado pelo *T. gondii* como rota para infectar os humanos. A inferência do fenótipo Le(a-b-) foi baseada na presença de um ou ambos alelos mutantes do gene *FUT3*, independente da mutação *G428A*. Estas estratégias foram sugeridas por estudos que demonstraram que a expressão eritrocitária dos fenótipos Lewis nem sempre é concordante com os genótipos. Assim, são adequadas para definir de maneira mais precisa os verdadeiros fenótipos Lewis do trato gastrointestinal (HENRY et al., 1995; HENRY, 1996).

A comparação das frequências dos fenótipos Lewis entre reagentes e não reagentes mostraram diferenças estatisticamente significantes. Os fenótipos Le(a+b-) e Le(a+b+) foram observados em ambos os grupos, mas o fenótipo Le(a-b-) foi encontrado apenas nas amostras reagentes. Desta forma, os resultados aqui relatados demonstram pela primeira vez, pelo conhecimento dos autores, forte associação deste fenótipo com a infecção por cepa RH de *T. gondii*.

As razões para esta associação não são totalmente compreendidas. É possível que diferentes fatores contribuam para os resultados relatados neste estudo. O fenótipo Le(a-b-) caracteriza-se pela ausência dos antígenos Le^a e Le^b tanto nos eritrócitos como no trato gastrointestinal e portanto, seus portadores expressam apenas o oligossacarídeo precursor (OP) tipo 1 na presença de mutações que inativam o gene *FUT2*, ou o antígeno H tipo 1 quando expressam normalmente a enzima FUTII. Em sua extremidade dissacarídica terminal, o OP tipo 1 possui uma molécula de galactose ligada a outra de N-Acetilglicosamina (Gal β 1 \rightarrow 3NAcGlc-R), a qual pode ser modificada pelas enzimas FUTII e FUTIII pela adição de uma ou duas moléculas de fucose, para formar os antígenos H tipo 1, Le^a ou Le^b, respectivamente (SCHENKEL-BRUNNER, 2000). Como a expressão dos antígenos Le^a e Le^b depende da presença da enzima FUTIII, mutações que inativam o gene *FUT3* são crucial para manutenção da estrutura inalterada do OP tipo 1 e do antígeno H tipo 1. Portanto, a ausência dos antígenos Le^a e Le^b pode favorecer a aderência do *T. gondii* membrana no processo de invasão celular.

Análises experimentais demonstraram que proteínas das roptrias do *T. gondii* aderem a moléculas de Gal e NAcGlc (de CARVALHO et al., 1991). Estas observações oferecem, pelo menos em parte, fundamentação para os resultados observados neste estudo, pois a maior frequência de infecção ocorreu nos indivíduos Le(a-b-). Nestes indivíduos, a extremidade dissacarídica do OP tipo1 não é modificada pela enzima FUTIII, embora possa ser fucosilada pela enzima FUTII para formar o antígeno H t ipo 1 (ORIOL, 1995). Portanto, é possível que combinação de Gal com NAcGlc na composição da estrutura oligossacarídica do OP tipo 1 e do antígeno H tipo1 favoreça a aderência de cepas RH do *T. gondii* às células hospedeiras e contribua para a maior suscetibilidade do fenótipo Le(a-b-) à infecção.

A suscetibilidade do fenótipo Le(a-b-) não parece ser absoluta pois amostras pertencentes aos demais fenótipos Lewis foram encontradas nos grupos

reagente e não reagente. As diferenças entre as frequências dos fenótipos Le(a+b-) e Le(a+b+) nestes grupos foram estatisticamente significantes. Amostras Le(a+b-) mostraram maior índice de infecção que aquelas Le(a+b+). As razões para estas diferenças não são totalmente compreendidas, porém é possível que variações estruturais nos antígenos Le^a e Le^b contribuam para estas observações.

O antígeno Le^a é monofucosilado e sua síntese é dependente da enzima FUTIII. O antígeno Le^b é difucosilado, mas sua síntese é dependente das enzimas FUTII e FUTIII. Portanto, estas moléculas apresentam variações na conformação espacial as quais, além de serem distinguidas por anticorpos monoclonais específicos, podem atuar como receptores para microrganismos (KARLSSON, 1995). De fato, análises experimentais demonstram que os antígenos H tipo 1, Le^a e Le^b atuam como ligantes para adesinas expressas pelo bacilo *Helicobacter pylori* (BOREN et al., 1993; ALKOUT et al., 1997). Estes antígenos são derivados do mesmo oligossacarídeo precursor e diferem entre si pelo número e localização das moléculas de fucose adicionadas (ORIOLE, 1995).

Análises experimentais demonstraram que moléculas de fucose são excluídas da região onde ocorre o processo ativo penetração dos taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* em células endoteliais humanas na formação do vacúolo parasitóforo (STUMBO et al., 2002). Portanto, pode-se presumir que células que não expressam moléculas fucosiladas apresentam propensão à infecção por este parasito. O papel da fucose na suscetibilidade à infecção por *T. gondii* é desconhecido. Embora a ausência deste monossacarídeo possa favorecer a infecção dos indivíduos Le(a-b-) é possível que variações na concentrações dos antígenos Le^a e Le^b também se relacionem com a suscetibilidade a este parasito.

Há demonstrações de que a concentração do antígeno Le^b varia no plasma de mulheres grávidas e não grávidas, mas concentrações reduzidas foram observadas apenas nas grávidas (HAMMAR et al., 1981). Os antígenos Le^a e Le^b são sintetizados no trato gastrintestinal e transportados para o plasma (HENRY et al., 1995; HENRY, 1996). É possível que as variações na concentração plasmática destes antígenos refletem a redução, mas não a ausência absoluta de síntese destes antígenos no trato gastrintestinal. Se a ausência de fucose favorece a infecção de células endoteliais humanas pelos taquizoítos da cepa RH do *T. gondii* (STUMBO et al., 2002) pode-se presumir que indivíduos que não expressam antígenos fucosilados estão sob risco elevado de infecção. Coincidentemente, o

maior percentual de infecção por esta cepa foi observado nas amostras Le(a-b-), seguido das Le(a+b-) e das Le(a+b+).

Embora este estudo não tenha analisado a aderência *in vitro* da cepa RH do *T. gondii* aos antígenos do sistema histo-sanguíneo Lewis, seus resultados sugerem que os diferentes fenótipos influenciam a taxa de infecção. Todas as amostras Le(a-b-) mostraram-se reagentes mas aproximadamente três quartos das Le(a+b-) e metade das Le(a+b+) apresentaram este resultado sorológico. Como as diferenças entre estes fenótipos resultam essencialmente da presença ou não de antígenos monofucosilados e difucosilados, é possível que a presença da fucose contribua para a redução da aderência de taquizoítos da cepa RH do *T. gondii* ao epitélio gastrintestinal humano. Em conclusão, este estudo demonstrou que o fenótipo Le(a-b-) inferido a partir das genotipagens *FUT2* e *FUT3* está associado à infecção por cepas RH de *T. gondii*.

Referências

ALKOUT, A. M. et al. Isolation of a cell surface component of *Helicobacter pylori* that binds H type 2, Lewis (a) and Lewis (b) antigens. *Gastroenterology*, v. 112, p. 1179-1187, 1997.

ANGSTROM, J. et al. Default biosynthesis pathway for blood group-related glycolipids in human small intestine as defined by structural identification of linear and branched glycosylceramides in a group O Le(a-b-) nonsecretor. *Glycobiology*, v. 14, p. 1-12, 2004.

BARRAGAN, A; BROSSIERS, F; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesion MIC2. *Celular Microbiology*, v. 7, p. 561-568, 2005.

BEIGUELMAN, B. **Os sistemas sanguíneos eritrocitários**. 3º ed. FUNPEC, 2003. cap. 3.

BORÉN, T. et al. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, v.262, p.1892-1895, 1993.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose. In: **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 27.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*, v. 81, p. 111-122, 2002.

CARRUTHERS, V; BOOTHROYD, J. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, p. 83-89, 2007.

CARRUTHERS, V.B. et al. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 4005-4011, 2000.

