

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

**ALINE CAROLINE DE LIMA MARQUES**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO ANTI - *TOXOPLASMA GONDII* DE  
PACIENTES COM DOENÇAS AUTOIMUNES EM USO DE MEDICAMENTOS  
IMUNOMODULADORES BIOLÓGICOS E SINTÉTICOS**

UBERABA – MG  
2018

**ALINE CAROLINE DE LIMA MARQUES**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO ANTI - *TOXOPLASMA GONDII* DE  
PACIENTES COM DOENÇAS AUTOIMUNES EM USO DE MEDICAMENTOS  
IMUNOMODULADORES BIOLÓGICOS E SINTÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Básica e Experimental, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues  
Júnior

UBERABA – MG  
2018

**ALINE CAROLINE DE LIMA MARQUES**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO ANTI - *TOXOPLASMA GONDII* DE  
PACIENTES COM DOENÇAS AUTOIMUNES EM USO DE MEDICAMENTOS  
IMUNOMODULADORES BIOLÓGICOS E SINTÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Básica e Experimental, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

12 de julho de 2018

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior – Orientador  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Profa. Dra. Karine Rezende de Oliveira  
Universidade Federal de Uberlândia

---

Dr. Cesar Gomez Hernandez  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

À Deus por me proporcionar sabedoria,  
ao meu esposo Reinaldo e ao meu filho  
Davi por todo amor, carinho, apoio,  
constante estímulo e força, e também pela  
a paciência e compreensão nos períodos de ausência.

Aos meus pais Maurício e Edileusa  
pelo amor incondicional,  
aos meus irmãos Thiago e Felipe  
pela força, torcida e desejo de sucesso.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por ter me concedido o fôlego de vida, saúde, sabedoria, força e perseverança para a conclusão de mais uma etapa importante em minha vida.

A minha sogra Erodite e ao meu sogro Antônio pelo carinho e ajuda com o meu filho Davi, para que eu pudesse concluir este sonho.

Ao meu orientador Dr. Virmondes Rodrigues Junior, pela a oportunidade, pela a paciência e por todo conhecimento proporcionado.

Aos funcionários e médicos do ambulatório de Reumatologia, minha gratidão.

A todos os amigos do laboratório de imunologia pela amizade e por todo o conhecimento compartilhado, em especial a Cristhianne Molinero, por participar diretamente de cada etapa deste trabalho me acompanhando, dando apoio necessário e dividindo experiências, ao seu esposo Daniel por me ajudar com os seus conhecimentos de informática com muita presteza.

A todos os meus familiares e amigos que me incentivaram em todas as minhas conquistas, o meu muito obrigada.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro por proporcionar a infraestrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Em síntese a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, incentivaram ou contribuíram com a realização deste projeto.

***“Confia no Senhor e faze o bem, habitarás na terra e, verdadeiramente serás alimentado. Deleita-te também no Senhor, e ele concederá o que deseja o teu coração”.***

*(Salmos 37:3-4)*

## RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição cosmopolita. Durante sua patogênese a resposta imune é fundamental para controle e contenção parasitária e, por essa razão, a toxoplasmose pode ser agressiva em pacientes expostos à imunossupressão terapêutica, como os bloqueadores do TNF- $\alpha$  utilizados no controle de doenças autoimunes. Neste estudo, o perfil sorológico anti-*Toxoplasma gondii* foi avaliado em pacientes com doenças autoimunes e que fazem uso de inibidores de TNF- $\alpha$  e drogas sintéticas, através da dosagem de IgM, IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Além disso, a avidéz dos anticorpos IgG total e IgG1 foi determinada em pacientes positivos para *Toxoplasma gondii* através do ELISA. Amostras de soro foram coletadas de 87 indivíduos, 32 pacientes com doenças autoimunes usando drogas sintéticas (SIB), 23 com doenças autoimunes usando bloqueadores de TNF- $\alpha$  (IB) e 32 indivíduos no grupo controle (GC). Pacientes positivos para IgG total apresentaram níveis significativamente mais baixos nos grupos IB e SIB em comparação ao GC ( $p < 0,0001$ ) e concentrações mais altas de IgM no grupo IB em comparação aos grupos SIB e GC ( $p < 0,05$ ). A análise da subclasse de IgG1 revelou níveis séricos menores no grupo IB em comparação ao GC ( $p < 0,05$ ) e a menor correlação positiva com IgG total. No entanto, a sua avidéz em pacientes pertencentes ao grupo IB foi significativamente maior em comparação com os pacientes nos grupos SIB e GC. Esses resultados sugerem que a terapia bloqueadora do TNF- $\alpha$  interfere na resposta imune humoral específica do *Toxoplasma gondii*, afetando diretamente o isótipo IgG1, que é o predominante na resposta específica de *Toxoplasma gondii* estudada.

**Palavras-chave:** bloqueadores de TNF- $\alpha$ , imunoglobulinas, *Toxoplasma-gondii*, imunossupressão terapêutica, toxoplasmose.

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonosis of cosmopolitan distribution. During the pathogenesis of this condition, the function of the immune system is fundamental for parasitic control and containment, and for this reason, toxoplasmosis can be aggressive in patients exposed to therapeutic immunosuppression, such as TNF blockers used in controlling autoimmune diseases. In this study, the anti-*Toxoplasma gondii* serological profile was evaluated in patients with autoimmune diseases using TNF inhibitors and synthetic drugs, by measuring IgM, total IgG, IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4. Furthermore, the avidity of total IgG and IgG1 antibodies were determined in *T. gondii* positive patients with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Serum samples were collected from 87 individuals, 32 patients with autoimmune diseases using synthetic drugs (SD), 23 with autoimmune diseases using TNF- $\alpha$  blockers (BD), and 32 healthy subjects in the control group (CG). IgG positive patients presented significantly lower levels in the BD and SD groups compared to the GC ( $p < 0.0001$ ) and higher levels of IgM concentration in the BD group compared to the SD and CG ( $p < 0.05$ ) groups. IgG1 subclass analysis revealed decreased serum levels in the BD group in comparison to the CG ( $p < 0.05$ ) and the lowest positive correlation with total IgG. However, its avidity in patients belonging to the BD group was significantly higher in comparison to patients in the SD and CG groups. These results suggest that TNF- $\alpha$  blocking therapy interferes with the humoral immune response specific to *T. gondii*, directly affecting the IgG1 isotype, which is the predominant one in the specific *T. gondii* response studied.

**Keywords:** TNF- $\alpha$  blockers, immunoglobulins, *Toxoplasma gondii*, therapeutic immunosuppression, Toxoplasmosis.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Tabela 1:** Positividade para anticorpos IgG total anti - *T. gondii* de pacientes com doenças autoimunes (IB, SIB) e (GC), sem doenças autoimunes. ....29

**Tabela 2:** Descrição das doenças autoimunes nos grupos SIB e IB e detecção da IgG total anti- *T. gondii*. ....29

**Tabela 3:** Frequência de Isótipos de imunoglobulinas em pacientes positivos para Toxoplasmose.....33

**Quadro 1:** Descrições dos medicamentos dos grupos IB e SIB.....23

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Determinação dos níveis de anticorpos IgG total. ....	28
<b>Figura 2.</b> Determinação dos níveis de anticorpos IgG total dos pacientes positivos. ....	29
<b>Figura 3A.</b> Determinação dos níveis de anticorpos IgM.....	30
<b>Figura 3B.</b> Níveis de IgM dos indivíduos positivos para IgG total anti- <i>T. gondii</i> .....	30
<b>Figura 4.</b> Determinação dos níveis da subclasse IgG1. ....	31
<b>Figura 5.</b> Determinação dos níveis da subclasse IgG2. ....	31
<b>Figura 6.</b> Determinação dos níveis da subclasse IgG3. ....	32
<b>Figura 7.</b> Determinação dos níveis da subclasse IgG4. ....	32
<b>Figura 8.</b> Correlação entre níveis séricos de anticorpos IgG total e a subclasse IgG1.....	33
<b>Figura 9.</b> ELISA-Avidez para IgG total. ....	34
<b>Figura 10.</b> ELISA-Avidez de IgG1. ....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLO

%: Porcento

°C: Grau Celsius

±: Desvio padrão

α: Alfa

γ: Gama

μL: Microlitro (s)

mL: Mililitro (s)

n: Número

AGHU: Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários

Anti- *T. gondii*: Anticorpo anti - *Toxoplasma gondii*

APC: Células apresentadoras de antígenos

CD: Cluster of differentiation

DMARDs: Disease Modifying Antirheumatic Drugs

DO: Densidade óptica

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

GC: Grupo controle

GPI: Glicosil fosfatidilinositol

HIV: Human Immunodeficiency Virus

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio

IA: Índice Aidez

IB: Grupo em uso de imunomodulador biológico

IE: Índice ELISA

IFN: Interferon

IL: Interleucina

MTX: Metotrexato

NK: Natural Killer

OPD: Orthophenylenediamine

PAMP: Padrões moleculares associados aos patógenos

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PBS-T: Solução salina tamponada com fosfato contendo Tween 20

SIB: Grupo sem uso de imunomodulador biológico

STAg: Antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii*

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

*T. gondii: Toxoplasma gondii*

Th: linfócito T *helper*

TLCK: Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride

TLR: Receptores semelhantes a Toll

TNF: Fator de necrose tumoral

TRIS-HCL: Tris Hydrochloride

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 HISTÓRICO DA TOXOPLASMOSE	14
1.2 CICLO E TRANSMISSÃO DO <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	15
1.3 RESPOSTA IMUNE CONTRA O <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	16
1.4 IMUNOSSUPRESSÃO TERAPÊUTICA X TOXOPLASMOSE	18
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS GERAIS</b>	<b>21</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>22</b>
4.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO	22
4.2 COLETA DE AMOSTRAS	22
4.3 SUJEITOS DA PESQUISA	22
4.3.1 Critérios de Inclusão	23
4.3.2 Critérios de Exclusão	24
4.4 MANUTENÇÃO E OBTENÇÃO DE TAQUIZOÍTOS DE <i>T. GONDII</i>	24
4.5 PREPARO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS (STAg)	25
4.6 TESTE DE ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	25
4.6.1 ELISA indireto para detecção de IgG Total	25
4.6.2 ELISA indireto para detecção das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4	26
4.6.3 ELISA de captura para detecção de IgM	26
4.7 ELISA-AVIDEZ PARA OS ANTICORPOS IgG TOTAL E SUBCLASSE IgG1	26
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>28</b>
5.1 DETECÇÃO DA IgG TOTAL ANTI- <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	28
5.2 DETECÇÃO DA IgM ANTI- <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	30
5.3 DETECÇÃO DAS SUBCLASSES IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ANTI- <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	30
5.4 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE ISÓTIPOS EM PACIENTES SOROPOSITIVOS PARA ANTICORPOS IgG ANTI- <i>T. GONDII</i>	32
5.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICO DE IgG TOTAL E IgG1	33
5.6 AVIDEZ PARA IgG TOTAL E IgG1	34

<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS: .....</b>	<b>40</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição cosmopolita que apresenta importância clínica e veterinária (DUBEY, BEATTIE, 1988). Durante sua patogênese, o sistema imune é fundamental no controle e contenção parasitária e, por essa razão, a toxoplasmose pode ser agressiva em pacientes expostos à imunossupressão terapêutica, causando o desenvolvimento de formas graves da doença como encefalite, coriorretinite, miocardite e até a morte (BERAN, et al., 2015).