CHIMELLI, L. et al. Pathology of the central nervous system in patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV): a report of 252 autopsy cases from Brazil. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1454138>> Acesso em: 01/08/09.

CINTRA, J. R.; MATTOS, L. C. Prevalência das substituições *T59G*, *T202C*, *C314T* e *T1067A* do gene *FUT3* em doadores de sangue da Região Noroeste Paulista. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2006, Recife-Olinda. Revista Brasileira de Hemoterapia: Recife-Olinda, 2006 a. p. 342.

CINTRA, J. R.; MATTOS, L. C. Frequência relativa da substituição *G428A* no gene *FUT2*. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e hemoterapia, 2006, Recife-Olinda. Revista Brasileira de Hemoterapia: Recife-Olinda, 2006 b. p. 335.

DE CARVALHO, L. et al. Localizaton of lectin-binding sites and sugar-binding proteins in tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Journal. Parasitology*, v. 77, p. 56-61, 1991.

DETANICO, L.; BASSO, R. M. C. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. *Revista Brasileira Análises Clínicas*, vol. 38, p. 15-18, 2006

FERREIRA, I. M. R et al. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Experimental Parasitology*, v. 118, p. 221-227, 2008.

GALISTEU, K. J. et al. Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. *Ver. Panam Infectol*, v. 9, p. 24-29, 2007.

GIFFONI, Aparecida. Andreani. **Toxoplasmose em gestantes: abordagem epidemiológica nos postos de saúde da rede pública da cidade de Rio Verde-Goiás**. Brasília, 2007. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de Brasília-UnB, Brasília-Rio Verde, 2007.

GILL, H. S. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in Tanzanian blood donors. *East Afr Med*, v. 62, p. 585-588, 1985.

GRAHN, A. et al. Determination of Lewis *FUT3* Gene Mutations by PCR Using Sequence-Specific *Primers* Enables Efficient Genotyping of Clinical Samples. *Hum Mutat*, 2001.

GUIMARÃES, A. S. A et al. Regional variation in Toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo Metropolitan Region. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, v. 35, p. 479-483, 1993.

HAMMAR, L. et al. Lewis phenotype of erythrocytes and Le^b-active glycolipid in serum of pregnant women. *Vox Sang*, v. 40, p. 27-33, 1981.

HENRY, S. M. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood group related chart microorganism receptors. *Transfus. Clin. Biol.*, v.8, p.226-230, 2001.

HENRY, S. M. Phenotyping for Lewis and Secretor histo-blood group antigens. *Immunohematology*, v. 12, p. 51-61, 1996.

HENRY, S; ORIOL, R. SAMUELSSON. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang*, v. 69, p. 166-182, 1995.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol Infect*, v. 8, p. 634-640, 2002.

IMBERTY, A.; VARROT, A. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Structural Biology*, v. 18, p. 567-576, 2008.

KARLSSON, K. A. Microbian recognition of target-cell glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 5, p. 622-635, 1995.

KOLBEKOVA, P. et al. New and old risk-factors for *Toxoplasma gondii* infection: prospective cross-sectional study among military personnel in the Czech Republic. *Clin. Microbiol. Infect*, v. 13, p. 1012-1017, 2007.

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*, v.9, n.2, p.152-153, 1990.

LÓPEZ, R. et al. IgG antibodies against *Toxoplasma gondii* in Cuban blood donors. *Rev Latino Am Microbiol*, v. 35, p. 207-210, 1993. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8209116>> Acesso em 24/01/210

MATTOS, C. C. B. 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 Sao Paulo State, Brazil. *Archives of Medical Science*, v. 4, p. 254-258, 2008.

MEIRA, Cristina da Silva. **Proteínas excretadas/secretadas (ESAs) de *Toxoplasma gondii*: emprego no diagnóstico sorológico da toxoplasmose cerebral em pacientes com AIDS.** São Paulo, SP, 2008. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Coordenadoria de Controle de doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2008.

MIDTVEDT, T.; VAAGE, L. Relationship between *Toxoplasma gondii* Antibodies and Blood Group. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, p. 575-576, 1989.

OLBRICH, J. N.; MEIRA, D. S. Soroprevalência de vírus linfotrópico de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana, sífilis e toxoplasmose em gestantes de Botucatu – São Paulo – Brasil. Fatores de risco para vírus linfotrópico de células T humanas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, p. 28-32, 2004.

ORIOU, R. **ABO, Hh, Lewis, and Secretion Serology, Genetics, and Tissue Distribution.** In **Blood Cell Biochemistry: Molecular Basis of Major Human Group Antigens.** New York: Jean-Pierre Cartron and Philippe Rouger, cap. 2, p. 37-74, 1995.

ORTEGA-BARRIA, E.; BOOTHROYD, J. C. A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J Biol Chem*, v.274, n.3, p.12567-76, 1999.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, v. 39, p. 1385–1394, 2009.

REICHE, E. M. V. et al. Prevalência de tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, p. 519-527, 2000.

REY, L. Toxoplasmose. In: **Bases da Parasitologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 11.

SALIBAY, C. C.; CLAVERIA, F. G. Serologic detection of *Toxoplasma gondii* infection in *Rattus* spp collected from three different sites in Dasmariñas, Cavite, Philippines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 36, p. 46-49, 2005

SCHENKEL-BRUNNER H. **Human Blood Groups – Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity**. Viena: Springer Wien New York, 2000.

SIBLEY, L.D. Intracellular Parasite Invasion Strategies. *Science*, v. 304, p.248-253, 2004.

STUMBO, A. C. et al. Anionic Sites, fucose residues and class I human Leukocyte antigen fate during interaction of *Toxoplasma gondii* with endothelial cells. *Mem Inst Oswald Cruz*, v. 97, p. 517-522, 2002

SVENSSON, L. et al. Secretor genotyping for A385T, G428A, C571T, C628T, 685delTGG, G849A, and other mutations from single PCR. *Transfusion*, v.40, p.856-860, 2000.

VALLOCHI, A. L. et al. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am. J. Ophthalmol*, v. 139, 2005. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734002>> Acesso em 25/01/2010.

ZHIBURT, E. B. The spread of antibodies to cytomegalovirus and *Toxoplasma* among donors of blood components. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, v.1, p. 59-61, 1997.

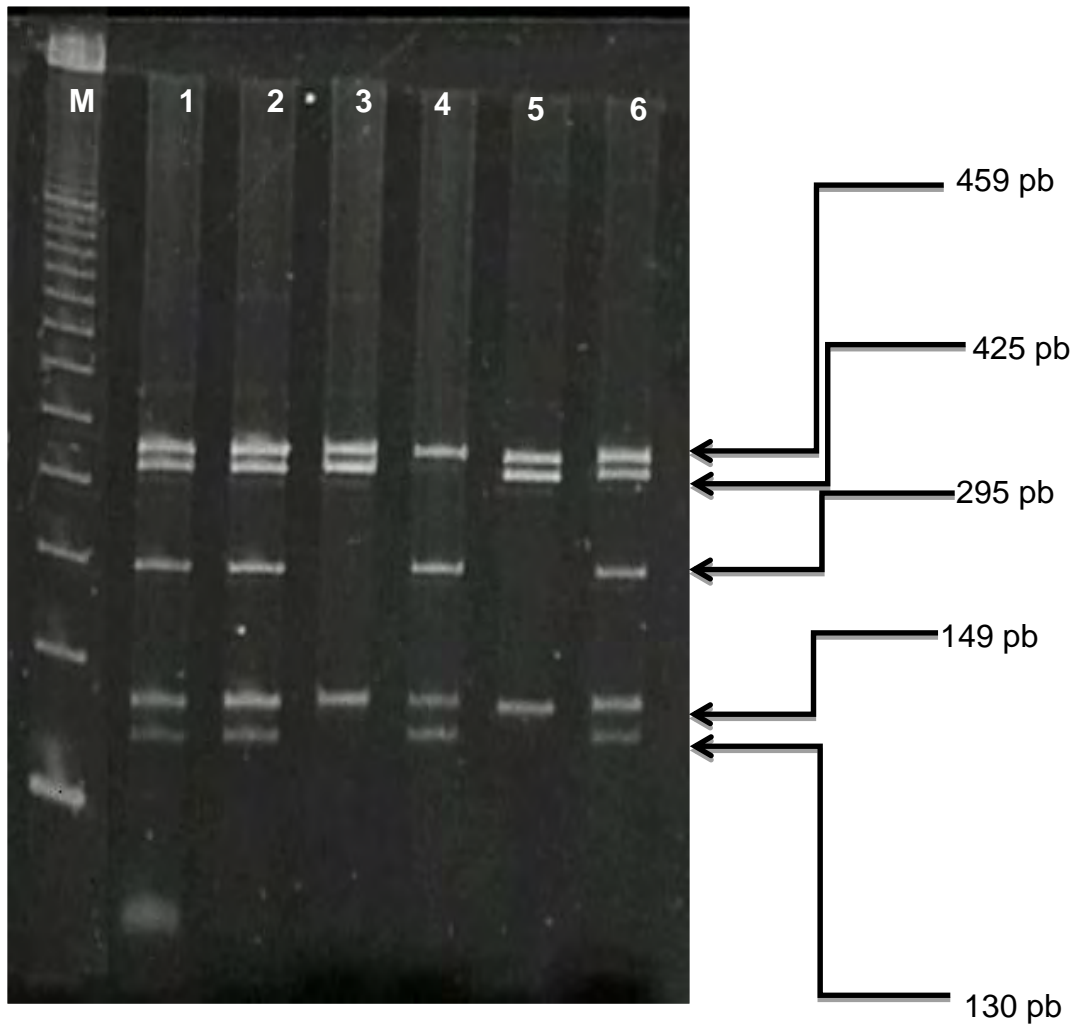


Figura 1. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 7,5% do fragmento de 1033 pares de bases do gene *FUT2* digerido com a enzima *AVA II*, ilustrando os genótipos GA (1, 2 e 6); AA (3 e 5); GG (4). M representa o marcador de 100 pares de bases.

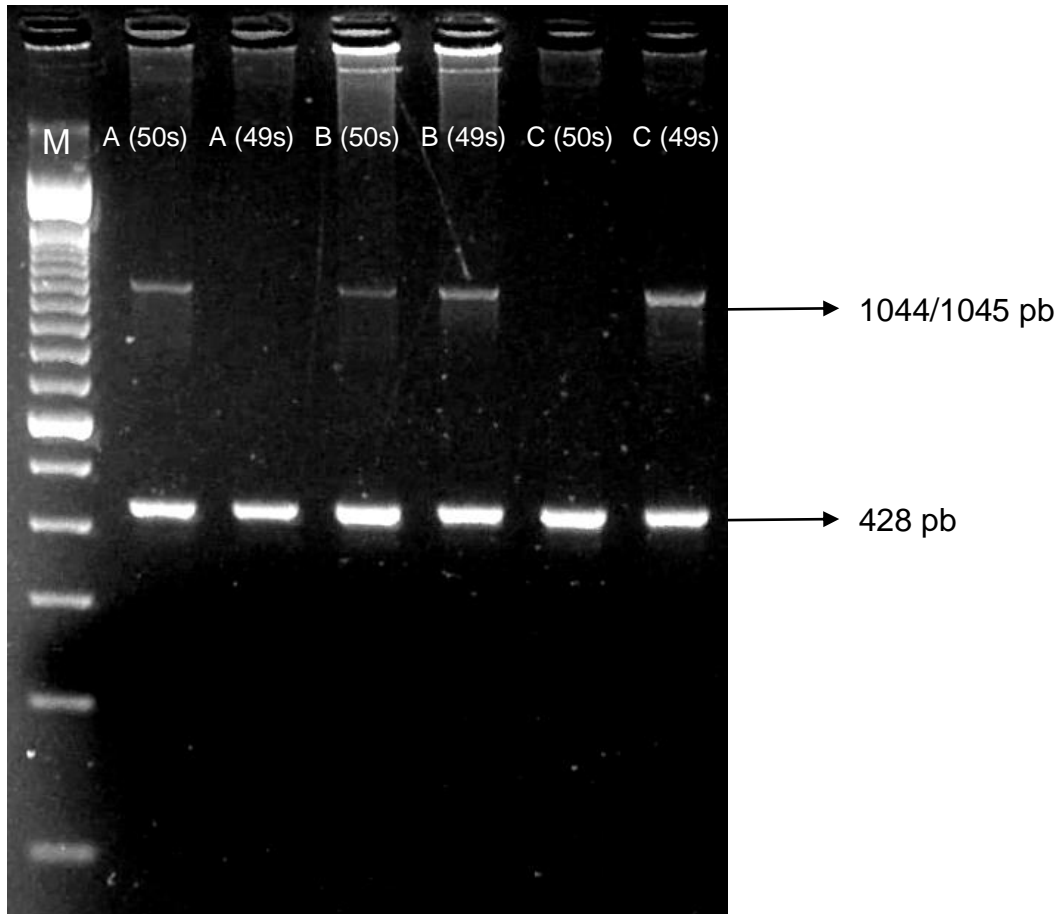


Figura 2. Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% dos genótipos *TT* (A), *TC* (B) e *CC* (C) do gene *FUT3*, mutação *T202C*. M representa o marcador de 100 pares de bases.

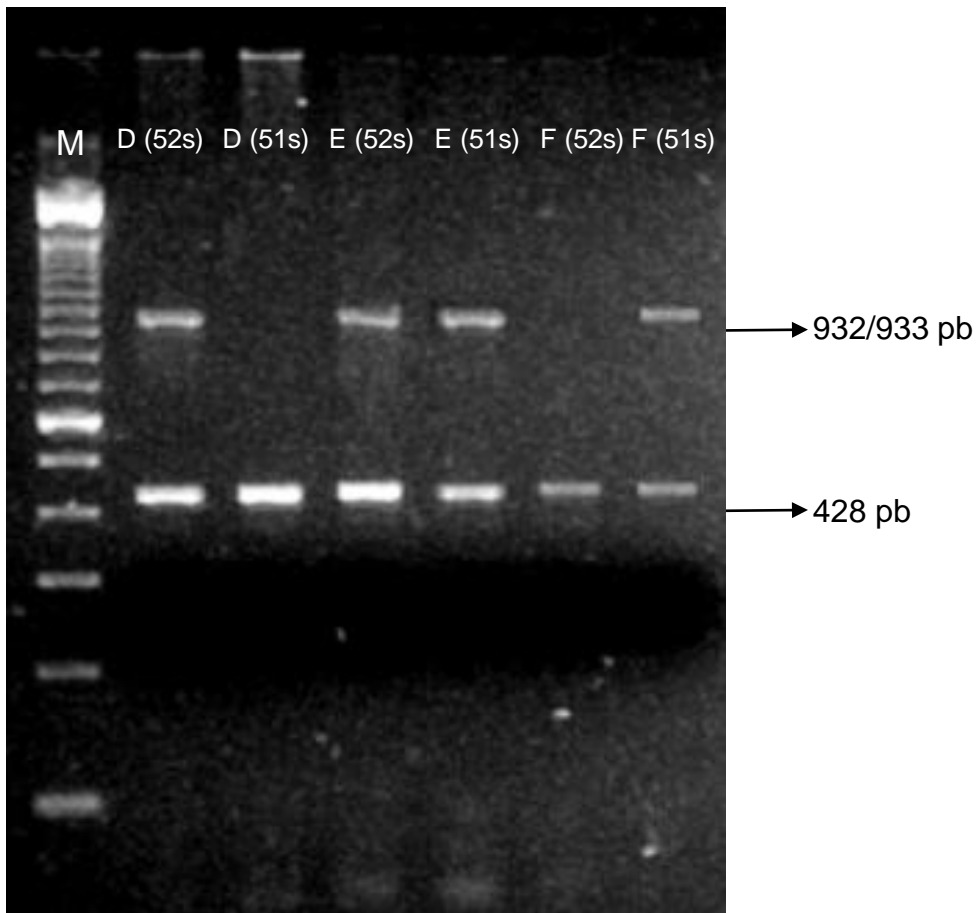


Figura 3. Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% dos genótipos CC (D), CT (E) e TT (F) do gene *FUT3*, mutação *C314T*. M representa o marcador de 100 pares de bases.