Dessa forma, é importante enfatizar o uso dos agentes imunomoduladores biológicos, que vêm sendo amplamente utilizados no controle das doenças autoimunes (SINGH, et al., 2012; LIMA, et al., 2015). De acordo com alguns autores o uso desses medicamentos imunomoduladores biológicos tais como os bloqueadores de TNF- $\alpha$ , pode aumentar o risco de doenças oportunistas e levar a reativação de doenças latentes como a tuberculose (YASUI, 2014; MOTA, et al., 2015), sendo extremamente importante compreender a associação da terapêutica dos imunomoduladores biológicos em doenças latentes como a toxoplasmose.

### 1.1 HISTÓRICO DA TOXOPLASMOSE

O agente etiológico da toxoplasmose é denominado *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) um protozoário intracelular obrigatório capaz de se replicar em qualquer célula nucleada (DUBEY, BEATTIE, 1988). É uma parasita de ciclo de vida heteroxênico que pode acometer o homem e outros animais (TENTER, et al., 2000), sendo o primeiro hospedeiro intermediário e o gato e outros felídeos (Família Felidae) classificados como hospedeiros definitivos (DUBEY, MILLER, FRENKEL, 1970; LINDSAY, BLAGBURN, DUBEY, 1997).

A doença foi descoberta em meados de 1908 pelos os pesquisadores Charles Nicolle e Louis Manceaux, através de um estudo com leishmaniose, onde identificaram a presença de um protozoário no tecido de um roedor norte africano, conhecido como *Ctenodactylus gundi*. Ambos nomearam o protozoário de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), pautados em sua morfologia em forma de meia lua, observada, quando o parasito se apresentava no estágio de taquizoíta (Toxon= arco, plasma= forma), (NICOLLE, MANCEAUX, 1909). Simultaneamente Alfonso Splendore descrevia o mesmo parasito no Brasil, por meio da observação do protozoário em um coelho, pois naquela época uma infecção letal acometia coelhos no país (SPLENDORE, 1909).

De acordo com alguns autores, durante muito tempo a importância clínica da doença passou despercebida, sendo assim o primeiro relato de toxoplasmose humana foi em 1923 por Jankú em Praga que evidenciou a presença de cistos na retina de uma criança de 11 meses de idade que foi a óbito com hidrocefalia e cegueira (JANKÚ, 1923).

## 1.2 CICLO E TRANSMISSÃO DO *TOXOPLASMA GONDII*

O ciclo biológico do *T. gondii* ocorre em duas fases caracterizadas de assexuada e sexuada, sendo encontrado em três estágios distintos: taquizoítos (forma livre), bradizoítos (contidos em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos) (MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

No hospedeiro intermediário os taquizoítos sofrem desenvolvimento assexuado por multiplicação rápida, podendo ser encontrados em praticamente todos os tecidos, apresentando a forma ovoide ou meia-lua. Após penetrarem nas células hospedeiras multiplicam-se por endodiogenia, levando à lise dessas células e alcançando a corrente sanguínea resultando na penetração de novas células. Por meio da ação da resposta imune, alguns desses taquizoítos iniciam uma segunda fase de desenvolvimento através da interconversão onde se transformam em bradizoítos, formando o cisto tecidual (DUBEY, LINDSAY, SPEER, 1998).

Os cistos teciduais podem conter centenas de bradizoítos, que são morfológicamente semelhantes aos taquizoítos, porém multiplicando-se lentamente e persistindo por toda a vida do hospedeiro. Quando ingeridos pelos hospedeiros definitivos como é o caso do gato e outros felídeos, os bradizoítos iniciam outra fase assexuada de multiplicação, primeiramente por endodiogenia, seguida de uma fase de endopoligenia nas células epiteliais do intestino delgado (DUBEY, 1998; TENTER, 2000).

Após repetidas multiplicações, inicia-se a fase sexuada por gamogonia, formando os oocistos, que por sua vez são liberados não-esporulados nas fezes do felídeo e sofrem o processo de esporogonia no ambiente; esta fase leva ao desenvolvimento de oocistos esporulados, os quais se tornam infectantes aos hospedeiros intermediários (DUBEY, 1998; DUBEY, LINDSAY, SPEER, 1998; DUBEY, 2008).

A transmissão da toxoplasmose no homem comumente ocorre através da ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos esporulados que foram eliminados como não esporulados nas fezes de gatos infectados e sofrem maturação no ambiente. A contaminação

pela ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou malcozidas de porcos, carneiros e bovinas também acontece com frequência (DUBEY, 2004; DATTOLI, et al., 2011).

Pode ocorrer também a transmissão vertical ou por via transplacentária através da passagem dos taquizoítos da mãe primoinfectada para o feto e nestes casos, dependendo da fase gestacional, pode ocasionar graves problemas neurológicos e oftalmológicos no neonato, como pode levar ao aborto (FIGUEIRÓ-FILHO, et al., 2005). Há descritos de outras vias de transmissão por meio de transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais (LUFT, et al., 1983; SHULMAN, 1994).

### 1.3 RESPOSTA IMUNE CONTRA O *TOXOPLASMA GONDII*

Na presença de um patógeno o sistema imunológico é ativado, sendo que a primeira linha de defesa em qualquer que seja a perturbação homeostática é a resposta imune inata (JANEWAY, MEDZHITOV, 2002).

Durante o estágio inicial da infecção há o recrutamento de células dendríticas, neutrófilos e monócitos para os locais de invasão parasitária, e geralmente a resposta imune inata contra os protozoários é a fagocitose, onde as moléculas de superfície do parasito são reconhecidas por receptores semelhantes a Toll (TLR) na membrana de células apresentadoras de antígenos (APC), resultando na ativação dos fagócitos (YAROVINSKY, et al., 2005). Os TLR's são expressos na superfície de diversos tipos celulares, e estes apresentam a capacidade de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP), presentes na superfície de organismos infecciosos. O *T. gondii* dentre outros protozoários, expressam lipídios glicosil fosfatidilinositol (GPI) que acarreta a ativação do TLR2 e TLR4 (YAROVINSKY, 2008).

Embora a resposta imune inata orquestre a primeira linha de defesa, alguns parasitas desenvolvem mecanismos de resistências para ignorar as defesas do hospedeiro, ou seja, de modo geral nota-se que diversos parasitos enganam o sistema imune inato evadindo do processo de fagocitose, acarretando por sua vez na estimulação da imunidade adaptativa que fará frente na defesa contra os protozoários (ABBAS, LITCHMAN & PILLAI, 2008).

O mecanismo de defesa principal da imunidade adaptativa contra protozoários intracelulares obrigatórios como no caso do *T. gondii* é a resposta mediada por células, ocorrendo ativação dos macrófagos por citocinas pró-inflamatórias derivadas de células do perfil Th1, onde os macrófagos e células NK são fundamentais no combate à infecção aguda (SCANGA, et al., 2002).

A resposta humoral ocorre por meio da síntese de anticorpos, que atuam sobre os taquizoítos extracelulares que foram liberados na corrente sanguínea, oriundos do rompimento das células infectadas. A captura do *T. gondii* pelas células fagocíticas é facilitada pelos anticorpos através da opsonização e estes também ativam o sistema complemento levando à lise dos parasitos (SAYLES, et al., 2000; FILISETTI, CANDOLFI, 2004).

A IgM é a primeira classe de anticorpo a ser sintetizada e pode ser detectada após uma semana de infecção por *T. gondii* (FILISETTI, CANDOLFI, 2004). A sua presença indica que a infecção está recente, caracterizada como fase aguda e, os níveis séricos de IgM diminuem até sua negativação (WIELAARD et al., 1983; DEL BONO, et al., 1989). Entretanto, uma pequena parte da população mantém essa IgM circulante durante um período de dois anos ou mais, essa é caracterizada como IgM residual (RIBEIRO et al., 2008; VILLARD, et al., 2016); a imunoglobulina IgA é sintetizada durante a fase aguda sendo detectada logo após IgM (GORGIEVSKI-HRISOHO, et al., 1996; BERTOZZI, et al., 1999).

As imunoglobulinas IgG surgem após uma a duas semanas da exposição ao *T. gondii* e altos títulos são atingidos em aproximadamente seis semanas de infecção, (CHAUDHRY, et al., 2014), porém esses níveis diminuem e permanecem ao longo da vida do indivíduo. A detecção sorológica desta imunoglobulina está associada a fase crônica e resistência ao *T. gondii* (REMYNGTON, et al, 2004; VILLARD, et al., 2016). Existem quatro subclasses IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, sendo que a IgG1, IgG2 e IgG3 são consideradas predominantes na toxoplasmose latente (HUSKINSON, et al., 1989).

No decurso da resposta humoral ao *T. gondii* os anticorpos IgG vão apresentando avidéz crescente, como reflexo do grau de maturação dos anticorpos. Dessa forma, durante os estágios iniciais de infecção esses anticorpos apresentam baixa afinidade ou baixa avidéz e, durante a fase crônica, esses anticorpos são de alta avidéz, é uma valiosa ferramenta diagnóstica por meio dos testes de avidéz dos anticorpos IgG (BEGHETTO, et al., 2003; CANDOLFI, et al., 2007), permitindo melhor esclarecimento e interpretação do estágio da infecção naqueles casos de persistência da IgM residual (RIBEIRO, et al., 2008). A resposta humoral além de conferir controle da infecção é uma estratégia comumente utilizada como diagnóstico, onde a detecção sorológica permite o conhecimento da exposição ao *T. gondii*, assim como também definir o tempo e estágio de infecção (NAOT, et al., 1981; MONTOYA, 2002; CANDOLFI, et al., 2007).

A secreção de citocinas e de anticorpos IgM, IgA, IgE e IgG contra as proteínas do parasito os levam a realizar a interconversão e se transformarem na forma intracelular de bradizoíto (SUZUKI, et al.,1988; SKARIAH, et al., 2010).

Dentre as células que participam da resposta, através da secreção de citocinas, encontram-se os perfis de T CD4<sup>+</sup> que evidenciam grande importância na resposta mediada por células. Estas apresentam três subtipos de células T CD4<sup>+</sup> chamados de Th1, Th2 e Th17 que participam na defesa do hospedeiro. As citocinas secretadas pelos fundamentais subtipos são IL-2 e IFN- $\gamma$  para as células Th1, IL-4, IL-5 e IL-13 para as células Th2 e IL-17 e IL-22 para as células Th17 (ABBAS, LITCHMAN & PILLAI, 2008).