Tabela 1. Resultados das genotipagens *G428A* do gene *FUT2* e *T202C* e *C314T* do gene *FUT3* e os fenótipos Lewis inferidos para o trato gastrointestinal.

<i>FUT2</i> (<i>G428A</i>)	<i>FUT3</i> (<i>T202C</i>)	<i>FUT3</i> (<i>C314T</i>)	Reagente	Não Reagente	Fenótipos (TGI)
AA	TT+TC	CC	22	10	Le(a+b-)
		CT	8	2	Le(a+b-)
		TT	0	0	Le(a-b-)
AA	CC	CC	0	0	Le(a-b-)
		CT	2	0	Le(a-b-)
		TT	1	0	Le(a-b-)
GG + GA	TT+TC	CC	52	45	Le(a+b+)
		CT	16	22	Le(a+b+)
		TT	4	0	Le(a-b-)
GG + GA	CC	CC	1	0	Le(a-b-)
		CT	9	0	Le(a-b-)
		TT	1	0	Le(a-b-)
Total			116	79	

Tabela 2. Valores absolutos e percentuais dos resultados reagente (R) e não reagente (NR) das 195 amostras de soro avaliadas por HAI e ELISA, de acordo com os fenótipos Lewis inferidos para o trato gastrintestina (TGI) e, o valor p calculado pelo teste exato de Fisher. Os valores de Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança a 95%.

Fenótipos (TGI)	Total N(%)	R N(%)	NR N(%)	p	OR	IC 95%
Le(a+b-)	42 (21,54%)	30 (25,86%)	12 (15,19%)	0,0795	1.948	0,9275-4.090
Le(a+b+)	135 (69,23)	68 (58,62%)	67 (84,81%)	0,0001	0,2537	0,1239-0,5198
Le(a-b-)	18 (9,23%)	18 (15,52%)	0 (0%)	0,0001	29.863	1.771-503.630
Total	195 (100%)	116 (59,5%)	79 (40,5%)			

Tabela 3. Valor p calculado pelo teste exato de Fisher para as comparações entre os fenótipos Lewis. Os valores de Odds Ratio (OR) e do intervalo de confiança (IC) a 95%.

Fenótipos Lewis	P	OR	IC 95%
Le(a-b-) X Le(a+b-)	0,0118	15.165	0,8463 - 271.710
Le(a-b-) X Le(a+b+)	0,0001	36.460	2.152 - 617.680
Le(a+b-) X Le(a+b+)	0,0206	2.463	2.463 - 5.214

Tabela 4. Frequência dos fenótipos Lewis inferidos de acordo com os grupos reagente e não reagente

Fenótipo Lewis Inferido	Reagente % (n)	Não reagente % (n)	TOTAL % (n)
Le(a+b-)	71,40 (30)	28,6 (12)	100,0 (42)
Le(a+b+)	50,4 (68)	49,6 (67)	100,0 (135)
Le(a-b-)	100,0 (18)	0,0 (0)	100,0 (18)

Conclusões

1. O sistema histo-sanguíneo Lewis está associado à infecção por *T. gondii* da cepa RH.
2. A combinação dos métodos de HAI e ELISA favorece a definição dos grupos “reagentes” e “não reagentes” para anticorpos IgG anti –*T. gondii* da cepa RH.
3. A infecção por cepas RH do *T. gondii* é comum em gestantes da região noroeste paulista que apresentam sorologia reagente para a toxoplasmose.
4. A identificação das mutações *G428A* do gene *FUT2*, *T202C* e *C314T* do gene *FUT3* constitui uma estratégia confiável para inferir os fenótipos Lewis em ambos os grupos.
5. O fenótipo Lewis negativo [Le(a-b-)] está associado ao maior risco para a infecção por cepas RH de *T. gondii*, enquanto os fenótipos Le(a+b-) e Le(a+b+) apresentam menor risco de infecção por cepas RH de *T. gondii*.
6. O processo de fucosilação controlado pelos genes *FUT2* e *FUT3* reduz o risco de infecção por cepas RH de *T. gondii*.

Referências Gerais

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAIS, S. Imunidade aos Microrganismos. In: **Imunologia celular e molecular**. 6^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 15.

ALKOUT, A. M. et al. Isolation of a cell surface component of *Helicobacter pylori* that binds H type 2, Lewis (a) and Lewis (b) antigens. *Gastroenterology*, v. 112; p. 1179-1187, 1997.

AJZENBERG, D. et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. *J. Infect Dis*, v. 186, p. 684-689, 2002.

ANGSTROM, J. et al. Default biosynthesis pathway for blood group-related glycolipids in human small intestine as defined by structural identification of linear and branched glycosylceramides in a group O Le(a-b-) nonsecretor. *Glycobiology*, v. 14, p. 1-12, 2004.

ASHBURN, D. et al. Specificity and usefulness of an IgE immunosorbent agglutination assay for toxoplasmosis. *J. Clin. Pathol*, v.48, n1, p.64-69, 1995.

BARRAGAN, A; BROSSIERS, F; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesion MIC2. *Cell Microbio*, v. 7, p. 561-568, 2005.

BAUM, J. et al. Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nature*, v. 4, p. 621-628, 2006.

BEIGUELMAN, B. **Os sistemas sanguíneos eritrocitários**. 3^oed. FUNPEC, 2003. cap. 3.

BORÉN, T. et al. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, v.262, p.1892-1895, 1993.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose. In: **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2^o edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 27.

CAMARGO, M. E. Serodiagnosis of toxoplasmosis in pregnancy. *AMB. Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.21, n.11, p.341-344, 1975.

CAMARGO NETO, E. et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *International Journal of Epidemiology*, v. 29, p. 941-947, 2000.

CANTOS, G. A. et al. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Rev Ass Med Brasil*, v. 46, p. 335-341, 2000.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*, v. 81, p. 111-122, 2002.

CARRUTHERS, V; BOOTHROYD, J. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, p. 83-89, 2007.

CARRUTHERS, V. B; GIDDINGS, O. K; SIBLEY, L. D. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbio.* 13, p. 225-235, 1999.

CARRUTHERS, V.B. et al. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infection and Immunity*, v. 68, p. 4005-4011, 2000.

CHARDÉS, T. et al. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect. Immun.*, v.58, n.5, p.1240-1246, 1990.

CHIMELLI, L. et al. Pathology of the central nervous system in patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV): a report of 252 autopsy cases from Brazil. *Neuropathol Appl Neurobio*, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1454138>> Acesso em: 01/08/09.

CINTRA, J. R.; MATTOS, L. C. Prevalência das substituições T59G, T202C, C314T e T1067A do gene *FUT3* em doadores de sangue da Região Noroeste Paulista. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2006, Recife-Olinda. Revista Brasileira de Hemoterapia: Recife-Olinda, 2006 a. p. 342.

CINTRA, J. R.; MATTOS, L. C. Frequência relativa da substituição G428A no gene *FUT2*. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e hemoterapia, 2006, Recife-Olinda. Revista Brasileira de Hemoterapia: Recife-Olinda, 2006 b. p. 335.

COÊLHO, R. A. I.; KOBAYASHI, M.; CARVALHO JUNIOR, L.B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop*, v. 45, p. 229-231, 2003.

COSTA, Tatiane Luiza. **Otimização e avaliação de métodos parasitológicos para diagnóstico da toxoplasmose em gestantes de risco e seus recém-nascidos após terapêutica específica.** Goiânia, GO, 2007. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal Goiás, 2007.

CRANE, M. S. T. J.; DVORAK, J. A. Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate cells by *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 5, p. 333-341, 1982.

DANIELS, G. ABO, Hh, and Lewis blood group systems. In. **Human blood groups.** Cambridge University Press, 1995. cap. 2.

de CARVALHO, L. et al. Localization of lectin-binding sites and sugar-binding proteins in tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol*, v. 77, p. 56-61, 1991.

DETANICO, L.; BASSO, R. M. C. Toxoplasmose: perfil sorológico de mulheres em idade fértil e gestantes. *RBAC*, vol. 38, p. 15-18, 2006.

DIAS, R. A. F.; FREIRE, R. L. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 26, n. 2, p. 239-248, 2005.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology s*, p. 267–299, 1998.