Sendo assim, no processo infeccioso do *T. gondii*, por se tratar de um parasita intracelular obrigatório, o principal mecanismo de resposta e defesa do hospedeiro é através da resposta imune Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (GAZZINELLI, et al., 1993; GAZZINELLI, et al., 1994).

A IL-12 é caracterizada como uma citocina chave na motivação da resposta imune de perfil Th1 devido a ativação da síntese de IFN- $\gamma$  por células NK, células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>; em oposição é enfatizado que ativação de células Th2 pelos protozoários tem como efeito o aumento da estimativa de sobrevivência do parasito e a exasperação das lesões devido às atividades das citocinas Th2 sobre macrófagos, notavelmente IL-4 (ROBBEN, et al., 2004; ALIBERTI, 2005).

Além do IFN- $\gamma$ , a citocina TNF- $\alpha$  também é necessária para proteção durante o estágio crônico da infecção; estudos realizados com camundongos mostram que a neutralização dessa citocina está relacionada com aumento da carga parasitária (GAZZINELLI, et al., 1993; YAP, et al., 1998).

#### 1.4 IMUNOSSUPRESSÃO TERAPÊUTICA X TOXOPLASMOSE

A resposta imunológica é crucial no controle e contenção parasitária e a eficácia da resposta varia dependendo do estado imune do hospedeiro. Sendo assim, em indivíduos em uso de medicamentos para controle de doenças autoimunes, a toxoplasmose pode ocasionar várias consequências, que vão desde sequelas graves, podendo evoluir para óbito (BERAN, et al., 2015).

As doenças autoimunes resultam de falhas dos mecanismos de autotolerância imunológica, onde o sistema imune perde a capacidade de discriminar estruturas próprias e não próprias e começa a reagir através das células e moléculas contra peptídeos próprios (SMITH, GERMOLEC, 1999). Neste contexto os medicamentos utilizados para o tratamento das doenças autoimunes como artrite reumatoide, artrite psoriásica, artrite idiopática juvenil,

psoríase dentre outras, consistem na inibição ou bloqueio de componentes do sistema imunológico e são caracterizados como imunossupressores (OSTENSEN, 1992).

Uma classe de drogas que vêm sendo amplamente indicadas e utilizadas são os imunomoduladores biológicos, que são anticorpos ou proteínas que atuam sobre células, citocinas pró-inflamatórias ou nos receptores de citocinas na tentativa de promover o controle das doenças autoimunes (SINGH, et al., 2012; LIMA, et al., 2015).

No entanto, segundo alguns pesquisadores o uso desses medicamentos imunomoduladores biológicos, tais como os bloqueadores de TNF- $\alpha$ , pode aumentar o risco de doenças oportunistas e levar a reativação de doenças latentes como a tuberculose (YASUI, 2014; MOTA, et al., 2015;). Um estudo de modelo de granuloma in vitro evidenciou que o bloqueio de TNF- $\alpha$  com o imunomodulador biológico infliximabe pode alterar a estrutura do granuloma em pacientes com tuberculose latente, além de modular negativamente citocinas importantes no perfil Th1 como o IFN- $\gamma$  e do perfil Th17 (SILVA, et al., 2018).

A citocina IFN- $\gamma$  tem um papel importante durante a infecção aguda, controlando a replicação dos taquizoítos, participando do processo de interconversão do estágio de taquizoítos para bradizoítos (SKARIAH, et al., 2010) e, juntamente com o TNF- $\alpha$  e o óxido nítrico, contribuem para a contenção parasitária precavendo a reativação dos cistos durante a infecção latente (SUZUKI, et al., 1988; SCHARTON-KERSTEN, et al., 1997; YAP, et al., 1998).

## 2 JUSTIFICATIVA

A terapêutica com drogas imunomoduladoras têm se tornado cada vez mais frequente no tratamento de doenças autoimunes e, segundo alguns pesquisadores, o uso de medicamentos imunomoduladores biológicos inibidores de TNF- $\alpha$ , pode aumentar o risco de contrair doenças oportunistas e levar a reativação de doenças latentes como a tuberculose (YASUI, 2014; MOTA, et al., 2015). Na literatura constam alguns relatos de casos da reativação da toxoplasmose com manifestação da forma cerebral, após tratamento com tais inibidores de TNF- $\alpha$  (YOUNG, MCGWIRE, 2005; CREN, BOUVARD, CROCHETTE, 2016).

Sabe-se que a citocina TNF- $\alpha$  juntamente com o óxido nítrico contribuem para a contenção parasitária precavendo a reativação dos cistos de *T. gondii* durante a infecção latente (SUZUKI, et al., 1988; SCHARTON-KERSTEN, et al., 1997; YAP, et al., 1998) e estudos realizados com camundongos mostram que a neutralização dessa citocina está relacionada com aumento da carga parasitária (GAZZINELLI, et al., 1993; YAP, et al., 1998). Contudo, atualmente não é feita uma triagem para toxoplasmose antes do início do tratamento com imunomoduladores.

Por essa razão, a compreensão da associação desses agentes imunomoduladores biológicos e, até mesmo os sintéticos, utilizados para tentativa de contenção da autoimunidade, é de suma importância para manter o controle da doença autoimune e, ao mesmo tempo, garantir a prevenção de reativação de doenças latentes como a toxoplasmose nesses pacientes.

### 3 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o perfil sorológico anti-*Toxoplasma gondii* de pacientes com doenças autoimunes em uso de medicamentos imunomoduladores biológicos e sintéticos.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de anticorpos IgM, IgG total, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 anti – *Toxoplasma gondii* em amostras de soro de pacientes com doenças autoimunes (artrite reumatóide e psoriásica, artrite idiopática juvenil, psoríase e espondilite anquilosante) que fazem o uso de drogas sintéticas ou biológicas (bloqueadores de TNF- $\alpha$ ).
- Determinar a avidéz dos anticorpos IgG total e IgG1 nos pacientes positivos para *Toxoplasma gondii*.
- Comparar os níveis séricos de anticorpos detectados entre os grupos de pacientes com doenças autoimunes e indivíduos do grupo controle.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo foi conduzido na cidade de Uberaba-MG, desenvolvido no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número de parecer 1.870.741, CAAE 59831016.2.0000.5154. Os pacientes atendidos no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFTM e diagnosticados com doenças autoimunes foram convidados a participarem do estudo; devidamente informados sobre os objetivos e mediante a aceitação em participar da pesquisa, foram fornecidos a estes pacientes o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo I, II**) e um questionário (**Apêndice I**), para levantamento de dados como sexo, idade, medicamentos em uso e comorbidades associadas. O uso da medicação foi um requisito importante para a formação dos grupos de estudo e foi também realizada a pesquisa de prontuários online dos pacientes no Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários (AGHU).

### 4.2 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes diagnosticados com doenças autoimunes atendidos no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas e de alunos (as) e funcionários (as) do laboratório de Imunologia da UFTM que não possuíam doenças autoimunes (autorreferido), para o grupo controle. Para a obtenção do soro os tubos foram centrifugados a 1000 xg por 10 minutos e armazenado em freezer a -20° C para posterior análise sorológica.

### 4.3 SUJEITOS DA PESQUISA

Os participantes da pesquisa foram divididos em três grupos: o grupo de pacientes com doenças autoimunes sem uso de imunomoduladores biológicos (SIB) composto por 32 pacientes; o grupo de pacientes com doenças autoimunes com o uso de imunomoduladores biológicos (IB) composto por 23 pacientes; e o grupo de indivíduos sem doenças autoimunes, grupo controle (GC) composto por 32 indivíduos.

Os pacientes do grupo SIB estavam na terapêutica das drogas de base convencionais, como as drogas para controle dos sintomas, que incluem os analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides e os corticosteroides, e na vigência também das drogas anti-reumáticas modificadoras do curso da doença - Disease Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs) sintéticas (GUMPEL, 1976) como, o metotrexato (MTX), sulfato de hidroxicloroquina, leflunomida e sulfassalazina.

Os pacientes do grupo IB estavam em uso de DMARDs biológicas (especificamente bloqueadores de TNF- $\alpha$ ), esses agentes são caracterizados como imunomoduladores biológicos tais como o adalimumabe, certolizumabe pegol, etanercepte, golimumabe e infliximabe, sendo que a terapia com essas drogas poderiam estar ou não associadas as drogas de base convencional (DMARDs sintéticas) (**Quadro 1**).

**Quadro 1.** Descrição dos medicamentos dos grupos IB e SIB

<b>Imunomoduladores biológicos</b>	<b>Até 3 meses</b>	<b>4 a 6 meses</b>	<b>7 a 12 meses</b>	<b>13 a 24 meses</b>	<b>25 a 60 meses</b>	<b>61 a 120 meses</b>	<b>Mais de 120 meses</b>
Adalimumabe	1	1	1	1	3		
Adalimumabe e MTX						1	
Certolizumabe				1			
Etanercepte		1			2	1	
Etanercepte e MTX	1				2	1	1
Etanercepte, Leflunomida e MTX						1	
Golimumabe e MTX		1		1	1		
Infliximabe e MTX					1		
<b>Drogas Sintéticas</b>							
Apenas drogas analgésicas					3		
Hidroxicloroquina	1						
Hidroxicloroquina e Leflunomida					1		
Leflunomida					1		
MTX	1			3	6		
MTX e Hidroxicloroquina			3	3	6		
MTX, Hidroxicloroquina e Leflunomida			1				
MTX e Leflunomida			1		1		
Sulfassalazina				1			

#### 4.3.1 Critérios de Inclusão

Foram utilizados como critérios para inclusão de pacientes no estudo:

- Indivíduos que não apresentaram doenças autoimunes para compor o grupo controle.

- Pacientes com doenças autoimunes em uso de drogas imunossupressoras, para o controle dos sintomas e fármacos considerados como modificadores do curso da doença tanto os sintéticos, como os imunomoduladores biológicos.

#### 4.3.2 Critérios de Exclusão

Foram utilizados como critérios para exclusão de pacientes no estudo:

- Pacientes diagnosticados com HIV ou qualquer outra doença causadora de imunodepressão.
- Pacientes imunossuprimidos devido a tratamento quimioterápico ou transplantados.
- Pacientes que estavam em uso de imunomoduladores biológicos que não fossem especificamente bloqueadores de TNF- $\alpha$ .
- Pacientes que não atingiram a maioridade legal
- Gestantes.
- Pacientes que não concordassem com a participação na pesquisa.

#### 4.4 MANUTENÇÃO E OBTENÇÃO DE TAQUIZOÍTOS DE *T. GONDII*

As formas taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidas em cultura celular, usando linhagens de células HeLa (RIBEIRO et al., 2009). As células foram infectadas com taquizoítos os quais foram mantidas por passagens seriadas em meio RPMI com 2% de Soro Fetal Bovino, a cada 48-72 horas. Os parasitos livres foram coletados por descamação da monocamada celular (cell scraper) e parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 13 x 4 mm e centrifugação rápida (45 x g por 1 minuto a 4°C) para remover restos celulares. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (900 x g por 10 minutos a 4°C) com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M (PBS, pH 7,2). O sedimento final de parasitos foi ressuscitado em PBS e os parasitos contados em câmara de Neubauer, utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Os parasitos foram armazenados a -20°C até a preparação do antígeno solúvel de *T. gondii*.

#### 4.5 PREPARO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS (STAg)

Antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii* (STAg) foram preparados como descrito por Scott e colaboradores (1987), com modificações. Suspensões parasitárias contendo aproximadamente  $10^8$  taquizoítos/mL foram ressuspendidas em solução de Tris-HCl a 50mM contendo inibidor de protease Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride a 0,1mM (TLCK - Sigma Aldrich) e submetidas a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, seguido por oito ciclos de ultrassom durante 5 minutos a 60 Hz em banho de gelo. Após centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e determinado sua concentração proteica, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Foram armazenadas alíquotas do extrato com antígenos solúveis totais a -80°C até utilização posterior.

#### 4.6 TESTE DE ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*TOXOPLASMA GONDII*

Os experimentos foram realizados através do ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 anti – *Toxoplasma gondii* nas amostras de soro dos pacientes e indivíduos do grupo controle. Para tanto foi considerado padronização prévia que foi realizado segundo a técnica descrita, com modificações (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1986).

##### 4.6.1 ELISA indireto para detecção de IgG Total

Placas de alta afinidade (Thermo Scientific™ Nunc™, EUA) foram sensibilizadas com STAg (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, todas as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestle, São Paulo, SP, PBS-T-M5%) por uma 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens com PBS-T, as amostras de soro foram diluídas 1:64 em PBS-T-M5% e incubadas por uma hora a 37°C. Após seis lavagens, foi adicionado o anticorpo anti-IgG humana (1:2000) conjugado com peroxidase (IgG/HRP, DAKO) e incubado por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, a reação foi revelada por meio da adição do substrato enzimático 1,2 orthophenylenediamine (OPD, Dako) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%.

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de placas de microtitulação a 490 nm. Controles positivos e negativos foram incluídos na placa. Os níveis de anticorpos foram expressos em índice ELISA (IE), segundo a fórmula:  $IE = DO \text{ amostra} / \text{cut off}$ , onde *cut off* foi calculado como a média da DO de soros controles negativos acrescidos de três desvios padrões. Valores de  $IE > 1,2$  foram considerados positivos para excluir valores de reatividade limítrofes próximos a valores de  $IE = 1,0$ .

#### 4.6.2 ELISA indireto para detecção das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4

Placas de alta afinidade (Thermo Scientific™ Nunc™, EUA) foram sensibilizadas com STAg (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, todas as placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e foram bloqueadas com PBS-T contendo 1% de albumina bovina sérica (PBS-T-BSA 1%) por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as amostras de soro foram diluídas a 1:64 em PBS-T-BSA 1% e incubadas por 2 horas a 37°C. Após seis lavagens, foram adicionados os anticorpos anti-IgG1 (1:1000 – BD Pharmigen™) ou anti-IgG2 (1:1000 – BD Pharmigen™) ou anti-IgG3 (1:1000 – BD Pharmigen™) ou anti-IgG4 (1:2000 – BD Pharmigen™) humanas conjugadas com Biotina e incubadas por 1 hora a 37°C. Logo em seguida, as placas foram lavadas 6 vezes, foi adicionada estreptavidina conjugada com peroxidase (1:1000) e incubadas por 30 minutos, no escuro, a temperatura ambiente. Após novas lavagens, a reação foi revelada e analisada conforme descrito no item 4.6.1.

#### 4.6.3 ELISA de captura para detecção de IgM

Para detecção de IgM foi realizado ELISA de captura Kit comercial “Anti TOXO IgM SYM (Symbiosys Diagnóstica Ltda, Leme, Brasil), conforme instruções do fabricante.

Os níveis de anticorpos foram expressos em índice ELISA (IE), segundo a fórmula:  $IE = DO \text{ amostra} / \text{cut off}$ , onde *cut off* foi calculado através da média das absorbâncias do Controle *cut off*, lido em 450nm. Valores de  $IE > 1,1$  foram considerados positivos

#### 4.7 ELISA-AVIDEZ PARA OS ANTICORPOS IgG TOTAL E SUBCLASSE IgG1

Para a avaliação da avidéz de IgG total e da subclasse IgG1, o mesmo procedimento do ELISA foi realizado para as amostras de soro positivas, aumentando-se apenas uma etapa após a incubação com o soro dos pacientes, onde colocou-se solução de ureia 8M diluída em PBS em uma das placas enquanto na placa não tratada colocou-se apenas PBS, por 15 minutos a temperatura ambiente, para avaliação da força de ligação entre os antígenos de *T. gondii* com os anticorpos dos pacientes.

Os resultados dos testes de avidéz foram expressos por meio do índice Avidéz, segundo a formula:  $IA = IE \text{ da cavidade com ureia} / IE \text{ da cavidade sem ureia} \times 100$ . Sendo que os resultados obtidos para porcentagem de avidéz do anticorpo IgG foram interpretados da seguinte maneira:

Valores:

- 0 - 30%: Baixa avidéz
- 31 - 59 %: Avidéz moderada:
- 60-100%: Alta avidéz:

Interpretação:

- Avidéz baixa: Sugere infecção recente ocorrida nos últimos três meses.
- Avidéz moderada: Não permite definir o período da infecção, caracterizado como período indeterminado.
- Avidéz alta: Sugere que a infecção tenha ocorrido há mais de três meses (HEDMAN et al,1993).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

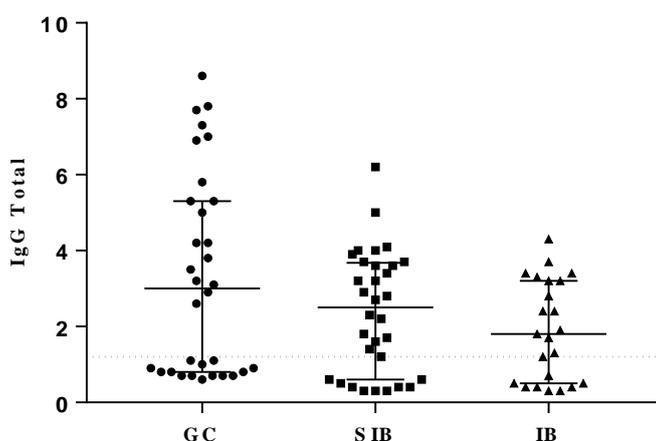
A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism versão 7.04 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Para os dados que não seguiram distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. Quando a distribuição foi normal, utilizou-se One-Way ANOVA. Para as análises de correlação foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 5 RESULTADOS

Um total de 87 indivíduos foram analisados, sendo 56 (64,4%) do sexo feminino e 31 (35,6%) do sexo masculino, a média de idade entre os indivíduos foi de 47,2 ( $\pm 15,5$ ) no grupo IB, 53,5 ( $\pm 13,4$ ) no grupo SIB e 47,2 ( $\pm 13,6$ ) no GC.

### 5.1 DETECÇÃO DA IgG TOTAL ANTI-*TOXOPLASMA GONDII*

No estudo analisou-se a positividade de IgG total anti- *T. gondii* nos pacientes do grupo de estudo e indivíduos do grupo controle. Detectou-se que 64,4% (56/87) dos participantes possuem anticorpos IgG anti – *T. gondii*, destes 71,9% (23/32) pertencem ao grupo SIB, 65,2% (15/23) ao grupo IB, enquanto que no GC (18/32) esse percentual foi de 56,3%. Não houve diferença estatisticamente significativa de positividade da IgG Total entre nenhum dos grupos (**Figura 1**).



**Figura 1.** Determinação dos níveis de anticorpos IgG total nos respectivos grupos, resultados foram expressos por índice ELISA (IE), com mediana e interquartil. A linha pontilhada representa o valor do cut-off para IgG total (IE: 1,2), análise Kruskal-Wallis.

A **tabela 1** evidencia a positividade para IgG Total anti- *T. gondii* respectivamente nos grupos de estudo IB, SIB e GC e, a **tabela 2**, a descrição das doenças autoimunes nos grupos SIB e IB e detecção da IgG total anti- *T. gondii*.

**Tabela 1:** Positividade para anticorpos IgG total anti - *T. gondii* de pacientes com doenças autoimunes (IB, SIB) e (GC), sem doenças autoimunes.

	Positivos IgG Total n (%)	Negativos IgG Total n (%)	TOTAL
IB	15 (65,2)	8 (34,8)	23
SIB	23 (71,9)	9 (28,1)	32
GC	18 (56,3)	14 (43,8)	32
TOTAL	56 (64,4)	31 (35,6)	87

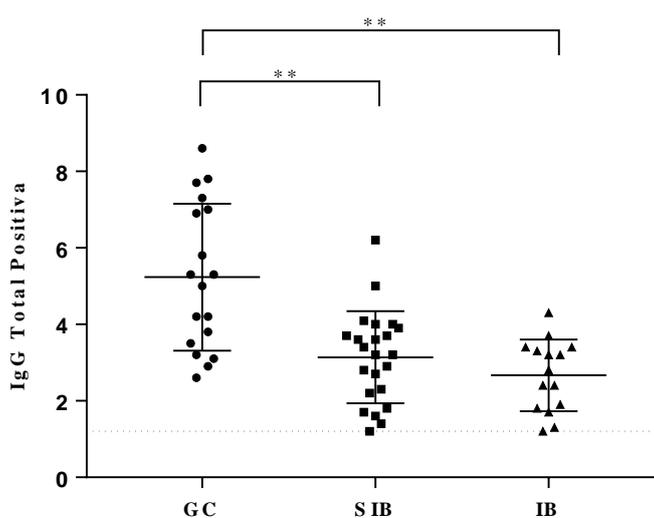
Dados apresentados em número (n) e porcentagem (%) das amostras analisadas.