FERREIRA M. et al. Diagnóstico laboratorial da infecção por *Toxoplasma gondii* na gestação. *RBAC*, v. 39, p. 37-38, 2007.

FERREIRA, I. M. R et al. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Experimental Parasitology*, v. 118, p. 221-227, 2008.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmose. In: VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. cap. 99.

GALISTEU, K. J. et al. Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. *Ver. Panam Infectol*, v. 9, p. 24-29, 2007.

GIFFONI, Aparecida. Andreani. **Toxoplasmose em gestantes: abordagem epidemiológica nos postos de saúde da rede pública da cidade de Rio Verde-Goiás**. Brasília, 2007. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de Brasília-UnB, Brasília-Rio Verde, 2007.

GILL, H. S. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in Tanzanian blood donors. *East Afr Med*, v. 62, p. 585-588, 1985.

GRADELLA, Débora Barreto Teresa. **Polimorfismos dos genes *abo*, *lewis* e *secretor* correlacionados com o câncer de mama. Araraquara, SP, 2007**. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2007.

GRAHN, A. et al. Determination of Lewis *FUT3* Gene Mutations by PCR Using Sequence-Specific *Primers* Enables Efficient Genotyping of Clinical Samples. *Hum Mutat*, 2001.

GUIMARÃES, A. S. A et al. Regional variation in Toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo Metropolitan Region. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, v. 35, p. 479-483, 1993.

HAMMAR, L. et al. Lewis phenotype of erythrocytes and Le^b-active glycolipid in serum of pregnant women. *Vox Sang*, v. 40, p. 27-33, 1981.

HENRY, S. M. Phenotyping for Lewis and Secretor histo-blood group antigens. *Immunohematology*, v. 12, p. 51-61, 1996.

HENRY, S. M. Molecular diversity in the biosynthesis of GI tract glycoconjugates. A blood group related chart microorganism receptors. *Transfus. Clin. Biol.*, v.8, p.226-230, 2001.

HENRY, S; SAMUELSSON, BO. **ABO polymorphisms and their putative biological relationships with disease. Human blood cells:** Consequences of genetic polymorphisms and variations. Singapore: Imperial College Press, p. 15-103, 2000.

HENRY, S; ORIOL, R. SAMUELSSON. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang*, v. 69, p. 166-182, 1995.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol Infect*, v. 8, p. 634-640, 2002.

IMBERTY, A.; VARROT, A. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Structural Biology*, v. 18, p. 567-576, 2008.

JOINER, K. A.; DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: a Protozoan for the Nineties. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 1169-1172, 1993.

KARLSSON, K. A. Microbian recognition of target-cell glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 5, p. 622-635, 1995.

KOLBEKOVA, P. et al. New and old risk-factors for *Toxoplasma gondii* infection: prospective cross-sectional study among military personnel in the Czech Republic. *Clin. Microbiol. Infect*, v. 13, p. 1012-1017, 2007.

KUKOWSKA-LATALLO, J. et al. A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase. *Genes & Development*, v. 4, p. 1288-1303, 1999.

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*, v.9, n.2, p.152-153, 1990.

LIEBERMAN, L. A.; HUNTER, C. A. The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Inter. Rev. Immunol*, v. 21, p. 373-403, 2002.

LÓPEZ, R. et al. IgG antibodies against *Toxoplasma gondii* in Cuban blood donors. *Rev Latino Am Microbiol*, v. 35, p. 207-210, 1993. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8209116>> Acesso em 24/01/210.

LYNFIELD, R; GUERINA, N. G. Toxoplasmosis. *Pediatr. Rev.*,v.18, n.3, p.75-83, 1997.

MATTOS, C. C. B. 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 Sao Paulo State, Brazil. *Archives of Medical Science*, v. 4, p. 254-258, 2008.

MEIRA, Cristina da Silva. **Proteínas excretadas/secretadas (ESAs) de *Toxoplasma gondii*: emprego no diagnóstico sorológico da toxoplasmose cerebral em pacientes com AIDS.** São Paulo, SP, 2008. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Coordenadoria de Controle de doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2008.

MIDTVEDT, T; VAAGE, L. Relationship between *Toxoplasma gondii* Antibodies and Blood Group. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, p. 575-576, 1989.

MILLAR, Patricia Riddell. **Soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em trabalhadores de um matadouro –frigorífico na cidade de Palmas, Paraná, Brasil.** Niterói, RJ, 2005. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal Fluminense, 2005.

MILLER, C. M. et al. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, p.1-17, 2008.

MOLLICONE, R. et al. Molecular basis of Lewis $\alpha(1,3/1,4)$ -fucosyltransferase gene deficiency (*FUT3*) found in Lewis-negative Indonesian Pedigrees. *Journal of Biological Chemistry*, p. 20987-20994, 1994.

NISHIHARA, S. et al. Molecular Genetic Analysis of the Human Lewis Histo-blood Group System. *Journ. Biol. Chemistry*, v. 269, p. 29271-29278, 1994.

NISHIHARA, S. et al. Molecular behavior of mutant Lewis enzymes *in vivo*. *Glycobiology*, v. 9, p. 373-382, 1999.

OLBRICH, J. N; MEIRA, D. S. Soroprevalência de vírus linfotrópico de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana, sífilis e toxoplasmose em gestantes de Botucatu – São Paulo – Brasil. Fatores de risco para vírus linfotrópico de células T humanas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, p. 28-32, 2004.

ORIOLO, R. **ABO, Hh, Lewis, and Secretion Serology, Genetics, and Tissue Distribution. In Blood Cell Biochemistry: Molecular Basis of Major Human Group Antigens. New York: Jean-Pierre Cartron and Philippe Rouger, cap. 2, p. 37-74, 1995.**

ORTEGA-BARRIA, E.; BOOTHROYD, J. C. A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J Biol Chem*, v.274, n.3, p.12567-76, 1999.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, v. 39, p. 1385–1394, 2009.

PASSOS, L. N.; ARAÚJO FILHO, O. F.; ANDRADE JUNIOR, H. F. Toxoplasma encephalitis in aids patients in São Paulo during 1988 and 1991. a comparative retrospective analysis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 42, p. 141-145, 2000.

PINTO, L.D. et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in domestic cats treated in private clinics of Porto Alegre, Brazil. *Ciência Rural*. v. 39, p. 2464-2469, 2009.

RAVN, V.; DABELSTEEN, E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS*, v. 108, p. 1-28, 2000.

REICHE, E. M. V. et al. Prevalência de tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, p. 519-527, 2000.

REY, L. Toxoplasmose. In: **Bases da Parasitologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 11.

REY, L. C.; RAMALHO, I. L. Seroprevalence of toxoplasmosis in Fortaleza, Ceara, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.41, n.3, p171-174,1999.

SALIBAY, C. C; CLAVERIA, F. G. Serologic detection of *Toxoplasma gondii* infection in *Rattus* spp collected from three different sites in Dasmariñas, Cavite, Philippines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 36, p. 46-49, 2005.

SALIBAY, C. C; DUNGCA, J. Z; CLAVERIA, F. G. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection among Urban (Manila) and Suburban (Dasmariñas, Cavite) Residents, Philippines. *J. Protozool. Res.* v. 18, p. 26-33, 2008.

SALOMAA, V. et al. Genetic background of Lewis negative blood group phenotype and its association with atherosclerotic disease in the NHLBI Family Heart Study. *Journal of Internal Medicine*, v. 247, 2000.

SCHENKEL-BRUNNER H. **Human Blood Groups – Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity**. Viena: Springer Wien New York, 2000.

SIBLEY, L.D. Intracellular Parasite Invasion Strategies. *Science*, v. 304, p.248-253, 2004.

SOARES, R. M. Caracterização molecular de *Toxoplasma gondii*. *Ver. Brás. Parasitol*, v. 13, pg.17-19, 2004.

SOEJIMA, M.; KODA, Y. Molecular mechanisms of Lewis antigen expression. *Legal Medicine*, v. 7, p. 266-269, 2005.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology*, v.116, p35-42, 1998.