**Tabela 2:** Descrição das doenças autoimunes nos grupos SIB e IB e detecção da IgG total anti- *T. gondii*

Doença	SIB (N=32) n (%)		IB (N=23) n (%)	
	IgG positiva	IgG negativa	IgG positiva	IgG negativa
Artrite Idiopática Juvenil	0 (0)	0 (0)	1(4,4)	0(0)
Artrite Psoriásica	0 (0)	0 (0)	1 (4,4)	1 (4,4)
Artrite Reumatoide	20 (62,5)	8 (25)	10 (43,4)	1 (4,4)
Espondilite Anquilosante	2 (6,3)	1 (3,1)	3 (13)	5 (21,7)
Espondiloartrite	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4,4)
Psoríase	1 (3,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	23	9	15	8

Dados apresentados em número (n) e porcentagem (%) das amostras analisadas

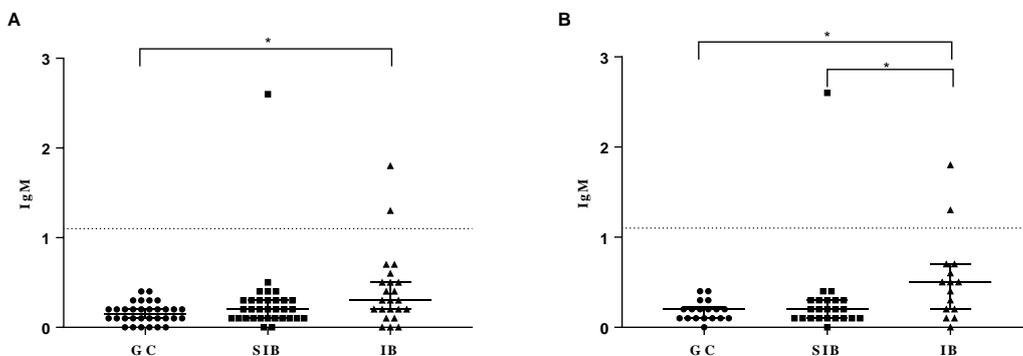
Quando foram analisados apenas os pacientes soropositivos para IgG total observou-se que os níveis desses anticorpos foram significativamente menores nos grupos IB e SIB quando comparados ao GC ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Determinação dos níveis de anticorpos IgG total dos pacientes positivos nos respectivos grupos, resultados foram expressos por índice ELISA (IE), com média e desvio padrão. A linha pontilhada representa o valor do cut-off para IgG total (IE: 1,2). \*\* Dados estatisticamente significantes,  $p < 0,0001$ , análise One-way ANOVA.

## 5.2 DETECÇÃO DA IgM ANTI-*TOXOPLASMA GONDII*

Avaliou-se também os níveis séricos de anticorpos IgM dos pacientes dos grupos SIB, IB e indivíduos do GC e a maioria dos pacientes foram negativos para Toxoplasmose aguda, excetuando-se dois pacientes do IB e um do SIB, que apresentaram IgM positivas. Contudo, observou-se que a concentração de IgM foi significativamente maior nos pacientes do grupo IB quando comparados com CG (**Figura 3A**). Quando analisados apenas os pacientes com Toxoplasmose latente, ou seja, IgG total positiva, verificou-se níveis estatisticamente maiores nas concentrações de IgM dos pacientes do grupo IB quando comparados aos pacientes do SIB e GC ( $p < 0,05$ ) (**Figura 3B**).

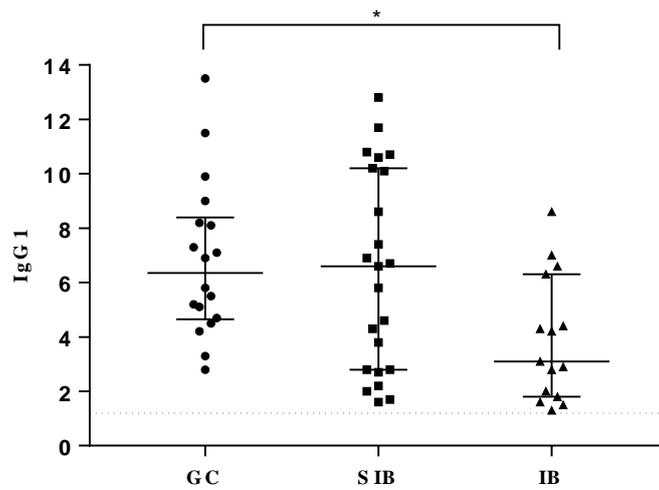


**Figura 3 A.** Determinação dos níveis de anticorpos IgM nos respectivos grupos. **B.** Níveis de IgM dos indivíduos positivos para IgG total anti- *T. gondii*. Os resultados foram expressos por índice ELISA (IE), com mediana e interquartis. A linha pontilhada representa o valor do cut-off para IgM (IE: 1,1). \* Dados estatisticamente significantes,  $p < 0,05$ , análise Kruskal-Wallis.

## 5.3 DETECÇÃO DAS SUBCLASSES IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ANTI-*TOXOPLASMA GONDII*

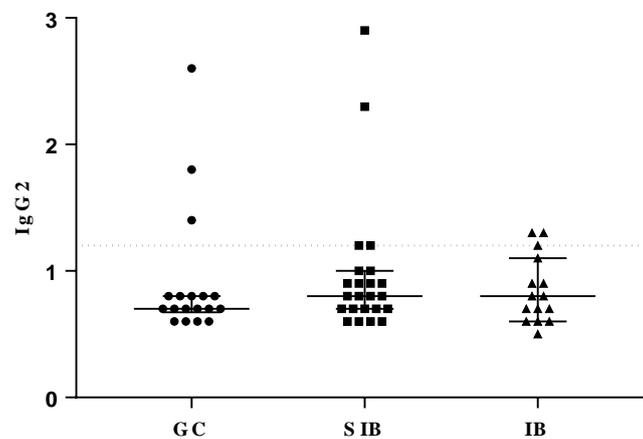
Foram detectadas as subclasses de IgG total (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) dos pacientes do grupo de estudo IB, SIB e GC.

Na análise da subclasse IgG1 observou-se níveis diminuídos no grupo IB quando comparados CG ( $p < 0,05$ ) (**Figura 4**).

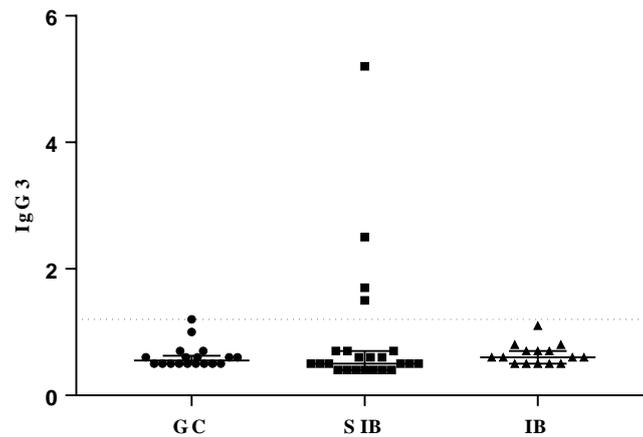


**Figura 4.** Determinação dos níveis da subclasse IgG1 nos respectivos grupos, resultados foram expressos por índice ELISA (IE), com mediana e interquartil. A linha pontilhada representa o valor do cut-off para IgG1 (IE: 1,2). \*Dados estatisticamente significantes,  $p < 0,05$ , análise Kruskal-Wallis.

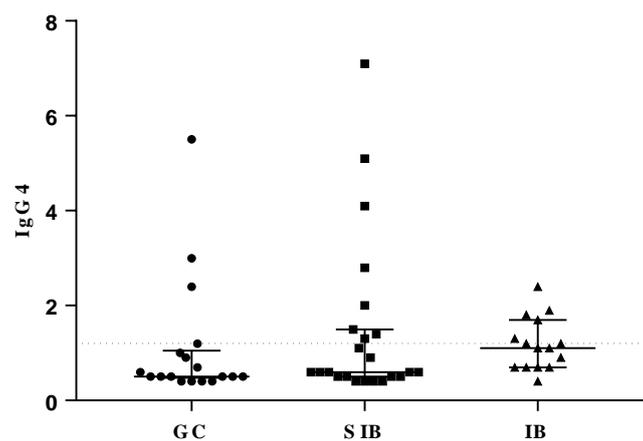
E quanto a detecção dos níveis séricos das subclasses IgG2, IgG3 e IgG4 não houve diferenças estatisticamente significativa quando comparados os grupos (**Figura 5**), (**Figura 6**) e (**Figura 7**), respectivamente.



**Figura 5.** Determinação dos níveis da subclasse IgG2 nos respectivos grupos, resultados foram expressos por índice ELISA (IE), com mediana e interquartil. A linha pontilhada representa o valor do cut-off para IgG2 (IE: 1,2), análise Kruskal-Wallis.



**Figura 6.** Determinação dos níveis da subclasse IgG3 nos respectivos grupos, resultados foram expressos por índice ELISA (IE), com mediana e interquartis. A linha pontilhada representa o valor do cut-off para IgG3(IE: 1,2), análise Kruskal-Wallis.



**Figura 7.** Determinação dos níveis da subclasse IgG4 nos respectivos grupos, resultados foram expressos por índice ELISA (IE), com mediana e interquartis. A linha pontilhada representa o valor do cut-off para IgG4 (IE: 1,2), análise Kruskal-Wallis.

#### 5.4 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE ISÓTIPOS EM PACIENTES SOROPOSITIVOS PARA ANTICORPOS IgG ANTI- *T. GONDII*

Após a análise das subclasses, foi realizado uma avaliação da frequência dos isótipos, e observou-se que a subclasse IgG1 foi a mais predominante dentre os indivíduos estudados. A (tabela 3) evidencia a frequência das subclasses em pacientes com IgG Total positivos para toxoplasmose.

**Tabela 3:** Frequência de Isótipos de imunoglobulinas em pacientes positivos para Toxoplasmose. Dados apresentados em número (n) e porcentagem das amostras analisadas

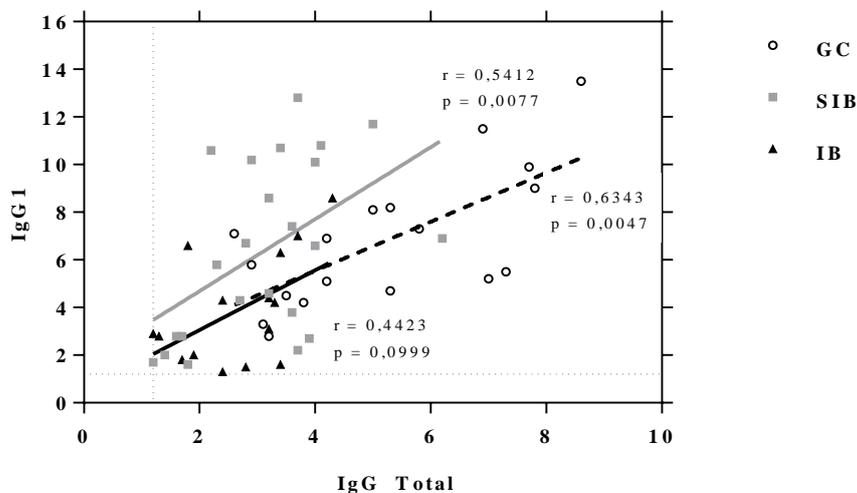
Subclasses	GC (N = 32)	SIB (N = 32)	IB (N =23)
	N (%)	N (%)	N (%)
<b>IgG total</b>	18 (56,3)	23 (71,9)	15 (65,2)
<b>IgG 1</b>	18 (100) *	23 (100) *	15 (100) *
<b>IgG 2</b>	3 (16,7) *	2 (8,7) *	3 (20) *
<b>IgG 3</b>	1 (5,6) *	4 (17,4) *	0 (0) *
<b>IgG 4</b>	4 (22,2) *	8 (34,8) *	7 (46,7) *
<b>IgM</b>	0 (0)	1 (3,1)	2 (8,7)

\* Frequência calculada com base em IgG+.

### 5.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICO DE IgG TOTAL E IgG1

Após observar uma maior frequência da subclasse IgG1 nos indivíduos positivos para IgG total, foi realizado uma análise dos IE de IgG total dos grupos SIB, IB, GC e correlacionou-se com os IE da subclasse IgG1 dos seus respectivos grupos, onde foi possível verificar uma correlação positiva, sugerindo uma moderada associação entre a positividade para IgG Total e positividade para IgG1.

Os grupos GC e SIB apresentaram uma correlação estatisticamente positiva ( $p = 0,0047$ ;  $r = 0,6343$  e  $p = 0,0077$ ;  $r = 0,5412$ , respectivamente), enquanto o grupo IB não houve correlação significativa ( $p = 0,0999$ ;  $r = 0,4423$ ), demonstrando a menor correlação positiva entre IgG total e IgG1 (**Figura 8**).

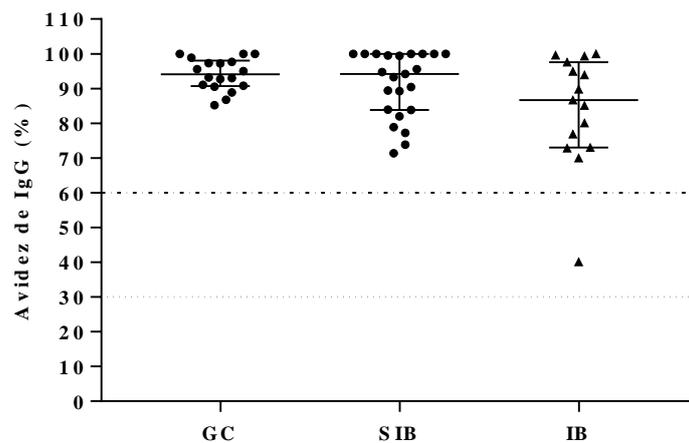


**Figura 8.** Correlação entre níveis séricos de anticorpos IgG total e a subclasse IgG1 nos respectivos grupos. Coeficientes de correlação foram calculados pelo teste de correlação de Spearman, onde p expressa significância e r o coeficiente de correlação.

## 5.6 AVIDEZ PARA IgG TOTAL E IgG1

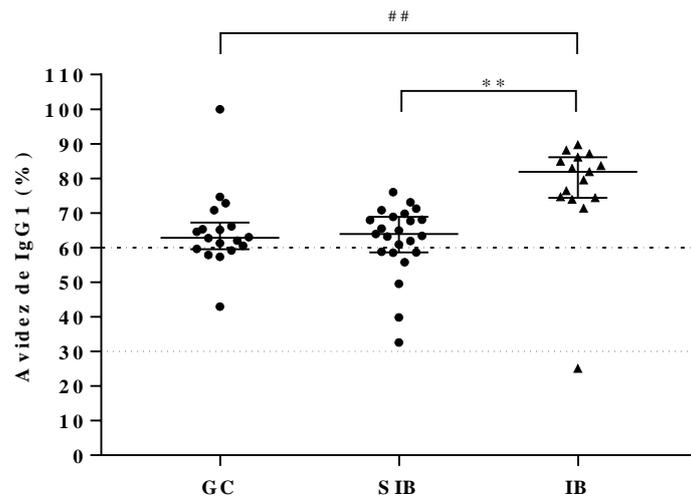
Realizou-se ELISA-Avidez para confirmação de cronicidade dos pacientes positivos para IgG total, tendo em vista a positividade de IgM em três pacientes; logo como a IgG1 apresentou uma maior frequência em todos os grupos, realizou-se também o teste de avides para esta subclasse.

A maior parte dos pacientes de ambos grupos apresentaram IgG total de alta avides, ou seja, encontram-se na fase crônica da infecção ou latência, excetuando-se apenas um paciente do grupo IB que foi positivo para IgM e apresentou IA: 40% para IgG total, uma avides moderada que não permite identificar o período da infecção. Nesse caso há necessidade de monitoramento, pois o paciente faz uso de imunomodulador biológico e essa IgM positiva detectada pode ser residual e estar encaminhando para a cronicidade ou pode ser oriunda de infecção recente ou reativação. Não houve diferença significativa de avides quando comparados os grupos IB, SIB e GC (**Figura 9**).



**Figura 9.** ELISA-Avides para IgG total nos respectivos grupos; os resultados foram expressos por índice Avides (IA), com mediana e interquartil. As linhas pontilhadas representam, baixa avides de 0-30%, período indeterminado 31-59% e alta avides de 60-100%, análise Kruskal-Wallis.

Na análise da avides de IgG1 verificou-se que os pacientes pertencentes ao IB apresentaram avides significativamente mais alta quando comparados com os pacientes do grupo SIB e GC (**Figura 10**).



**Figura 10.** ELISA-Avidiz de IgG1 nos respectivos grupos, os resultados foram expressos por índice Avidiz (IE), com mediana e interquartis. As linhas pontilhadas representam baixa avidiz, 0-30%, período indeterminado 31-59% e alta avidiz de 60-100%. Dados estatisticamente significantes ##  $p = 0,0004$ ; \*\*  $p = 0,0001$ , análise Kruskal-Wallis.

## 6 DISCUSSÃO

As drogas biológicas especificamente bloqueadores TNF- $\alpha$  têm sido amplamente utilizadas para o controle dos processos patológicos autoimunes (LIMA, et al., 2015). Essa terapia pode colaborar com a reativação de algumas doenças latentes como a tuberculose (YASUI, 2014). A avaliação do impacto dessas drogas em outras doenças como a toxoplasmose latente não tem sido devidamente considerada. A reativação da toxoplasmose foi observada em outras condições de imunossupressão, como na infecção pelo HIV (ESPINOZA-OLIVA, et al., 2014) e no tratamento com imunossupressores nos transplantes de órgãos humanos (SHARMA, et al., 2016).

O presente estudo avaliou os níveis séricos de positividade de IgG total, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM anti- *T. gondii* assim como a avidéz, em indivíduos controles e com doenças autoimunes em tratamento ou não com inibidores do TNF- $\alpha$ .

A análise dos níveis de IgG total no soro dos participantes deste estudo 64,4%, indica a toxoplasmose latente e foi condizente com os achados na população brasileira que apresentam de 40 a 80% de IgG total positivas específicas para toxoplasmose (KAWARABAYASHI, et al., 2007; WALCHER, et al., 2017), porém não houve diferença significativa de positividade para IgG Total anti- *T. gondii* entre os pacientes dos grupos de estudo SIB, IB e indivíduos do GC. Tais achados foram semelhantes ao do estudo realizado por SERT e colaboradores (2007) em pacientes com artrite reumatoide (AR) no Sul da Turquia, que também não observaram diferenças significativas na positividade de IgG anti- *T. gondii* quando comparados aos indivíduos do grupo controle.

Em contrapartida EL-HENAWY e colaboradores (2017) evidenciaram uma maior positividade de IgG específica para o *T. gondii* em pacientes com AR em relação aos indivíduos do grupo controle, porém neste mesmo estudo não verificaram diferença estatisticamente significativa da positividade IgG anti- *T. gondii* nos pacientes com AR submetidos a tratamentos distintos. A variação de positividade de IgG anti – *T. gondii* encontrada pode ter sido oriunda de alguns fatores como aspectos culturais, hábitos alimentares, condições ambientais (DAMAS, et al., 2016).

Considerando o grupo soropositivo IgG anti- *T. gondii*, observou-se, menores concentrações séricas desses anticorpos nos pacientes tratados SIB e IB em relação aos indivíduos do CG. Esses resultados podem estar associados a doença de base ou terapêutica imunossupressora administrada. O metotrexato isoladamente já se mostrou capaz de modular a produção de citocinas como a IL-4 e IFN- $\gamma$  (GERARDS, et al., 2003). Ainda, o bloqueio in

vitro do TNF- $\alpha$  com o infliximabe promove uma modulação negativa de citocinas importantes como o IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17 (SILVA, et al., 2018). Assim esses tratamentos poderiam interferir na estimulação, proliferação e diferenciação de células B de memória (HOFFMAN et al., 2016).

Os níveis séricos de anticorpos IgM anti- *Toxoplasma gondii* foram negativos em 84 pacientes e positivos em 1 paciente do SIB e 2 do IB. Como os três pacientes positivos para IgM anti- *T. gondii* apresentavam IgG total positiva, foi realizado o teste de avidéz, para melhor compreensão e interpretação dos dados encontrados. Um paciente do grupo SIB e o outro do IB teve como resultado um IA= 99,5%, e 94,9% respectivamente, sugerindo fase crônica da doença, e a IgM residual (RIBEIRO et al., 2008). Já o outro paciente pertencente ao IB apresentou, um IA= 40,1%, avidéz moderada, podendo a IgM ser sugestiva de uma infecção recente, ou de reativação. A análise da IgM foi por meio da técnica de ELISA por captura para evitar interferências de possíveis ligações inespecíficas.

Os níveis de IgM embora sendo em sua maioria negativos para *T. gondii* apresentaram concentrações significativamente maior nos pacientes do grupo IB quando comparados com CG, além disso ao analisar-se apenas os pacientes com Toxoplasmose latente, ou seja, IgG total positiva, observou-se que os pacientes do grupo IB apresentaram níveis de IgM maiores quando comparados aos pacientes do grupo SIB e indivíduos do controle ( $p < 0,05$ ). Essas concentrações séricas de IgM maiores nos pacientes do grupo IB poderia estar associada a terapêutica bloqueadora do TNF- $\alpha$ , que ao reduzir níveis de citocinas como o IFN- $\gamma$  e a IL-17 (SILVA et al., 2018), poderiam modular a resposta imune a ponto de permitir o crescimento do parasita, levando a uma ativação de linfócitos B naive, sem contudo permitir a reativação da infecção. Sabe-se que o IFN- $\gamma$  juntamente com o TNF- $\alpha$  são moléculas importantes na contenção parasitária, prevenindo a ruptura de cistos durante a infecção latente (SUZUKI et al., 1988; YAP et al., 1998).

Estudos realizados em camundongos mostram que a neutralização do TNF- $\alpha$  proporcionam o aumento da carga parasitária (JOHNSON, 1992) e imunomoduladores biológicos como o etanercepte podem levar a reativação da toxoplasmose latente em camundongos devido ao bloqueio da via do TNF- $\alpha$  (EL-SAYED et al., 2016).

Os estudos citados acima colocam em evidência a possibilidade de associação do imunomodulador biológico com a antigenemia, visto que o uso de tal terapêutica altera os níveis de IFN- $\gamma$  e bloqueia o TNF- $\alpha$ , moléculas importantes no controle parasitário (EL-SAYED, et al., 2016; SILVA, et al., 2018).

Quando analisadas as subclasses de IgG total (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) dos pacientes do grupo de estudo SIB, IB e indivíduos do grupo controle foi possível evidenciar que a IgG1 foi a subclasse predominante em todos os grupos, tais dados vão de encontro com a literatura que mostra que o subtipo IgG1 é encontrado com maior frequência na resposta contra o *T. gondii* (HUSKINSON et al., 1989).