STUMBO, A. C. et al. Anionic Sites, fucose residues and class I human Leukocyte antigen fate during interaction of *Toxoplasma gondii* with endothelial cells. *Mem Inst Oswald Cruz*, v. 97, p. 517-522, 2002.

SVENSSON, L. et al. Secretor genotyping for A385T, G428A, C571T, C628T, 685delITGG, G849A, and other mutations from single PCR. *Transfusion*, v.40, p.856-860, 2000.

TENTER, A. M; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

TOMLEY, F. M; SOLDATI, D. S. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Parasitology*, v. 17, p. 81-88, 2001.

VALLOCHI, A. L. et al. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am. J. Ophthalmol*, v. 139, 2005. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734002>> Acesso em 25/01/2010.

VAZ, R. S. et al. Technical evaluation of serological screening tests for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies to prevent unnecessary transfusion risks. *Rev. bras. hematol. Hemoter*, v. 30, p. 277-280, 2008.

ZHIBURT, E. B. The spread of antibodies to cytomegalovirus and *Toxoplasma* among donors of blood components. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, v.1, p. 59-61, 1997.

Apêndices

APÊNDICE A – 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 UNIP, São José do Rio Preto, SP, 2009.

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

Nakashima F^{1,2}, Mattos CCB², Ferreira AIC², Cintra JR², Spegiorin LCJF³, Oliani DCM³, Oliani AH³, Mattos LC^{2*}

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^a e Le^b, 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 histossanguíneo 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 histossanguíneo Lewis.

Apoio: BAP/FAMERP; CAPES-DS

APÊNDICE B – 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 UNIP, São José do Rio Preto, SP, 2009.

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

Spegorin LCJF; Brandão de Mattos CC; Ferreira AIC; Nakashima F; Meira CS; Gomes AHS; Oliani AH; Pereira-Chiocola 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 grupo de gestantes de baixa renda, atendidas no Ambulatório de Gestações de Alto Risco, Hospital de Base (FUNFARME). **Material e Método:** em um período de 15 meses foram coletadas 174 amostras de soro de 87 gestantes com suspeita de infecção por *Toxoplasma gondii* e 87 de sangue de cordão umbilical de seus recém-nascidos. Para a determinação 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 avididade para IgG. Do total, 13 encontravam-se no 1º trimestre, 35 no 2º trimestre e 38 no 3º 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 avididade para IgG foi maior que 40%, sugerindo infecção crônica no início da gravidez; em 16 gestantes os valores de avididade situaram-se entre 15-39%, sugerindo infecção aguda. Não foram observados resultados com avididade abaixo de 15%, possivelmente devido ao encaminhamento tardio ao serviço de gestação de alto risco (durante ou depois do 2º 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 é grande importância para a avaliação 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 C – Resumo apresentado em forma de pôster durante o XI Simpósio de Genética & I Simpósio IMC-IBILCE Células-Tronco.

Fenótipos e genótipos do sistema histo-sanguíneo Lewis como fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii*

Aluno: Fabiana Nakashima

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

RESUMO

O sistema histo-sanguíneo Lewis caracteriza-se pela expressão dos antígenos Le^a e Le^b, os quais determinam os fenótipos eritrocitários Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-). Estes antígenos são sintetizados no intestino delgado, no fígado, no pâncreas e nos rins, mas adsorvem aos eritrócitos a partir do plasma. Sua expressão resulta de interações epistáticas entre os genes *FUT2* (19q13.3) e *FUT3* (19p13.3), os quais codificam fucosiltransferases específicas (FUTII e FUTIII). Essas enzimas fucosilam estruturas precursoras do tipo 1 (Gal α 1 \rightarrow 3GlcNAc-R) gerando os antígenos H tipo 1 (Fuc α 1 \rightarrow 2Gal α 1 \rightarrow 3GlcNAc-R), Le^a (Gal α 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 2]GlcNAc-R) e Le^b (Fuc α 1 \rightarrow 2Gal α 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 2]GlcNAc-R). Esses antígenos podem atuar como potenciais receptores para microorganismos patogênicos e influenciar a suscetibilidade ou a resistência a infecções. O *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, infecta os humanos utilizando o trato gastrointestinal como rota de infecção, um local onde se dá a expressão dos antígenos Le^a e Le^b. Esses eventos aparentemente independentes ocorrem no mesmo órgão e podem estar relacionados entre si. Estudos prévios investigaram associações entre os sistemas de grupos sanguíneos e infecção por *T. gondii*, mas não incluíram o sistema Lewis e portanto, sua influência nessa relação parasito-hospedeiro permanece desconhecida. Dada a importância epidemiológica e clínica da infecção por *T. gondii* em gestantes, o objetivo geral deste projeto é investigar a associação entre o sistema histo-sanguíneo Lewis e a infecção por *T.gondii*. Seus objetivos específicos compreendem: **1.** Selecionar dois grupos de gestantes, um com e outro sem evidência de infecção por *T. gondii*; **2.** Identificar, com o uso de métodos moleculares, os genótipos *FUT2* e *FUT3* para a definição dos fenótipos Lewis. **3.** Verificar se há associação entre a evidência de infecção e os fenótipos e genótipos do sistema Lewis. Serão analisadas amostras de DNA genômico e de soro sanguíneo estocadas no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, coletadas de gestantes atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto - FUNFARME, as quais integram os projetos em andamento no referido laboratório. A aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (Parecer 089/2005) e os termos de consentimento pós-esclarecidos foram previamente obtidos. A definição de evidência de infecção será baseada na presença ou não de anticorpos anti-*T. gondii* das classes IgM e IgG, com o uso do método ELISA. Esta estratégia permitirá a composição dos dois grupos: com e sem infecção. Para a genotipagem *FUT2* e *FUT3* será utilizado o método PCR-SSP com *Primers* específicos para as substituições G428A (*FUT2*) e T202C e C314T (*FUT3*). As combinações dos genótipos resultantes destas substituições permitem inferir os fenótipos Le(a+b-),

Le(a-b+) e Le(a-b-). As frequências dos genótipos e dos fenótipos do sistema histossanguíneo Lewis de ambos os grupos de gestantes serão comparadas com o uso do teste quiquadrado, aceitando-se o erro alfa de 5%. Também serão calculados o risco relativo e ODDS RATIO. Nossa hipótese é que os fenótipos e os genótipos do sistema Lewis influenciam a infecção por *T. gondii*.

Palavras-chave: Sistema Lewis, *FUT2*, *FUT3*, *Toxoplasma gondii*, relação parasito-hospedeiro

APÊNDICE D – Resumo apresentado em forma de pôster durante o 55º Congresso de Genética da Sociedade Brasileira de Genética – SBG.

ASSOCIAÇÃO ENTRE O SISTEMA HISTO-SANGUÍNEO LEWIS E INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM GESTANTES

Nakashima, F^{1,2}; Brandão de Mattos, CC²; Ferreira, AIC²; Cintra, JR²; Spegiorin, LCJF³; Meira, CS⁴; Pereira-Chioccola, VL⁴; Mattos, LC²

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

4- Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos - Instituto Adolfo Lutz - São Paulo
e-mail: nakashima.f@gmail.com / luiz.carlos@famerp.br

Palavras-chave: sistema histo-sanguíneo Lewis, *FUT3*, *FUT2*, *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose, gestante

Introdução: O sistema histo-sanguíneo Lewis caracteriza-se pela síntese dos antígenos Le^a e Le^b que compõe os fenótipos Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-). Estes antígenos constituem potenciais receptores para microrganismos patogênicos no trato gastrointestinal e em outros tecidos. Sua expressão resulta da fucosilação do oligossacarídeo precursor tipo 1 (Galβ1→3GlcNAcβ1-R), controlada pela ação conjunta das enzimas FUTII e FUTIII codificadas pelos genes *FUT2* (Secretor) e *FUT3* (Lewis), respectivamente. Mutações no gene *FUT3* levam à expressão do fenótipo Le(a-b-). A infecção por *Toxoplasma gondii*, além da elevada frequência populacional, atrai a atenção devido aos riscos de transmissão congênita. Este parasito, além de utilizar como rota de infecção o mesmo local de expressão dos antígenos Lewis, também infecta grande variedade de células nucleadas. Estes eventos biológicos aparentemente independentes podem estar relacionados entre si.

Objetivo: Investigar se o sistema Lewis está associado à infecção por *T. gondii*.

Material e Métodos: Cento e cinco amostras de soro e de DNA genômico de gestantes atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Hospital de Base de São José do Rio Preto foram analisadas. O teste ELISA foi empregado para detectar anticorpos IgG específicos (cepa RH do *T. gondii*) e compor os grupos “reagente” e “não reagente”. As mutações *G428A* (*FUT2*) e *T202C* e *C314T* (*FUT3*) identificadas por PCR-RFLP e PCR-SSP respectivamente, foram utilizadas para inferir os fenótipos Lewis. O teste exato de Fisher foi usado para comparar as proporções dos fenótipos entre reagentes e não reagente. **Resultados:** Das 105 amostras analisadas, 70 (66,7%) mostraram-se reagentes e 35 (33,3%) não reagentes. Entre as reagentes, 20 (28,6%) eram Le(a+b-), 40 (57,1%) Le(a-b+) e 10 (14,3%) Le(a-b-). Das não reagentes, 8 (22,8%) eram Le(a+b-) e 27 (77,2%) Le(a-b+). A frequência do fenótipo Le(a-b-) mostrou diferença estatisticamente significativa

entre os grupos “reagente” e “não reagente” [Le(a-b-) X Le(a-b+): $p=0,01$; Le(a-b-) X (Le(a+b-) + Le(a-b+): $p=0,02$]. As demais comparações não foram significantes [Le(a-b-) X Le(a+b-): $p=0,08$; Le(a+b-) X Le(a-b+): $p=0,35$]. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o sistema histo-sanguíneo Lewis está associado à infecção por *T. gondii* com maior suscetibilidade do fenótipo Le(a-b-). É possível que a ausência de fucosilação do oligossacarídeo precursor tipo 1 pela enzima FUTIII influencie a infecção por *T. gondii* no trato gastrintestinal. A habilidade do *T. gondii* infectar grande variedade de células nucleadas parece resultar de sua adaptação em se ligar a um receptor único. Como o oligossacarídeo precursor tipo 1 é um componente comum das membranas de células nucleadas pode contribuir, pelo menos em parte, com a infecção por este parasito.

Apoio Financeiro: Capes, BAP-FAMERP

APÊNDICE E – Resumo apresentado em forma de pôster durante o XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia II Encontro de Parasitologia do Mercosul da Sociedade Brasileira de Parasitologia – SBP.

FENÓTIPO LEWIS NEGATIVO COMO POTENCIAL FATOR DE RISCO PARA A INFECÇÃO POR CEPA RH DE *Toxoplasma gondii*

Fabiana Nakashima^{1,2}, Cinara C Brandão de Mattos², Ana I C Ferreira², Juliana R Cintra², Lígia C J F Spegiorin³, Thaís C Silva⁴, Cristina S Meira⁴, Vera L Pereira-Chiocola⁴, Luiz C de Mattos²

1. IBILCE–UNESP, 2. Dep Biologia Molecular – FAMERP, 3. Dep Ginecologia e Obstetrícia – FAMERP/ HB–FUNFARME, 4. Instituto Adolfo Lutz – SP
e-mail: luiz.carlos@famerp.br

Toxoplasma gondii, causador da toxoplasmose, uma doença de importância para gestantes, fetos e neonatos, invade grande variedade de células humanas e utiliza o trato gastrointestinal como rota de infecção. Neste local ocorre a expressão de antígenos fucosilados Le^a e Le^b que determinam os fenótipos do sistema histossanguíneo Lewis: Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-). A expressão destes fenótipos resulta de interações epistáticas entre os genes *FUT2* (Secretor) e *FUT3* (Lewis) os quais codificam as fucosiltransferases FUTII e FUTIII, respectivamente. Mutações no gene *FUT3* comprometem a função da FUTIII determinando a ausência de fucosilação dos oligossacarídeos precursores bem como a expressão do fenótipo Le(a-b-). A infecção por *T. gondii* e a expressão dos antígenos Lewis ocorrem no mesmo órgão e, embora aparentemente independentes, podem estar relacionadas entre si. O objetivo deste trabalho foi investigar a associação entre a infecção por *T. gondii* e o sistema histossanguíneo Lewis. Cento e sessenta amostras de sangue periférico e de DNA genômico de gestantes atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Hospital de Base de São José do Rio Preto foram analisadas. Microplacas de ELISA, sensibilizadas com antígenos específicos para cepa RH produzidos “in-house”, foram utilizados para compor dois grupos, um com (G1) e outro sem (G2) evidência de infecção com base na presença ou não de anticorpos específicos. Os fenótipos Lewis foram inferidos a partir da combinação das genotipagens *FUT2* (*G428A*) e *FUT3* (*T202C* e *C314T*) realizadas com o uso do método PCR-RFLP e PCR-SSP respectivamente. As proporções dos fenótipos Lewis entre os dois grupos foram comparadas pelo teste exato de Fisher, aceitando-se o erro alfa de 5%. Das amostras analisadas, 103 (64,4%) foram incluídas no G1 e 57 (35,6%) no G2. No G1, 33 (32%) eram Le(a+b-), 53 (56,3%) Le(a-b+) e 12 (11,7%) Le(a-b-) e no G2, 11 (19,3%) eram Le(a+b-) e 46 (80,7%) Le(a-b+). O fenótipo Le(a-b-) mostrou diferenças estatisticamente significantes em relação aos fenótipos Le(a-b+) [p=0,003], Le(a+b-)/Le(a-b+) [p=0,004], mas não para o Le(a+b-) [p=0,09]. Além disso, Le(a+b-) e Le(a-b+) também diferiram entre os grupos analisados (p=0,04). Embora a presença de infecção tenha sido observada em todos os fenótipos, os resultados sugerem associação entre o fenótipo Le(a-b-) com a infecção por *T. gondii*. É possível que a ausência de fucosilação controlada pelo gene *FUT3* influencie a suscetibilidade a este parasito. Apoio: CAPES, BAP-FAMERP

APÊNDICE F – Resumo apresentado em forma de pôster durante o 54º Congresso de Genética da Sociedade Brasileira de Genética – SBG.

Discordância entre os fenótipos eritrocitários do sistema Lewis (ISBT 007) e o status secretor definido pela genotipagem *FUT2*

Galbiatti, AL; Viana, ARA; Nakashima, F; Nunes, DPT; Pereira Jr, EJ; Ferreira, AIC; Mattos, CCB; Mattos, LC

Laboratório de Imunogenética – Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

luiz.carlos@famerp.br

Palavras-chave: sistema Lewis, *G428A*, fenótipo secretor, gene *FUT2*

A expressão dos fenótipos eritrocitários do sistema Lewis [Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-)], resulta de interações epistáticas entre os genes *FUT2* (19q13.3) e *FUT3* (19p13.3), os quais codificam as fucosiltransferases FUTII e FUTIII, respectivamente, responsáveis pela síntese dos antígenos Lea e Leb. A presença de ambas as enzimas determina o fenótipo Le(a-b+) e classifica seus portadores como secretores positivos. A presença isolada da FUTIII, determina o fenótipo Le(a+b-) e classifica seus portadores como secretores negativos. A ausência da FUTIII determina o fenótipo Le(a-b-) mas não permite a definição do status secretores. A substituição *G428A* no exon 2 do gene *FUT2* permite diferenciar o status secretor positivo (GG ou GA) do negativo (AA). A fenotipagem do sistema Lewis é frequentemente utilizada para inferir o status secretor, especialmente em estudos de associação com doenças. O objetivo desse trabalho foi verificar a concordância entre a expressão dos fenótipos Le(a+b-) e Le(a-b+) e o status secretor definido pela genotipagem *FUT2*. Foram selecionados 70 indivíduos adultos não relacionados, de ambos os sexos, caucasianos e não caucasianos. Uma amostra de sangue com anticoagulante foi coletada de cada participante para a obtenção de eritrócitos e de DNA genômico. Os fenótipos Lewis foram identificados pelo método gel centrifugação. O DNA genômico foi extraído por um método salino e a genotipagem *FUT2* foi realizada pelo método PCR-SSP. Duas reações de amplificação, uma com o *primer* *FUT2-G* (Sense: 5'-CGTACCCCTGCTCCTGG-3') e outra, com o *primer* *FUT2-A* (Sense: 5'-CGGCTACCCCTGCTCCTA-3'), foram realizadas. Os *primer* anti-sense (5'-GGCTGCCTCTGGCTTAAAG-3') e os *Primers* HGH-1 (Sense: 5'-GCCTTCCCAACCATTCCTT-3') e HGH-2 (Sense: 5'-TCACGGATTCTGTTGTCTTTC-3'), para controle interno, foram incluídos em ambas as reações. Os *Primers* *FUT2-G* e *FUT2-A* amplificaram fragmentos de 519 e 520 pares de bases, respectivamente, e os *Primers* HGH-1 e HGH-2, fragmentos de 428 pares de base. Os amplificons foram analisados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Dos 70 indivíduos analisados, 14,3% (10/70) apresentaram o fenótipo Le(a+b-), 61,4% (43/70), o fenótipo Le(a-b+) e 24,3% (17/70), o fenótipo Le(a-b-). Do total, 68,6% (48/70) foram genotipados como secretores positivos (GG + GA) e 31,4% (22/70), como secretores negativos (AA). O

fenótipo Le(a+b-) foi totalmente concordante com o genótipo *FUT2* (AA). Apenas 38 (88,4%) dos 43 indivíduos com fenótipo Le(a-b+) foram concordantes com o genótipo *FUT2* (GG/GA). Os resultados demonstram que há alto índice de discordância entre o fenótipo Le(a-b+) e o status secretor definido pela genotipagem *FUT2* e sugerem que a fenotipagem Lewis não representa, isoladamente, um meio confiável para inferir o status secretor que um indivíduo expressa.

Apoio: BAP-FAMERP 2007/2008

APÊNDICE G – Resumo apresentado em forma de pôster durante V Congresso Científico da UNIRP.

GENOTIPAGEM *FUT2* E FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA LEWIS: ÍNDICES DE CONCORDÂNCIA

Ana Lívia Galbiatti⁵, Aline Regina Alves Viana¹, Fabiana Nakashima^{2,3}, Daniela Prudente Teixeira Nunes^{2,5}, Eduardo José Pereira Junior², Ana Iara da Costa Ferreira¹, Cinara de Cássia Brandão de Mattos^{2,5}, Luiz Carlos Mattos⁵.

¹ Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP

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

³ Programa de Pós-Graduação em Genética – IBILCE–UNESP,

⁴ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FAMERP

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – FAMERP

alinerav@gmail.com - Curso de Ciências Biológicas UNIRP

A expressão dos fenótipos eritrocitários do sistema Lewis [Le(a+b-), Le(a-b+) e Le(a-b-)], resulta de interações epistáticas entre os genes *FUT2* (19q13.3) e *FUT3* (19p13.3), que codificam as fucosiltransferases FUTII e FUTIII, respectivamente, responsáveis pela síntese dos antígenos Le^a e Le^b. A presença de ambas as enzimas determina o fenótipo Le(a-b+) e classifica seus portadores como secretores positivos. A presença isolada da FUTIII, determina o fenótipo Le(a+b-) e classifica seus portadores como secretores negativos. A ausência da FUTIII na presença ou ausência da FUTII determina o fenótipo Le(a-b-) mas não permite a definição do status secretor. A substituição *G428A* no exon 2 do gene *FUT2* permite diferenciar o status secretor positivo (GG ou GA) do negativo (AA). A fenotipagem do sistema Lewis é frequentemente utilizada para inferir o status secretor. O objetivo desse trabalho foi verificar o índice de concordância entre a expressão dos fenótipos Le(a+b-) e Le(a-b+) e o *status* secretor definido pela genotipagem *FUT2*. Foram selecionados 70 indivíduos adultos não relacionados, de ambos os sexos, caucasianos e não caucasianos. Uma amostra de sangue com anticoagulante foi coletada de cada participante para a obtenção de eritrócitos e de DNA genômico. Os fenótipos Lewis foram identificados pelo método gel centrifugação. A genotipagem *FUT2* foi pelo método PCR-SSP. Duas reações de amplificação, uma com o *primer* *FUT2-G* e outra com o *primer* *FUT2-A* (519 e 520 pb), foram realizadas. Os *primer* anti-sense e os *Primers* HGH-1 e HGH-2 (428 pb), para controle interno, foram incluídos em ambas as reações. Os amplificons foram analisados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Dos 70 indivíduos analisados, 14,3% (10/70) apresentaram o fenótipo Le(a+b-), 61,4% (43/70), o fenótipo Le(a-b+) e 24,3% (17/70), o fenótipo Le(a-b-). O fenótipo Le(a+b-) foi totalmente concordante com o genótipo *FUT2* (AA), mas apenas 38 (88,4%) dos 43 indivíduos com fenótipo Le(a-b+) mostraram-se concordantes com o genótipo *FUT2* (GG/GA). Os resultados

demonstram que o índice de concordância entre o fenótipo Le(a-b+) e o *status* secretor definido pela genotipagem *FUT2* não é absoluto e sugerem que a fenotipagem Lewis não representa, isoladamente, um meio confiável para inferir o *status* secretor que um indivíduo expressa.

Apoio: BAP-FAMERP 2007/2008

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP

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

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

Parecer n.º 089/2005

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º *3082/2005* sob a responsabilidade de Luiz Carlos de Mattos, com o título "Perfil de Glicoconjugados ABH-LEWIS como fatores de risco para infecção por toxoplasma gondii", 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 (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, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 23 de maio de 2005.

Prof.ª Dr.ª **Patrícia Maluf Cury**
Coordenadora do CEP/FAMERP

Prof.ª Dr.ª PATRÍCIA MALUF CURY
CREMESP - 17611

ANEXO B - Resumo do Artigo Publicado no Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases - Original paper - ISSN 1678-9199. V. 16, n 1, p. 87- 95, 2010

ABO BLOOD GROUPS AND *Helicobacter pylori* cagA INFECTION: EVIDENCE OF AN ASSOCIATION

Mattos DE (1), Cintra JR (2), Brandão de Mattos CC (3), Nakashima F (4), Silva RCMA (5), Moreira HW (1), de Mattos LC (2, 3)

(1) Clinical Analysis Department, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, UNESP, Araraquara, São Paulo State, Brazil; (2) Regional Blood Center of São José do Rio Preto, Regional Medical School Foundation, FUNFARME, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil; (3) Immunogenetics Laboratory, Molecular Biology Department, São José do Rio Preto Medical School, FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil; (4) Biology Department, Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences, São Paulo State University, UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil; (5) Specialized Gastroenterology Laboratory, Hospital de Base, FUNFARME, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil.

ABSTRACT: Diseases resulting from *Helicobacter pylori* infection appear to be dependent on a host of genetic traits and virulence factors possessed by this microorganism. This paper aimed to investigate the association between the ABO histo-blood groups and *H. pylori* cagA infections. Genomic DNA samples (n = 110) of gastric biopsies obtained from patients with endoscopic diagnosis of peptic ulcers (n = 25) and chronic active gastritis (n = 85) were analyzed by PCR using specific primers for the cagA gene. Of the samples, 66.4% (n = 73) tested positive and 33.6% (n = 37) negative for the gene. The cagA strain was predominant in peptic ulcers (n = 21; 84.0%) compared with chronic active gastritis (n = 52; 61.2%) (p = 0.05; OR 3.332; 95% CI: 1.050-10.576). Additionally, the cagA strain was prevalent in the type O blood (48/63; 76.2%) compared with other ABO phenotypes (25/47; 53.2%) (p = 0.01; OR 2.816; 95% CI: 1.246-6.364). These results suggest that *H. pylori* cagA

infection is associated with the O blood group in Brazilian patients suffering from chronic active gastritis and peptic ulcers.

KEY WORDS: ABO blood groups, *H. pylori* infection, cagA strain, chronic active gastritis, peptic ulcers.

FINANCIAL SOURCE: BAP/FAMERP and CAPES.

Doi: 10.1590/S1678-91992010005000004

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 23/02/2010

Fabiana Nakashima

CRBM: 15264