Os níveis séricos da IgG1 anti- *T. gondii* foram estatisticamente menores nos pacientes do grupo IB quando comparados aos indivíduos do controle. E os mesmos pacientes tratados com os agentes bloqueadores de TNF- $\alpha$  apresentaram uma menor correlação positiva de IgG1 com IgG total anti- *T. gondii* em relação aos outros grupos SIB e GC.

De modo interessante observou-se que, mesmo os pacientes do grupo IB apresentando índices ELISA IgG1 significativamente menores que o grupo controle, sua avidéz estava significativamente maior que os demais grupos, sugerindo que a inibição do TNF- $\alpha$  afeta predominantemente a produção de IgG1 de baixa avidéz. Esses resultados fortalecem a associação da medicação imunomoduladora biológica (inibidores de TNF- $\alpha$ ) e sintética interferindo na resposta humoral, tanto nas concentrações de IgG total anti- *T. gondii* como no subtipo IgG1 anti- *T. gondii*, visto que os indivíduos não tratados (GC), apresentaram concentrações maiores de IgG total e do isótipo IgG1 anti- *T. gondii*.

Para os demais isótipos de imunoglobulina IgG não foi observado uma participação significativa na resposta imune *Toxoplasma gondii* assim como não foi observado diferenças significativas entre os grupos.

## 7 CONCLUSÃO

Esses dados sugerem que a terapia com bloqueadores de TNF- $\alpha$  interfere na resposta imune humoral específica para o *Toxoplasma gondii* afetando diretamente o isótipo IgG1, o predominante nessa resposta, sendo importante ressaltar a necessidade de um melhor monitoramento desses indivíduos no manejo clínico. Contudo, estudos posteriores serão necessários para elucidar o quanto esta modulação pode levar ao risco de reativação da infecção.

**REFERÊNCIAS:**

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular & Molecular**. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier, 6ª ed., 350-352, 2008.

ALIBERTI, J. Host persistence: Exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, 5(2):162-170, 2005.

BEGHETTO, E.; BUFFOLANO, W.; SPADONI, A.; DEL PEZZO M.; DI CRISTINA M. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(12): 5414–8, 2003.

BERAN, O.; KODYM, P.; MALY, M.; DAVIDOVA, A.; REINVARTOVA, G.; JILICH, D.; MICHAL HOLUB, M.; ROZSYPAL, H. 2015. The Effect of Latent *Toxoplasma gondii* Infection on the Immune Response in HIV-Infected Patients. **BioMed Research International**, (2015):1-7, 2015.

BERTOZZI, L.C.; SUZUKI, L. A.; ROSSI, C.L.. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 41 (3): 175-177, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 7 (72): 248-54, 1976.

CANDOLFI, E.R.; PASTOR, R.; HUBER, D.; FILISETTI, O.; VILLARD. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 58 (1): 83-88, 2007.

CHAUDHRY, S.A.; GAD, N.; KOREN G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Journal List Canadian Family Physician**, 60 (4): 334-336, 2014.

CREN, J.B.; BOUVARD, B.; CROCHETTE, N. Cerebral toxoplasmosis and anti-TNF $\alpha$ : a case report. **IDCases** (5) 40–42, 2016.

DAMAS, M.S.; MARTINEC, N.L.; FLEGR, J. Do differences in *Toxoplasma* prevalence influence global variation in secondary sex ratio? Preliminary ecological regression study. **Parasitology**, 143(9):1193-203, 2016.

DATTOLI, V. C. C.; VEIGA, R.V.; CUNHA, S.S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. et al. Oocyst ingestion as an important transmission route of *toxoplasma gondii* in brazilian urban children. **Journal Parasitology**, 97(6): 1080–1084, 2011.

DEL BONO, V.; CANESSA, A.; BRUZZI, P.; FIORELLI, M.A.; TERRAGNA, A. Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. **Journal of Clinical Microbiology**, 27(9): 2133-5, 1989.

DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma*. **International Journal Parasitology**, 28 (7):1019–1024, 1998.

DUBEY, J.P. The History of *Toxoplasma gondii* - The First 100 Years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 55(6): 467 – 475, 2008.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, 126 (1-2): 57–72, 2004.

DUBEY, J.P., BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of Animals and Man. **CRC Press**, Boca Raton, 220, 1988.

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 Reviews**, 11(2): 267 – 299, 1998.

DUBEY, J.P.; MILLER, N.L.; FRENKEL, J.K. The *Toxoplasma gondii* Oocyst From Cat Feces. **Journal of Experimental Medicine**, 132(4): 636 – 662, 1970.

EL-HENAWY, A.A.; HAFEZ, E.A.R.; NABIH, N.; SHALABY, N.M.; MASHALY, M. Anti-Toxoplasma antibodies in Egyptian rheumatoid arthritis patients. **Rheumatology International**, 37:785–90, 2017.

EL-SAYED, N.M.; ISMAIL, K.A.; BADAWY, A.F.; ELHASANEIN, K.F. In vivo effect of anti-TNF agent (etanercept) in reactivation of latent toxoplasmosis. **Journal of Parasitic disease**, 40(4):1459-65, 2016.

ESPINOZA-OLIVA, M.; AVILA, E.S.; ARTEGA, M.B.; OROZCO, L.V.S.; RAMIREZ, M.L.G. Case Report: Cerebral Toxoplasmosis Infection by Reactivation of *T. gondii* in Pediatric Patients with HIV. **Journal Neuroinfectious Diseases**, 2014.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.A. et al. Acute toxoplasmosis: study of the frequency, vertical transmission rate and the relationship between maternal-fetal diagnostic tests during pregnancy in a Central-Western state of Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia**, 27(8): 442-9, 2005.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, 40 (1): 71-80, 2004.

GAZZINELLI, R.T.; ELTOUM, I.; WYNN T.A.; SHER A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **Journal of Immunology**, 151(7):3672, 1993.

GAZZINELLI, R.T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E.Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, 153(6):2533–2543, 1994.

GERARDS, A.H.; LATHOUDER, S.; GROOT, E.R.; DIJKMANS, B.A.; AARDEN, L.A. Inhibition of cytokine production by methotrexate. **Rheumatology**, 42 (10) 1189–1196, 2003.

GORGIEVSKI-HRISOHO, M.; GERMANN, D.; MATTER, L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, 34(6): 1506-1511, 1996.

GUMPEL, J.M. Cyclophosphamide, gold and penicillamine disease-modifying drugs in rheumatoid arthritis—tailored dosage and ultimate success. **Rheumatology Rehabilitation**, 15(3):217–220, 1976.

HEDMAN, K.; LAPPALAINEN, M.; SODERLUND, M.; HEDMAN, L. - Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Microbiology**, 4:123-129, 1993.

HOFFMAN, W.; LAKKIS, F.G.; CHALASANI, G. B Cells, Antibodies, and More. clinical **Journal of the American Society of Nephrology**, v.11(1) 137-54, 2016.

HUSKINSON, J.; STEPICK-BIEK, P.N.; ARAUJO, F.G.; THULLIEZ, P.; SUZUKI, Y.; REMINGTON J.S. *Toxoplasma* Antigens Recognized by Immunoglobulin G Subclasses during Acute and Chronic Infection. **Journal of clinical microbiology**, 27(9): 2031-2038, 1989.

JANEWAY, C.A. JR; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review Immunology**, 20:197–216, 2002.

JANKŮ, J. Pathogens a pathologica anatomie T. Zv. Vrozaného kolobou z lute skurney oku normal ne velikem a mikrophtalmickem s nalezem parisitu v sitnici. **Cesk Parasitology**, 62: 1021-1027, 1923.

JOHNSON, L. A Protective Role for Endogenous Tumor Necrosis Factor in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, 60 (5): 1979-1983; 1992.

KAWARABAYASHI, M.; AURELIANO, D. P ; RAYMUNDO, M.L; GARCIA, R.A., et al. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres, atendidas nas unidades da rede de saúde pública da região metropolitana de São Paulo (2001-2005). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 66(1): 63-67, 2007.

LIMA, R.T.Q.; BEZERRA, M.C.; RIBEIRO, A.T.M.; MEDEIROS, M.M.M.C. Perfil do uso de agentes biológicos no tratamento da artrite reumatoide: Experiência do Hospital Universitário Walter Cantídio. **Revista de Medicina da UFC**, 55 (2): 15-22, 2015.

LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; DUBEY, J.P. Feline toxoplasmosis and importance of the *Toxoplasma gondii* oocysts. **Parasitology**, 19, 448–46, 1997.

LUFT, B.J.; NAOT, Y.; ARAUJO, F.G.; et al. Primary and reactivated *Toxoplasma* infection in patients with cardiac transplants: clinical spectrum and problems in diagnosis in a defined population. **Annals of Internal Medicine**, 99:27-31, 1983.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; ALMEIDA, G. Research on IgM anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by using a reverse immunoenzymatic technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, 28 (1): 6-11, 1986.

MONTOYA, J.G. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, Vol. 185, S73–S82, 2002.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. 2004. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363 2004.

MOTA, L.M.H.; CRUZ, B.A.; BRENOL, C.V.; POLLAK, D.F.; et al. Segurança do uso de terapias biológicas para o tratamento de artrite reumatoide e espondiloartrites. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 3, p.281–309, 2015.

NAOT, Y.; BARNETT, E.V.; REMINGTON, J.S. Method for avoiding false-positive results occurring in immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays due to presence of both rheumatoid factor and antinuclear antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, 14: 73–8, 1981.

NICOLLE, C., MANCEAUX, L. “Sur un protozoaire nouveau du *gondii: toxoplasma*”. **Seances Academy Scientific**, 148: 369–372, 1909.

OSTENSEN, M. Treatment with immunosuppressive and disease modifying drugs during pregnancy and lactation. **American Journal of Reproductive Immunology**, 28(3-4):148-52, 1992.

REMINGTON, J.S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J.G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(3):941–5, 2004.

RIBEIRO, D.P.; FREITAS, M.M.P.; CARDOSO, M.R.D.; PAJUABA, A.C.A.M.; SILVA, N.M.; MINEO, T.W.P.; SILVA, J.S.; MINEO, J.R.; SILVA, D.A.O. CpGODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. **Vaccine**, 27 (19):2570-2579, 2009.

RIBEIRO, A.C.; MUTIS, M.S.; FERNANDES, O. Association of the presence of residual anti *Toxoplasma gondii* IgM in pregnant women and their respective family groups in Miracema, Northwest Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 103 (6): 591-4, 2008.

ROBBEN, P.M.; MORDUE, D.G.; TRUSCOTT, S.M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. et al. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **Journal of Immunology**, 172:3686–3694, 2004.

SAYLES, P.C.; GIBSON, G.W.; JOHNSON, L.L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, 68(3):1026-33, 2000.

SCANGA, C.A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D. et al. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **Journal of Immunology**, 168:5997, 2002.

SCHARTON-KERSTEN, T.M.; YAP, G.; MAGRAM, J.; SHER, A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, 185:1261–1273, 1997.

SCOTT, P.; PERACE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. **Journal of Immunology**, Baltimore, 139 (1): 221-227, 1987.

SERT, M.; OZBEK, S.; PAYDAS, S.; YAMAN, A. Is there any relationship between *Toxoplasma* infection and reactive arthritis? **Postgraduate Medical Journal**, 53:14–16, 2007.

SHARMA, R.; SHAH, N.; CLAUS, J.; PATEL, S.; ZACHARIAH, M. *Toxoplasma* chorioretinitis following renal transplantation. **kidney international**, 89: 724, 2016.

SHULMAN, I.A. Parasitic infections and their impact on blood donor selection and testing. **Archives Pathology Laboratory Medicine**, 118:366–70, 1994.

SILVA, D.A.A.; SILVA, M.V.; BARROS, C.C.O.; ALEXANDRE, P.B.D.; TIMÓTEO, R.P.; CATARINO, J.S.; SALES-CAMPOS, H.; MACHADO, J.R.; RODRIGUES, D.B.R.; OLIVEIRA, C.J.; RODRIGUES, V. TNF- $\alpha$  blockade impairs in vitro tuberculous granuloma formation and down modulate Th1, Th17 and Treg cytokines. **Plos One** 13(3): 1-13, 2018.

SINGH, J.A.; FURST, D.E.; BHARAT, A.; CURTIS, J.R.; et al. Update of the 2008 American College of Rheumatology (ACR) Recommendations for the use of Disease-Modifying AntiRheumatic Drugs and Biologics in the treatment of Rheumatoid Arthritis (RA). **Arthritis Care Research (Hoboken)**, 64(5): 625–39, 2012.

SKARIAH, S.; MATTHEW KARMEN MCINTYRE; DANA G. MORDUE. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion, **Parasitology Research**, 107 (2): 253–260, 2010.

SMITH, D.A.; GERMOLEC, D.R. Introduction to immunology and autoimmunity. **Environ Health Perspect.** 107(5): 661–665, 1999.

SPLENDRE, A. — Sur un nouveau protozoaire parasite du lapin. **Bull. Soc. Path. Exot.** 2:462-464, 1909.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M.A.; SCHREIBER, R.D.; REMINGTON, J.S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, 240:516–518, 1988.

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

VILLARD, O.; CIMON, B.; L'OLLIVIER, C.; FRICKER-HIDALGO, H.; GODINEAU, N.; HOUZE, S.; PARIS, L.; PELLOUX, H.; VILLENA, I.; CANDOLFI E. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, 84: 22-23, 2016.

WALCHER, D.L. et al. Toxoplasmose gestacional: uma revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas – RBAC**, 49 (4): 323-327, 2017.

WIELAARD, I.F.; GRUIJTHUIJSEN, H.V.; DUERMAYER, W. et al. Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, 17:981-987, 1983.

YAP, G.S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHAREST, H.; SHER, A. Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. **Journal of immunology**, 160 (3):1340–1345, 1998.

YAROVINSKY, F. Toll-Like Receptors and Their Role in Host Resistance to *Toxoplasma gondii*, **Immunology Letters**, 119, (1-2): 17-21, 2008.

YAROVINSKY, F.; ZHANG, D.; ANDERSEN, J.F. et al., TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**, 308:1626, 2005.

YASUI, K. Immunity against Mycobacterium tuberculosis and the risk of biologic anti-TNF-alpha reagents. **Pediatric Rheumatology Online Journal**, 12: 45, 2014.

YOUNG, J.D.; MCGWIRE, B.S. Infliximab and reactivation of cerebral toxoplasmosis. **New England Journal of Medicine**, 353(14):1530-1, 2005.

## APÊNDICE

### Apêndice I: Questionário para levantamentos de dados.

**Projeto: Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados**

Paciente Nº: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Registro Geral (Hospital): \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

Telefones: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

Raça/Cor: ( ) Branco ( ) Negro ( ) Amarelo ( ) Parda ( ) Indígena ( ) Ignorado

Estado Civil: ( ) Solteiro(a) ( ) Casado(a) ( ) Amasiado(a) ( ) Divorciado(a) ( ) Viúvo(a)

Escolaridade: ( ) FI ( ) FC ( ) EMI ( ) EMC ( ) SI ( ) SC

Renda familiar: ( ) Até 2 salários ( ) De 2 a 5 salários ( ) De 5 a 10 salários ( ) Mais de 10 salários

Uso de drogas ilícitas: ( ) não ( ) sim. Qual? \_\_\_\_\_

Tabagismo: ( ) não ( ) sim. Quantidade diária? \_\_\_\_\_

Alcoolismo ( ) não ( ) sim. Quantidade diária? \_\_\_\_\_

Uso de medicamentos: ( ) não ( ) sim. Quais? \_\_\_\_\_

Conhece a Toxoplasmose: ( ) não ( ) Já ouviu falar ( ) Sabe algo a respeito ( ) sim

Possui saneamento básico na residência? ( ) coleta de lixo ( ) esgoto ( ) água

Possui gatos? ( ) não ( ) sim. Costuma deixá-los “passear” na rua? ( ) não ( ) sim. Onde esses animais depositam seu dejetos? ( ) caixa de areia ( ) quintal ou jardim da casa

Possui hábitos de jardinagem? ( ) não ( ) sim. Usa luvas? ( ) não ( ) sim

---

Tem o hábito de lavar frutas, verduras e legumes antes do consumo? ( ) não ( ) às vezes esquece  
( ) lava em água corrente ( ) deixa algum tempo no vinagre ( ) deixa algum tempo no hipoclorito

---

Tem o hábito de consumir carnes cruas ou mal passadas? ( ) não ( ) sim

---

### **Informações do Prontuário**

Portador de qual doença autoimune? \_\_\_\_\_

---

Em uso de medicação para controle? ( ) não ( ) sim. Qual? \_\_\_\_\_

---

Início do tratamento? \_\_\_\_\_

Tempo de tratamento? \_\_\_\_\_

Uso de pomadas? ( ) não ( ) sim. Qual? \_\_\_\_\_

---

Uso de imunobiológico? ( ) não ( ) sim. Qual? \_\_\_\_\_

Início do tratamento com imunobiológico? \_\_\_\_\_

Tempo de tratamento com imunobiológico? \_\_\_\_\_

---

Comorbidades associadas: \_\_\_\_\_

---

**Observações gerais:** \_\_\_\_\_

---

### **Sorologia para *T. gondii*:**

IgM \_\_\_\_\_ IgG \_\_\_\_\_

---

**GRUPO DE ESTUDO:** \_\_\_\_\_

## ANEXO

**Anexo I** – Termo de consentimento livre e esclarecido para os pacientes com doenças autoimunes.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto:

**Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados**

### TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo “Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados”, por ser paciente do Ambulatório de Reumatologia. O objetivo desse trabalho é analisar a resposta do seu sistema imunológico, frente à toxoplasmose, antes e depois do seu tratamento com imunobiológicos. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida, apenas iremos coletar seu sangue e alguns dados.

Pacientes que fazem uso de medicamentos para tratamento de doença autoimune devem sempre ser acompanhados para que não corram o risco de contrair doenças oportunistas ou reativar doenças que estão latentes. Por isso, espera-se que o benefício decorrente da sua participação nesta pesquisa seja a descoberta de informações importantes para tomar os devidos cuidados com relação à necessidade de adequação a um tratamento.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO

Título do Projeto:

**Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados**

Eu, \_\_\_\_\_, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo. Receberei uma via deste Termo.

Uberaba, ...../ ...../.....

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

\_\_\_\_\_  
Documento de Identidade

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável orientador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

**Telefone de contato dos pesquisadores: (34) 3318-5289**

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelo telefone 3700-6776.

**Anexo II** – Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos controles.

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE APÓS ESCLARECIMENTO**

Título do Projeto:

**Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados**

### **TERMO DE ESCLARECIMENTO**

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo “Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados”. O objetivo desse trabalho é analisar a resposta do sistema imunológico, frente à toxoplasmose, antes e depois do tratamento com imunobiológicos. Pacientes que fazem uso de medicamentos para tratamento de doença autoimune podem ficar com a imunidade baixa e, por essa razão, devem sempre ser acompanhados para que não corram o risco de contrair doenças oportunistas ou reativar doenças que estão latentes. Para que possam ser avaliados quanto à sua capacidade de responder contra essas doenças, é necessário que sejam comparados com indivíduos saudáveis, ou seja, que não possuem doenças autoimunes ou qualquer outra doença que possa prejudicar o sistema imune e nem fazem uso de qualquer medicação que abaixe a imunidade, por isso você foi convidado (a) a participar desse estudo. Espera-se que o benefício decorrente da sua participação nesta pesquisa seja a descoberta de informações importantes para tomar os devidos cuidados com relação à necessidade de adequação a um tratamento para pacientes com doenças autoimunes. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida, apenas iremos coletar seu sangue e alguns dados. Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE APÓS ESCLARECIMENTO

Título do Projeto:

**Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados**

Eu, \_\_\_\_\_,  
li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo. Receberei uma via deste Termo.

Uberaba, ...../ ...../.....

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

\_\_\_\_\_  
Documento de Identidade

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável orientado

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

### **Telefone de contato dos pesquisadores**

Pesquisadoras:

Aline Caroline de Lima Marques

Ana Carolina de Morais Oliveira

Cristhianne Molinero Andrade Ratkevicius

(34) 3318-5299

Pesquisador orientador:

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

(34) 33185289

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelo telefone 3700-6776.



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados

**Pesquisador:** Virmondes Rodrigues Junior

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 59831016.2.0000.5154

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.870.741

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_754500.pdf	08/12/2016 11:02:56		Aceito
Outros	Diretoria_de_Pesquisa.pdf	08/12/2016 11:01:33	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
Outros	Autorizacao_MPHU_UNIUBE.pdf	17/11/2016 10:01:46	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
Outros	Autorizacao_Obstetricia_UFTM.pdf	17/11/2016 10:01:17	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
Outros	Autorizacao_Reumatologia_UFTM.pdf	17/11/2016 09:52:05	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcordaoumbilical.doc	11/11/2016 16:55:43	Ana Carolina de Morais Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoFinalPlataformaBrasil.doc	11/11/2016 16:31:36	Ana Carolina de Morais Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEgestantes.doc	08/11/2016 15:46:07	CRISTHIANNE MOLINERO ANDRADE RATKEVICIUS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	09/09/2016 12:05:07	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
Outros	ApendiceIQuestionarioImunobiologicos.doc	03/08/2016 09:37:04	Ana Carolina de Morais Oliveira	Aceito
Outros	ApendiceIQuestionarioGestantes.doc	03/08/2016 09:36:43	Ana Carolina de Morais Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEimunobiologicos.doc	03/08/2016 09:36:16	Ana Carolina de Morais Oliveira	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado