



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia

Ana Carolina de Moraes Oliveira

**Associação do diabetes *mellitus* gestacional e modulação da resposta imune
humoral e celular específica a *Toxoplasma gondii***

Uberaba – MG

2020

Ana Carolina de Moraes Oliveira

Associação do diabetes *mellitus* gestacional e modulação da resposta imune humoral e celular específica a *Toxoplasma gondii*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração Parasitologia e Imunologia aplicadas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

Uberaba – MG

2020

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

O45a Oliveira, Ana Carolina de Moraes
Associação do diabetes *mellitus* gestacional e modulação da resposta
imune humoral e celular específica a *Toxoplasma gondii* / Ana Carolina de
Moraes Oliveira. -- 2020.
117 f. : il., fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Infectologia) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2020
Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Diabetes gestacional. 3. Imunidade humoral. 4.
Imunidade celular. I. Rodrigues Júnior, Virmondes. II. Universidade Federal
do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 563.1

Dedico este trabalho à minha amada mãe Angela (in memoriam), que foi e sempre será minha inspiração e fortaleza, meu exemplo de mulher, de estudante e de profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, por terem me sustentado na fé, principalmente nos últimos dois anos, me concedendo sabedoria, dedicação e perseverança para concluir essa etapa tão desafiadora e enriquecedora da minha vida profissional.

Aos meus pais Airton e Angela (in memoriam), e a meu irmão Augusto, por serem meu alicerce, que com amor incondicional sempre foram os meus principais incentivadores, e meu maior motivo para lutar e conquistar sonhos.

Ao Arthur, por ser companheiro e compartilhar comigo todos os sonhos, me apoiando e incentivando com muito amor, carinho e respeito.

À Vanessa e ao Fernando, que me acolheram em Uberaba como filha, por todo apoio e orações.

Ao Prof. Dr. Virmondês Rodrigues Júnior, pela confiança depositada em mim e em minhas ideias, por me acolher no Laboratório de Imunologia e me orientar a fazer ciência, pelos ensinamentos que vou carregar para sempre na minha carreira profissional.

Ao Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva, pelo conhecimento transmitido, pela disposição e pelo tempo despendido para me ajudar.

À Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes, que me auxiliou com o seu conhecimento e amizade durante todos esses anos.

À Dra. Marina Carvalho Paschoini, pela disponibilidade em sempre ajudar e por abrir as portas do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do HC-UFIM para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, pelo incentivo na vida acadêmica, e por ceder a cepa do parasito para a realização deste trabalho.

À Dra. Fernanda Bernadelli, que carinhosamente contribuiu para que as citometrias fossem realizadas com sucesso.

À Dra. Caroline Martins Mota, pela amizade e toda colaboração científica desde a época da graduação.

À Paula Tatiana Mutão Ferreira e à Renata de Souza Resende, por me ajudarem diretamente e intensamente em todas as etapas do trabalho, e que se tornaram amigas valiosas.

A todos os colegas do Laboratório de Imunologia e de toda pós-graduação, pela amizade, pela convivência e aprendizados diários, por todos os momentos e lanches partilhados e pelas boas risadas.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia e Parasitologia, que auxiliaram para a viabilização deste trabalho.

Aos funcionários de vários setores da UFTM, Marieta, Carlos e Tainara, que contribuíram para que as coletas de todas as amostras pudessem ser realizadas.

Aos secretários do Programa de Medicina Tropical: Clever e Marcelo, pela eficiência e pronto atendimento em ajudar em tudo que fosse necessário.

Aos professores Dr. Alexandre e Dra. Marlene, pelo incentivo científico, bem como todos meus amigos de trabalho, Sílvia, Camila, Guilherme, Anderson e Lucas, pela amizade, pelo incentivo, e pelas trocas de conhecimento que me proporcionam aprendizado diário, crescimento pessoal e profissional.

A todos meus familiares e verdadeiros amigos, pelas alegrias vividas e compartilhadas, pelas orações e pela palavra de conforto e motivação nos momentos de dificuldade e desânimo.

A todas as pacientes que colaboraram para a execução deste trabalho.

Todos vocês foram fundamentais durante essa jornada! Muito obrigada!

*“Foi o tempo que dedicaste
à tua rosa que a fez tão importante...”*

Antoine de Saint-Exupéry, O Pequeno Príncipe

RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose de elevada prevalência mundial, sendo a forma congênita um grande problema de saúde pública devido a sua alta morbi/mortalidade. O diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é caracterizado pela intolerância à glicose durante a gestação, podendo causar complicações na gravidez e ao feto. Os objetivos desse trabalho foram avaliar e comparar a resposta imune humoral e celular específica à toxoplasmose, de gestantes cronicamente infectadas por *T. gondii*, com e sem DMG; bem como a resposta humoral de seus respectivos recém-nascidos (RN). O trabalho envolveu 81 gestantes atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), sendo 34 com DMG e 47 controles, das quais foram obtidos os resultados do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) via prontuário, e coletadas amostras de sangue no terceiro trimestre de gestação; o estudo também envolveu 45 RN (20 DMG e 25 controles) dos quais foram obtidos amostras do sangue de cordão umbilical. A imunidade humoral foi analisada pela dosagem de IgG total, subclasses de IgG e IgG avides anti-*T. gondii*. Para avaliação da imunidade celular foram cultivadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 32 gestantes (16 DMG e 16 controles) sob estímulo policlonal e estímulo parasito-específico, citocinas do sobrenadante foram dosadas, e citometria de fluxo foi realizada para análise de expressão de moléculas de superfície, citocinas e fator de transcrição (FOXP3) em linfócitos. Todas as gestantes e RN foram positivos para IgG total, e a subclasse prevalente foi a IgG1. Houve correlação negativa entre as glicemias do TOTG das gestantes e os níveis de IgG total, IgG1 e avides de IgG. A avides de IgG das gestantes com DMG foi significativamente menor comparada com as gestantes do grupo controle. Além disso, apenas no grupo DMG houve redução significativa da avides de IgG na amostra de terceiro trimestre comparada à amostra prévia. As gestantes do grupo DMG apresentaram maior número de linfócitos T expressando os marcadores de ativação e exaustão celular (CD28 e PD-1). Na presença de antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) o número de células T CD8⁺ foi maior no grupo DMG, porém a quantidade de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , IL-10 e IL-17 foi significativamente menor no grupo DMG, enquanto não houve diferença entre os grupos na quantidade de células Treg funcionais CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺LAP⁺. Adicionalmente, sob o estímulo de STAg, a secreção de citocinas IL-17, IL-4, TNF e IL-2 no sobrenadante de cultura de PBMC foi menor no grupo DMG. Assim, concluiu-se que existe uma correlação entre o aumento da glicemia das pacientes e a diminuição dos níveis de anticorpos anti-*T. gondii*, associado à diminuição de avides de IgG das pacientes que desenvolvem DMG. Além

disso, as gestantes com DMG apresentam diminuição das respostas do perfil Th1, Th2 e Th17, sugerindo uma associação entre o DMG e a modulação negativa da resposta imune humoral e celular contra *T. gondii*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Diabetes gestacional. Imunidade humoral. Imunidade celular

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonosis worldwide prevalent and the congenital form is a major public health problem due to its high morbidity/mortality. Gestational diabetes *mellitus* (GDM) is characterized by glucose intolerance during pregnancy, which can cause pregnancy and fetus complications. This study was conducted in order to evaluate and compare the specific humoral and cellular immune response, of pregnant chronically infected with *T. gondii*, with and without GDM; as well as the humoral response of their respective newborns (NB). The study was carried out on 81 pregnant (34 with GDM and 47 controls) attended at Clinical Hospital of Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), from whom the results of the Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) were obtained at medical records, and blood samples were collected at third trimester of pregnancy; also on 45 newborns (20 GDM and 25 controls) from whom umbilical cord blood samples were obtained. Humoral immunity was analyzed by measuring anti-*T. gondii* total IgG, IgG subclasses and avidity of IgG. To evaluate cellular immunity peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 32 pregnant women (16 GDM and 16 controls) were cultured, supernatant cytokines were determined and flow cytometry were performed to analyze the expression at lymphocytes of surface molecules, cytokines and transcription factor. All pregnant women and NB were positive for total IgG, and the prevalent subclass was IgG1. There was a negative correlation between the OGTT glycemia of pregnant women and the levels of total IgG, IgG1 and avidity of IgG. The IgG avidity of GDM pregnant women was significantly lower than control pregnant. In addition, only in the GDM group there was a significant reduction in IgG avidity on the third trimester sample compared to previous sample. Patients from GDM group had a higher number of T lymphocytes expressing markers of cell activation and exhaustion (CD28 and PD-1). In the presence of *T. gondii* soluble antigen (STAg) the number of CD8⁺ T cells was higher in the GDM group, but the amount of CD4⁺ T cell producing IFN- γ , IL-10 and IL-17 was significantly lower in the GDM group, while there was no difference between groups in the number of CD4⁺ CD25^{High}FOXP3⁺LAP⁺ functional Treg cells. Additionally, under STAg stimulus, the secretion of IL-17, IL-4, TNF and IL-2 cytokines at PBMC culture supernatant was lower in DMG group. In conclusion there was a correlation between the increase in blood glucose and the decrease in levels of anti-*T. gondii* antibodies, associated with decrease IgG avidity in patients who develop GDM. Also, GDM pregnant women have immune responses decrease in Th1, Th2 and Th17 profiles, suggesting an association between GDM and the negative modulation of the humoral and cellular immune responses against *T. gondii*.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Gestational diabetes. Humoral immunity. Cellular immunity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Valores médios das glicemias de jejum, 1 hora e 2 horas após ingestão de 75g dextrose, das gestantes do grupo controle e DMG. Os valores do *cut-off* para o diagnóstico de diabetes *mellitus* gestacional são: Jejum > 92 mg/dL; 1 hora ≥ 180 mg/dL, 2 horas ≥ 153 mg/dL. A linha vermelha representa a média dos valores.**Dados estatisticamente significantes (p < 0,0001, teste t não pareado). DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 50
- Figura 2.** Níveis de anticorpos IgG total anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), em amostras de (A) 81 gestantes (47 controles e 34 DMG) e (B) 45 recém-nascidos (25 controles e 20 DMG). A linha vermelha representa a média dos valores. A linha tracejada representa o valor do *cut-off* (IE:1,2). DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 52
- Figura 3.** Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), em amostras de (A) 81 gestantes (47 controles e 34 DMG) e (B) 45 recém-nascidos (25 controles e 20 DMG). A linha vermelha representa a mediana dos valores. A linha tracejada representa o valor do *cut-off* (IE:1,2). DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 54
- Figura 4.** Correlação entre os valores de glicemia do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e os níveis de IgG total anti-*T. gondii* das gestantes dos grupos controle e DMG. (A) Glicemia de jejum, (B) Glicemia de 1 hora após dextrose e (C) Glicemia de 2 horas após dextrose. As linhas tracejadas representam os valores do *cut-off* para o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (Jejum > 92 mg/dL; 1 hora ≥ 180 mg/dL, 2 horas ≥ 153 mg/dL). *Dados estatisticamente significantes, teste de correlação de Spearman. IE: Índice ELISA. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 56
- Figura 5.** Correlação entre os valores de glicemia do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e os níveis de IgG1 anti-*T. gondii* das gestantes dos grupos controle e DMG. (A) Glicemia de jejum, (B) Glicemia de 1 hora após dextrose e (C) Glicemia de 2 horas após dextrose. As linhas tracejadas representam os valores do *cut-off* para o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (Jejum > 92 mg/dL; 1 hora ≥ 180 mg/dL, 2 horas ≥ 153 mg/dL). *Dados estatisticamente significantes, teste de correlação de Spearman. IE: Índice ELISA. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 57
- Figura 6.** Índice avidéz dos anticorpos IgG total anti-*T. gondii*, expresso em porcentagem (%). (A) Amostras do 3º trimestre de gestação de 81 gestantes (47 controles e 34 DMG). (B) Amostras do 3º trimestre de gestação de 45 gestantes (25 controles e 20 DMG) e amostras dos respectivos recém-nascidos (RN). (C) Amostras prévias e amostras do 3º trimestre de gestação de 23 gestantes (12 controles e 11 DMG). As linhas pontilhadas demarcam as áreas que representam baixa avidéz (0-30%), avidéz indeterminada (30-60%) e alta avidéz (>60%). A linha vermelha em A e C representa a média dos valores, e em B representa a mediana dos valores. Dados estatisticamente significantes, p<0,05 *Teste t pareado **Teste t não pareado ***Mann-Whitney. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 59

Figura 7. Correlação entre os valores de glicemia do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e o índice avidéz de IgG total anti-*T. gondii* das gestantes dos grupos controle e DMG. (A) Glicemia de jejum, (B) Glicemia de 1 hora após dextrose e (C) Glicemia de 2 horas após dextrose. As linhas tracejadas representam os valores do *cut-off* para o diagnóstico de diabetes mellitus gestacional (Jejum > 92 mg/dL; 1 hora ≥ 180 mg/dL, 2 horas ≥ 153 mg/dL). *Dados estatisticamente significantes, teste de correlação de Spearman. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 60

Figura 8. Ativação e exaustão celular de linfócitos T, avaliados pela expressão dos receptores de superfície celular: CD28 e PD-1. (A) Representação do processo utilizado para separar as *gates* na citometria. Porcentagem de células T (B) CD8+, (C) CD8⁺CD28⁺, (D) CD8⁺PD-1⁺, (E) CD8⁺CD28⁺PD-1⁺, (F) CD4⁺, (G) CD4⁺CD28⁺, (H) CD4⁺PD-1⁺ e (I) CD4⁺CD28⁺PD-1⁺, que foram adquiridas por citometria de fluxo das células PBMCs de 32 gestantes (16 controles e 16 DMG) após 96h cultura nas três condições distintas (somente meio de cultura, estímulo policlonal de α-CD3/α-CD28, e estímulo específico de STAg). A linha vermelha representa a mediana dos valores. Dados estatisticamente significantes, p<0,05 *Wilcoxon **Mann-Whitney. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 63

Figura 9. Produção intracelular de citocinas por linfócitos T CD4⁺ (A) Representação do processo utilizado para separar as *gates* na citometria. Porcentagem de células T CD4⁺ (B) produtoras de IFN-γ, (C) produtoras de IL-10, (D) produtoras de IL-17, (E) dupla produtora de IFN-γ e IL-10, (F) dupla produtora de IFN-γ e IL-17, (G) dupla produtora de IL-17 e IL-10, que foram adquiridas por citometria de fluxo das células PBMCs de 32 gestantes (16 controles e 16 DMG) após 96h cultura nas três condições distintas (somente meio de cultura, estímulo policlonal de α-CD3/α-CD28, e estímulo específico de STAg). A linha vermelha representa a mediana dos valores. Dados estatisticamente significantes, p<0,05 *Wilcoxon **Mann-Whitney. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 65

Figura 10. Níveis das citocinas (A) IFN-γ, (B) IL-10, (C) IL-17, (D) IL-4, (E) TNF, (F) IL-6 e (G) IL-2, expressos em pg/mL, que foram quantificadas por CBA no sobrenadante das três condições de 96h de cultura (somente meio de cultura, estímulo policlonal de α-CD3/α-CD28, e estímulo específico de STAg) das células PBMCs de 32 gestantes (16 controles e 16 DMG). A linha vermelha representa a mediana dos valores. Dados estatisticamente significantes, p<0,05 *Wilcoxon **Mann-Whitney. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 68

Figura 11. Fenótipo de células T reguladoras. (A) Representação do processo utilizado para separar as *gates* na citometria. Porcentagem de células (B) T CD4⁺CD25⁺, (C) T CD4⁺CD25^{High}, (D) T CD4⁺FOXP3⁺, (E) T CD4⁺LAP⁺, (F) T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺, (G) T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺LAP⁺, que foram adquiridas por citometria de fluxo das células PBMCs de 32 gestantes (16 controles e 16 DMG) após 96h cultura nas três condições distintas (somente meio de cultura, estímulo policlonal de α-CD3/α-CD28, e estímulo específico de STAg). A linha vermelha representa a mediana dos valores. Dados estatisticamente significantes, p<0,05 *Wilcoxon **Mann-Whitney. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional. 71

Figura 12. Resposta imune específica a *T. gondii*, de gestantes cronicamente infectadas pelo parasito, com e sem diabetes *mellitus* gestacional (DMG). Altos níveis de glicose na corrente sanguínea caracterizam as pacientes com DMG, enquanto as normoglicêmicas foram identificadas como pacientes do grupo controle. Houve correlação negativa entre a glicemia das gestantes e os níveis de IgG total, IgG1 e avidéz de IgG, ou seja, quanto maior a glicose sanguínea das pacientes menor o nível de anticorpos anti-*T. gondii*. Sob estímulo policlonal (anti-CD3/anti-CD28), as pacientes do grupo DMG apresentaram maior número de linfócitos T expressando os marcadores de ativação e exaustão celular (CD28 e PD-1), mas na presença de STAg não houve diferença. Sob estímulo de STAg, o número de células T CD8⁺ foi maior no grupo DMG, enquanto o número de células T CD4⁺ foi semelhante entre os grupos. Porém, a quantidade de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , IL-10 e IL-17 foi significativamente menor no grupo DMG, enquanto não houve diferença entre os grupos na quantidade de células Treg funcionais CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺LAP⁺. A IL-10 foi mais secretada pelas células mononucleares do sangue periférico das pacientes DMG, não houve diferença entre os grupos na secreção de IFN- γ e IL-6, enquanto a secreção de citocinas IL-17, IL-4, TNF e IL-2 foi menor no grupo DMG. Portanto, comparadas às gestantes normoglicêmicas, as gestantes que desenvolvem DMG apresentam diminuição das respostas do perfil Th1, Th2 e Th17, bem como diminuição de avidéz de IgG e correlação entre o aumento da glicemia e a diminuição dos níveis de anticorpos anti-*T. gondii*, sugerindo uma associação entre o DMG e a modulação negativa da resposta imune celular e humoral contra *T. gondii*. Células B, células NK e monócitos estão separadas por um box, para representar que também são células mononucleares do sangue periférico, mas não foram diretamente analisadas neste trabalho. Termos de uso: essa figura é derivada de imagens atribuídas à “Servier Medical Art” da Servier, usada sob os termos de licença da Creative Commons Attribution 3.0 France (CC BY 3.0 FR).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número e porcentagem de gestantes com e sem Diabetes *Mellitus* Gestacional (DMG) e seus recém-nascidos, em relação a soropositividade para anticorpos anti-*T. gondii*. 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
AB+	Grupo sanguíneo AB
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
APC	Fluorocromo <i>Allophycocyanin</i>
APCs	Células apresentadoras de antígenos
B7-1	Proteína de membrana B7 do tipo I (o mesmo que CD80)
B7-2	Proteína de membrana B7 do tipo II (o mesmo que CD86)
BB515	Fluorocromo <i>Brilliant Blue 515</i>
BLIMP-1	<i>B-lymphocyte-induced maturation protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD16	<i>Cluster of Differentiation 16</i>
CD25	<i>Cluster of Differentiation 25</i>
CD25^{High}	Alta expressão de CD25
CD28	<i>Cluster of Differentiation 28</i>
CD3	<i>Cluster of Differentiation 3</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD56	<i>Cluster of Differentiation 56</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cepa RH	Cepa altamente virulenta de <i>T. gondii</i>
CIA	Ensaio de quimioluminescência
d	Densidade
DC	Células dendríticas
dL	Decilitros (unidade de volume)
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
Fc	Fragmento cristalizável de imunoglobulina
FcRn	Receptor de Fc neonatal
FITC	Fluorocromo <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FOXP3	Fator de transcrição <i>forkhead box P3</i> (proteína)
g	Gramas (unidade de peso)
h	Hora (unidade de tempo)
HBV	Vírus da hepatite B
HC	Hospital de Clínicas
HCV	Vírus da hepatite C
HeLa	Linhagem de células imortalizadas obtidas de um adenocarcinoma cervical, coletadas em 1951 de Henrietta Lacks
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hz	Hertz
IA	Índice avidéz
IADPSG	<i>International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups</i>
IE	Índice ELISA
IFAT	Ensaio de imunofluorescência indireta
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Subclasse de IgG 1
IgG2	Subclasse de IgG 2
IgG3	Subclasse de IgG 3
IgG4	Subclasse de IgG 4
IgM	Imunoglobulina da classe M
IHA	Ensaio de hemaglutinação indireta

IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor de Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
ISAGA	Ensaio de aglutinação por imunoabsorção
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>
LAT	Teste de aglutinação por látex
M	Molar
mg	Miligramas (unidade de peso)
mL	Mililitros (unidade de volume)
mm	Milímetros (unidade de comprimento)
NK	Células natural killer
nm	Nanômetros (unidade de comprimento)
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Probabilidade
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 20 a 0,05%
PBS-T-BSA1%	Solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 20 a 0,05% e 1% de <i>Bovine Serum Albumin</i>
PBS-T-M5%	Solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 20 a 0,05% e 5% de leite em pó desnatado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PD-1	<i>Programmed cell death-1</i>
PE	Fluorocromo <i>Phycoerythrin</i>

PE-Cy7	Fluorocromo que combina <i>Phycoerythrin</i> e <i>cyanine</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIBF	Fator de bloqueio induzido por progesterona
r	Índice de correlação de Spearman
RN	Recém-nascido
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (1969)
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SFB	Soro Fetal Bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
STAg	Antígenos solúveis de taquizoítas de <i>T. gondii</i>
T	Linfócito T
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de células T
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th1	Perfil de linfócitos T auxiliares
Th17	Perfil de linfócitos T auxiliares
Th2	Perfil de linfócitos T auxiliares
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Fator de necrose tumoral
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
Treg	Linfócitos T reguladores
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
vs	<i>Versus</i>
WB	<i>Western blotting</i>
x g	Força relativa da gravidade
μg	Micrograma (unidade de peso)

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. Introdução	19
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose.....	20
1.2. Epidemiologia e fisiopatologia da toxoplasmose	21
1.3. Diagnóstico e tratamento da toxoplasmose	24
1.4. Resposta imune, toxoplasmose e gestação	27
1.5. Gestação e diabetes <i>mellitus</i> gestacional	30
2. Objetivos.....	33
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. Justificativa	35
4. Material e Métodos.....	39
4.1. Aspectos éticos	40
4.2. Pacientes	40
4.3. Coleta de dados.....	40
4.4. Divisão dos grupos e desenho experimental.....	41
4.5. Amostras de sangue	42
4.6. Manutenção e obtenção de <i>T. gondii</i>	42
4.7. Preparo de antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>	42
4.7.1. STAg para utilização em ensaios sorológicos.....	43
4.7.2. STAg para utilização em cultura de células.....	43
4.8. ELISA indireto para a detecção de IgG total anti- <i>T. gondii</i>	43
4.9. ELISA-avidez para anticorpos IgG total anti- <i>T. gondii</i>	44
4.10. ELISA indireto para detecção de subclasses de IgG anti- <i>T. gondii</i>	45
4.11. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) das pacientes....	45

4.12. Cultura de células	46
4.13. Citometria de fluxo para análise da expressão de moléculas de superfície, citocinas e fator de transcrição	46
4.14. Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura por CBA.....	47
4.15. Análise estatística	48
4.16. Normas de biossegurança	48
5. Resultados.....	49
5.1. Caracterização da amostra	50
5.2. Avaliação da resposta imune humoral específica a <i>T. gondii</i>	51
5.3. Avaliação da resposta imune celular	61
5.3.1. Ativação e exaustão de linfócitos <i>T</i>	61
5.3.2. Produção intracelular de citocinas por linfócitos <i>T CD4</i> ⁺	64
5.3.3. Produção de citocinas pelas <i>PBMCs</i>	66
5.3.4. Expressão do fenótipo de <i>Treg</i>	68
6. Discussão.....	72
7. Conclusão	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXO I	111
ANEXO II.....	113
ANEXO III	115



1. Introdução

1.1. *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909), um protozoário capaz de infectar e se replicar na maioria das células nucleadas de diversos hospedeiros (SAADATNIA; GOLKAR, 2012, SPLENDORE, 1908, TOMBÁ CZ et al., 2018). Esse parasito faz parte do Reino Protista, Sub-reino Protozoa e Filo Apicomplexa (MONTROYA; LIESENFELD, 2004), por possuir um complexo apical composto de roptrias, micronemas, grânulos densos e elementos do citoesqueleto, que lhe conferem proteção e auxiliam na adesão e invasão da célula hospedeira (KIM, 2018, TOMBÁ CZ et al., 2018).

Esse eucarioto unicelular apresenta três formas infectantes: os esporozoítos (forma de resistência), os taquizoítos (forma de replicação rápida) e os bradizoítos (forma de multiplicação lenta). Os esporozoítos são encontrados dentro de oocistos (4 esporozoítos para cada oocisto), que são produzidos no intestino de felinos infectados, e eliminado para o meio externo juntamente com suas fezes. Os taquizoítos são encontrados no sangue e/ou outros líquidos orgânicos e tecidos dos hospedeiros durante a fase aguda da doença, ou ainda na fase de reativação da doença e, são responsáveis por disseminar o parasito no hospedeiro. Os bradizoítos são encontrados dentro de cistos teciduais dos hospedeiros intermediários, na fase crônica (latente) da doença, presente em alguns tecidos específicos, tais como o cérebro, os músculos esqueléticos e cardíacos, e podem permanecer viáveis nos tecidos por tempo indeterminado, pois parecem evadir à resposta imune do hospedeiro (FRENKEL, 1973, KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018, SASAI; PRADIPTA; YAMAMOTO, 2018, TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

O ciclo biológico de *T. gondii* é heteroxeno, cujos membros da família dos felinos, principalmente os gatos, são os hospedeiros definitivos ou completos do parasito onde ocorre a fase sexuada do ciclo. Enquanto uma ampla variedade de animais de sangue quente (pássaros, mamíferos não felinos e o ser humano) são os hospedeiros intermediários ou incompletos onde se desenvolve a fase assexuada do ciclo (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970, KIM, 2018, SANDRIN et al., 2012).

A fase sexuada do ciclo inicia-se por meio do carnivorismo dos felídeos, com a ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos. No trato digestivo do gato, *T. gondii* invade as células epiteliais do intestino e inicia a esquizogonia, que consiste na proliferação do parasito com formação de esquizontes. Os esquizontes se rompem e liberam merozoítos, que penetram em novos enterócitos e em seguida se diferenciam em gametócitos. Os gametócitos

originam o micro (masculinos) e macro (femininos) gametas, de cuja fusão formam zigotos que se diferenciam em oocistos imaturos. Estes são eliminados com as fezes do hospedeiro definitivo e disseminados no ambiente, onde sofrem processo de esporogonia, tornando-se oocistos maduros e infectantes (DUBEY; FRENKEL, 1972).

A fase assexuada do ciclo acontece nos hospedeiros intermediários, quando ingerem água ou alimentos infectados por oocistos maduros contendo esporozoítos, ou carne crua/mal cozida contendo cistos de bradizoítos. Com a ingestão do parasito, ele invade células epiteliais do intestino do hospedeiro, dando origem aos taquizoítos da fase aguda da infecção, os quais conseguem invadir várias células do hospedeiro e se replicar, por endodiogenia, dentro de um vacúolo parasitóforo (DUBEY, 1998, KIM, 2018, SASAI; YAMAMOTO, 2019). O desenvolvimento de cistos teciduais em vários locais do corpo define a fase crônica do ciclo assexuado. Uma vez que o parasita é capaz de atravessar a barreira epitelial do intestino, ele dissemina por todo o corpo podendo encistar no cérebro, músculos ou olho, onde podem permanecer pelo resto da vida do hospedeiro (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998, KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018, MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

Vale ressaltar que a via de infecção oral é a mais comum do ser humano, enquanto hospedeiro intermediário, porém existem outras formas de infecção. A transmissão vertical, que resulta na passagem de taquizoítos via transplacentária da mãe para o feto, pode ocasionar as manifestações clínicas mais graves (MALDONADO et al., 2017). Além disso, outras formas, mais raras, de transmissão de taquizoítos para o homem são em acidentes laboratoriais com perfurocortantes, ou em transplante de órgãos e transfusão sanguínea (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998, DUNAY et al., 2018, MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

1.2. Epidemiologia e fisiopatologia da toxoplasmose

A toxoplasmose possui grande importância médica e epidemiológica, pois estima-se que mais de um terço da população mundial esteja cronicamente infectada por *T. gondii* (ARAÚJO-ANDRADE et al., 2007). Além disso, embora a maioria das infecções em indivíduos adultos imunocompetentes seja assintomática, a infecção por *T. gondii* tem alta morbidade, podendo ser fatal, em indivíduos imunocomprometidos e em fetos e recém-nascidos com infecção congênita (MALDONADO et al., 2017, SASAI; YAMAMOTO, 2019).

A prevalência de toxoplasmose humana latente pode variar de 10 a 90% em uma população de indivíduos adultos dependendo do país, da região geográfica, das características climáticas, do grupo étnico, dos hábitos alimentares, dos fatores culturais, da higiene e da vulnerabilidade socioeconômica da população estudada (MAREZE et al., 2019, PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009, TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000, VARELLA et al., 2003).

Geralmente, a taxa de prevalência da doença é mais elevada em locais de clima úmido e quente (SAADATNIA; GOLKAR, 2012). Estima-se que nas Américas do Sul e Central de 50 a 80% da população humana adulta apresenta soropositividade para a toxoplasmose, enquanto nos Estados Unidos da América esses valores diminuem, ficando entre 16 a 40% (HILL; DUBEY, 2002).

Um estudo realizado em uma cidade do sudeste do Brasil revelou que idades mais avançadas, menores graus de escolaridade, menores rendas familiares, desemprego e morar em local sem armazenamento de água foram os principais fatores associados à soropositividade para *T. gondii* (MAREZE et al., 2019).

Em seres humanos imunocompetentes, a maioria das infecções por *T. gondii* progride para um quadro assintomático ou apenas sintomas semelhantes a uma gripe leve (TOMBÁČZ et al., 2018), e somente alguns indivíduos apresentam manifestações clínicas durante a fase aguda, como linfadenopatia e retinocoroidite (PAUL, 1999).

Porém a toxoplasmose pode manifestar sintomas sistêmicos graves, relacionadas ao tropismo do parasito e a sua persistência dentro do cérebro; que ocorre em indivíduos imunodeficientes como pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e desenvolvem AIDS, pacientes com doenças linfoproliferativas, pacientes que realizam quimioterapia ou transplante de órgãos, ou em fetos infectados de forma vertical (KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018, MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

A forma congênita é uma das mais graves da toxoplasmose sendo um importante problema de saúde pública devido à alta morbidade e mortalidade (MATTOS et al., 2011), o que justifica os muitos estudos epidemiológicos realizados em população de gestantes. Uma revisão sobre a soroprevalência global de *T. gondii* e o seu impacto na gestação e na toxoplasmose congênita, demonstrou que a prevalência de anticorpos IgG específicos ao parasito, em gestantes, na Europa variaram de 9,1% na Inglaterra a 63,2% na Alemanha; na Ásia e Oceania variaram de 0,8% na Coreia do Sul a 60,4% na Turquia; na África variaram de 25,3% em Burquina Faso até 75,2% em São Tomé e Príncipe; e que em relação às Américas a maioria dos trabalhos são provenientes de países da América Latina, principalmente do Brasil,

que apresenta altas taxas de prevalência da doença, variando de 6,1% no México a 77,5% no Brasil (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009).

No Brasil, existem vários estudos que relataram a alta prevalência de gestantes soropositivas para IgG anti-*T. gondii*, sendo 77,1% no Rio de Janeiro (MEIRELLES FILHO, 1985), 69,4% em Recife (NÓBREGA et al., 1999), 59,8% em Porto Alegre, Rio Grande do Sul (VARELLA et al., 2003), 59,6% em Jaçanã, Rio Grande do Norte (FREITAS et al., 2017), 57,1% na região de São Paulo (KAWARABAYASHI et al., 2007) e 51,6% em Uberlândia, Minas Gerais (SEGUNDO et al., 2004).

As infecções congênitas normalmente ocorrem quando a mulher se infecta durante a gestação, resultando na infecção do feto. Geralmente é durante uma infecção primária na gestação, porém já foi demonstrado que a reinfecção por uma nova cepa de *T. gondii* pode causar a toxoplasmose congênita (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009, GAVINET et al., 1997). Além disso, em menor proporção, uma mulher imunossuprimida pode sofrer reativação de uma infecção prévia à gestação, sendo capaz de infectar o feto (DOLLFUS et al., 1998, KODJIKIAN et al., 2004, VILLENA et al., 1998, VOGEL et al., 1996).

As alterações ou lesões fetais mais comuns que podem ocorrer se enquadram dentro da “Síndrome ou Tétrade de Sabin”, e são: coriorretinite, calcificações cerebrais, perturbações neurológicas e alterações no volume craniano, tais como micro ou macrocefalia (ARAUJO-ANDRADE et al., 2007, PENA; DISCACCIATI, 2013). O tempo gestacional está diretamente ligado ao risco de transmissão vertical do parasito e inversamente relacionado à gravidade das lesões fetais, ou seja, no primeiro trimestre de gravidez existe menor chance de o parasita atravessar a barreira placentária e infectar o feto, mas caso isso ocorra, a gravidade da doença é maior do que quando a infecção ocorre no terceiro trimestre (LINDSAY; DUBEY, 2011).

Quando a transmissão ocorre na fase final da gravidez os efeitos sobre o feto são mais brandos, inclusive pode nascer uma criança assintomática. Aproximadamente 67% a 80% dos recém-nascidos infectados durante a gestação apresentam infecção subclínica que só pode ser diagnosticada através de exames sorológicos. Embora essas crianças pareçam saudáveis ao nascimento, elas podem desenvolver ao longo dos anos sintomas clínicos e deficiências, principalmente afetando os olhos, o sistema nervoso central ou o ouvido (surdez). Estima-se que cerca de um terço das crianças infectadas no terceiro trimestre de gestação desenvolverá deficiência visual (FERREIRA et al., 2020, TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000, VILLENA et al., 2010).

Em indivíduos imunocomprometidos, os cistos contendo bradizoítos podem se romper levando à reativação da infecção latente resultando em encefalite toxoplásmica ou retinocoroidite que pode levar à cegueira (HILL; DUBEY, 2002, PORTER; SANDE, 1992), ou ainda miocardite e pneumonia, que podem ser fatais (LIU et al., 2015).

Em indivíduos imunocompetentes, o controle da doença é a progressão para a fase de latência (crônica), caracterizada pelo encistamento dos parasitos em diferentes tecidos do corpo como músculo esquelético e cardíaco, cérebro e retina (DUNAY et al., 2018).

1.3. Diagnóstico e tratamento da toxoplasmose

Vários métodos podem ser utilizados para o diagnóstico da toxoplasmose. Existem aqueles que são baseados na pesquisa direta do parasito, a partir de testes moleculares para detecção de seu DNA, por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que permite a identificação de *T. gondii* por meio dos seus segmentos característicos de ácidos nucleicos, após a ampliação. Além disso, são considerados aqueles que investigam a doença de forma indireta, como é realizado em ensaios sorológicos, por meio da pesquisa de anticorpos específicos contra o parasito (SAADATNIA; GOLKAR, 2012).

São diversos os testes sorológicos para a detecção de anticorpos específicos ao parasito, como por exemplo, ensaios de aglutinação por imunoabsorção (ISAGA), ensaios de hemaglutinação indireta (IHA), teste de aglutinação por látex (LAT) ensaios de imunofluorescência indireta (IFAT), ensaios de quimioluminescência (CIA), *western blotting* (WB) e o ensaio imunoenzimático *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) (LIU et al., 2015). Dentre esses, geralmente os ensaios imunoenzimáticos ELISA e CIA são métodos de rotina utilizados em laboratórios clínicos para o rastreamento de IgG e IgM anti-*T. gondii* em amostras biológicas, principalmente o soro, de pacientes (SAADATNIA; GOLKAR, 2012, ZHANG et al., 2016).

O diagnóstico de toxoplasmose ainda depende de testes laboratoriais, principalmente porque a infecção geralmente é subclínica tanto em indivíduos imunocompetentes como em gestantes. Com isso, o status imunológico da infecção por *T. gondii* é determinado rotineiramente por meio do diagnóstico sorológico (ZHANG et al., 2016).

A cinética da produção de imunoglobulinas específicas ao parasito é utilizada para auxiliar no diagnóstico da doença e definir o estágio da infecção (ZHANG et al., 2016). Sendo assim, a toxoplasmose aguda é caracterizada sorologicamente por baixos níveis de anticorpos IgG e pela presença de anticorpos IgM específicos a *T. gondii*, adicionalmente, a

detecção de IgA específica também pode contribuir para o diagnóstico de infecção aguda. Por outro lado, um resultado de altos níveis séricos de IgG associado a ausência de IgM são marcadores de cronicidade da doença, porém indica apenas que houve exposição prévia ao agente mas não define o período exato que a infecção foi adquirida (CAMARGO et al., 1991, LIU et al., 2015, ZHANG et al., 2016). Por isso, na prática laboratorial é rotineiramente utilizado o ensaio para detecção de avididade de IgG, pois em infecções recentes os anticorpos IgG apresentam baixa avididade para os antígenos correspondentes. Com o transcorrer da infecção os anticorpos vão apresentando avididade crescente de modo que nas infecções mais antigas existe um predomínio marcante de IgG de alta avididade (CAMARGO et al., 1991, LIU et al., 2015).

Além disso, a ausência de anticorpos IgM, IgA e IgG específicos para *T. gondii* na amostra do paciente significa ausência de infecção, e caso a investigação sorológica seja em gestantes, esse resultado no início da gestação indica maior risco de contrair a doença durante a gravidez (CHAUDHRY; GAD; KOREN, 2014). Deste modo, em casos de sorologia negativa, a gestante deve ser orientada quanto à importância da prevenção e deve realizar o exame sorológico novamente no segundo e terceiro trimestres de gestação (SILVA; OKAZAKI, 2012).

O diagnóstico de infecção aguda (infecção primária ou reinfecção por nova cepa do parasito) na gravidez é crucial, pois é nessa fase que existe o maior risco de transmitir o parasito para o feto (MATTOS et al., 2011). Quando ocorre infecção durante a gravidez e o tratamento não é realizado de forma adequada, as taxas de infecção do feto são de 25%, 54% e 65% no primeiro, segundo e terceiro trimestres, respectivamente. Contudo, se a doença é devidamente diagnosticada e tratada, ocorre a redução na transmissão congênita, bem como melhora a severidade de manifestações clínicas (MALDONADO et al., 2017, SARDARIAN et al., 2018). Adicionalmente, gestantes imunocomprometidas com sorologia IgM negativa e IgG positiva devem ser acompanhadas durante toda a gravidez, pois pode ocorrer infecção congênita (AMENDOEIRA; CAMILLO-COURA, 2010).

Dessa forma, a fim de prevenir a transmissão da toxoplasmose via transplacentária, a orientação correta da população sobre as vias de infecção, hábitos de higiene e os riscos da doença é uma estratégia muito importante para diminuir a chance de contato com o parasito. E o acompanhamento adequado do pré-natal permite evitar a doença congênita ou pelo menos amenizar seus efeitos em casos de transmissão (DUNAY et al., 2018).

Como já foi enfatizado, a toxoplasmose congênita é uma das formas da doença que pode causar graves efeitos (KHAN; KHAN, 2018), por isso é tão importante o diagnóstico de

toxoplasmose na gestante, bem como o diagnóstico correto se houve a transmissão congênita, e isso atualmente é bastante desafiador (CHAUDHRY; GAD; KOREN, 2014). Primeiro porque cada técnica apresenta limitações, podendo resultar em testes falso-positivos e falso-negativos. Além disso, a presença de anticorpos IgG no soro das gestantes não determina de forma exata o tempo de infecção. Outro desafio está na interpretação dos resultados de IgM, pois em alguns indivíduos, ela pode ser detectada por longos períodos após a infecção aguda; portanto, um resultado positivo não é garantia de infecção recente (SENSINI, 2006, ZHANG et al., 2016). E por último, também envolve o tratamento, pois as medicações do tratamento para toxoplasmose podem ser tóxicas e teratogênicas, portanto, devem ser utilizadas com restrição, (KHAN; KHAN, 2018) e isso destaca o desafio do diagnóstico, pois são os resultados laboratoriais que direcionam a conduta do médico para o tratamento da gestante e do feto.

Para diagnosticar se houve a transmissão vertical da doença, as gestantes com suspeita de infecção aguda são submetidas à coleta de líquido amniótico, do qual é realizado um ensaio de PCR para a detecção direta do parasito (BRASIL, 2018, KHAN; KHAN, 2018). Adicionalmente, o ultrassom fetal pode ajudar a determinar se houve infecção congênita, sendo que espessura placentária aumentada, calcificações cerebrais, ventriculomegalia, calcificações intra-hepáticas, limitação do crescimento fetal e intestino ecogênico são resultados associados com toxoplasmose congênita (MALDONADO et al., 2017). Porém, vale ressaltar que um ultrassom fetal normal não pode excluir uma infecção fetal, portanto, mais um desafio diagnóstico.

Também é importante fazer o diagnóstico no recém-nascido após seu nascimento. A presença de IgM ou IgA anti-*T. gondii* no soro do recém-nascido é indicativo de infecção congênita, porque essas classes de imunoglobulinas não atravessam a barreira placentária, como ocorre com os anticorpos IgG. Fisiologicamente, presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* no soro do recém-nascido geralmente é proveniente da passagem placentária do anticorpo materno, porém, se os níveis de IgG aumentarem e continuarem positivos após o primeiro ano de vida da criança, isso sugere infecção congênita (AMENDOEIRA; CAMILLO-COURA, 2010, REMINGTON et al., 2006). Atualmente, o Ministério da Saúde incluiu o exame de toxoplasmose no teste do pezinho para auxiliar na detecção precoce da infecção congênita, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) – Portaria nº 7 de 4 de março de 2020 (BRASIL, 2020) .

Os medicamentos utilizados para o tratamento da toxoplasmose na gravidez variam de acordo com a idade gestacional. A espiramicina, uma droga de ação parasitostática que atua

impedindo a transmissão vertical do parasito, é utilizada no primeiro trimestre da gestação por não atravessar a barreira placentária e com isso não oferecer risco iatrogênico para o feto. Nos últimos dois trimestres da gestação é utilizado o esquema tríplice, uma combinação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico, os dois primeiros são parasiticidas que inibem a proliferação e sobrevivência de *T. gondii* através da inibição da via metabólica do folato. Porém, a pirimetamina gera efeitos adversos porque além de atuar na via metabólica do parasito também inibe o metabolismo do ácido fólico no corpo humano em tecidos com alta atividade metabólica, como a medula óssea. Portanto, associa-se a esse esquema de tratamento o ácido folínico, para diminuir a supressão da medula óssea (BEN-HARARI; GOODWIN; CASOY, 2017, BRASIL, 2013, KHAN; KHAN, 2018).

O tratamento para os recém-nascidos com toxoplasmose adquirida na gestação deve ser iniciado imediatamente após o nascimento, independente da presença de sintomas da doença. É recomendado utilizar o esquema tríplice de forma continuada durante 12 meses, e se houver presença de coriorretinite ou proteinorraquia também devem ser associados corticoides ao tratamento (BAQUERO-ARTIGAO et al., 2013, DUNAY et al., 2018).

1.4. Resposta imune, toxoplasmose e gestação

A infecção em seres humanos ocorre, principalmente, via ingestão de oocistos, por isso, o tecido intestinal é o sítio primário onde se instala uma inflamação, e os enterócitos são a primeira linha de defesa do hospedeiro contra *T. gondii*. Os enterócitos infectados secretam quimiocinas que recrutam células dendríticas (DC) e macrófagos para o local, assim os parasitas invadem essas células e por meio delas conseguem atravessar barreiras endoteliais, permitindo a entrada em locais como o cérebro (BORGES et al., 2019).

A resposta imune contra *T. gondii* tem seu início pelas células do sistema imune inato, com a fagocitose do parasito via macrófagos e a produção de citocinas pró-inflamatórias (principalmente IL-12) por neutrófilos, células dendríticas (DC) e monócitos. Essa citocina desencadeia a produção massiva de IFN- γ por células *natural killer* (NK), células TCD4⁺ e células TCD8⁺, ativando assim a resposta imune adaptativa, que é polarizada para o perfil de células T auxiliares (Th) 1, responsável pelo controle da infecção. Esse perfil de células é classicamente caracterizado como pró-inflamatório, cujas citocinas características são IFN- γ , IL-2 e TNF (FISCH; CLOUGH; FRICKEL, 2019, SAITO et al., 2010, SASAI; YAMAMOTO, 2019).

Com a pressão da resposta imune adaptativa, os taquizoítos que escapam da destruição se transformam em bradizoítos e formam cistos nos tecidos musculares e nervoso, conseguindo sobreviver por vários anos sem sofrerem ataque do sistema imune do hospedeiro (SASAI; YAMAMOTO, 2019, SOUZA et al., 2010).

Embora a imunidade efetiva contra esse parasito seja altamente inflamatória, dependente do IFN- γ , o organismo do hospedeiro também precisa de mecanismos para se proteger do excesso de inflamação gerada. Assim, as células imunes também aumentam a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, não somente na fase inicial após a infecção, como também na fase crônica (SASAI; YAMAMOTO, 2019). Portanto, uma resposta Th1 excessiva leva a danos nos tecidos, podendo ocasionar o desenvolvimento de alguma patologia. Camundongos com deficiência de IL-4 ou IL-10, em razão da disfunção de Th2 e células T reguladoras (Treg), tem sobrevida reduzida após a infecção por *T. gondii* (BORGES et al., 2019).

Além das células Th1, as células Th17 e Treg são duas subpopulações distintas de células T CD4⁺, que realizam funções importantes na resposta contra *T. gondii* (XU et al., 2020), e a razão entre Treg/Th17 é crucial na resposta imunológica contra o parasito durante a gestação, pois sua diminuição resulta em maiores taxas de aborto por *T. gondii* (ZHANG et al., 2012).

As células do perfil Th17 são reconhecidas pela secreção da citocina IL-17, e atuam de forma semelhante ao perfil Th1, aumentando a citotoxicidade e/ou a atividade fagocítica de macrófagos, neutrófilos e células NK, o que gera um estado de inflamação (LUCCIA et al., 2019). A citocina imunorregulatória TGF- β e a citocina pró-inflamatória IL-6 são fatores de diferenciação de células *Tnaive* para Th17 (KORN et al., 2009). Já foi demonstrado que o recrutamento de neutrófilos, importante para o controle do número de parasitas durante os estágios iniciais da infecção por *T. gondii*, é dependente da sinalização da IL-17 (KELLY et al., 2005). Além disso, Silva e colaboradores (2014) demonstraram que sob estímulo de *T. gondii* houve maior número de células T CD4⁺IL17⁺ na população de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de mulheres soropositivas para *T. gondii*. Assim, as células Th17 desempenham papel importante na resposta inflamatória, contribuindo para o processo de controle da invasão e replicação do parasita.

As células Treg possuem o *forkhead box P3* (FOXP3) como fator de transcrição, por isso são descritas como células CD4⁺ FOXP3⁺ e servem para modular as respostas imunes, limitando o excesso de inflamação, ou seja, produzem resposta anti-inflamatória pela liberação de citocinas como IL-10 e TGF- β (ZHANG et al., 2012). Durante o curso da

gestação o número de células Treg aumenta, e elas desempenham um papel fundamental na manutenção de uma gravidez normal. Baixa quantidade ou deficiência de função dessas células estão associados à infertilidade e a abortos recorrentes, devido rejeição imunológica do feto (ROBERTSON; CARE; MOLDENHAUER, 2018, ZHANG et al., 2012). Um estudo realizado em camundongos por Zhao e colaboradores (2017) mostrou que a infecção aguda por *T. gondii* diminui a população de Treg e os níveis de TGF- β , desencadeando vários efeitos adversos na gestação.

As células T desempenham papel central na resposta imune, e para completar as subpopulações de células T CD4⁺ mais estudadas, as células do perfil Th2 são caracterizadas por produzirem citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e estarem envolvidas na imunidade humoral. Além disso, considerado um o perfil celular importante durante a gravidez por promover a tolerância materna aos aloantígenos do feto (SAITO et al., 2010, SIFNAIOS et al., 2019).

Os mecanismos da imunidade celular são importantes na resposta anti-*T. gondii*, mas os anticorpos também promovem o controle de parasitos. Portanto, o desenvolvimento da resposta humoral durante a infecção é fundamental no controle, e necessário para resistência a longo prazo, pois as imunoglobulinas conseguem inibir a invasão de taquizoítos na célula hospedeira e limitar sua disseminação sistêmica (COUPER et al., 2005, PARK et al., 2019).

Geralmente, os anticorpos IgM e IgA específicos são produzidos no primeiro contato com o parasito, uma semana após a infecção, atingindo um pico dentro de 1 mês e então diminuem após 1 a 6 meses. Os anticorpos IgG específicos aparecem dentro de 1 a 2 semanas após a infecção, atingindo maiores níveis em aproximadamente 6 a 10 semanas, em seguida os níveis diminuem, porém, persistem detectáveis por toda a vida dos pacientes (LIU et al., 2012, ZHANG et al., 2016).

A classe de imunoglobulinas IgG é subdividida em quatro subclasses distintas, sendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. As subclasses de IgG específicas para *T. gondii*, não são utilizadas na rotina para o diagnóstico da toxoplasmose, mas alguns estudos anteriores sugeriram que poderiam ser usadas como biomarcadores de alterações oculares e neurológicas na infecção congênita (SOUZA-E-SILVA et al., 2013). Além disso, na toxoplasmose em humanos predomina-se o subtipo IgG1 (HUSKINSON et al., 1989), e os anticorpos IgG2, IgG3 e IgG4 são menos detectados e apresentam cinética variável em relação a cada indivíduo (CORREA et al., 2007).

Diante do exposto, observa-se que a imunidade contra o parasito não determina o fim da infecção, mas impede a multiplicação de taquizoítos, a destruição da célula hospedeira e a

disseminação dos parasitos durante a fase crônica (LIPSKA; WYSOCKA; TUROWSKI, 2000).

1.5. Gestação e diabetes *mellitus* gestacional

Para que seja possível tolerar a imunogenicidade alogênica fetal, a gravidez gera um estado fisiológico de supressão imune na mulher, com desvio da resposta de perfil Th1 para Th2. Além disso, o aumento de células Treg também é essencial nesse processo (SAITO et al., 2010).

Durante a gestação ocorrem mudanças significativas no metabolismo materno, portanto, fatores genéticos e hormonais associados a hábitos alimentares da gestante podem levar ao desenvolvimento de patologias obstétricas, como por exemplo o diabetes *mellitus* gestacional (DMG) (CHIEFARI et al., 2017); uma doença que pode provocar um desequilíbrio na resposta imunológica, e que aumenta o risco de complicações fetais e gestacionais (SIFNAIOS et al., 2019).

O diabetes *mellitus* é um distúrbio metabólico caracterizado pela hiperglicemia causada pelo defeito na secreção ou na ação da insulina, ou de ambos. Atualmente ele recebe quatro classificações de acordo com a etiologia: tipo I, tipo II, outros tipos específicos e DMG. A causa do tipo I é a deficiência absoluta de secreção de insulina, enquanto no tipo II é uma combinação de resistência à insulina e uma secreção de insulina inadequada. São classificados como outros tipos específicos de diabetes *mellitus* todas as outras causas que resultam em hiperglicemia, como os defeitos genéticos que geram disfunção das células β , os defeitos genéticos na ação da insulina, as doenças do pâncreas exócrino, as endocrinopatias, a hiperglicemia induzida por medicamentos ou drogas, e síndromes genéticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014, OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2017).

O DMG é um tipo de diabetes *mellitus* caracterizado por uma resistência à insulina e intolerância à glicose que tem início durante a gestação (LUCCIA et al., 2019, OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2017, VAMBERGUE et al., 2008). Sua prevalência varia de 0,6% a 25%, dependendo do nível socioeconômico, do grupo étnico estudado e dos critérios diagnósticos utilizados, sendo considerado a comorbidade metabólica de maior frequência nas gestações (CHIEFARI et al., 2017, JOHNS et al., 2006, PENDELOSKI et al., 2015, VAMBERGUE et al., 2008). Esse número tem aumentado mundialmente nos últimos anos como consequência da crescente prevalência de obesidade, e do número de mulheres que

adiam a gravidez para idade mais avançada. Além disso, as mudanças nos critérios diagnósticos permitiram determinar melhor a prevalência da doença, resultando em maior número de casos, tornando-a uma preocupação para a saúde pública (CHIEFARI et al., 2017, GOMES et al., 2013).

Um estudo que reuniu dados de mais de 25 mil gestantes, de 9 países diferentes, avaliou a relação entre as glicemias das mulheres e os comprometimentos maternos e fetais (HAPO, 2008), possibilitando que várias sociedades médicas reavaliassem os critérios e valores de referência para o diagnóstico de DMG; porém, ainda não existe um consenso mundial. No Brasil, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) adota as recomendações propostas pelo *International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups* (IADPSG) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a realização do diagnóstico de DMG (OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2017, WHO, 2014).

Assim, as Diretrizes da SBD preconizam que durante o pré-natal todas as gestantes devem ser submetidas a exames de glicemia para investigação/diagnóstico de diabetes *mellitus*, prévio ou gestacional.

O primeiro parâmetro para o diagnóstico é a glicemia de jejum no primeiro trimestre de gestação, cujo valor maior que 126 mg/dL é sugestivo de diabetes *mellitus* prévio; enquanto valor maior ou igual a 92 mg/dL e menor que 126 mg/dL é referente a diagnóstico de DMG. São necessárias duas amostras de soro em jejum, em dias distintos, para a confirmação desses resultados (OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2017, WHO, 2014).

As gestantes que apresentarem glicemia de jejum normal (menor que 92 mg/dL) no primeiro trimestre de gestação, devem ser submetidas ao segundo parâmetro de diagnóstico que é o teste oral de tolerância a glicose (TOTG), entre a 24^a e 28^a semana de gestação. Esse exame consiste na dosagem da glicemia em jejum, e das glicemias em 1 hora e 2 horas após ingestão oral de uma solução contendo 75g de dextrose. Os valores de referência utilizados para o diagnóstico de DMG são: glicemia maior que 92 mg/dL, maior ou igual a 180 mg/dL, e maior ou igual a 153 mg/dL, para a dosagem em jejum, 1 hora e 2 horas, respectivamente, sendo que um dos valores alterados já é suficiente para o diagnóstico (OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2017, WHO, 2014).

O DMG está associado a várias complicações maternas e fetais durante a gestação, bem como complicações futuras. Durante a gravidez, a mulher com DMG pode desenvolver pré-eclâmpsia, polidrâmnio e necessidade de parto cesária, enquanto o recém-nascido pode sofrer de morte súbita intrauterina, macrossomia, hipoglicemia, hiperbilirrubinemia e

dificuldade respiratória. As complicações de longo prazo, tanto para a mãe quanto para a criança, envolvem o risco de desenvolver diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), obesidade, hipertensão, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (ACOG, 2018, CHIEFARI et al., 2017, HAPO, 2008, LOGAKODIE et al., 2017). Também já foi descrito que existe uma associação entre DMG e a infecção por *Helicobacter pylori* (CARDAROPOLI et al., 2015). Alshareef e colaboradores (2018) demonstraram que a soropositividade para *H. pylori* foi significativamente maior entre as gestantes com DMG.

Kanková, Flegr e Calda (2015) demonstraram que gestantes com sorologia positiva para *T. gondii* possuem maiores níveis de glicose no sangue quando comparadas às gestantes com sorologia negativa, tornando a prevalência de diabetes *mellitus* gestacional significativamente maior em mulheres com IgG anti- *T. gondii* positivo.



2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Analisar a resposta imunológica humoral e celular de gestantes soropositivas para *T. gondii* que desenvolveram diabetes gestacional.
- Avaliar a resposta imunológica humoral dos recém-nascidos cujas mães são soropositivas para *T. gondii* e desenvolveram diabetes gestacional.

2.2. Objetivos específicos

- Detectar e comparar a presença dos anticorpos IgG total, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgG avides anti – *T. gondii* em amostras de soro das gestantes com e sem diabetes gestacional e de seus recém-nascidos, frente a antígenos solúveis de *T. gondii*.
- Correlacionar o índice glicêmico com o nível de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG avides anti-*T. gondii* de todas as gestantes.
- Avaliar e comparar a expressão de marcadores de ativação (CD28) e exaustão (PD-1) celular, de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ das pacientes com e sem DMG, após estímulo *in vitro* com anti-CD3/anti-CD28 e com antígenos solúveis de *T. gondii*.
- Avaliar e comparar a produção intracelular de citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-17 por células T CD4⁺ das pacientes com e sem DMG, após estímulo *in vitro* com anti-CD3/anti-CD28 e com antígenos solúveis de *T. gondii*.
- Avaliar e comparar os níveis de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17) secretadas por PBMCs das pacientes com e sem DMG, após estímulo *in vitro* com anti-CD3/anti-CD28 e com antígenos solúveis de *T. gondii*.
- Avaliar e comparar a expressão do fenótipo de Treg de células T CD4⁺ das pacientes com e sem DMG, após estímulo *in vitro* com anti-CD3/anti-CD28 e com antígenos solúveis de *T. gondii*.



3. Justificativa

A toxoplasmose é considerada uma das zoonoses mais comuns no mundo. No Brasil, por exemplo, estima-se que a soroprevalência na população humana adulta seja entre 50 e 83% (MANCINI et al., 2012).

A infecção por *Toxoplasma gondii* apresenta grande importância em saúde pública devido à sua ocorrência de formas clínicas graves, notadamente em recém-nascidos com infecção congênita e em indivíduos imunocomprometidos (MATTOS et al., 2011).

T. gondii é considerado um dos parasitos mais bem sucedidos, associado, principalmente, ao alto risco de infecções congênitas (DARD et al., 2016, MAJIDIANI et al., 2016). A infecção fetal ocorre através de passagem transplacentária, quando a mãe adquire a infecção durante a gestação ou, quando é reinfectada por uma nova cepa de *T. gondii* (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009, GAVINET et al., 1997) ou, menos comumente, quando mulheres cronicamente infectadas tem um imunocomprometimento importante (VARELLA et al., 2003), pois pacientes imunocomprometidas podem sofrer reativação da infecção (PORTER; SANDE, 1992).

Portanto, mesmo a gestante considerada imune à infecção por *T. gondii* (pela presença de anticorpos IgG específicos), apresenta riscos de transmissão vertical do parasito para o feto. Oliveira e colaboradores (2015) demonstraram que uma puérpera considerada imune à toxoplasmose durante o pré-natal, apresentou sorologia positiva de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* logo após o parto, e seu recém-nascido foi infectado, apresentando coriorretinite.

No primeiro trimestre de gestação o risco de o parasito atravessar a barreira placentária e infectar o feto é baixo, no entanto gera graves consequências a ele caso ocorra a infecção. Por outro lado, no terceiro trimestre de gestação a transmissão do parasito é mais provável de ocorrer, mas a doença é geralmente menos grave (LINDSAY; DUBEY, 2011) e muitas vezes negligenciada porque é assintomática no momento do nascimento e permanece despercebida. Apesar de a maioria dos recém-nascidos infectados (85-90%) não apresentar sintomas, podem desenvolver sequelas após semanas, meses ou anos do nascimento (CARLIER et al., 2012), incluindo problemas oculares e neurológicos, sendo a coriorretinite o acometimento mais frequente (aproximadamente 65% dos casos) (MELAMED et al., 2010).

No Brasil, vários trabalhos investigaram a prevalência de gestantes soropositivas para *T. gondii*, e os resultados encontrados foram de 74,5% no Rio Grande do Sul (SPALDING et al., 2005); 77,5% em Recife (PORTO et al., 2008); 61,2% em Minas Gerais (CARELLOS et al., 2008); 60% em São Paulo (OLBRICH NETO; MEIRA, 2004); 70,6% em Mato Grosso (LEÃO et al., 2004); 67% no Paraná (REICHE et al., 2000); 71,3% em Fortaleza (REY; RAMALHO, 1999); 68,5% em Sergipe (MELO INAGAKI et al., 2014). Devido à alta

prevalência da doença, existe a necessidade de acompanhamento sorológico durante o período gestacional (ISABEL; COSTA; SIMÕES, 2007, PENA; DISCACCIATI, 2013).

Sob orientações do Ministério da Saúde, no Brasil a triagem sorológica para toxoplasmose já é bem estabelecida para todas as mulheres que realizam o pré-natal (BRASIL, 2018), porém a conduta atualmente adotada é que na presença de anticorpos IgG positivos e IgM negativos, considera-se a gestante imune, e portanto nenhuma outra sorologia para toxoplasmose é realizada durante a gestação, pois não é considerada a possibilidade de transmissão congênita da doença (BRASIL, 2012). O Ministério da Saúde alerta sobre as gestantes imunocomprometidas, que nessas mulheres pode haver transmissão materno-fetal em caso de toxoplasmose prévia à gestação (BRASIL, 2012), e considera-se imunocomprometidas pacientes portadoras de HIV/AIDS ou gestantes em uso de imunossupressores como corticóides e quimioterápicos. Porém, gestantes que desenvolvem diabetes *mellitus* gestacional não entram na lista de pacientes que devem ser acompanhadas em relação à sorologia de toxoplasmose, quando já são consideradas imunes. Ou seja, as gestantes que desenvolvem DMG deveriam ser enquadradas nesse grupo de risco.

Existem vários estudos abordando a toxoplasmose em gestantes e em pacientes imunossuprimidos, entretanto, faltam dados na literatura a respeito da possibilidade de reativação da infecção em gestantes, associada à presença de diabetes *mellitus* gestacional. Além disso, existem poucos estudos que investigaram o papel das células imunes inatas e adaptativas na fisiopatologia da DMG (LUCCIA et al., 2019), e não há ainda dados a respeito do padrão de resposta imunológica presente na associação dessa patologia com a toxoplasmose.

No Brasil, um estudo envolvendo quase 5 mil mulheres revelou uma prevalência de 18% de DMG (TRUJILLO et al., 2014). A prevalência de diabetes *mellitus* gestacional pode chegar até 25% das gestantes, dependendo do critério de diagnóstico utilizado (PENDELOSKI et al., 2015).

Além desses dados indicando altos valores, já foi demonstrado que a prevalência de diabetes *mellitus* gestacional é significativamente maior em mulheres com IgG anti- *T. gondii* positivo (KANKOVÁ; FLEGR; CALDA, 2015). Adicionalmente, um estudo recente na China revelou uma associação entre diabetes *mellitus* e a infecção por *T. gondii*, sendo que a soroprevalência em mulheres com DMG foi de 21,25% e significativamente maior que a prevalência do grupo controle sem diabetes (LI et al., 2018). Porém, os dados da literatura que descrevem uma relação entre toxoplasmose e DMG são restritos à sorologia, e não explicam a relação entre essas duas doenças com base na resposta imunológica.

Assim, faz-se necessário avaliar a resposta imunológica dessas gestantes frente à infecção de toxoplasmose, para conhecer o impacto da diabetes gestacional sobre essa infecção parasitária e gerenciar melhores estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento da toxoplasmose, podendo influenciar diretamente na redução da transmissão congênita.



4. Material e Métodos

4.1. Aspectos éticos

O trabalho foi aprovado, parecer 1.870.741 (Anexo I), pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos. As pacientes foram convidadas a fazerem parte do estudo, foram informadas e esclarecidas sobre o projeto, e aquelas que concordaram em participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II), e um TCLE para coleta de sangue de cordão umbilical (Anexo III), estando cientes de todos os procedimentos adotados.

4.2. Pacientes

Participaram do estudo 81 gestantes no terceiro trimestre de gestação, que foram atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM), durante as consultas de pré-natal. Os critérios de inclusão foram: gestantes cuja idade gestacional fosse igual ou superior a 29 semanas, maiores de 18 anos, com perfil sorológico de fase crônica para toxoplasmose (positividade para IgG anti- *T. gondii* e negatividade para IgM anti-*T. gondii*), e que concordassem em participar do estudo.

Os critérios de exclusão do estudo consistiram em gestantes com sorologia negativa ou indeterminada para toxoplasmose, pacientes menores de 18 anos, pacientes com outro tipo de diabetes *mellitus* (DM1 ou DM2), pacientes que apresentavam algum tipo de câncer, ou alguma doença crônica transmissível, ou outras comorbidades infectocontagiosas (por exemplo, HIV, HCV, HBV, sífilis) que podem imunossuprimir o sistema imunológico. Além disso, não puderam participar aquelas que não concordaram e não assinaram o TCLE.

4.3. Coleta de dados

Mediante o aceite em participar do presente estudo, e assinatura do TCLE, foram coletados os seguintes dados, via entrevista, de cada paciente: idade, escolaridade, renda familiar e idade gestacional.

Adicionalmente, foi realizada pesquisa de prontuário das pacientes pelo Serviço de Arquivo Médico para obtenção do resultado de sorologia anti-*T. gondii* (IgM e IgG), do resultado do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG), do diagnóstico médico de diabetes

mellitus gestacional, e de informações sobre outras comorbidades que fizessem parte dos critérios de exclusão do trabalho.

O diagnóstico de DMG foi realizado segundo os critérios recomendados pela Sociedade Brasileira de Diabetes (OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2017), conforme descrito no Item 1.5.

4.4. Divisão dos grupos e desenho experimental

A partir do diagnóstico médico de DMG e do resultado do TOTG, segundo os critérios da SBD, as 81 pacientes participantes do trabalho foram divididas em dois grupos: 34 gestantes que desenvolveram diabetes *mellitus* gestacional (grupo DMG) e 47 gestantes sem diabetes (grupo controle). O trabalho também envolveu amostra de 45 recém-nascidos dessas mulheres que participaram do trabalho, sendo 20 do grupo DMG e 25 do grupo controle.

Primeiramente foi realizado a avaliação da resposta imune humoral, por meio dos ensaios de ELISA para dosagens de anticorpos IgG anti- *T. gondii*, suas subclasses, e IgG avidéz. Esses ensaios sorológicos envolveram as amostras de soro do terceiro trimestre das 81 gestantes (34 DMG e 47 controles), e dos 45 RN (20 DMG e 25 controles). Além disso, de 23 pacientes (11 DMG e 12 controles) foi possível analisar também uma amostra de soro anterior ao terceiro trimestre de gestação (média de 15 e 14 semanas antes da amostra de terceiro trimestre, para os grupos DMG e controle, respectivamente), para realização do ensaio de IgG avidéz.

Posteriormente, dessas 81 gestantes, 32 delas (16 DMG e 16 controles) no 3º trimestre de gestação foram envolvidas nos ensaios para a avaliação da resposta imune celular, que consistiu em isolamento e cultivo das células PBMCs de cada paciente, por 96 horas, sob estímulo policlonal e estímulo específico de *T. gondii*. Ao final desse tempo, o sobrenadante originado da cultura foi utilizado para as dosagens de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17, enquanto as células foram utilizadas para os ensaios de citometria de fluxo para análise da expressão de moléculas de superfície, citocinas e fator de transcrição expressos nas células, a fim de avaliar ativação e exaustão celular, fenótipo de células Treg, e expressão de citocinas por linfócitos T CD4.

4.5. Amostras de sangue

De cada paciente, juntamente com a coleta de dados, amostras de sangue periférico (aproximadamente 20mL no total) foram obtidas via punção venosa em tubos de coleta a vácuo com e sem anticoagulante, para a realização de todos os experimentos do trabalho. Os tubos sem anticoagulantes foram centrifugados para obtenção de soro, que foi distribuído em alíquotas e armazenado a -20 °C até a realização dos testes sorológicos. O sangue total coletado com heparina sódica foi utilizado para a separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) para a realização da cultura celular.

As amostras de sangue dos recém-nascidos foram obtidas do cordão umbilical, de cujas mães foram incluídas no trabalho, e que nasceram no HC-UFTM. Imediatamente após o parto, amostras do sangue de cordão são coletadas rotineiramente para realização de exames laboratoriais de tipagem sanguínea, portanto, para esse trabalho foi utilizado o volume residual dessa amostra. O plasma obtido após centrifugação foi distribuído em alíquotas e armazenado a -20 °C até a realização dos testes sorológicos.

4.6. Manutenção e obtenção de *T. gondii*

Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos em cultura celular, usando linhagens de células HeLa (RIBEIRO et al., 2009). Resumidamente, as células foram infectadas com taquizoítos do parasito e cultivadas em meio RPMI suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), a cada 48-72 horas eram realizadas infecção de novas células para manter o parasito vivo e se multiplicando, enquanto os parasitos livres eram coletados e parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 13 x 4 mm e centrifugação rápida (70 x g por 1 minuto a 4°C) para remoção de restos celulares. O sobrenadante (contendo os parasitos) foi coletado e lavado três 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 da suspensão parasitária foi armazenado a -20 °C até a preparação do antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg).

4.7. Preparo de antígeno solúvel de *T. gondii*

Antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii* (STAg) foram preparados como descrito anteriormente por Scott e colaboradores (1987), com modificações.

4.7.1. STAg para utilização em ensaios sorológicos

O sedimento de parasitos foi ressuspensionado com 9mL de coquetel de inibidores de proteases (Complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche Applied Science) diluído em água de injeção. Essa suspensão parasitária contendo aproximadamente 10^8 taquizoítos/mL foi submetida a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, e em seguida adicionado 1mL de PBS 10 vezes concentrado, para corrigir a osmolaridade. Para completar a preparação, essa suspensão foi submetida a 6 ciclos de sonicação por 1 minuto cada em uma cuba ultrassônica a 60 Hz (USC 1400 – Unique). Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C, coleta do sobrenadante, e determinação de sua concentração proteica (BRADFORD, 1976). O extrato com os antígenos solúveis totais foi separado em alíquotas e armazenado a -80 °C até sua utilização nos ensaios de ELISA indireto.

4.7.2. STAg para utilização em cultura de células

O sedimento de parasitos foi ressuspensionado com 9mL de água de injeção, e essa suspensão parasitária contendo aproximadamente 10^8 taquizoítos/mL foi submetida a doze ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C, e em seguida adicionado 1mL de PBS 10 vezes concentrado. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C e a coleta do sobrenadante, seguido de filtração em membrana com poro de 0,22 µm e determinação de sua concentração proteica (BRADFORD, 1976). O extrato estéril com os antígenos solúveis totais foi separado em alíquotas e armazenado a -80 °C até sua utilização nos ensaios de cultura de células.

4.8. ELISA indireto para a detecção de IgG total anti-*T. gondii*

Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para detecção de anticorpos IgG total presentes nas amostras de soro das pacientes e dos recém nascidos, foram realizados segundo a técnica descrita anteriormente (MINEO et al., 1986) com modificações. Placas de 96 poços com fundo chato e alta afinidade (Nunc MaxiSorp™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) foram sensibilizadas com STAg (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e posteriormente bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite

em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP – PBS-T-M5%) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens as amostras de soro foram adicionadas (diluídas a 1:64 em PBS-T-M5%) e incubadas por 1 hora a 37 °C. Em seguida, foram realizadas seis lavagens e adicionado o anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (DAKO North America, Fisher Scientific, Carpinteria, EUA), diluído a 1:2000 em PBS-T-M5% e incubado por 1 hora à 37 °C. Decorrido o tempo e seis novas lavagens, a reação foi revelada por meio da adição do substrato enzimático TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine – Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) pronto para uso. A reação foi finalizada pela adição de ácido fosfórico 1M. Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de microplacas (ENSPIRE, PerkinElmer, Waltham, EUA) a 450 nm. Além das amostras de interesse, foram adicionadas à placa, amostras controles negativo e positivo para confirmar que a reação ocorreu corretamente. Os níveis de anticorpos foram expressos em índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / \text{cut off}$, sendo o *cut off* calculado como a média da DO de soros controles negativos somada a três desvios padrões. Os valores de $IE \geq 1,2$ foram considerados positivos.

4.9. ELISA-avidez para anticorpos IgG total anti-*T. gondii*

Para determinar a avidez dos anticorpos IgG total anti-*T. gondii*, foi realizado o ELISA-avidez das amostras de soro das pacientes e dos recém nascidos. Esse ensaio avidez foi realizado conforme descrito no item 4.7 para dosagem de anticorpos IgG total anti-*T. gondii*, porém com uma etapa a mais. Após o bloqueio com PBS-T-M5%, as amostras de soro foram incubadas em duplicata (diluídas a 1:64 em PBS-T-M5%) por 1 hora a 37 °C. Em seguida, um dos poços com a amostra foi incubado com solução de uréia 8 M em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente, enquanto o outro poço da duplicata foi incubado somente com PBS, para avaliação da força de ligação entre os antígenos do parasito com os anticorpos das pacientes. Posteriormente, ambas os poços foram lavados seis vezes com PBS-T, e as etapas finais foram realizadas como descritas para o ELISA indireto de IgG total (item 4.7). Os resultados dos testes de avidez foram expressos por meio do índice Avidez (IA) em porcentagem (%), calculado de acordo com a seguinte fórmula: $IA = IE \text{ do poço com ureia} / IE \text{ do poço sem ureia} \times 100$. Sendo que IA de 0-30% correspondem à baixa avidez (fase aguda, indica que a infecção foi adquirida recentemente, aproximadamente nos últimos três meses); IA de 30-60% correspondem a avidez intermediária (período indeterminado da infecção),

enquanto IA de 60-100% correspondem a alta avidéz (fase crônica, indica que a infecção foi adquirida antes de três meses)

4.10. ELISA indireto para detecção de subclasses de IgG anti-*T. gondii*

A detecção de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*T. gondii* presentes nas amostras de soro das pacientes e dos recém nascidos foi feita por ELISA indireto, conforme a técnica descrita anteriormente (MINEO et al., 1986) com modificações. Placas de 96 poços com fundo chato e alta afinidade (Nunc MaxiSorp™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) foram sensibilizadas com STAg (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e posteriormente bloqueadas com PBS-T contendo 1% de BSA (Bovine Serum Albumin – AMRESCO, Solon, EUA) (PBS-T-BSA1%) durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, mais três lavagens foram realizadas e as amostras de soro adicionadas (diluídas a 1:64 em PBS-T-BSA), sendo incubadas por 2 horas a 37 °C. Após seis lavagens, foi adicionado cada anticorpo de detecção biotilado referente a uma subclasse de IgG humana (BD Biosciences, San Jose, EUA), sendo que o anti-IgG1, anti-IgG2 e anti-IgG3 foram diluídos a 1:1000 em PBS-T-BSA1%, enquanto que o anti-IgG4 foi diluído a 1:2000, seguido por um período de incubação de 1 hora à 37 °C. Decorrido o tempo e seis novas lavagens, o sinal da reação foi amplificado pela adição de estreptavidina-peroxidase (BD Biosciences, San Jose, EUA) diluída 1:1000 em PBS-T-BSA1%, e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. As etapas seguintes foram realizadas conforme descrito anteriormente para o ELISA indireto para detecção de IgG total anti-*T. gondii* (item 4.7).

4.11. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) das pacientes

As PBMC das gestantes foram separadas por gradiente de densidade utilizando-se Ficoll-Hypaque (d=1,077 g/mL; Histopaque-1077, Sigma-Aldrich). O sangue total de cada paciente (20 mL) coletado em tubos contendo Heparina de Sódio foi cuidadosamente colocado sobre 10 mL de uma solução de Ficoll-Hypaque em tubos plásticos cônicos de 50mL. Os tubos foram centrifugados a 400 x g por 20 minutos, a temperatura ambiente, sem aceleração e sem freio. Ao final da centrifugação, a nuvem de células (PBMC) formada na interface Ficoll-plasma foi coletada com pipeta e transferida para outro tubo do tipo Falcon de 50mL. O excesso de Ficoll presente na suspensão celular foi removido por meio de três

lavagens com 10mL de meio RPMI incompleto com centrifugação a 200 x g a 4 °C por 10 minutos. Após a última lavagem as células foram ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, e a quantidade de células determinadas por contagem em câmara de Neubauer, utilizando líquido de Turk. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar.

4.12. Cultura de células

Após a separação, as PBMCs (2×10^6 células/poço) de cada gestante foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços (BD Falcon® - Bedford, MA, EUA), em três condições distintas: ausência de estímulo (apenas com meio RPMI suplementado com 10% de SFB); estímulo policlonal (anticorpos anti-CD3 a 1µg/mL e anti-CD28 a 0,25µg/mL - BD Biosciences, EUA); e estímulo específico de *T. gondii* (STAg a 5µg/mL). As células foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C durante 96 horas. Decorridos os 4 dias, os sobrenadantes da cultura foram coletados e armazenados a -80 °C até a realização da análise de citocinas, e as células foram imediatamente utilizadas para a análise por citometria de fluxo.

4.13. Citometria de fluxo para análise da expressão de moléculas de superfície, citocinas e fator de transcrição

Durante o cultivo celular, nas últimas 6 horas de cultura as PBMC foram incubadas com solução Golgistop™ (BD Biosciences, EUA). Ao final das 96 horas da cultura, as células foram recolhidas, centrifugadas (400 x g, 4 °C, 5 minutos) e, em seguida, ressuspendidas e incubadas em PBS suplementado com 10% de soro humano AB+ (previamente submetido à inativação do sistema complemento), por 30 minutos. Em seguida, as células de cada condição da cultura foram divididas em 4 tubos distintos para realização de todas as marcações, sendo eles: tubo 1 (branco – sem adição de anticorpos); tubo 2 (anti-CD8-BB515, anti-PD-1-PE, anti-CD4-PE-Cy7 e anti-CD28-APC); tubo 3 (anti-CD25-FITC, anti-Foxp3-PE, anti-CD4-PE-Cy7 e anti-LAP-Alexa Fluor 647); tubo 4 (anti-IL17-Alexa Fluor 488, anti-IL10-PE, anti-CD4-PE-Cy7 e anti-IFN γ -Alexa Fluor 647) (BD Biosciences, EUA). A utilização dos anticorpos foi segundo as recomendações do fabricante. Após nova centrifugação (400 x g, 4 °C, 5 minutos), foram adicionados os anticorpos direcionados às moléculas de superfície das células, anti-CD8-BB515, anti-PD-1-PE, anti-CD4-PE-Cy7, anti-

CD28-APC, anti-CD25-FITC e anti-LAP-Alexa Fluor 647, cada um no seu respectivo tubo, e incubados por 30 minutos a 4°C e ao abrigo da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS para remover o excesso de anticorpos (400 x g, 4 °C, 5 minutos), fixadas e permeabilizadas com 100µL de Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, EUA), por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas com Permwash (BD Biosciences, EUA) para retirada do fixador e permeabilizador (400 x g, 4 °C, 5 minutos), sendo então adicionados os anticorpos direcionados às moléculas intracelulares, específicos para o fator de transcrição (anti-FOXP3-PE) e para as citocinas (anti-IL17-Alexa Fluor 488, anti-IL10-PE e anti-IFN γ -Alexa Fluor 647), cada um no seu respectivo tubo, e incubados por 30 minutos a 4 °C e ao abrigo da luz. Ao final deste período as células foram novamente lavadas com Permwash (400 x g, 4 °C, 5 minutos), seguidas de uma lavagem com PBS (400 x g, 4 °C, 5 minutos) e ressuspendidas em 100µL de paraformoldeído 0,5% e armazenadas no escuro à 4 °C, até o momento da análise no citômetro de fluxo. Paralelamente aos tubos marcados foram utilizados isotipos controles compatíveis com as fluorescências utilizadas. A aquisição dos 50.000 eventos foi realizada em citômetro FACSCantoII (BD Biosciences, EUA) utilizando o programa Diva 6.0. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa FlowJo 10.6.1.

4.14. Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura por CBA

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A presentes no sobrenadante de cultura foram dosadas pela técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando o BDTM CBA *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (Catálogo: 560484), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, as citocinas recombinantes do kit, em diluições seriadas (curva padrão), e as amostras de sobrenadante de cultura de PBMC das pacientes foram incubadas com microesferas de intensidade de fluorescência distintas, cada microesfera é revestida com um anticorpo de captura específico para uma citocina. Em seguida, sem lavagens, foram adicionados anticorpos de detecção conjugados com ficoeritrina (PE), específicos para cada citocina. Após incubação por 3 horas à temperatura ambiente, as microesferas foram lavadas com solução própria do *kit* e realizada a aquisição dos dados em citômetro FACSCalibur (BD Biosciences, EUA), utilizando o programa Cell Quest (BD Biosciences, EUA). As microesferas específicas para cada citocina foram separadas por emitirem intensidades diferentes de fluorescência emitida à 660nm e a quantidade de citocina ligada a cada uma delas, pela intensidade de fluorescência emitida à 585nm. A análise dos resultados foi realizada pelo software FCAP Array 2.0 (BD Biosciences, EUA), e as concentrações das

citocinas calculadas a partir da curva padrão. O limite de detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17 foram respectivamente de 2,6; 4,9; 2,4; 4,5; 3,8; 3,7 e 18,9 pg/mL.

4.15. Análise estatística

A análise estatística de todos os dados foi realizada utilizando-se o software *GraphPad Prism* versão 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

As variáveis: glicemias do TOTG, idade das gestantes, níveis de IgG total das gestantes e recém-nascidos e IgG avides das gestantes, seguiram a distribuição normal, portanto foram analisadas pelos testes paramétricos Teste t não pareado (comparação entre os grupos) e Teste t pareado (comparação dentro do grupo).

Todas as outras variáveis estudadas não seguiram a distribuição normal, portanto para as análises realizadas entre os grupos DMG e controle foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney, enquanto para as análises dentro de cada grupo foi utilizado o teste não paramétrico Wilcoxon.

Além disso, também foi realizado o teste não paramétrico de Spearman para correlacionar os valores de glicemia do TOTG com os níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG avides das gestantes.

Para todos os testes, os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.16. Normas de biossegurança

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).



5. Resultados

5.1. Caracterização da amostra

Neste estudo foram envolvidas 81 gestantes no terceiro trimestre de gestação, divididas em dois grupos distintos: controle e DMG, de acordo com o diagnóstico médico de DMG e os resultados do TOTG.

As amostras de sangue para a realização do estudo foram coletadas no terceiro trimestre de gestação, sendo que a média da idade gestacional das pacientes do grupo DMG e controle foram, respectivamente, de 35,1 e 35 semanas. Adicionalmente, foi possível analisar uma amostra de soro anterior ao terceiro trimestre de gestação de 23 pacientes (11 DMG e 12 controles), sendo a média de 15 e 14 semanas antes da amostra de terceiro trimestre, para os grupos DMG e controle, respectivamente.

Os valores do TOTG obtidos no prontuário de cada paciente possibilitou a comparação da glicemia entre cada grupo, nos três tempos do exame. Os valores glicêmicos de jejum, 1 hora e 2 horas após ingestão de 75g de dextrose do grupo DMG (média: 101,0; 170,1 e 147,2 mg/dL, respectivamente) foram estatisticamente maiores ($p < 0,0001$, teste t não pareado) que os valores do grupo controle (média: 79,2; 114,8 e 101,1 mg/dL, respectivamente) (Figura 1).

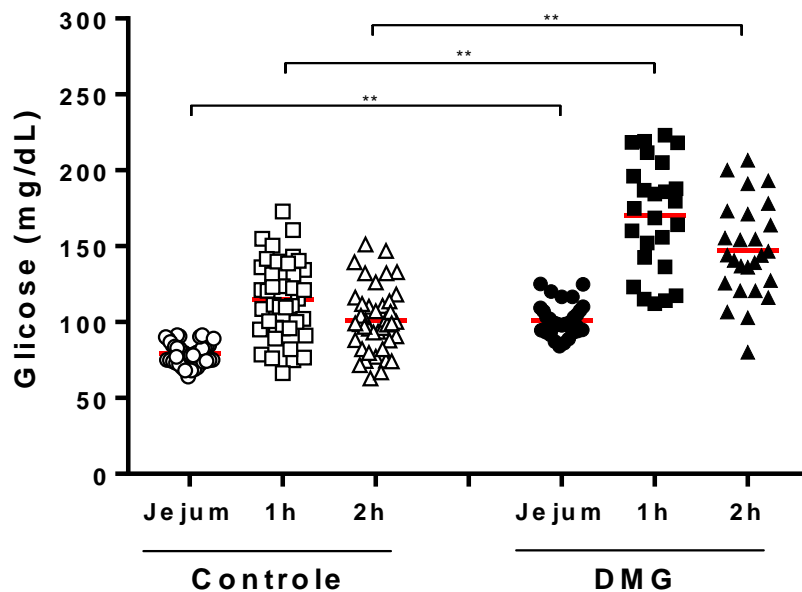


Figura 1. Valores médios das glicemias de jejum, 1 hora e 2 horas após ingestão de 75g dextrose, das gestantes do grupo controle e DMG. Os valores do *cut-off* para o diagnóstico de diabetes *mellitus* gestacional são: Jejum > 92 mg/dL; 1 hora \geq 180 mg/dL, 2 horas \geq 153 mg/dL. A linha vermelha representa a média dos valores. **Dados estatisticamente significantes ($p < 0,0001$, teste t não pareado). DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional.

O grupo controle foi constituído por 47 gestantes com média de idade de 27,4 anos (mediana de 26 anos, intervalo de 18 – 41 anos, desvio padrão de 5,5). Enquanto o grupo DMG foi constituído por 34 gestantes com média de idade de 31,5 anos (mediana de 31 anos, intervalo de 21 – 43 anos, desvio padrão de 6,1). A média de idade das gestantes diabéticas foi significativamente maior que a das gestantes do grupo controles ($p=0,0022$).

Para ambos os grupos, o grau de escolaridade e a renda familiar foi similar, com predominância de ensino médio completo (48,9% e 38,2% para grupo controle e grupo DMG, respectivamente), e renda de até dois salários mínimos (76,6% e 85,3% para grupo controle e grupo DMG, respectivamente).

O estudo também envolveu 45 dos recém-nascidos dessas mulheres que participaram do trabalho, sendo 25 do grupo controle e 20 do grupo DMG. O número reduzido de recém-nascidos em relação ao número de gestantes é devido a dois fatores: ou a mulher não autorizou a utilização do sangue de cordão umbilical, ou o parto não foi realizado no HC-UFTM, e assim não foi possível adquirir a amostra.

5.2. Avaliação da resposta imune humoral específica a *T. gondii*

A resposta imune humoral anti- *T. gondii* foi avaliada, com os ensaios de ELISA indireto, pelos anticorpos IgG total e suas subclasses específicos ao parasito, nos soros das gestantes e dos recém-nascidos. Assim, foi possível detectar no soro das gestantes, anticorpos IgG total, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em 100%, 97,9%, 4,3%, 6,4% e 17% das pacientes do grupo controle, e em 100%, 97,1%, 2,9%, 5,9% e 23,5% das pacientes do grupo DMG, respectivamente. No soro dos recém-nascidos essa positividade foi, respectivamente, de 100%, 100%, 0%, 4% e 12% no grupo controle, e de 100%, 100%, 5%, 0% e 20% no grupo DMG (Tabela 1). Para todos os resultados positivos dos recém-nascidos, a mãe também apresentou positividade para a respectiva imunoglobulina.

Tabela 1. Número e porcentagem de gestantes com e sem Diabetes *Mellitus* Gestacional (DMG) e seus recém-nascidos, em relação a soropositividade para anticorpos anti-*T. gondii*.

Anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	Número de amostras positivas n (%)			
	Gestante		Recém-nascido	
	Controle n=47	DMG n=34	Controle n=25	DMG n=20
IgG total	47 (100%)	34 (100%)	25 (100%)	20 (100%)
IgG1	46 (97,9%)	33 (97,1%)	25 (100%)	20 (100%)
IgG2	2 (4,3%)	1 (2,9%)	0	1 (5%)
IgG3	3 (6,4%)	2 (5,9%)	1 (4%)	0
IgG4	8 (17%)	8 (23,5%)	3 (12%)	4 (20%)

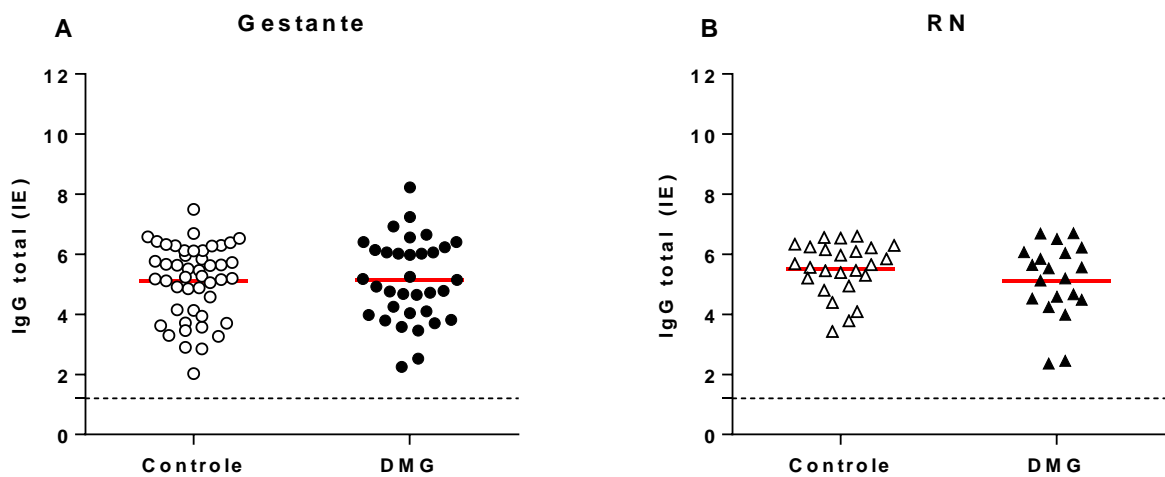


Figura 2. Níveis de anticorpos IgG total anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), em amostras de (A) 81 gestantes (47 controles e 34 DMG) e (B) 45 recém-nascidos (25 controles e 20 DMG). A linha vermelha representa a média dos valores. A linha tracejada representa o valor do *cut-off* (IE:1,2). DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional.

A análise dos níveis de anticorpos IgG total anti-*T. gondii* revelou que todas as amostras foram positivas, mas não houve diferenças estatísticas entre os valores das gestantes (Figura 2A) do grupo controle (média: 5,11) e do grupo DMG (média: 5,13), $p=0,9567$; nem entre os valores dos recém-nascidos (Figura 2B) do grupo controle (média: 5,51) e do grupo DMG (média: 5,12), $p=0,2153$.

Também não houve diferenças estatísticas entre os níveis dos anticorpos das subclasses de IgG específicas ao parasito, quando comparado os valores entre os grupos de gestantes (Figura 3A), e entre os grupos de recém-nascidos (Figura 3B). As medianas dos valores para as gestantes do grupo controle e DMG foram respectivamente de: IgG1 (4,26 e 3,85, $p=0,2738$), IgG2 (0,57 e 0,52, $p=0,1054$), IgG3 (0,61 e 0,67, $p=0,7016$) e IgG4 (0,76 e 0,66, $p=0,6736$). As medianas dos valores para os recém-nascidos do grupo controle e DMG foram, respectivamente, de: IgG1 (5,18 e 4,67, $p=0,6146$), IgG2 (0,60 e 0,55, $p=0,7730$), IgG3 (0,62 e 0,63, $p=0,8078$) e IgG4 (0,78 e 0,78, $p=0,8965$). É possível observar que, entre as subclasses, houve predominância de IgG1 na resposta contra *T. gondii*, tanto nas amostras das gestantes, quanto nas amostras dos recém-nascidos, e que o número de pacientes positivos para as demais subclasses foi bem pequeno, principalmente para IgG2 e IgG3 (Tabela 1 e Figura 3).

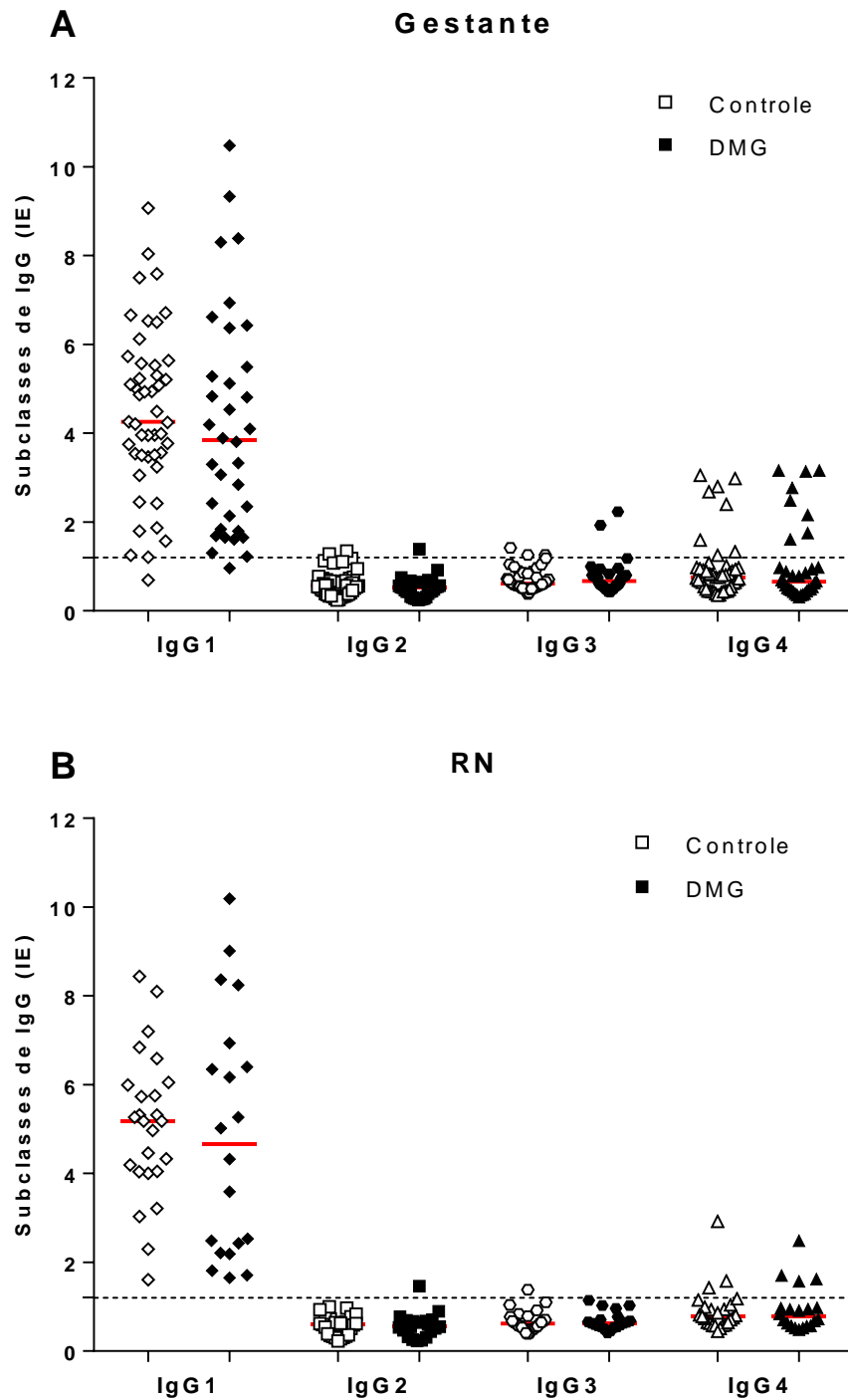


Figura 3. Níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), em amostras de (A) 81 gestantes (47 controles e 34 DMG) e (B) 45 recém-nascidos (25 controles e 20 DMG). A linha vermelha representa a mediana dos valores. A linha tracejada representa o valor do *cut-off* (IE:1,2). DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional.

Como demonstrado na figura 2A, os níveis de IgG total anti-*T. gondii* foram semelhantes, e sem diferença estatística, entre os dois grupos de gestantes. Porém, os níveis

desses anticorpos foram correlacionados com os valores de glicemia do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) das pacientes dos grupos controle e DMG (Figura 4), e essa análise indicou que existe uma correlação negativa entre esses dois parâmetros. Ou seja, quanto maiores os índices glicêmicos, menores são os níveis de IgG total anti-*T. gondii*. Essa correlação negativa foi observada para os 3 tempos do TOTG (jejum, 1h e 2h), sendo que os valores estatisticamente significantes foram encontrados na avaliação da glicemia de 1h após a ingestão da dextrose.

Essa análise de correlação foi realizada tanto nos grupos controle e DMG separadamente, quanto considerando todas as pacientes ao mesmo tempo. No tempo em jejum, para o grupo controle ($r = -0,0045$, $p = 0,9760$), para o grupo DMG ($r = -0,2212$, $p = 0,2087$) e para todas as pacientes em conjunto ($r = -0,0473$, $p = 0,6770$) a correlação negativa não foi estatisticamente significativa (Figura 4A). No tempo de 2h, para o grupo controle ($r = -0,1281$, $p = 0,4246$), para o grupo DMG ($r = -0,1730$, $p = 0,3980$) e para todas as pacientes em conjunto ($r = -0,1443$, $p = 0,2439$) a correlação negativa também não foi estatisticamente significativa (Figura 4C). E no tempo de 1h, a correlação negativa não foi significativa quando analisado somente o grupo controle ($r = -0,1944$, $p = 0,2294$), mas a análise de todas as pacientes em conjunto demonstrou uma correlação negativa significativa ($r = -0,2790$, $p = 0,0244$), e no grupo DMG essa correlação negativa foi ainda mais significativa ($r = -0,6228$, $p = 0,0009$) (Figura 4B).

Os mesmos resultados foram encontrados para a correlação entre os níveis de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* e os resultados de glicemia do TOTG (Figura 5). Da mesma forma, essa correlação foi realizada tanto nos grupos controle e DMG separadamente, quanto considerando todas as pacientes ao mesmo tempo. No tempo em jejum, para o grupo controle ($r = -0,1139$, $p = 0,4509$), para o grupo DMG ($r = -0,2994$, $p = 0,0854$) e para todas as pacientes em conjunto ($r = -0,2008$, $p = 0,0741$) a correlação negativa não foi estatisticamente significativa (Figura 5A). No tempo de 1h, a correlação negativa não foi significativa quando analisado somente o grupo controle ($r = -0,2980$, $p = 0,0618$), mas a análise das pacientes DMG ($r = -0,5746$, $p = 0,0027$) e de todas as pacientes em conjunto ($r = -0,3821$, $p = 0,0017$) demonstraram uma correlação negativa significativa (Figura 5B). E para essa subclasse de IgG, no tempo de 2h, para o grupo controle ($r = -0,2369$, $p = 0,1358$) e para o grupo DMG ($r = -0,1938$, $p = 0,3427$) a correlação negativa também não foi significativa, mas quando analisado todas as pacientes em conjunto ($r = -0,2802$, $p = 0,0216$) essa correlação negativa foi estatisticamente significativa (Figura 5C). Portanto, quanto maiores os índices glicêmicos, menores são os níveis de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii*.

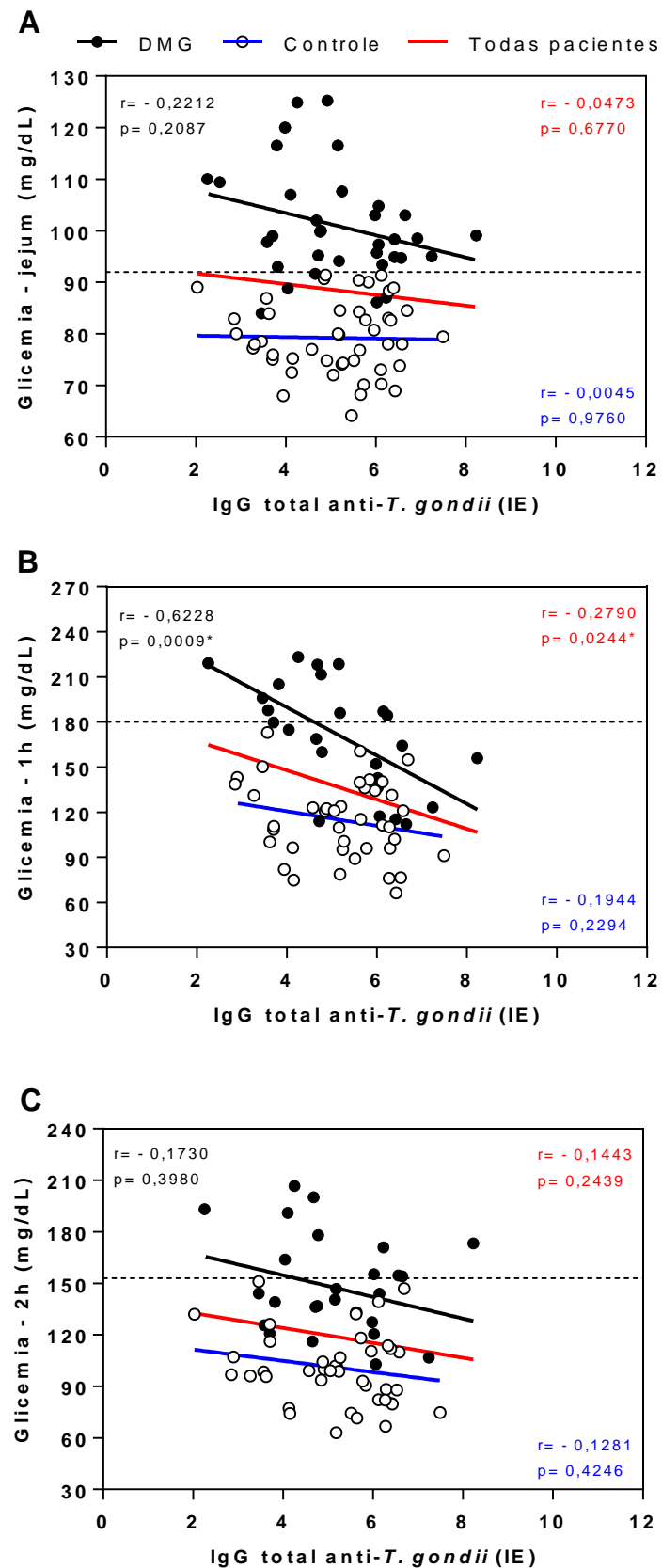


Figura 4. Correlação entre os valores de glicemia do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e os níveis de IgG total anti-*T. gondii* das gestantes dos grupos controle e DMG. **(A)** Glicemia de jejum, **(B)** Glicemia de 1 hora após dextrose e **(C)** Glicemia de 2 horas após dextrose. As linhas tracejadas representam os valores do *cut-off* para o diagnóstico de diabetes *mellitus* gestacional (Jejum > 92 mg/dL; 1 hora ≥ 180 mg/dL, 2 horas ≥ 153 mg/dL). *Dados estatisticamente significantes, teste de correlação de Spearman. IE: Índice ELISA. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional.

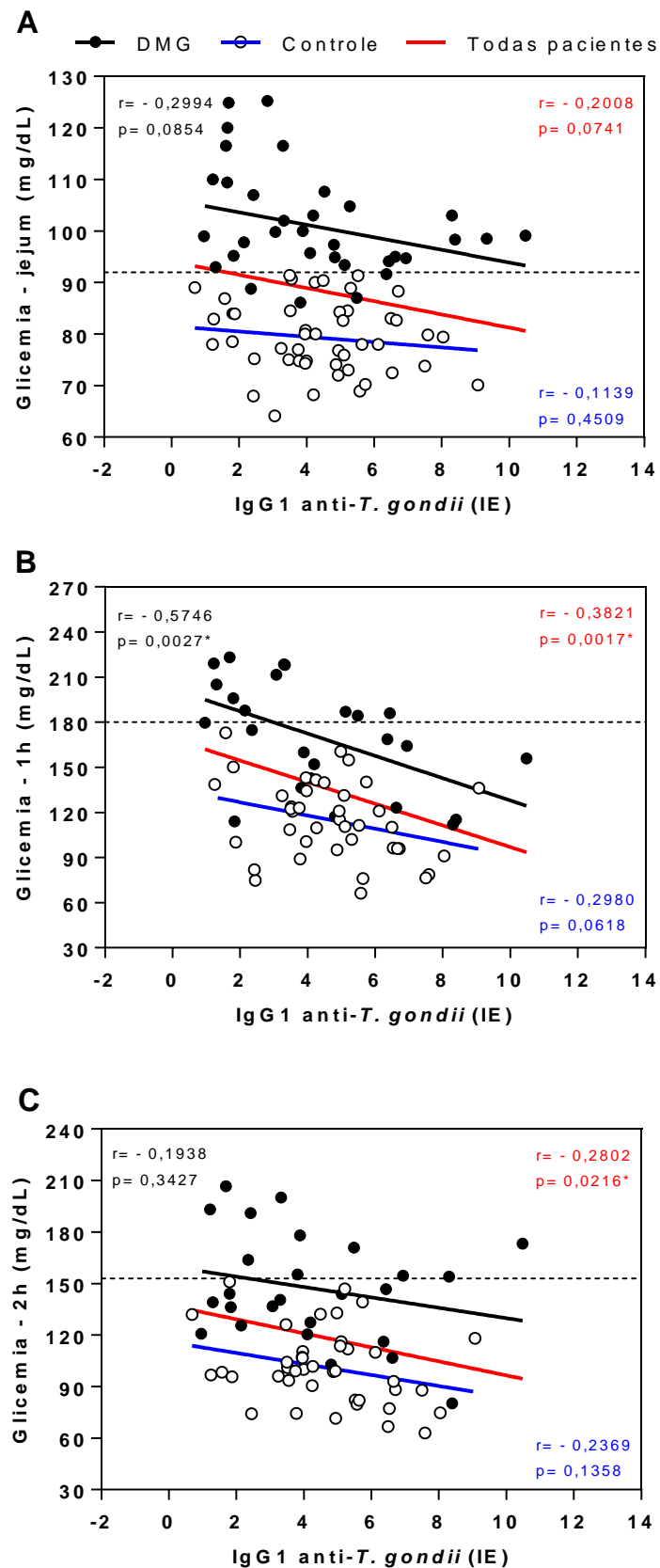


Figura 5. Correlação entre os valores de glicemia do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e os níveis de IgG1 anti-*T. gondii* das gestantes dos grupos controle e DMG. (A) Glicemia de jejum, (B) Glicemia de 1 hora após dextrose e (C) Glicemia de 2 horas após dextrose. As linhas tracejadas representam os valores do *cut-off* para o diagnóstico de diabetes *mellitus* gestacional (Jejum > 92 mg/dL; 1 hora ≥ 180 mg/dL, 2 horas ≥ 153 mg/dL). *Dados estatisticamente significantes, teste de correlação de Spearman. IE: Índice ELISA. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional.

Além disso, o ensaio de ELISA avidez para a determinação do índice avidez (IA) dos anticorpos IgG total anti-*T. gondii* de todas as pacientes, evidenciou que a avidez de IgG das gestantes diabéticas (média: 85,1%) foi significativamente menor que das gestantes não diabéticas (média: 90,94%), $p < 0,0001$ (Figura 6A), mas essa diferença não ocorreu na avidez dos anticorpos IgG dos recém-nascidos (RN), nem quando comparado entre os dois grupos de recém-nascidos (91,53% controle vs 87,31% DMG, $p = 0,0799$), nem quando comparado os recém-nascidos com suas respectivas mães (92,88% mãe vs 91,53% RN, $p = 0,9218$ para o grupo controle, e 84,87% mãe vs 87,31% RN, $p = 0,1650$ para o grupo DMG) (Figura 6B).

Também foi possível analisar a avidez de IgG em amostra anterior ao terceiro trimestre de gestação, de 11 pacientes do grupo DMG e 12 pacientes do grupo controle. Sendo assim, foi obtido o resultado pareado (amostra prévia e amostra de 3º trimestre) de 23 pacientes (Figura 6C). Foi possível observar que a avidez de IgG das pacientes diabéticas (média: 90,2%) não era menor que das pacientes não diabéticas (média: 91,34%) antes do 3º trimestre de gestação, $p = 0,7225$. Ou seja, a avidez de IgG foi significativamente menor no grupo DMG (média: 84,68%) em relação ao grupo controle (média: 91,5%) apenas no 3º trimestre/final da gestação, $p = 0,0266$. O mais interessante é que a avidez desse anticorpo diminuiu no 3º trimestre somente nas pacientes diabéticas ($p = 0,0486$), enquanto nas pacientes controles não houve diferença significativa entre a amostra prévia e a amostra do 3º trimestre ($p = 0,9371$).

Para concluir a avaliação da resposta imune humoral desse trabalho, foi realizada a correlação entre os valores de avidez de IgG anti-*T. gondii* e os resultados de TOTG das gestantes, que mostrou significativa correlação negativa entre o índice avidez e os níveis de glicemia, nos 3 tempos do exame (jejum, 1h e 2h), quando considerado todas as pacientes em conjunto ($r = - 0,3497$, $p = 0,0015$; $r = - 0,5005$, $p < 0,0001$; $r = - 0,3442$, $p = 0,0043$, respectivamente) (Figura 7). Portanto, quanto maior o índice glicêmico, menor a avidez de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

Quando analisado cada um dos grupos separadamente, no tempo em jejum, para o grupo controle ($r = - 0,0882$, $p = 0,5598$) e para o grupo DMG ($r = - 0,0163$, $p = 0,9269$) a correlação negativa não foi estatisticamente significante (Figura 7A). No tempo de 1h, a correlação negativa também não foi significativa no grupo controle ($r = - 0,1767$, $p = 0,2755$), mas foi bastante significativa no grupo DMG ($r = - 0,5108$, $p = 0,0091$) (Figura 7B). E no tempo de 2h, para o grupo controle a correlação foi positiva sem significância ($r = 0,0308$, $p = 0,8482$), enquanto para o grupo DMG a correlação negativa também não foi significativa ($r = - 0,1282$, $p = 0,5325$) (Figura 7C).

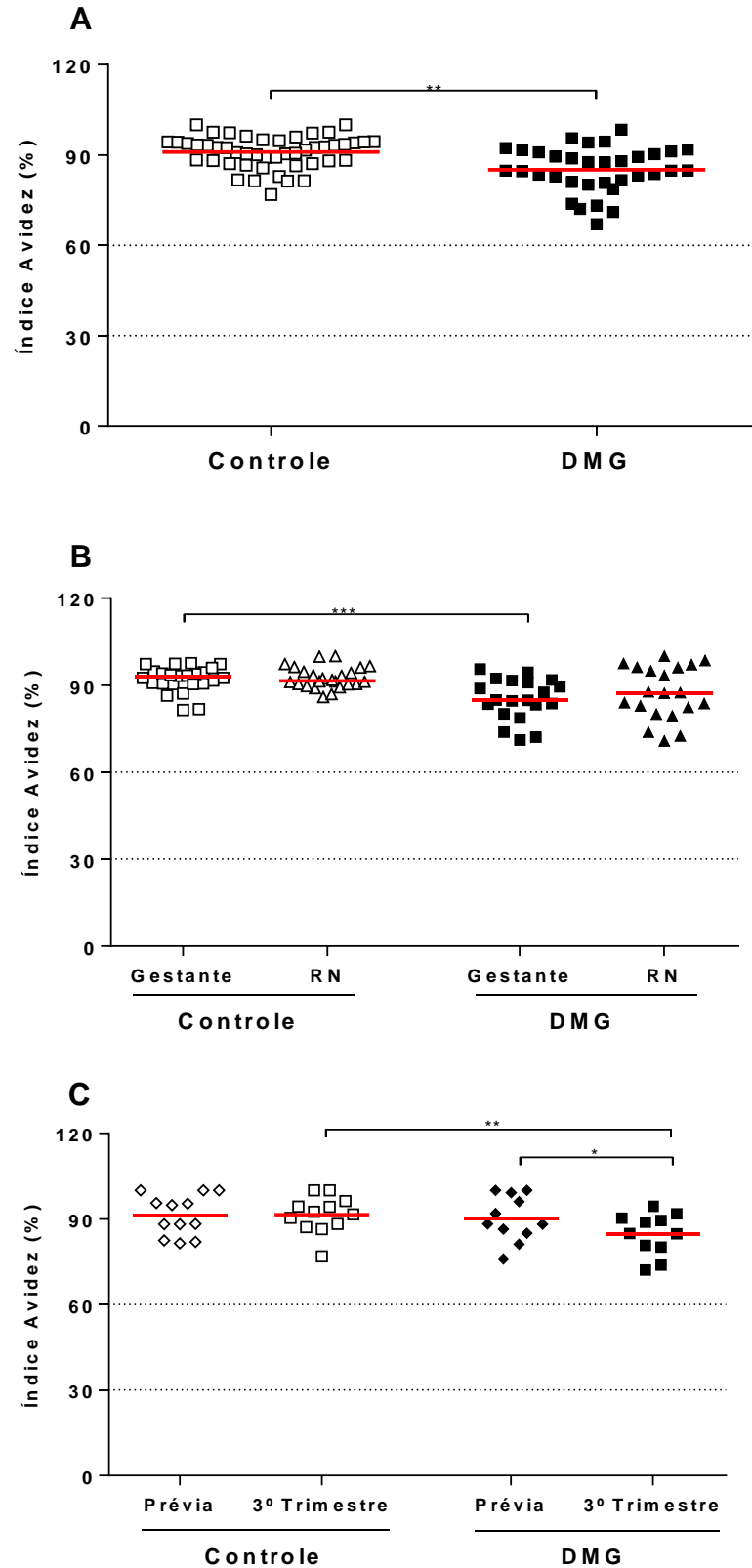


Figura 6. Índice avidéz dos anticorpos IgG total anti-*T. gondii*, expresso em porcentagem (%). **(A)** Amostras do 3º trimestre de gestação de 81 gestantes (47 controles e 34 DMG). **(B)** Amostras do 3º trimestre de gestação de 45 gestantes (25 controles e 20 DMG) e amostras dos respectivos recém-nascidos (RN). **(C)** Amostras prévias e amostras do 3º trimestre de gestação de 23 gestantes (12 controles e 11 DMG). As linhas pontilhadas demarcam as áreas que representam baixa avidéz (0-30%), avidéz indeterminada (30-60%) e alta avidéz (>60%). A linha vermelha em A e C representa a média dos valores, e em B representa a mediana dos valores. Dados estatisticamente significantes, $p < 0,05$ *Teste t pareado **Teste t não pareado ***Mann-Whitney. DMG: Diabetes Mellitus Gestacional.

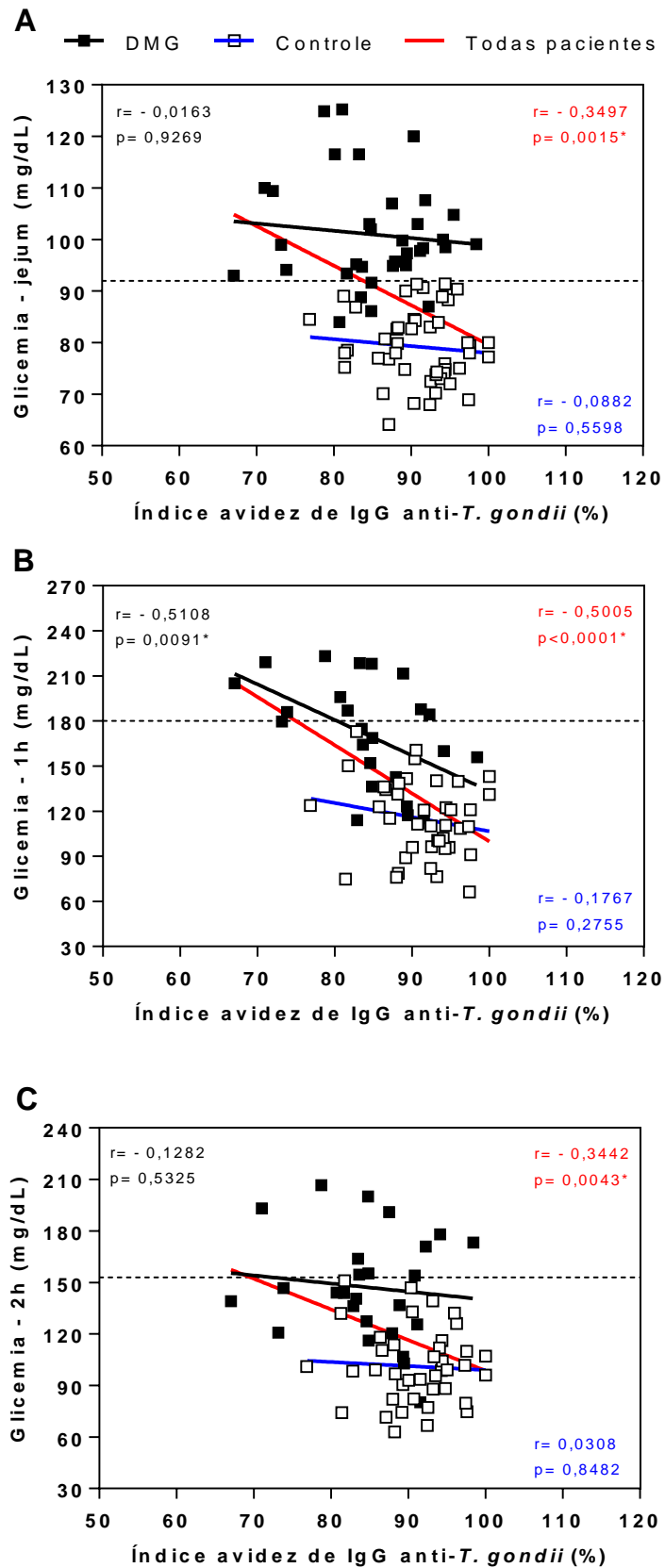


Figura 7. Correlação entre os valores de glicemia do Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) e o índice avidéz de IgG total anti-*T. gondii* das gestantes dos grupos controle e DMG. **(A)** Glicemia de jejum, **(B)** Glicemia de 1 hora após dextrose e **(C)** Glicemia de 2 horas após dextrose. As linhas tracejadas representam os valores do *cut-off* para o diagnóstico de diabetes *mellitus* gestacional (Jejum > 92 mg/dL; 1 hora ≥ 180 mg/dL, 2 horas ≥ 153 mg/dL). *Dados estatisticamente significantes, teste de correlação de Spearman. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional.

5.3. Avaliação da resposta imune celular

5.3.1. Ativação e exaustão de linfócitos T

O co-receptor CD28 e o receptor *programmed cell death-1* (PD-1), que são respectivamente marcadores de ativação e exaustão celular, foram analisados, por citometria de fluxo, em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ obtidos de células PBMC das gestantes dos grupos controle e DMG, após 96 horas de cultura nas três condições distintas (meio ou anti-CD3/anti-CD28 ou STAg) (Figura 8).

A figura 8A esquematiza o processo utilizado para separar as *gates*, na análise dos dados de ativação e exaustão celular, obtidos pela citometria de fluxo.

A quantidade, em porcentagem, de células T CD8⁺ (Figura 8B) e T CD4⁺ (Figura 8F) foram analisadas para os dois grupos de gestantes, e foi possível observar que quando as células PBMCs foram estimuladas com anti-CD3/anti-CD28, houve aumento significativo de linfócitos T CD8⁺, e diminuição significativa de linfócitos T CD4⁺, em relação às células cultivadas apenas com meio, tanto no grupo controle ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente), quanto no grupo DMG ($p = 0,0004$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Quando comparado entre os dois grupos de gestantes, não houve diferença significativa na quantidade de células T CD4⁺, em nenhuma das três condições de cultura: meio, anti-CD3/anti-CD28 e STAg ($p = 0,8017$, $p = 0,8747$ e $p > 0,9999$, respectivamente). Por outro lado, as gestantes diabéticas apresentaram maiores quantidades de células T CD8⁺ em relação às gestantes não diabéticas, e essa diferença foi significativa tanto na condição basal de cultura, apenas com meio ($p = 0,0253$), quanto sob estímulo de antígeno específico de *T. gondii* ($p = 0,0378$).

A análise da expressão do co-receptor CD28 revelou que altas quantidades de linfócitos T CD8⁺ expressaram esse receptor na sua superfície, e que não houve mudança dessa quantidade em nenhuma das três condições de cultura, e nem entre os dois grupos de gestantes estudados (Figura 8C). Além disso, altas quantidades de linfócitos T CD4⁺ também expressaram CD28 na sua superfície, porém no grupo controle ($p = 0,0092$) e no grupo DMG ($p < 0,0001$) foi detectado menor quantidade de células T CD4⁺ CD28⁺ quando PBMCs foram estimuladas com anti-CD3/anti-CD28, em relação à cultura somente com meio. Além disso, comparando os dois grupos de gestantes, observou-se que, com estímulo de anti-CD3/anti-CD28, as pacientes diabéticas expressaram mais células T CD4⁺ CD28⁺ do que as pacientes controles ($p = 0,0025$) (Figura 8G).

Avaliando a expressão de PD-1 nos linfócitos das pacientes, foi observado que os estímulos policlonal e específico de *T. gondii* aumentaram de forma significativa o número de células T CD8⁺ expressando PD-1 em sua superfície, em ambos os grupos de gestantes: controle ($p < 0,0001$ e $p = 0,0021$, respectivamente) e DMG ($p < 0,0001$ e $p = 0,0027$, respectivamente). Porém, não houve diferença na quantidade de linfócitos T CD8⁺PD-1⁺ entre os dois grupos de pacientes (Figura 8D). Da mesma forma, os dois estímulos utilizados em cultura também elevaram significativamente o número de células T CD4⁺ expressando PD-1 em sua superfície, em ambos os grupos de gestantes ($p < 0,0001$). E a comparação entre grupos revelou que no estado basal da cultura (células não estimuladas) as gestantes diabéticas apresentaram mais células T CD4⁺PD-1⁺ do que as pacientes do grupo controle ($p = 0,0038$) (Figura 8H).

Também foram investigados os linfócitos que expressavam a dupla marcação desses receptores: CD28 e PD-1, e foi encontrado que no grupo controle e no grupo DMG os estímulos anti-CD3/anti-CD28 e STAg aumentaram significativamente a quantidade de células T CD8⁺CD28⁺PD-1⁺ ($p < 0,05$) (Figura 8E) e de células T CD4⁺CD28⁺PD-1⁺ ($p < 0,0001$) (Figura 8I). Adicionalmente, sob estímulo policlonal, o número de células T CD8⁺ e CD4⁺ expressando concomitantemente os dois receptores foi significativamente maior nas pacientes do grupo DMG ($p = 0,0211$ e $p = 0,0019$, respectivamente) (Figuras 8E e 8I). Nas diabéticas também foi significativamente maior o número de células T CD4⁺CD28⁺PD-1⁺ mesmo na ausência de estímulo (estado basal) ($p = 0,0022$) (Figura 8I).

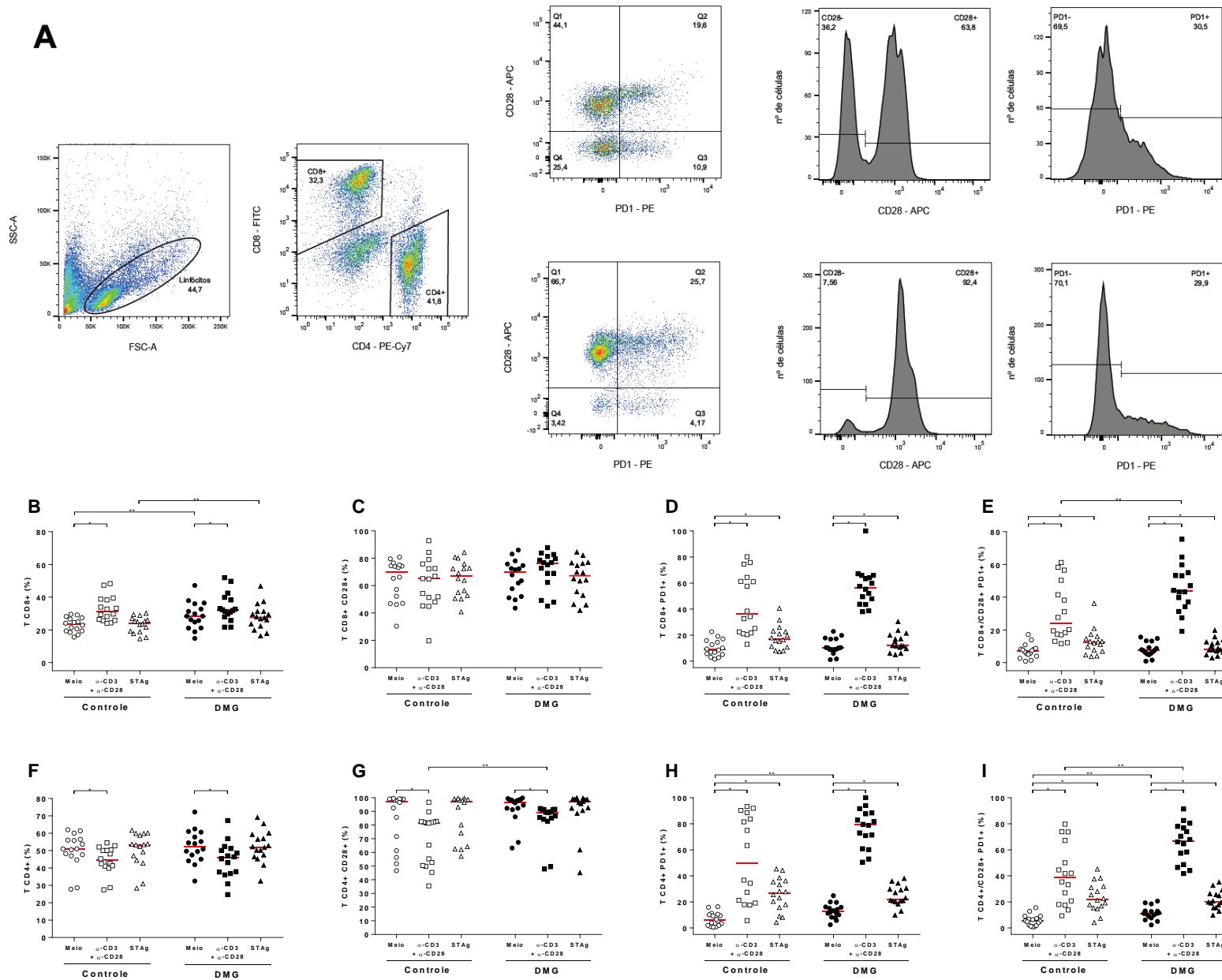


Figura 8. Ativação e exaustão celular de linfócitos T, avaliados pela expressão dos receptores de superfície celular: CD28 e PD-1. **(A)** Representação do processo utilizado para separar as *gates* na citometria. Porcentagem de células T **(B)** CD8⁺, **(C)** CD8⁺CD28⁺, **(D)** CD8⁺PD-1⁺, **(E)** CD8⁺CD28⁺PD-1⁺, **(F)** CD4⁺, **(G)** CD4⁺CD28⁺, **(H)** CD4⁺PD-1⁺ e **(I)** CD4⁺CD28⁺PD-1⁺, que foram adquiridas por citometria de fluxo das células PBMCs de 32 gestantes (16 controles e 16 DMG) após 96h cultura nas três condições distintas (somente meio de cultura, estímulo policlonal de α-CD3/α-CD28, e estímulo específico de STAg). A linha vermelha representa a mediana dos valores. Dados estatisticamente significantes, $p < 0,05$ *Wilcoxon **Mann-Whitney. DMG: Diabetes Mellitus Gestacional.

5.3.2. Produção intracelular de citocinas por linfócitos T CD4⁺

A produção intracelular das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-17 pelas células T CD4⁺ das gestantes foi avaliada por citometria de fluxo, pela imunofenotipagem das PBMCs das pacientes, após 96h de cultura com estímulo de anti-CD3/anti-CD28 ou de antígenos solúveis de *T. gondii* ou sem estímulo (Figura 9).

A figura 9A representa o processo utilizado para separar as *gates*, e identificar os linfócitos CD4⁺ produtores dessas citocinas, na citometria de fluxo.

Tanto no grupo controle, quanto no grupo DMG foi possível observar que ao comparar com a condição basal de cultura (sem estímulo), o estímulo de anti-CD3/anti-CD28 e o estímulo de STAg aumentaram significativamente o percentual de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ (IFN⁺) ($p < 0,0001$, Figura 9B), bem como o percentual de células T CD4⁺ produtoras de IL-10 (IL10⁺) ($p < 0,01$, Figura 9C), e também o percentual de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 (IL17⁺) ($p < 0,01$, Figura 9D).

A comparação entre os grupos revelou que, sob estímulo policlonal e sob estímulo de antígeno de *T. gondii*, as pacientes diabéticas apresentaram percentual significativamente menor de células T CD4⁺IFN⁺ ($p = 0,0468$ e $p = 0,0267$, respectivamente, Figura 9B). Além disso, sob o estímulo de STAg, as pacientes diabéticas também apresentaram percentual significativamente menor de células T CD4⁺IL10⁺ ($p = 0,0002$, Figura 9C) e células T CD4⁺IL17⁺ ($p = 0,0012$, Figura 9D).

Também foram analisadas as células T CD4⁺ dupla produtoras de citocinas, e igualmente para a produção de cada citocina separada, tanto no grupo controle quanto no grupo DMG, ao comparar com a condição basal de cultura (sem estímulo), o estímulo de anti-CD3/anti-CD28 e o estímulo de STAg aumentaram significativamente o percentual de células T CD4⁺ dupla produtora de IFN- γ e IL-10 (CD4⁺IFN⁺IL10⁺) ($p < 0,001$, Figura 9E), bem como o percentual de células T CD4⁺ dupla produtora de IFN- γ e IL-17 (CD4⁺IFN⁺IL17⁺) ($p < 0,001$, Figura 9F), e também o percentual de células T CD4⁺ dupla produtora de IL-17 e IL-10 (CD4⁺IL17⁺IL10⁺) ($p < 0,01$, Figura 9G).

Do mesmo modo, foi realizada a comparação entre os grupos controle e DMG, e sob o estímulo de STAg as pacientes diabéticas apresentaram menor quantidade de células T CD4⁺ dupla produtora de citocinas, em relação às pacientes controles, sendo que essa diferença não foi significativa para T CD4⁺IFN⁺IL17⁺ ($p = 0,0574$, Figura 9F), mas significativa para T CD4⁺IFN⁺IL10⁺ ($p = 0,0379$, Figura 9E) e T CD4⁺IL17⁺IL10⁺ ($p = 0,0007$, Figura 9G).

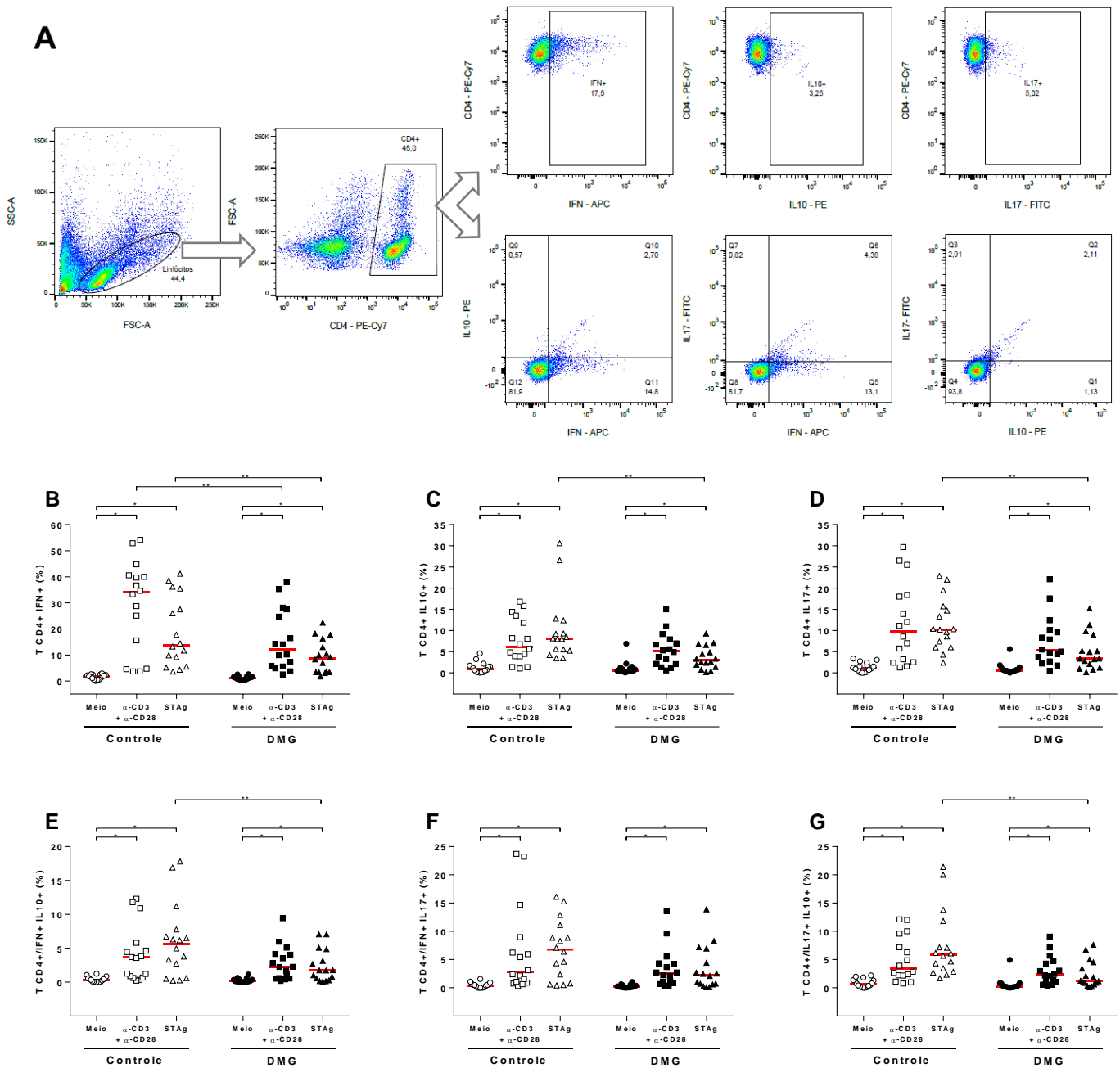


Figura 9. Produção intracelular de citocinas por linfócitos T CD4⁺ (A) Representação do processo utilizado para separar as gates na citometria. Porcentagem de células T CD4⁺ (B) produtoras de IFN- γ , (C) produtoras de IL-10, (D) produtoras de IL-17, (E) dupla produtora de IFN- γ e IL-10, (F) dupla produtora de IFN- γ e IL-17, (G) dupla produtora de IL-17 e IL-10, que foram adquiridas por citometria de fluxo das células PBMCs de 32 gestantes (16 controles e 16 DMG) após 96h cultura nas três condições distintas (somente meio de cultura, estímulo policlonal de α -CD3/ α -CD28, e estímulo específico de STAg). A linha vermelha representa a mediana dos valores. Dados estatisticamente significantes, $p < 0,05$ *Wilcoxon **Mann-Whitney. DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional.

5.3.3. Produção de citocinas pelas PBMCs

As citocinas produzidas pelas células PBMCs das pacientes envolvidas no estudo, foram quantificadas no sobrenadante da cultura dessas células após 96h de estímulo policlonal (α -CD3/ α -CD28) ou estímulo específico de *T. gondii* (STAg), bem como na ausência de estímulo (somente meio de cultura). A Figura 10 representa os níveis (em pg/mL) de todas as citocinas que foram dosadas, nas três condições de cultura e nos dois grupos de gestantes: IFN- γ , IL-10, IL-17, IL-4, TNF, IL-6 e IL-2.

Em ambos os grupos, a produção de IFN- γ foi significativamente maior quando as células das pacientes foram estimuladas, tanto com o estímulo policlonal ($p < 0,0001$), quanto com o estímulo específico de *T. gondii* ($p < 0,0001$). Porém, não houve diferença estatística na produção dessa citocina pelas células das gestantes do grupo controle em relação às gestantes do grupo DMG, nem na ausência de estímulo ($p = 0,4174$), nem com o estímulo policlonal ($p = 0,1929$), nem com o estímulo específico ($p = 0,1304$) (Figura 10A).

Quanto à produção de IL-10, também nos dois grupos, foi significativamente maior quando as células das pacientes foram estimuladas, tanto com o estímulo policlonal ($p < 0,0001$), quanto com o estímulo específico de *T. gondii* ($p < 0,0001$ no grupo controle, e $p = 0,0003$ no grupo DMG). Além disso, as pacientes do grupo DMG produziram significativamente mais IL-10 que as pacientes do grupo controle, quando as PBMCs não receberam estímulo ($p = 0,0086$) e, também na presença do estímulo específico de *T. gondii* ($p = 0,0295$). Por outro lado, na presença do estímulo policlonal, a produção de IL-10 pelo grupo DMG foi significativamente menor em relação às controles ($p = 0,0077$) (Figura 10B).

A produção de IL-17 pelas células estimuladas ($p = 0,0001$ – estímulo policlonal; $p = 0,0010$ no grupo controle, $p = 0,0009$ no grupo DMG – estímulo específico) também foi significativamente maior que pelas células sem nenhum estímulo. Quando comparada a produção dessa citocina entre os dois grupos, nas células cultivada apenas com meio de cultura não houve diferença estatística ($p = 0,5722$), mas as pacientes do grupo controle produziram significativamente maiores quantidades de IL-17 em relação às pacientes DMG, tanto quando as células foram estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 ($p = 0,0052$), como quando estimuladas com STAg ($p = 0,0266$) (Figura 10C).

Apenas no grupo controle houve produção significativamente maior de IL-4 pelas células estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 ($p = 0,0010$) e pelas células estimuladas com STAg ($p = 0,0002$). No grupo DMG não houve diferença entre os estímulos ($p = 0,0625$ e $p = 0,1250$), praticamente não houve produção de IL-4 pelas células dessas pacientes. Portanto,

as pacientes sem diabetes produziram significativamente mais IL-4 que as pacientes diabéticas, tanto sob estímulo policlonal ($p=0,0125$), como sob estímulo específico de *T. gondii* ($p=0,0162$) (Figura 10D).

Em relação à citocina TNF, nos dois grupos a produção foi significativamente maior quando as células das pacientes foram estimuladas, tanto com o estímulo policlonal ($p<0,0001$), quanto com o estímulo específico de *T. gondii* ($p<0,0001$). E as pacientes do grupo controle produziram significativamente mais TNF que as pacientes diabéticas, tanto sob estímulo policlonal ($p=0,0004$), como sob estímulo de STAg ($p=0,0012$) (Figura 10E).

A citocina IL-6 foi altamente produzida pelas células das pacientes diabéticas, inclusive quando cultivadas apenas com meio de cultura, por isso, não houve diferença estatística na produção dessa citocina nesse grupo de pacientes, quando comparado as células cultivadas sem estímulo em relação as duas condições de estímulo ($p=0,7615$ e $p=0,0554$). No grupo controle, a produção de IL-6 foi significativamente maior sob estímulo policlonal ($p<0,0001$) e sob estímulo de STAg ($p<0,0001$) quando comparada às células cultivadas apenas em meio. E o interessante é que entre os grupos, houve diferença significativa na produção dessa citocina apenas na condição basal, ou seja, em que as células foram cultivadas somente com meio de cultura ($p=0,0064$) (Figura 10F).

Referente à produção de IL-2, no grupo controle também foi significativamente maior quando as células das pacientes foram estimuladas, tanto com o estímulo policlonal ($p=0,0063$), quanto com o estímulo específico de *T. gondii* ($p=0,0004$). No grupo DMG, houve essa maior produção apenas quando estimuladas com STAg ($P=0,0010$). Assim, as pacientes do grupo DMG produziram significativamente menos IL-2 que as pacientes do grupo controle, quando as PBMCs receberam estímulo policlonal ($p=0,0037$) e, também na presença do estímulo específico de *T. gondii* ($p=0,0098$) (Figura 10G).

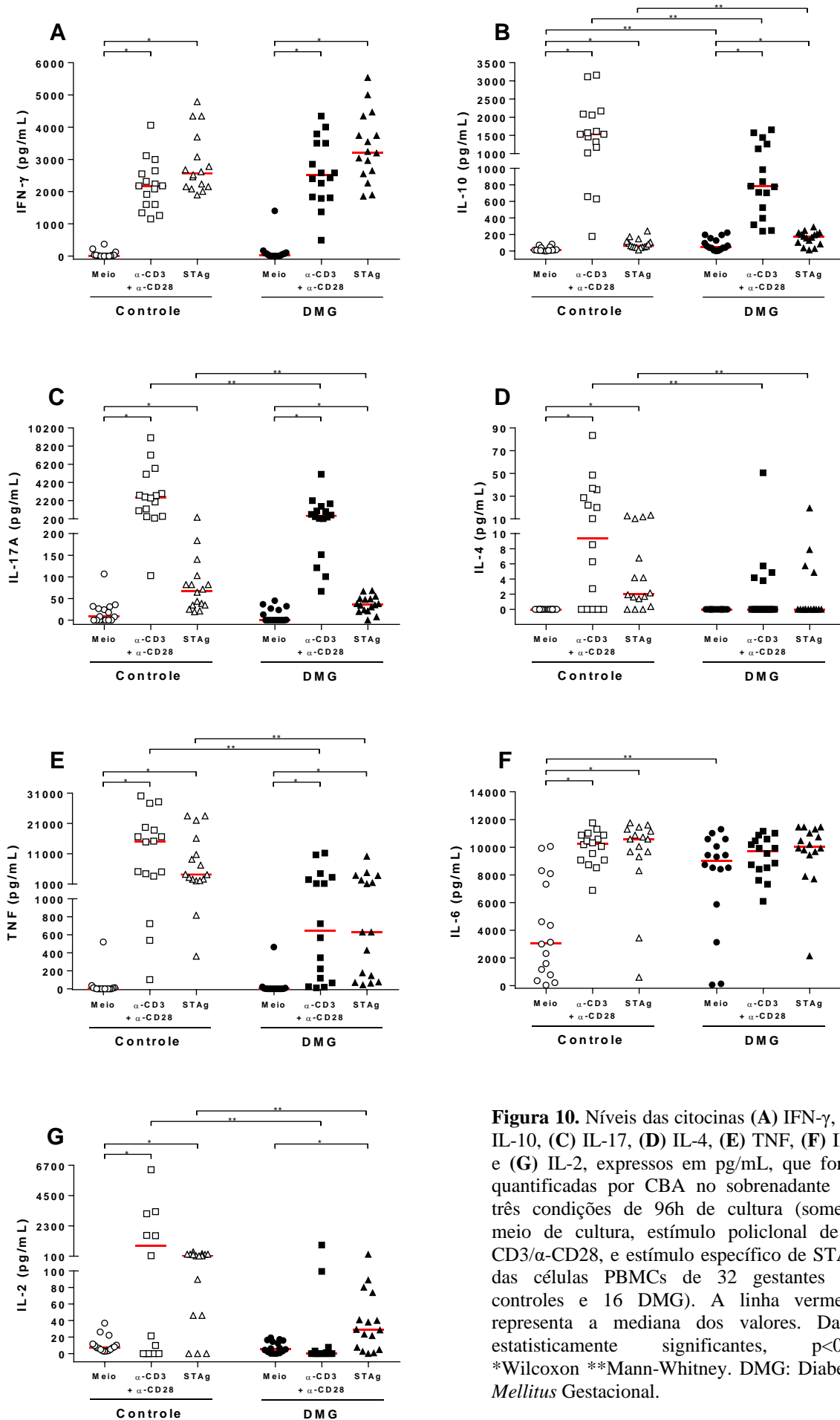


Figura 10. Níveis das citocinas (A) IFN- γ , (B) IL-10, (C) IL-17, (D) IL-4, (E) TNF, (F) IL-6 e (G) IL-2, expressos em pg/mL, que foram quantificadas por CBA no sobrenadante das três condições de 96h de cultura (somente meio de cultura, estímulo policlinal de α -CD3/ α -CD28, e estímulo específico de STAg) das células PBMCs de 32 gestantes (16 controles e 16 DMG). A linha vermelha representa a mediana dos valores. Dados estatisticamente significantes, $p < 0,05$ *Wilcoxon **Mann-Whitney. DMG: Diabetes Mellitus Gestacional.

5.3.4. Expressão do fenótipo de Treg

A subpopulação de linfócitos T auxiliares que possui papel regulador para manter a homeostase imunológica, conhecida como Treg, também foi estudada nesse trabalho, e caracterizada como célula T CD4⁺ que expressa em sua superfície altas quantidades de CD25 (CD25^{High}) e tem como fator de transcrição o *forkhead box P3* (FOXP3⁺). Além disso, existe um subconjunto de células Treg que expressam em sua membrana celular a proteína *latency-associated peptide* (LAP), uma forma do *transforming growth factor-beta* (TGF-β) ligado à membrana, que apresentam melhores efeitos imunorregulatórios e atuam por meio de um mecanismo dependente de TGF-β (GANDHI et al., 2010). Células Treg ativadas e funcionais expressam LAP em sua superfície (CUNHA et al, 2015).

Através da citometria de fluxo foi possível identificar esse fenótipo de Treg nas PBMCs das gestantes (Figura 11). A Figura 11A representa o processo utilizada para separar as *gates*.

A quantidade, em porcentagem, de células T CD4⁺CD25⁺ de todas as pacientes está representada na Figura 11B, e nos dois grupos estudados houve aumento significativo do percentual dessas células quando elas estavam sob os estímulos na cultura ($p < 0,0001$). Entre os grupos só houve diferença significativa entre o percentual de células T CD4⁺CD25⁺, na ausência de estímulo, em que as pacientes diabéticas apresentaram mais células que as controles ($p = 0,0043$).

No perfil clássico de células Treg, as células T CD4⁺ expressam altos níveis de CD25 (CD25^{High}), por isso também foram avaliadas essas células, e foi possível observar que da mesma forma houve aumento significativo do percentual dessas células quando elas estavam sob os estímulos na cultura ($p < 0,0001$), para os dois grupos de gestantes. E que as células T CD4⁺CD25^{High} foram significativamente mais altas no grupo DMG na ausência de estímulo na cultura ($p < 0,0001$), porém na presença do estímulo policlonal as pacientes DMG apresentaram menor percentual dessas células ($p = 0,0437$, Figura 11C).

As células T CD4⁺ que expressaram o fator de transcrição FOXP3 estão representadas na Figura 11D, e só houve diferença significativa entre as diferentes condições de cultura, com maior percentual das células T CD4⁺FOXP3⁺ quando elas estavam sob os estímulos de anti-CD3/anti-CD28 e STAg ($p < 0,0001$), para os dois grupos de gestantes.

As células T CD4⁺ que expressaram a proteína LAP estão representadas na Figura 11E e, também foi observado para os grupos controle e DMG que os dois estímulos da cultura elevaram significativamente o percentual das células T CD4⁺LAP⁺ ($p < 0,001$). Além disso, as

pacientes diabéticas apresentaram menores quantidades dessas células, sendo essa diferença significativa na condição basal da cultura (somente meio) ($p=0,0318$).

As células Treg clássicas são caracterizadas como células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ e estão representadas na figura 11F. Pode-se observar o mesmo padrão, em que para os dois grupos de gestantes, os dois estímulos da cultura elevaram significativamente o percentual das células Treg ($p<0,0001$). Adicionalmente, as células T $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+$ foram significativamente mais altas no grupo DMG na ausência de estímulo na cultura ($p<0,0001$).

A subpopulação de Treg que expressa LAP também foi avaliada, e está representada na Figura 11G. Os estímulos utilizados na cultura elevaram essa população de células Treg, nos dois grupos ($p<0,0001$). Porém não houve diferença entre as gestantes DMG e controles no número de células $CD4^+CD25^{High}FOXP3^+LAP^+$.

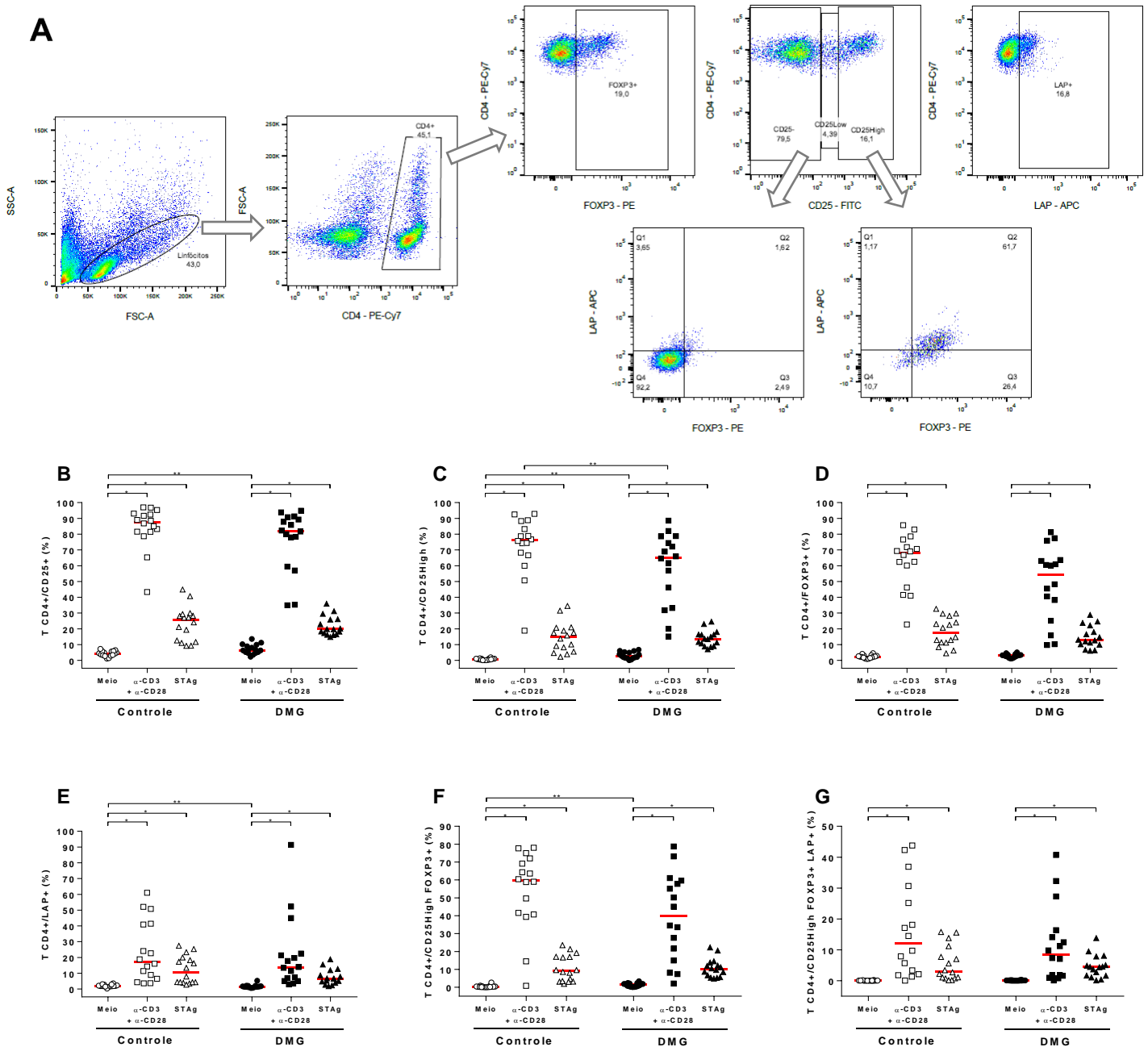


Figura 11. Fenótipo de células T reguladoras. (A) Representação do processo utilizado para separar as gates na citometria. Porcentagem de células (B) T CD4⁺CD25⁺, (C) T CD4⁺CD25^{High}, (D) T CD4⁺FOXP3⁺, (E) T CD4⁺LAP⁺, (F) T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺, (G) T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺LAP⁺, que foram adquiridas por citometria de fluxo das células PBMCs de 32 gestantes (16 controles e 16 DMG) após 96h cultura nas três condições distintas (somente meio de cultura, estímulo policlonal de α -CD3/ α -CD28, e estímulo específico de STAg). A linha vermelha representa a mediana dos valores. Dados estatisticamente significantes, $p < 0,05$ *Wilcoxon **Mann-Whitney. DMG: Diabetes Mellitus Gestacional.



6. Discussão

A toxoplasmose é uma doença parasitária, que muitas vezes não recebe atenção porque não causa dano à maioria das pessoas infectadas. Porém, a sua forma congênita pode resultar em complicações clínicas com sequelas graves ao recém-nascido, apresentando alta morbimortalidade (KHAN; KHAN, 2018, SAKI; SHAFIEENIA; FOROUTAN-RAD, 2016), sendo que a estimativa é de que a cada 1000 recém-nascidos no mundo, 1,5 deles apresentam infecção congênita (FREITAS et al., 2017). No Brasil, a prevalência de toxoplasmose em gestantes é alta, com taxas de até 60% a 77,5% dependendo do estado estudado (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009), e um trabalho realizado na região de São Paulo, revelou que no país, cerca de 230 a 300 crianças nascem infectadas com *T. gondii*, no período de um ano (KAWARABAYASHI et al., 2007).

O risco da transmissão vertical de *T. gondii* varia de 6% a 72%, sendo proporcionalmente maior quanto maior a idade gestacional; por outro lado, a gravidade da doença para o feto é inversamente proporcional à idade gestacional (MONTROYA; REMINGTON, 2008). Geralmente essa transmissão materno-fetal ocorre quando a mulher se infecta com o *T. gondii* pela primeira vez durante a gestação, ou é reinfetada por uma nova cepa de *T. gondii* (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009, GAVINET et al., 1997), porém, já foi demonstrado que pode ocorrer a infecção congênita em caso de reativação da doença, de uma infecção prévia à gestação, tanto em mulheres imunocompetentes mas principalmente em gestantes imunocomprometidas (ANDRADE et al., 2010, AZEVEDO et al., 2010, BACHMEYER et al., 2006, KODJIKIAN et al., 2004).

Sabe-se que o diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é uma patologia obstétrica caracterizada por intolerância à glicose e resistência à insulina com início durante a gestação, que pode afetar até 25% de gestantes, e ocasionar várias complicações para a mãe e ao recém-nascido (OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2017, PENDELOSKI et al., 2015). Por exemplo, a mulher pode apresentar risco de pré-eclâmpsia e de desenvolver diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) após o parto. E os filhos de mulheres com DMG apresentam risco aumentado de macrossomia, hipoglicemia neonatal, hiperbilirrubinemia, desconforto respiratório e natimortalidade, além de risco futuro de obesidade, desenvolvimento de DM2 e doenças cardiovasculares (ACOG, 2018, CHIEFARI et al., 2017, OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2017).

O DMG tem sido associado à resposta imune materna prejudicada (LUCCIA et al., 2019), porém são poucos os dados da literatura que associam essas duas patologias, e este estudo é pioneiro em avaliar como o DMG pode influenciar na resposta imune materna frente à infecção crônica de toxoplasmose.

Na toxoplasmose, na maioria dos casos uma infecção materna anterior à gestação protege o feto de transmissão congênita, porém existem casos já descritos de reativação da doença latente, com consequente infecção materno-fetal, principalmente em mulheres imunocomprometidas, por exemplo pelo vírus HIV (ANDRADE et al., 2010, CAMPOS et al., 2014, HENNEQUIN et al., 1997). Mas faltam dados na literatura que relacionem outras comorbidades, especialmente o diabetes gestacional, que podem afetar a resposta imune de uma gestante frente à infecção por *T. gondii*; avaliando se a infecção crônica da mulher realmente confere proteção contra a infecção congênita.

No presente trabalho, foi dado o primeiro passo nessa investigação, com a comparação entre alguns parâmetros da resposta imune anti-*T. gondii* de gestantes que desenvolveram DMG em relação a gestantes que apresentaram apenas o risco habitual de uma gestação (grupo controle).

Durante o pré-natal é realizada a triagem sorológica para toxoplasmose de todas as gestantes no Brasil, visto a importância de evitar a transmissão desse parasito via transplacentária. Este estudo envolveu apenas gestantes que foram definidas como “imunes” à doença, pelos exames laboratoriais realizados de rotina no pré-natal (IgG positivas e IgM negativas) e que portanto, tratadas como grupo de gestantes sem risco de transmitir o parasito ao feto. Sendo assim, as pacientes foram divididas entre as que apresentaram normoglicemia durante a gravidez, e aquelas que desenvolveram diabetes gestacional, para avaliar se o imunocomprometimento causado pela hiperglicemia durante a gestação pode afetar a resposta imunológica da mulher frente à toxoplasmose latente.

Primeiramente foi avaliada a resposta imune humoral específica a *T. gondii* de 81 gestantes, sendo 47 normoglicêmicas (grupo controle) e 34 que desenvolveram o diabetes *mellitus* gestacional (grupo DMG). A diferença dos índices glicêmicos das pacientes evidenciou e garantiu a distinção dos grupos (controle vs DMG), em que as médias glicêmicas foram significativamente maiores nas gestantes do grupo DMG, nos três tempos de realização do TOTG, comprovando que elas realmente desenvolveram diabetes *mellitus* gestacional.

Nos dois grupos os níveis de escolaridade e renda familiar foram semelhantes, porém a faixa etária das gestantes diabéticas foi maior que das pacientes do grupo controle, e esse dado comprova que a idade avançada é um fator de risco para desenvolvimento de DMG (OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2017).

Os testes sorológicos realizados permitiram detectar a presença de anticorpos IgG total anti-*T. gondii* em 100% das amostras analisadas, garantindo o critério de inclusão deste

estudo, em que estariam envolvidas no trabalho apenas gestantes com toxoplasmose latente (IgG positiva e IgM negativa).

Quanto aos níveis de IgG totais específicos a *T. gondii*, não houve diferença na média da produção desses anticorpos entre os dois grupos de gestantes analisados. Porém, a correlação dos níveis desses anticorpos com os níveis de glicemia do exame TOTG de todas as gestantes, revelou que existe uma correlação negativa entre esses dois parâmetros. Portanto, mesmo sem diferença estatística entre os níveis de anticorpos IgG total das gestantes do grupo controle e do grupo DMG, foi observado que quanto maiores os índices glicêmicos das pacientes, menores foram os níveis de anticorpos IgG total anti-*T. gondii*. Esses dados são o contrário do que foi encontrado por Kanková, Flegr e Calda (2015), que descreveu uma correlação positiva entre os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e de glicemia das gestantes, no entanto, em sua pesquisa essas dosagens de anticorpos foram realizadas no primeiro trimestre de gestação, o que difere do período gestacional estudado no presente trabalho, em que as dosagens de anticorpos foram realizadas no terceiro trimestre gestacional, período em que o diabetes gestacional já exerceu efeito sobre o organismo da mulher.

Park e colaboradores (2019) demonstraram, em modelo murino, que diminuição da produção de anticorpos IgM e IgG específicos ao parasito estavam relacionados com aumento da carga parasitária no sistema nervoso central do animal. Ou seja, menores níveis de anticorpos podem estar relacionado à maior carga parasitária.

As subclasses de IgG específicas ao parasito também foram avaliadas no soro das gestantes, sendo que houve prevalência de IgG1 em relação aos demais subtipos, apenas uma paciente de cada grupo não apresentou essa imunoglobulina. A segunda subclasse prevalente nas amostras das gestantes foi a IgG4, com 17% e 23,5% de soropositividade das pacientes do grupo controle e DMG, respectivamente. Foram poucas as gestantes positivas para IgG2 e IgG3, para ambos os grupos. Esses resultados são semelhantes aos obtidos em um trabalho realizado no México, que também encontrou, entre as subclasses específicas a *T. gondii*, prevalência de IgG1 (50%) seguida de IgG4 (15%) (CAÑEDO-SOLARES et al., 2008).

Adicionalmente, não houve diferença significativa dos níveis de todas as subclasses de IgG, entre os grupos controle e DMG. Os níveis de IgG1 foram os maiores e semelhantes entre os dois grupos, e as poucas pacientes positivas para IgG2, IgG3 e IgG4, apresentaram níveis bem mais baixos dessas e semelhantes entre si.

Esses resultados obtidos são compatíveis com a literatura, que numa infecção por *T. gondii* em seres humanos, todas as subclasses de IgG específicas já foram identificadas, sendo a IgG1 a primeira a ser produzida e a mais prevalente (HUSKINSON et al., 1989;

NASCIMENTO et al., 2015; SOUZA-E-SILVA et al., 2013). Além disso, IgG2, IgG3 e IgG4 apresentam uma cinética variável nesse tipo de infecção (CORREA et al., 2007). IgG1 e IgG3 são fortes ativadores da via clássica do complemento, e auxiliam na fagocitose do parasito por opsonização, portanto estão relacionadas à destruição do parasito. Por outro lado, sugere-se que IgG2 e IgG4 estejam pouco associadas à proteção do hospedeiro, porque não são úteis para controlar a replicação de parasitos intracelulares (CAÑEDO-SOLARES et al., 2008; HUSKINSON et al., 1989).

Neste trabalho também foi possível avaliar a presença desses anticorpos específicos a *T. gondii* no sangue de cordão umbilical de 45 recém-nascidos, filhos das gestantes envolvidas (25 do grupo controle e 20 do grupo DMG). Essa análise revelou que as subclasses de anticorpos presentes no soro dos recém-nascidos correspondiam às encontradas no soro de sua respectiva mãe. Além disso, também não houve diferença significativa nos níveis desses anticorpos, quando comparado os dois grupos estudados.

Sendo assim, 100% dos recém-nascidos apresentaram anticorpos IgG total e IgG1 anti-*T. gondii*. Em relação à IgG2, 3 gestantes (2 controles e 1 DMG) foram positivas para essa imunoglobulina, mas apenas o recém-nascido da gestante DMG apresentou IgG2. Quanto à IgG3, foram positivas 5 gestantes (3 controles e 2 DMG), e apenas o recém-nascido de uma gestante controle apresentou IgG3. Para IgG4, foram positivas 16 gestantes (8 de cada grupo), e os filhos de 3 dessas controles e 4 dessas DMG também foram positivos para IgG4. Isso pode ser sugestivo de que os anticorpos presentes nos recém-nascidos, foram adquiridos via transplacentária, pois todas as quatro subclasses de IgG atravessam a barreira placentária, mediada pelo receptor FcRn, com isso a IgG materna atinge a corrente sanguínea do feto e o protege contra infecções, sendo a IgG1 e a IgG2, respectivamente, as subclasses mais e menos eficientemente transportadas (SIMISTER, 2003).

Cañedo-Solares e colaboradores (2008) também demonstraram que IgG1 foi a subclasse mais frequente tanto nas amostras das mães, quanto dos recém-nascidos, e que essa subclasse de imunoglobulina não foi relacionada à infecção congênita. Por outro lado, eles sugeriram que a presença IgG2 e IgG3 na amostra dos recém-nascidos estavam relacionadas a transmissão vertical do parasito, e que IgG3 e IgG4 presente na amostra de recém-nascidos estavam relacionadas a manifestações clínicas da doença.

No presente estudo, o único recém-nascido que foi positivo para IgG2, também foi positivo para IgG4, e pertencia ao grupo DMG, além disso, o nível de IgG2 dele foi maior que o nível de IgG2 de sua respectiva mãe. Como a IgG2 é a subclasse menos transportada via transplacentária (SIMISTER, 2003), geralmente IgG2 fetal corresponde a 60% do nível de

IgG2 materno (MALEK et al., 1996), e ainda ela pode estar relacionada à transmissão congênita (CAÑEDO-SOLARES et al., 2008), isso pode ser sugestivo de que talvez esse recém-nascido tenha sido infectado pelo parasito. Um trabalho realizado no Brasil, demonstrou que a detecção de IgG2 e IgG4 específicos a um antígeno recombinante de *T. gondii* foi associado à presença de retinocoroidite e calcificações cerebrais na criança (SOUZA-E-SILVA et al., 2013).

O recém-nascido que foi positivo para IgG3, pertencia ao grupo controle, e o nível dessa imunoglobulina também foi maior que o nível de IgG3 de sua respectiva mãe, porém esse recém-nascido não foi positivo para IgG4. Além disso, no trabalho realizado no México, a transmissão congênita do parasito ao feto estava relacionada à presença de IgG3 no soro do recém-nascido, mas com ausência de IgG3 no soro da mãe (CAÑEDO-SOLARES et al., 2008).

Também já foi demonstrado que, ao final da gestação, os níveis de anticorpos IgG, principalmente IgG1, no soro fetal podem ser maiores que os níveis de anticorpos no soro da mãe (MALEK et al., 1996, SIMISTER, 2003). Esse resultado foi obtido no presente trabalho, em que os níveis de IgG total e IgG1 de vários recém-nascidos foram maiores que os níveis desses anticorpos de suas respectivas mães. Enquanto os níveis de IgG4 dos recém-nascidos positivos foram todos menores que os níveis de IgG4 de suas respectivas mães.

Da mesma forma que foi realizada a correlação dos níveis de IgG total das gestantes com os valores de glicemia obtidos no exame TOTG, também foi realizada a correlação IgG1 vs TOTG, revelando novamente que mesmo sem diferença estatística entre os níveis de anticorpos IgG1 das gestantes do grupo controle e do grupo DMG, existe uma correlação negativa entre esses dois parâmetros, ou seja, quanto maiores os índices glicêmicos das pacientes, menores foram os níveis de anticorpos IgG1 anti-*T. gondii*. E para ambas as correlações (IgG total e IgG1), a correlação negativa foi significativa quando comparada todas as pacientes em conjunto, e quando analisadas apenas as pacientes diabéticas (na glicemia de 1h). Portanto, isso sugere que glicemias mais elevadas modulam a resposta imunológica e afetam a produção de anticorpos.

Na rotina clínica, durante a investigação sorológica para toxoplasmose no período gestacional, um exame muito utilizado para auxiliar no diagnóstico de infecção aguda é o teste de avididade de IgG, que mede a afinidade funcional de um anticorpo a seu antígeno (LIESENFELD et al., 2001). Somente a presença de anticorpos IgG no soro das gestantes não determina exatamente o tempo de infecção (SAADATNIA; GOLKAR, 2012). No início de uma infecção, com o desafio antigênico primário, a avididade de um anticorpo IgG específico é

baixa, e durante as semanas ou meses ela vai aumentando devido à maturação de afinidade dos linfócitos B (LIESENFELD et al., 2001). Sendo assim, quanto maior a avidéz dos anticorpos IgG, mais antiga é a infecção, indicando uma infecção crônica de toxoplasmose, por isso, anticorpos IgG de baixa avidéz são sugestivos de uma infecção aguda, indicando maior risco de transmissão congênita (BRASIL, 2018, FONSECA et al., 2017).

No presente estudo foi avaliada a avidéz de anticorpos IgG total anti-*T. gondii* de todas as pacientes, e o resultado mostrou que tanto as gestantes do grupo controle quanto as do grupo DMG apresentaram alta avidéz de IgG (IA > 60%), indicando que todas elas realmente eram pacientes com infecção toxoplásmica latente (critério de inclusão do trabalho). Porém, houve diferença estatística significativa entre o índice avidéz das pacientes dos dois grupos, sendo que as pacientes diabéticas apresentaram menores índices, nas amostras de terceiro trimestre de gestação. O mais interessante é que foi possível analisar a avidéz de IgG em amostras prévias ao terceiro trimestre, de algumas pacientes, e esse resultado revelou que a avidéz de IgG das pacientes diabéticas era semelhante à avidéz das pacientes controles, e que no terceiro trimestre, somente no grupo DMG houve diminuição significativa do índice avidéz, mostrando que o diabetes gestacional interferiu na resposta imune humoral específica a toxoplasmose. Essas mulheres passaram a produzir anticorpos anti-*T. gondii*, por células B recém estimuladas.

Quando avaliada a avidéz dos anticorpos IgG presentes nas amostras dos recém-nascidos, não houve diferença nem entre os grupos de recém-nascidos, e nem entre a análise pareada mãe/recém-nascido. Já foi demonstrado que a IgG no soro do feto permanece baixa até o segundo trimestre, ou seja, a transferência de IgG materna ocorre principalmente a partir do início do segundo trimestre de gestação, sendo a maior parte transferida durante o terceiro trimestre (SIMISTER, 2003). Isso sugere que a diminuição da avidéz dos anticorpos maternos ocorreu somente no final da gestação, e que embora a maior parte da transferência de IgG materna ocorra durante o terceiro trimestre de gestação, os anticorpos IgG específicos a *T. gondii* do recém-nascidos foram referentes à um *pool* de anticorpos recebidos via transplacentária ao longo de toda a gestação.

Também foi realizada a correlação dos níveis de avidéz de IgG total vs TOTG de todas as pacientes, sendo ainda mais significativa a correlação negativa que existe entre a glicemia das gestantes e o índice avidéz de IgG, pois nos três tempos do exame (jejum, 1h e 2h, a análise de todas as pacientes em conjunto resultou em valores significativos). Isso significa que quanto maiores os índices glicêmicos das pacientes, menores os índices de avidéz de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

Esses resultados são interessantes e sugerem que é necessária uma atenção às paciente diabéticas quanto à interpretação do exame de avidéz de IgG, pois ocorreu diminuição do índice ao longo da gestação, porém todas elas continuaram dentro dos limites de referência que correspondem à IgG de alta avidéz, e isso pode “mascarar” a possível mudança de resposta imunológica contra o *T. gondii*, que seja negativa para a proteção e prevenção da infecção congênita.

Visto que estudos anteriores já demonstraram que o diabetes provoca uma redução da resposta imunológica (SAKI; SHAFIEENIA; FOROUTAN-RAD, 2016), os resultados das três correlação do presente trabalho (TOTG vs IgG total, IgG1 e avidéz de IgG total) apontam a existência de uma possível associação entre diabetes e a modulação negativa da resposta imunológica humoral contra o protozoário *T. gondii*. Sendo a glicemia de 1h após a ingestão de dextrose o melhor parâmetro para correlação, pois foi nesse tempo que houve diferença significativa entre todas as correlações realizadas, provavelmente por se tratar do tempo em que ocorre o pico da glicemia. Além disso, o índice avidéz de IgG anti-*T. gondii* foi o parâmetro mais significativo para demonstrar que os valores de glicemia das gestantes afetam a resposta imune humoral específica ao parasito. Com isso, sugere-se que as gestantes diabéticas e seus recém-nascidos precisam ser melhores acompanhados quanto a essa infecção parasitária, e mais estudos são necessários para confirmação dessa hipótese.

As alterações da resposta imune que ocorrem na mulher durante a gravidez e a resposta imune necessária para combater uma infecção por *T. gondii* são antagônicas (BORGES et al., 2019).

O principal mecanismo para controle e eliminação de infecções causadas por parasitas intracelulares é a produção de uma resposta imune do perfil Th1 pelo hospedeiro, com a produção de citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12. Por isso, as células NK, os linfócitos T CD4⁺ do perfil Th1 e os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos possuem atividade sinérgica e protetora contra *T. gondii*, devido a capacidade de produzir IFN- γ e citocinas pró-inflamatórias, que estimulam a produção de óxido nítrico, fundamental para eliminar o parasita (DENKERS; GAZZINELLI, 1998, GAZZINELLI et al., 1991, HUNTER et al., 1995). Quando ocorre a diferenciação para o perfil Th2, resulta no aumento da susceptibilidade ao parasita (DENKERS; GAZZINELLI, 1998).

A gravidez está associada a um aumento na produção de progesterona que estimula as células NK e as células T a produzirem fator de bloqueio induzido pela progesterona (PIBF), que diminui a atividade das células NK e promove a expansão de células Th2, favorecendo a produção de citocinas como IL-4 e IL-13. Além disso, durante a gestação também ocorre a

expansão de células Treg, importantes para a tolerância imunológica materna ao feto. Portanto, a imunomodulação durante a gravidez contribui para o desenvolvimento de um ambiente com predomínio de células Th2 e Treg, que facilita a evasão de *T. gondii* da resposta imune, podendo causar aumento da patologia materna ou da probabilidade de transmissão congênita (BORGES et al., 2019).

A avaliação da resposta imune celular dessas gestantes revelou que o diabetes gestacional não alterou a quantidade de células T CD4⁺ das mulheres, em comparação às mulheres não diabéticas. Trabalhos anteriores também encontraram esse mesmo resultado (LOBO et al., 2018, PENDELOSKI et al., 2015, SCHOBER et al., 2014), enquanto Friebe-Hoffmann e colaboradores (2017) relataram diminuição no total de células T auxiliares CD4⁺ nas pacientes afetadas pela DMG, e Fagundes e colaboradores (2016) relataram aumento no número total dessas células em pacientes DMG.

Por outro lado, desde a condição basal, e na presença de estímulo específico do parasito, o número de células T CD8⁺ foi significativamente maior nas gestantes do grupo DMG. Esse resultado diverge da literatura, que autores não encontraram diferença no número de células T CD8⁺ entre gestantes diabéticas e não diabéticas (FRIEBE-HOFFMANN et al., 2017, PENDELOSKI et al., 2015). Porém, nenhum estudo avaliou a resposta celular específica para toxoplasmose, como realizado neste trabalho.

As duas populações de linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺, das pacientes foram avaliadas quanto à ativação e exaustão celular, através da expressão dos marcadores de superfície CD28 e PD-1, respectivamente.

Para a estimulação de células T é necessária a combinação de vários sinais, o sinal antígeno-específico que acontece via receptor de células T (TCR), e sinais adicionais que são independentes do antígeno e ocorrem via moléculas co-receptoras. Dentre os co-receptores expressos na superfície dos linfócitos T, existem aqueles que são estimulatórios, pois transmitem sinais positivos que irão ativar a célula, e aqueles que são inibitórios, que modulam negativamente a sinalização do TCR. Portanto, eles definem o destino e a função da célula T. Os co-receptores inibitórios tem papel importante contra a ativação irrestrita de linfócitos T, auxiliando na manutenção da tolerância periférica e homeostase imunológica durante uma infecção (CHEN; FLIES, 2013, HUI et al., 2017).

O CD28 é um co-receptor estimulatório expresso constitutivamente na superfície de células T CD4⁺ e T CD8⁺ *naives*, sua ligação às moléculas B7-1 e B7-2 em células apresentadoras de antígenos (APCs) fornece sinal essencial para o crescimento e a sobrevivência de células T (CHEN; FLIES, 2013). Conforme esperado, por ser um receptor

constitutivo dos linfócitos, os dois grupos de gestantes avaliadas neste trabalho apresentaram alta porcentagem das duas populações de linfócitos expressando esse co-receptor de ativação. Esse mesmo resultado foi obtido por Pendeloski e colaboradores (2015), que analisaram células PBMC isoladas do sangue periférico de gestantes, sem nenhum estímulo. Adicionalmente, as pacientes do grupo DMG expressaram mais células T CD4⁺CD28⁺ que as pacientes do grupo controle, indicando que as células das pacientes diabéticas foram mais ativadas quando estimuladas com anti-CD3/anti-CD28.

O PD-1 é um co-receptor inibitório, sendo PD-L1 e PD-L2 seus dois ligantes, que são expressos por várias células imunes e não imunes, inclusive bastante expressos em células tumorais (FREEMAN et al., 2000, ISHIDA et al., 1992, KEIR et al., 2008). Neste estudo, todas as gestantes, sem distinção entre os grupos, apresentaram aumento de porcentagem de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) expressando esse marcador de exaustão celular após as células receberem estímulos, demonstrando que as células realmente foram estimuladas. Sendo que no estado basal (sem estímulo) as pacientes diabéticas apresentaram maior quantidade de células T CD4⁺ em exaustão (T CD4⁺PD-1⁺). Essa diferença de células T CD4⁺PD-1⁺ entre gestantes diabéticas e não diabéticas também foi encontrada por Pendeloski e colaboradores (2015).

Sob estímulo policlonal, o número de células T CD8⁺ e CD4⁺ expressando concomitantemente CD28 e PD-1 foi significativamente maior nas pacientes do grupo DMG. Além disso, nas diabéticas também foi significativamente maior o número de células T CD4⁺CD28⁺PD-1⁺ no estado basal. Sabe-se que a ativação de PD-1 suprime as funções dos linfócitos T através da desfosforilação de componentes de sinalização do TCR (CHEN; FLIES, 2013), porém, Hui e colaboradores (2017) demonstraram que PD-1 prefere a sinalização do co-receptor CD28 como alvo para a desfosforilação, e portanto as vias co-estimulatórias possuem papéis importantes na regulação da função das células T efetoras e nas respostas à terapia anti-PD-L1 ou anti-PD-1. Portanto, essas células expressando a dupla marcação de CD28 e PD-1 provavelmente sofrem mais efeito inibitório quando PD-1 é ativado por seu ligante. Sendo assim, os resultados demonstram que as células das pacientes com diabetes gestacional são mais ativadas e levadas à exaustão, que as células das pacientes normoglicêmicas.

O linfócito T CD8⁺ desempenha função fundamental no controle da infecção crônica de toxoplasmose (JEFFERS et al., 2018, KHAN; HWANG; MORETTO, 2019). Já foi demonstrado, em modelo animal, que durante a fase tardia da toxoplasmose crônica, as células T CD8⁺ são capazes de gerar uma forte resposta anamnésica, ou seja, uma imunidade

adaptativa potente, importante para manter *T. gondii* em quiescência e prevenir a reativação da infecção latente (BHADRA et al., 2011, BHADRA; COBB; KHAN, 2013).

Bhadra e colaboradores (2011) mostraram que um aumento progressivo na expressão da molécula inibitória PD-1 nas células T CD8⁺ dos camundongos durante a fase crônica da infecção pelo parasita, foi correlacionado à reativação de parasitemia (comprovada por expressão gênica, em que genes de taquizoítos estavam aumentados em relação a genes de bradizoítos). Além disso, quando esses camundongos eram tratados com anti-PD-L1 (anticorpo que inibe o ligante de PD-1), eles apresentavam melhor sobrevida, porque o tratamento impedia a reativação da infecção (diminuição de bradizoítos e aumento de taquizoítos). Sendo esse mecanismo dependente de célula T CD8⁺, pois os animais que tiveram célula T CD8 depletadas não sobreviveram, mesmo com o tratamento de anti-PD-L1. Isso mostra que o tratamento anti-PD-L1 aumenta a resposta células T CD8⁺ em camundongos infectados cronicamente, o que impede a reativação da infecção, levando à sobrevivência do hospedeiro.

Portanto, PD-1 aumentado é indicativo de células em exaustão, com perda de função em controlar a infecção pelo parasito, e conseqüentemente com risco de reativação da doença aguda. E os dados deste estudo mostraram que as pacientes diabéticas apresentaram mais células T CD8 expressando PD-1 que as pacientes controles, sugerindo potencial risco para esse grupo de pacientes.

Notoriamente o linfócito T CD8⁺ é muito importante na resposta imune contra a infecção de toxoplasmose, porém o linfócito T auxiliar é essencial para uma boa expansão das células T CD8⁺, ou seja, as células CD4⁺ são necessárias para a manutenção das funções de T CD8⁺ (JEFFERS et al., 2018). Pois, na ausência das células T CD4⁺, os linfócitos citotóxicos não conseguem desempenhar bem o seu papel, uma vez que a imunidade gerada não pode ser mantida, e a resposta a um desafio secundário se torna fraca (KHAN; HWANG; MORETTO, 2019). Hwang e colaboradores (2016) mostraram que durante a infecção crônica por *T. gondii*, as células T CD4⁺ específicas aumentam a expressão do fator de transcrição BLIMP-1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein*), com conseqüente aumento de receptores inibitórios, inclusive PD-1, e perda de funcionalidade. Assim, células T CD4⁺ em exaustão não auxiliam adequadamente os linfócitos T CD8⁺ a desempenharem função efetiva contra a infecção crônica de toxoplasmose, sendo capaz de reativar a infecção latente. De forma que a transferência adotiva de células T CD4⁺ que sofreram deleção de BLIMP-1, para animais infectados, foi capaz de reverter a disfuncionalidade de linfócitos T CD8⁺ e impedir a reativação da infecção latente (HWANG et al., 2016).

As pacientes do grupo DMG, do presente estudo, também apresentaram mais células T CD4⁺ em exaustão (expressando PD1⁺), portanto, sugerindo que a resposta de linfócitos T auxiliares das pacientes diabéticas também está prejudicada.

Sabe-se que a ligação de PD-1 a seus ligantes resulta em inibição da proliferação de linfócitos e da secreção de citocinas (FREEMAN et al., 2000, ISHIDA et al., 1992, KEIR et al., 2008). No estudo realizado por Freeman e colaboradores (2000), células humanas T CD4⁺ obtidas de PBMCs foram estimuladas com PD-L1 e anti-CD3, e após 96h a produção de citocinas por essas células foi prejudicada, em que a secreção de IFN- γ e IL-10 diminuíram 80% e 60%, respectivamente. Além disso, quando as células foram estimuladas com PD-L1 e anti-CD28 também houve diminuição na produção de IL-2. Assim, a ativação de células T na presença de ligante de PD-1 resulta em inibição da secreção de citocinas.

Sendo assim, quanto mais células T de um indivíduo expressarem PD-1, mais sujeito está de ser ativado por um dos seus ligantes, e com isso podendo inibir a resposta imunológica como a secreção de citocinas. Esses dados corroboram em parte com os resultados obtidos no presente estudo, em que as pacientes do grupo DMG, apresentaram mais linfócitos T expressando a molécula PD-1, na presença de estímulo policlonal e, também secretaram menos citocinas IL-10, IL-17, IL-4, TNF e IL-2, que foram quantificadas por CBA no sobrenadante de cultura das células PBMC.

As citocinas IL-2, IFN- γ e TNF são características do perfil Th1 de células T CD4⁺, e são importantes para a imunidade celular e para proteção contra infecções por parasitas intracelulares. Enquanto a IL-13, a IL-5 e a IL-4 (juntamente com IL-13 estimula a ativação de linfócito B) são características do perfil Th2. A população denominada de Th17, foi proposta por produzir seletivamente IL-17, e desempenha um papel crítico na indução de inflamação com recrutamento de neutrófilos, bastante envolvido na patogênese de doenças autoimunes e rejeição. A diferenciação das células Th17 humanas é inibida por altas concentrações de TGF- β , mas requer IL-1 β e IL-6. A função dessas três populações de células T efetoras (Th1, Th2 e Th17) é regulada pelas células Treg CD4⁺CD25⁺, que são células importantes para a manutenção da tolerância periférica (LOMBARDELLI et al., 2016, SAITO et al., 2010)

A IL-6 foi inicialmente considerada uma citocina pró-inflamatória, porém, nos sistemas imunes inato e adaptativo, a IL-6 está envolvida tanto na amplificação como na proteção contra a inflamação. Assim, a regulação inadequada da IL-6 pode desempenhar um papel protetor ou deletério direto nas doenças em que a IL-6, ou outros fatores inflamatórios, causam uma inflamação de baixo grau, por exemplo como observado na obesidade e diabetes

tipo 2 (KRISTIANSEN; MANDRUP-POULSEN, 2005). A alta secreção de IL-6 participa da patogênese do diabetes *mellitus* gestacional, pois pode agravar a resistência à insulina na gravidez (MORISSET et al., 2011). Neste trabalho, a citocina IL-6 foi altamente produzida pelas células PBMC das pacientes diabéticas, com diferença significativa entre o grupo das pacientes controle, na condição basal (cultivadas apenas com meio de cultura). Em comparação com gestantes não diabéticas, o aumento dos níveis séricos circulantes de IL-6 em mulheres diagnosticadas com DMG já foi relatado em vários estudos (ATÈGBO et al., 2006, EDALAT et al., 2013, MORISSET et al., 2011, SIDDIQUI et al., 2019). No entanto, nas duas condições de estímulos, no presente trabalho, as células dos dois grupos produziram altos níveis de IL-6, sem diferença.

Alguns autores encontraram que os níveis séricos de IL-4 não foram diferentes entre mulheres com e sem DMG (ATÈGBO et al., 2006, FAGUNDES et al., 2016). No presente estudo, quando as células PBMC foram estimuladas (policlonal ou específico) as pacientes do grupo controle produziram significativamente mais IL-4 que as pacientes diabéticas. No grupo DMG praticamente não houve produção de IL-4 pelas células dessas pacientes. Isso sugere que o perfil Th2 das pacientes diabéticas foi menor em relação às pacientes controles. Além disso, como a IL-4 é uma citocina do perfil Th2 relacionada à produção de anticorpos, pode-se sugerir que a diminuição de citocina IL-4 nas pacientes diabéticas pode contribuir com a diminuição (mesmo que sem diferença estatística) de anticorpos IgG1 das pacientes DMG em relação às pacientes controle, e principalmente com a correlação negativa estatisticamente significante dos níveis de IgG1 com os níveis glicêmicos das gestantes.

As PBMC das pacientes do grupo DMG secretaram significativamente menos IL-2 e TNF que as células do grupo controle, quando receberam estímulo policlonal e, também na presença do estímulo específico de *T. gondii*. No estado basal não houve diferença entre os grupos. As duas são citocinas do perfil Th1, portanto isso sugere que o diabetes gestacional também modula negativamente o perfil Th1 de células das gestantes, inclusive na resposta específica à toxoplasmose.

Outros estudos também mostraram que os níveis de IL-2 e/ou TNF- α , quantificada no soro ou em sobrenadante de cultura de células PBMC cultivadas somente em meio, foram similares entre os grupos (FAGUNDES et al., 2016, GEORGIOU et al., 2008, GUEUVOGHLANIAN-SILVA et al., 2012, SAUCEDO et al., 2011). Enquanto também já foi demonstrado que pacientes DMG possuem menos IL-2 sérica (ATÈGBO et al., 2006, HARA et al., 2016). Em contraste, alguns autores que quantificaram as citocinas no soro de gestantes, encontraram níveis de TNF- α maior nas gestantes DMG que nas controles

(ALTINOVA et al., 2007, ATÈGBO et al., 2006, LÓPEZ-TINOCO et al., 2012, SALMI et al., 2012). Porém, nenhum desses trabalhos avaliou a produção dessa citocinas por células estimuladas.

O TNF- α desempenha papel importante na infecção crônica por *T. gondii*, pois camundongos deficientes dessa citocina ou de seus receptores não conseguem controlar a infecção parasitária (SCHLÜTER et al., 2003, YAP et al., 1998). A falta de TNF- α influenciou na redução da produção de óxido nítrico sintase (iNOS) (SCHLÜTER et al., 2003).

A IL-2 promove a expansão e a sobrevivência das células T, portanto sua retirada pode levar à morte celular (KEIR et al., 2008). Carter e colaboradores (2002) demonstraram que a ativação de PD-1 por seus ligantes (PD-L1 ou PD-L2) nos linfócitos T CD4⁺ e, principalmente nos T CD8⁺, inibiu a proliferação celular com consequente diminuição da produção de IL-2. Esses dados corroboram com os achados do presente estudo, em que as pacientes do grupo DMG apresentaram mais células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando PD-1, e consequentemente menor produção de citocina IL-2.

No presente estudo, três citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-17) foram avaliadas de duas maneiras distintas: tanto a produção intracelular delas pelas células T CD4⁺ das gestantes, através da imunofenotipagem por citometria de fluxo; quanto a secreção nos sobrenadantes de cultura de células PBMC das pacientes, através da dosagem por CBA.

A avaliação de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ revelou que as pacientes diabéticas apresentaram percentual significativamente menor de células T CD4⁺IFN⁺, tanto sob estímulo policlonal, como sob estímulo antigênico específico. Em contrapartida, a quantificação de IFN- γ no sobrenadante de cultura revelou que não houve diferença na secreção dessa citocinas entre as células PBMC dos dois grupos de gestantes.

Os dados da literatura são controversos, pois já foi descrito que as concentrações séricas de IFN- γ de gestantes com DMG foi semelhante (FAGUNDES et al., 2016), menor (ATÈGBO et al., 2006), e maior (HARA et al., 2016) que das pacientes normoglicêmicas.

O IFN- γ é uma citocina característica do perfil Th1, bastante produzida em resposta a infecções intracelulares, inclusive com fundamental importância no controle da toxoplasmose (DENKERS; GAZZINELLI, 1998, GAZZINELLI et al., 1991, HUNTER et al., 1995). Camundongos *knockout* para IFN- γ ou para o receptor de IFN- γ são altamente susceptíveis à infecção por *T. gondii*, isso prova o quanto essa citocina é importante para a resposta imune de defesa do hospedeiro frente a esse parasito (NISHIYAMA et al., 2020, YAP; SHER, 1999). Os resultados obtidos mostraram que as pacientes diabéticas apresentaram uma

diminuição de células T CD4⁺ do perfil Th1. Nos sobrenadantes da cultura, não houve diferença nos níveis dessa citocina entre os dois grupos, nos vários estímulos usados. Isso sugere que outras células mononucleares das pacientes diabéticas, como os monócitos e/ou linfócitos CD8⁺ e/ou células NK, devem ser mais ativadas para auxiliar no controle da toxoplasmose, via produção dessa citocina pró-inflamatória. Hara e colaboradores (2016) mostraram que no sangue de gestantes com DMG existe maior quantidade de células NK (CD16⁺CD56⁻).

Um estudo recente realizado com gestantes no primeiro trimestre da gestação, com fase aguda ou indeterminada da toxoplasmose, avaliou a produção de citocinas por células PBMC estimuladas com STAg e comparou a positividade de IFN- γ e TGF- β entre os casos em que houve transmissão congênita e os que não houve transmissão. Curiosamente, a transmissão vertical de *T. gondii* foi mais relacionada aos casos positivos para IFN- γ e negativos para TGF- β (citocina imunorreguladora). Além disso, no grupo de mães transmissoras do parasito, foi encontrado maior proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos a antígeno de *T. gondii* (GÓMEZ-CHÁVEZ et al., 2019).

Os resultados obtidos no presente trabalho, na fase crônica da infecção, apontam uma diminuição de células T CD4⁺IFN⁺ das pacientes diabéticas, indicativo de uma imunomodulação negativa.

A avaliação de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 revelou que as pacientes diabéticas apresentaram percentual significativamente menor de células T CD4⁺IL17⁺ específicas para STAg. Isso sugere que para o controle da toxoplasmose as pacientes diabéticas apresentarem menos quantidade de células do perfil Th17. Além disso, a secreção de IL-17 pelas células PBMC também foi significativamente menor no grupo de pacientes DMG, tanto com estímulo policlonal tanto com o STAg. Nenhum outro estudo investigou o perfil de células Th17 e produção de IL-17 na resposta contra toxoplasmose, de pacientes diabéticas.

Em dois estudos de Fagundes e colaboradores (2016, 2018), eles relataram que não houve diferença entre a quantidade de IL-17 no plasma de gestantes DMG e controles, esses resultados são semelhantes com o presente estudo, em que na condição basal (sem estímulo) também não houve diferença entre os dois grupos.

A análise de células T CD4⁺ produtoras de IL-10 revelou que as pacientes diabéticas apresentaram percentual significativamente menor de células T CD4⁺IL10⁺ específicas para o antígeno de *T. gondii*. Animais *knockout* para IL-10 infectados por *T. gondii* exibem uma patologia grave e morrem devido à excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, animais cronicamente infectados tratados com anticorpo anti-IL10R sucumbem à

infecção e morrem. Portanto, a IL-10 é necessária para a sobrevivência do hospedeiro tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção por *T. gondii* (JANKOVIC et al., 2007).

Jankovic e colaboradores (2007) demonstraram que numa infecção aguda por *T. gondii*, em camundongo, a citocina IL-10 foi produzida principalmente pelas células T CD4⁺ dupla produtoras de IL-10 e IFN- γ , e que essa subpopulação celular era do perfil Th1 de linfócitos. No presente estudo, sob o estímulo de STAg as pacientes diabéticas apresentaram quantidade significativamente menor de células T CD4⁺ dupla produtora de citocinas, tanto T CD4⁺IFN⁺IL10⁺ quanto T CD4⁺IL17⁺IL10⁺, em relação às pacientes controles. Isso sugere que as pacientes diabéticas apresentaram uma resposta Th1 anti-*T.gondii* prejudicada.

Contraditoriamente, nos sobrenadantes de cultura das pacientes do grupo DMG as células PBMC secretaram significativamente mais IL-10 que as células das pacientes do grupo controle, quando não receberam estímulo e, também na presença do estímulo específico de *T. gondii*. Esses resultados são compatíveis com a literatura, em que Atègbo e colaboradores (2006) encontraram que os níveis séricos de IL-10 foram significativamente aumentados em mulheres com DMG em comparação com mulheres controle. Portanto, esse dado sugere que outras células do sangue periférico estão contribuindo para os altos níveis de IL-10 no sobrenadante das pacientes diabéticas. A IL-10 pode ser produzida por múltiplos tipos celulares do sistema imune inato e adaptativo, como eosinófilos, DC, macrófagos, células NK, linfócitos B, linfócitos T CD8⁺ e vários subtipos de T CD4⁺, por exemplo o Treg (OUYANG et al., 2011).

Uma recente revisão reuniu diversos estudos que já demonstraram a importância da célula Treg na manutenção de uma gestação saudável, pois como o embrião expressa aloantígenos derivados do pai, é necessária uma resposta imunológica materna tolerogênica, mediada pelas Treg, capaz de inibir a imunidade efetora e conter a inflamação. Sendo assim, durante o curso da gravidez, o número de células Treg é aumentado através de muitos mecanismos, enquanto a diminuição ou a disfunção dessas células estão associadas a infertilidade da mulher, abortos recorrentes, ou complicações na gravidez (ROBERTSON; CARE; MOLDENHAUER, 2018).

No presente estudo, na ausência de estímulos, as pacientes do grupo DMG apresentaram mais células T CD4⁺CD25⁺, células T CD4⁺CD25^{High} e células T CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺, ou seja, no estado basal, as pacientes diabéticas expressaram maior quantidade de células Treg que as gestantes não diabéticas. Em contrapartida, na presença de estímulo policlonal as populações de Treg foram menores nas pacientes DMG, sugerindo que, sob estímulo, as Treg das pacientes diabéticas não conseguiram se expandir completamente.

Mahmoud e colaboradores (2012) também encontraram maior quantidade de células T CD4⁺ CD25⁺ no sangue de gestantes DMG. Por outro lado, Lobo e colaboradores (2018) não encontraram diferença significativa na porcentagem dessas células entre os grupos DMG e controle; e ainda relataram menor frequência de células Treg CD25^{bright} e FOXP3^{high} em pacientes com DMG em comparação aos controles.

Zhang e colaboradores (2012) demonstraram, em modelo animal, que na infecção por *T. gondii* a razão de células Treg/Th17 da placenta diminui, e isso aumenta as taxas de aborto. Portanto, as células Treg também são necessárias para a manutenção da gravidez após a infecção por *T. gondii*.

O estímulo de STAg influenciou de forma similar na quantidade de Treg dos dois grupos estudados, ou seja, não houve diferença significativa entre DMG e controles. Além disso, não houve diferença entre as gestantes DMG e controles no número de células Treg CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺LAP⁺, que é um subconjunto de células Treg com melhores efeitos imunorregulatórios. Sun e colaboradores (2012) utilizaram vários experimentos *in vitro* para demonstrar que as células Treg funcionais após estimulação são aquelas que expressam LAP em sua superfície. Todas as gestantes envolvidas no presente estudo, diabéticas e não diabéticas, evoluíram bem a gravidez até o final, sugerindo que as Treg estavam funcionais em ambos os grupos.

Todos esses resultados apresentados sugerem que, comparadas às gestantes normoglicêmicas, as pacientes que desenvolveram diabetes gestacional apresentaram diminuição da resposta imunológica do perfil Th1, Th2 e Th17; enquanto o perfil Treg não foi muito afetado. Além disso, a produção de anticorpos IgG e IgG1 específicos a *T. gondii* pelas gestantes foi inversamente proporcional à glicemia, e a avididade de IgG foi significativamente menor nas pacientes do grupo DMG. Sendo assim, é possível concluir que o diabetes *mellitus* gestacional modula negativamente a resposta imune humoral e celular da gestante cronicamente infectada por *T. gondii*.

Na toxoplasmose crônica, normalmente, os cistos teciduais do parasito permanecem inativos por toda a vida de um hospedeiro, mas os taquizoítos podem reemergir e causar doença/sintomas, em pacientes imunocomprometidos, geralmente associado à supressão da resposta imune do hospedeiro, mas os mecanismos de reativação ainda não foram bem descritos (JEFFERS et al., 2018).

Uma vez que a DMG pode modular a resposta imune da gestante, existe a necessidade de acompanhar melhor essas gestantes consideradas imunes à toxoplasmose (IgG positivas e

IgM negativas) e seus recém-nascidos, com mais estudos para avaliar a real possibilidade de reativação dos cistos teciduais no final da gestação, devido à influência do diabetes.

Quando a infecção congênita causada por *T. gondii* ocorre no terceiro trimestre da gravidez, a transmissão tardia de parasitos reduz o tempo para a multiplicação do parasito no feto ou no recém-nascido, conseqüentemente os danos não são evidentes precocemente. Por isso, muitas vezes as infecções congênicas são negligenciadas por serem assintomáticas no momento do nascimento e permanecerem despercebidas. Porém, manifestações clínicas podem aparecer semanas ou anos após o nascimento (CARLIER et al., 2012), normalmente na forma de coriorretinite grave (MELAMED et al., 2010).

A Figura 12 esquematiza os principais resultados obtidos no presente trabalho.

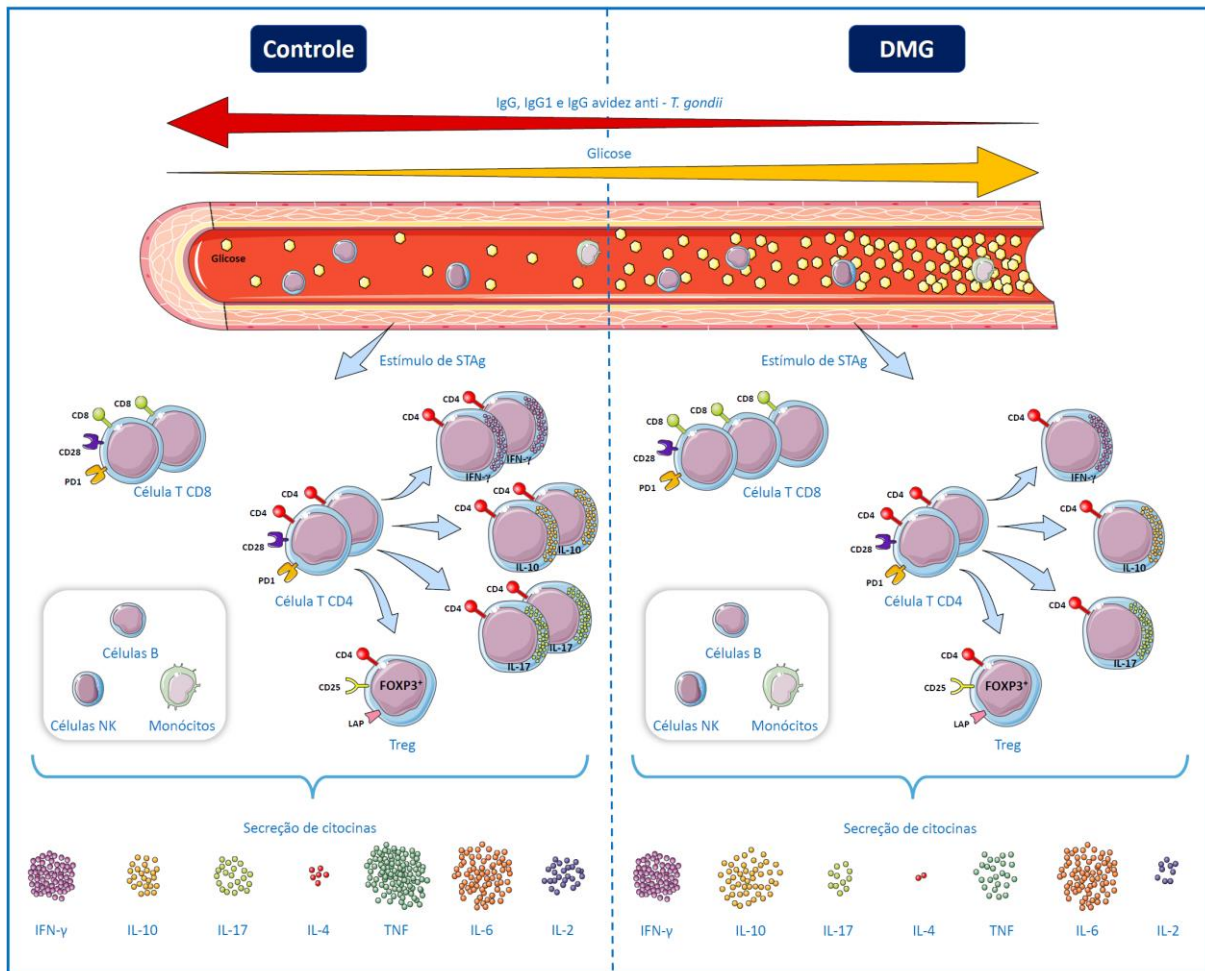


Figura 12. Resposta imune específica a *T. gondii*, de gestantes cronicamente infectadas pelo parasito, com e sem diabetes *mellitus* gestacional (DMG). Altos níveis de glicose na corrente sanguínea caracterizam as pacientes com DMG, enquanto as normoglicêmicas foram identificadas como pacientes do grupo controle. Houve correlação negativa entre a glicemia das gestantes e os níveis de IgG total, IgG1 e avides de IgG, ou seja, quanto maior a glicose sanguínea das pacientes menor o nível de anticorpos anti-*T. gondii*. Sob estímulo policlonal (anti-CD3/anti-CD28), as pacientes do grupo DMG apresentaram maior número de linfócitos T expressando os marcadores de ativação e exaustão celular (CD28 e PD-1), mas na presença de STAg não houve diferença. Sob estímulo de STAg, o número de células T CD8⁺ foi maior no grupo DMG, enquanto o número de células T CD4⁺ foi semelhante entre os grupos. Porém, a quantidade de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , IL-10 e IL-17 foi significativamente menor no grupo DMG, enquanto não houve diferença entre os grupos na quantidade de células Treg funcionais CD4⁺CD25^{High}FOXP3⁺LAP⁺. A IL-10 foi mais secretada pelas células mononucleares do sangue periférico das pacientes DMG, não houve diferença entre os grupos na secreção de IFN- γ e IL-6, enquanto a secreção de citocinas IL-17, IL-4, TNF e IL-2 foi menor no grupo DMG. Portanto, comparadas às gestantes normoglicêmicas, as gestantes que desenvolvem DMG apresentam diminuição das respostas do perfil Th1, Th2 e Th17, bem como diminuição de avides de IgG e correlação entre o aumento da glicemia e a diminuição dos níveis de anticorpos anti-*T. gondii*, sugerindo uma associação entre o DMG e a modulação negativa da resposta imune celular e humoral contra *T. gondii*. Células B, células NK e monócitos estão separadas por um box, para representar que também são células mononucleares do sangue periférico, mas não foram diretamente analisadas neste trabalho. Termos de uso: essa figura é derivada de imagens atribuídas à “Servier Medical Art” da Servier, usada sob os termos de licença da Creative Commons Attribution 3.0 France (CC BY 3.0 FR).



7. Conclusão

Conclui-se que o DMG modula a resposta imune humoral das gestantes, caracterizada pela diminuição de avidéz de IgG anti- *T. gondii* e por correlação entre a diminuição dessa avidéz e o aumento dos níveis glicêmicos. O DMG também afetou a resposta imune celular da mulher, modulando negativamente a produção de citocinas IL-2, IL-4, TNF e IL-17, e o número de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , IL-10 e IL-17, sob estímulo de antígeno de *T. gondii*, e ainda aumentou o número de linfócitos T expressando os marcadores de ativação e exaustão celular (CD28 e PD-1), sob estímulo policlonal.



Referências

ACOG Practice Bulletin No. 190 Summary: Gestational Diabetes *Mellitus*. **Obstetrics and Gynecology**, v. 131, n. 2, p. 406–408, 2018.

ALSHAREEF, S. A.; RAYIS, D. A.; ADAM, I.; GASIM, G. I. *Helicobacter pylori* infection, gestational diabetes **mellitus** and insulin resistance among pregnant Sudanese women. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 517, 2018.

ALTINOVA, A. E.; TORUNER, F.; BOZKURT, N.; BUKAN, N.; KARAKOC, A.; YETKIN, I.; AYVAZ, G.; CAKIR, N.; ARSLAN, M. Circulating concentrations of adiponectin and tumor necrosis factor- α in gestational diabetes *mellitus*. **Gynecological Endocrinology**, v. 23, n. 3, p. 161–165, 2007.

AMENDOEIRA, M, R, R.; CAMILLO-COURA, L, F. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. **Scientia Medica**, 2010; v. 20, n. 1, p. 113-119, 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v. 37, Supplement 1, p. S81-S90, 2014.

ANDRADE, G. M. Q.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; CARELLOS, E. V. M.; ROMANELLI, R. M. C.; VITOR, R. W. A.; CARNEIRO, A. C. A. V.; JANUARIO, J. N. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 1, p. 85–88, 2010.

ARAUJO-ANDRADE, C.; PICHARDO-MOLINA, J. L.; BARBOSA-SABANERO, G.; FRAUSTO-REYES, C.; TORRES-LÓPEZ, A. Detection of the presence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in human colostrum by Raman spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 12, n. 3, 2007.

ATÈGBO, J. M.; GRISSA, O.; YESSOUFOU, A.; HICHAMI, A.; DRAMANE, K. L.; MOUTAIROU, K.; MILED, A.; GRISSA, A.; JERBI, M.; TABKA, Z.; KHAN, N. A. modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4137- 4143, 2006.

AZEVEDO, K. M. L. DE; SETÚBAL, S.; LOPES, V. G. S.; CAMACHO, L. A. B.; OLIVEIRA, S. A. DE. Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency-virus infected women. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 186–189, 2010.

BACHMEYER, C.; MOUCHNINO, G.; THULLIEZ, P.; BLUM, L. Congenital toxoplasmosis from an HIV-infected woman as a result of reactivation. **Journal of Infection**, v. 52, n. 2, p. 55–57, 2006.

BAQUERO-ARTIGAO, F.; MARTÍN, F. C.; CORRIPIO, I. F.; MELLGREN, A. G.; GUASCH, C. F.; FERNÁNDEZ-MIRANDA, M. C.; GONZÁLEZ-TOMÉ, M. I.; GIANZO, J. A. C.; NETH, O.; AMADOR, J. T. R. Guía de la Sociedad Española de Infectología

Pediátrica para el diagnóstico y tratamiento de la toxoplasmosis congénita, **Anales de Pediatría**, v. 79, n. 2, p. 116.e1-116.e16, 2013.

BEN-HARARI, R. R.; GOODWIN, E.; CASOY, J. Adverse event profile of pyrimethamine-based therapy in toxoplasmosis: a systematic Review. **Drugs R D**, v. 17, n. 4, p. 523-544, 2017.

BHADRA, R.; COBB, D. A.; KHAN, I. A. Donor CD8+ T cells prevent *Toxoplasma gondii* de-encystation but fail to rescue the exhausted endogenous CD8+ T cell population. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 9, p. 3414–3425, 2013.

BHADRA, R.; GIGLEY, J. P.; WEISS, L. M.; KHAN, I. A. Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8 + T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 22, p. 9196–9201, 2011.

BORGES, M.; MAGALHÃES SILVA, T.; BRITO, C.; TEIXEIRA, N.; ROBERTS, C. W. How does toxoplasmosis affect the maternal-foetal immune interface and pregnancy? **Parasite Immunology**, v. 41, n. 3, p. 1–11, 2019.

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**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Atenção ao pré-natal de baixo risco** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – 1. ed. rev. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2013. 318 p. – (Cadernos de Atenção Básica, n° 32)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Gestação de alto risco: manual técnico** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – 5. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2012. 302 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de Notificação e Investigação: **Toxoplasmose gestacional e congênita** [recurso eletrônico]/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2018. 31 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde Coordenação-Geral de Gestão de Tecnologias em Saúde Coordenação de Monitoramento e Avaliação de Tecnologias em Saúde. **Ampliação do uso do teste do**

pezinho para a detecção da toxoplasmose congênita. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 90 p. – (Relatório de Recomendação nº 516 Fevereiro/2020)

CAMARGO, M. E.; SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 3, p. 213-218, 1991.

CAMPOS, F. A.; ANDRADE, G. M. Q. DE; PÁDUA SANTOS LANNA, A. DE; LAGE, B. F.; ASSUMPÇÃO, M. V. M.; PINTO, J. A. Incidence of congenital toxoplasmosis among infants born to HIV-coinfected mothers: case series and literature review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 609–617, 2014.

CAÑEDO-SOLARES, I.; GALVÁN-RAMÍREZ, M. D. L. L.; LUNA-PASTÉN, H.; RODRÍGUEZ PÉREZ, L. R.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; RICO-TORRES, C. P.; VELA-AMIEVA, M.; PÉREZ-ANDRADE, M.; FIGUEROA-DAMIÁN, R.; CORREA, D. Congenital toxoplasmosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 5, p. 469–474, 2008.

CARDAROPOLI, S.; GIUFFRIDA, D.; PIAZZESE, A.; TODROS, T. *Helicobacter pylori* seropositivity and pregnancy-related diseases: A prospective cohort study. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 109, p. 41-47, 2015.

CARELLOS, E. V. M.; ANDRADE, G. M. Q. DE; AGUIAR, R. A. L. P. DE. Avaliação da aplicação do protocolo de triagem pré-natal para toxoplasmose em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: estudo transversal em puérperas de duas maternidades. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 391–401, 2008.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012.

CARTER, L. L.; FOUSER, L. A.; JUSSIF, J.; FITZ, L.; DENG, B.; WOOD, C. R.; COLLINS, M.; HONJO, T.; FREEMAN, G. J.; CARRENO, B. M. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 3, p.634-643, 2002.

CHAUDHRY, S. A.; GAD, N.; KOREN, G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Canadian Family Physician - Le Médecin de famille canadien**, v. 60, n. 4, p.334-336, 2014.

CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 4, p. 227–242, 2013.

CHIEFARI, E.; ARCIDIACONO, B.; FOTI, D.; BRUNETTI, A. Gestational diabetes *mellitus*: an updated overview. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 40, n. 9, p. 899–909, 2017.

CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C. P. Congenital and acquired toxoplasmosis: Diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 651–660, 2007.

COUPER, K. N.; ROBERTS, C. W.; BROMBACHER, F.; ALEXANDER, J.; JOHNSON, L. L. *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8060-8068, 2005.

CUNHA, A. P. DA; WU, H. Y.; REZENDE, R. M.; VANDEVENTER, T.; WEINER, H. L. In vivo anti-LAP mAb enhances IL-17/IFN- γ responses and abrogates anti-CD3-induced oral tolerance. **International Immunology**, v. 27, n. 2, p. 73–82, 2015.

DARD, C.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; PELLOUX, H. Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 492–506, 2016.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 569-588, 1998.

DOLLFUS, H.; DUREAU, P.; HENNEQUIN, C.; UTEZA, Y.; BRON, A.; DUFIER, J. L. Congenital toxoplasma chorioretinitis transmitted by preconceptionally immune women. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 82, n. 12, p. 1444-1445, 1998.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P., MILLER, N. L., FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* Oocyst From Cat Feces. **Journal of Experimental Medicine**, v.132, p.636-62, 1970.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **The Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155–177, 1972.

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**, v. 11, p. 269-299, 1998.

DUNAY, I. R.; GAJUREL, K.; DHAKAL, R.; LIESENFELD, O.; MONTOYA, J. G. Treatment of toxoplasmosis : historical perspective, animal. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 31, n. 4, p. 1–33, 2018.

EDALAT, B.; SHARIFI, F.; BADAMCHIZADEH, Z.; HOSSEIN-NEZHAD, A.; LARIJANI, B.; MIRAREFIN, M.; FAKHRZADEH, H. Association of metabolic syndrome with inflammatory mediators in women with previous gestational diabetes *mellitus*. **Journal**

of **Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2013.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YEAR, H.; GONDON, E.; JANAUD, J. C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 2, p.280-285, 2009.

FAGUNDES, D. L. G.; FRANÇA, E. L.; GONZATTI, M. B.; RUGDE, M. V. C.; CALDERON, I. M. P.; HONORIO-FRANÇA, A. C. The modulatory role of cytokines IL-4 and IL-17 in the functional activity of phagocytes in diabetic pregnant women. **APMIS**, v. 126, n. 1, p. 56–64, 2018.

FAGUNDES, D. L.; FRANÇA, E. L.; SILVA FERNANDES, R. T. DA; HARA, C. D. C. P.; MORCELI, G.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; CALDERON, I. D. M. P. Changes in T-cell phenotype and cytokines profile in maternal blood, cord blood and colostrum of diabetic mothers. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 29, n. 6, p. 998–1004, 2016.

FERREIRA, L.; VALADÃO, M. C. DA S.; SKARZYNSKI, P. H.; SANFINS, M. D.; BIAGGIO, E. P. V. Effect of congenital toxoplasmosis on the encoding of speech in infants. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 129, p.109767, 2020.

FISCH, D.; CLOUGH, B.; FRICKEL, E. M. Human immunity to *Toxoplasma gondii*. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 12, p. e1008097, 2019.

FONSECA, Z. C.; RODRIGUES, I. M. X.; E MELO, N. C.; AVELAR, J. B.; CASTRO, A. M.; AVELINO, M. M. IgG avidity test in congenital toxoplasmosis diagnoses in newborns. **Pathogens**, v. 6, n. 2, p. 1–11, 2017.

FREEMAN, G. J.; LONG, A. J.; IWAI, Y.; BOURQUE, K.; CHERNOVA, T.; NISHIMURA, H.; FITZ, L. J.; MALENKOVICH, N.; OKAZAKI, T.; BYRNE, M. C.; HORTON, H. F.; FOUSSER, L.; CARTER, L.; LING, V.; BOWMAN, M. R.; CARRENO, B. M.; COLLINS, M.; WOOD, C. R.; HONJO, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, p. 1027–34, 2000.

FREITAS, L. C.; MARQUES, M. R.V.; LEITE, R. B.C.H.; BARBOSA, V. S.A. Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women in a city in Rio Grande Do Norte state, Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 46, n. 2, p. 147-158, 2017.

FRENKEL, J. K. Toxoplasma in and around us. **BioScience**, v. 23, p. 343-52, 1973.

FRIEBE-HOFFMANN, U.; ANTONY, L.; KRUESSEL, J. S.; PAWLOWSKI, B.; HOFFMANN, T. K. Peripheral immunological cells in pregnant women and their change during diabetes. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 125, n. 10, p. 677–683, 2017.

GANDHI, R.; FAREZ, M. F.; WANG, Y.; KOZORIZ, D.; QUINTANA, F. J.; WEINER, H. L. Cutting Edge: Human Latency-Associated Peptide T cells: a novel regulatory T cell subset. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 9, p. 4620-4624, 2010.

GAVINET, M. F.; ROBERT, F.; FIRTION, G.; DELOUVRIER, E.; HENNEQUIN, C.; MAURIN, J. R.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1276-1277, 1997.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 1, p. 286-292, 1991.

GEORGIOU, H. M.; LAPPAS, M.; GEORGIOU, G. M.; MARITA, A.; BRYANT, V. J.; HISCOCK, R.; PERMEZEL, M.; KHALIL, Z.; RICE, G. E. Screening for biomarkers predictive of gestational diabetes *mellitus*. **Acta Diabetologica**, v. 45, n. 3, p. 157–165, 2008.

GOMES, C. P.; TORLONI, M. R.; GUEUVOGHLANIAN-SILVA, B. Y.; ALEXANDRE, S. M.; MATTAR, R.; DAHER, S. Cytokine levels in gestational diabetes *mellitus*: A Systematic Review of the Literature. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 69, n. 6, p. 545–557, 2013.

GÓMEZ-CHÁVEZ, F.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; FLORES-GARCÍA, Y.; LUNA-PASTÉN, H.; FIGUEROA-DAMIÁN, R.; MORA-GONZÁLEZ, J. C.; CORREA, D. Maternal immune response during pregnancy and vertical transmission in human toxoplasmosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 285, 2019.

GUEUVOGHLANIAN-SILVA, B. Y.; TORLONI, M. R.; MATTAR, R.; OLIVEIRA, L. S. DE; SCOMPARINI, F. B.; NAKAMURA, M. U.; DAHER, S. Profile of inflammatory mediators in gestational diabetes *mellitus*: phenotype and genotype. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 3, p. 241-250, 2012.

HAPO Study Cooperative Research Group, METZGER, B. E.; LOWE, L. P.; DYER, A. R.; TRIMBLE, E. R.; CHAOVARINDR, U. et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 19, p. 1991-2002, 2008.

HARA, C. D. C. P.; FRANÇA, E. L.; FAGUNDES, D. L. G.; QUEIROZ, A. A. DE; RUDGE, M. V. C.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; CALDERON, I. D. M. P. Characterization of natural killer cells and cytokines in maternal placenta and fetus of diabetic mothers. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–8, 2016.

HENNEQUIN, C.; DUREAU, P.; N'GUYEN, L.; THULLIEZ, P.; GAGELIN, B.; DUFIER, J. L. Congenital toxoplasmosis acquired from an immune woman. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 16, n. 1, p. 75-77, 1997.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology Infection**, v. 8, p. 634-640, 2002.

HUI, E.; CHEUNG, J.; ZHU, J.; SU, X.; TAYLOR, M. J.; HEIDI, A.; SASMAL, D. K.; HUANG, J.; KIM, J. M.; MELLMAN, I.; VALE, D. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. **Science**, v. 355, n. 6332, p. 1428–1433, 2017.

HUNTER, C. A.; BERMUDEZ, L.; BEERNINK, H.; WAEGELL, W.; REMINGTON, J. S. Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 4, p. 994-1000, 1995.

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**, v. 27, n. 9, p. 2031–2038, 1989.

HWANG, S. J.; COBB, D. A.; BHADRA, R.; YOUNGBLOOD, B.; KHAN, I. A. Blimp-1-mediated CD4 T cell exhaustion causes CD8 T cell dysfunction during chronic toxoplasmosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 9, p. 1799–1818, 2016.

ISABEL, F. T.; COSTA, P. I.; SIMÕES, M. J. S. Toxoplasmose em gestantes de Araraquara/SP: análise da utilização do teste de avidéz de IgG anti-*Toxoplasma* na rotina do pré-natal. **Scientia Medica**, v. 17, n. 2, p. 57-62, 2007.

ISHIDA, Y.; AGATA, Y.; SHIBAHARA, K.; HONJO, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 11, p. 3887–3895, 1992.

JANKOVIC, D.; KULLBERG, M. C.; FENG, C. G.; GOLDSZMID, R. S.; COLLAZO, C. M.; WILSON, M.; WYNN, T. A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A.; SHER, A. Conventional T-bet+Foxp3- Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 273–283, 2007.

JEFFERS, V.; TAMPAKI, Z.; KIM, K.; SULLIVAN, W. J. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 13, p. 2355–2373, 2018.

JOHNS, K.; OLYNIK, C.; MASE, R.; KREISMAN, S.; TILDESLEY, H. Gestational diabetes *mellitus* outcome in 394 patients. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 28, p. 122–127, 2006.

KANKOVÁ, S.; FLEGR, J.; CALDA, P. An elevated blood glucose level and increased incidence of gestational diabetes *mellitus* in pregnant women with latent toxoplasmosis. **Folia Parasitológica**, v. 62, pii. 2015.056, 2015.

KAWARABAYASHI, M.; PICANÇO AURELIANO, D.; LÚCIA RAYMUNDO, M.; APARECIDA GARCIA, R.; ALVES DA COSTA-SILVA, T.; GOMES CASTELLÃO, K.; HILOMI TANIGUCHI, H.; EDUARDO TOLEZANO, J.; MITSUYOSHI HIRAMOTO, R. 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 do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 63–67, 2007.

KEIR, M. E.; BUTTE, M. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 677–704, 2008.

KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 617–621, 2005.

KHAN, I. A.; HWANG, S.; MORETTO, M. *Toxoplasma gondii*: CD8 T cells cry for CD4 help. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 136, p. 1–8, 2019.

KHAN, K.; KHAN, W. Congenital toxoplasmosis: An overview of the neurological and ocular manifestations. **Parasitology International**, v. 67, n. 6, p. 715–721, 2018.

KIM, K. The Epigenome, Cell Cycle, and Development in *Toxoplasma*. **Annual Review of Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 479–499, 2018.

KOCHANOWSKY, J. A.; KOSHY, A. A. *Toxoplasma gondii*. **Current Biology**, v. 28, n. 14, p. R770–R771, 2018.

KODJIKIAN, L.; HOIGNE, I.; ADAM, O.; JACQUIER, P.; AEBI-OCHSNER, C.; AEBI, C.; GARWEG, J. G. Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 23, n. 3, p. 272–274, 2004.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 485–517, 2009.

KRISTIANSEN, O. P.; MANDRUP-POULSEN, T. Interleukin-6 and diabetes: The good, the bad, or the indifferent? **Diabetes**, v. 54, n. suppl 2, p. S114–S124, 2005.

LOGAKODIE, S.; AZAHADI, O.; FUZIAH, P.; NORIZZATI, B. I. B.; TAN, S. F.; ZIENNA, Z. Z. R.; NORLIZA, M.; NORAINI, J.; HAZLIN, M.; NORALIZA, M. Z.;

SAZIDAH, M. K.; MIMI, O. Gestational diabetes mellitus: The prevalence, associated factors and foeto-maternal outcome of women attending antenatal care. **Malays Fam Physician**, v. 12, n. 2, p. 9–17, 2017.

LEÃO, P. R. D.; MEIRELLES FILHO, J.; MEDEIROS, S. F. Toxoplasmose: soroprevalência em puérperas atendidas pelo Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 8, p. 542, 2004.

LI, Y. X.; XIN, H.; ZHANG, X. Y.; WEI, C. Y.; DUAN, Y. H.; WANG, H. F.; NIU, H. T. *Toxoplasma gondii* infection in diabetes mellitus patients in china: seroprevalence, risk factors, and case-control studies. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 4723739, 2018.

LIESENFELD, O.; MONTOYA, J. G.; KINNEY, S.; PRESS, C.; REMINGTON, J. S. Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 8, p. 1248–1253, 2001.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 138, p. 1829–1831, 2011.

LIPSKA, A.; WYSOCKA, J.; TUROWSKI, D. Immune response and diagnostic aspects during *Toxoplasma gondii* infection. **Wiadomości parazytologiczne**, v. 46, n. 3, p. 315-325, 2000.

LIU, L.; LIU, T.; YU, L.; CAI, Y.; ZHANG, A.; XU, X.; LUO, Q.; HU, Y.; SONG, W.; LUN, Z.; LU, F.; WANG, Y.; SHEN, J. rROP2(186-533): a novel peptide antigen for detection of IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 9, n. 1, p. 7-12, 2012.

LIU, Q.; WANG, Z. D.; HUANG, S. Y.; ZHU, X. Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.

LOBO, T. F.; BORGES, C. DE M.; MATTAR, R.; GOMES, C. P.; ANGELO, A. G. S. DE; PENDELOSKI, K. P. T.; DAHER, S. Impaired Treg and NK cells profile in overweight women with gestational diabetes mellitus. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 3, p. 3–7, 2018.

LOMBARDELLI, L. LOGIODICE, F.; AGUERRE-GIRR, M.; KULLOLLI, O.; HALLER, H.; CASART, Y.; BERREBI, A.; L'FAQIHI-OLIVE, F. E.; DUPLAN, V.; ROMAGNANI, S.; MAGGI, E.; RUKAVINA, D.; LE BOUTEILLER, P.; PICCINNI, M. P. Interleukin-17-producing decidual CD4+ T cells are not deleterious for human pregnancy when they also produce interleukin-4. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 14, n.1, p.1-14, 2016.

LÓPEZ-TINOCO, C.; ROCA, M.; FERNÁNDEZ-DEUDERO, A.; GARCÍA-VALERO, A.; BUGATTO, F.; AGUILAR-DIOSDADO, M.; BARTHA, J. L. Cytokine profile, metabolic

syndrome and cardiovascular disease risk in women with late-onset gestational diabetes *mellitus*. **Cytokine**, v. 58, n. 1, p. 14-19, 2012.

LUCCIA, T. P. B. DE; PENDELOSKI, K. P. T.; ONO, E.; PARES, D. B. S.; YAZAKI, S.; SILVIA, S. Unveiling the pathophysiology of gestational diabetes: studies on local and peripheral immune cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 17, n. e12860, p. 1-8, 2019.

MAHMOUD, F.; ABUL, H.; DASHTI, A.; AL-JASSAR, W.; OMU, A. Trace elements and cell-mediated immunity in gestational and pre-gestational diabetes *mellitus* at third trimester of pregnancy. **Acta Medica Academica**, v. 41, n. 2, p. 175-185, 2012.

MAJIDIANI, H.; DALVAND, S.; DARYANIC, A.; GALVAN-RAMIREZ, M. L.; FOROUTAN-RAD, M. Is chronic toxoplasmosis a risk factor for diabetes *mellitus*? A systematic review and meta-analysis of case-control studies. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 605-609, 2016.

MALDONADO, Y. A.; READ, J. S.; AAP COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Diagnosis, treatment, and prevention of congenital toxoplasmosis in the United States. **Pediatrics**, v. 139, n. 2, e20163860, 2017.

MALEK, A.; SAGER, R.; KUHN, P.; NICOLAIDES, K. H.; SCHNEIDER, H. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 36, n. 5, p. 248-255, 1996.

MANCINI, D. T.; ASSIS, L. C.; RAMALHO, T. C.; da CUNHA, E. F. F.; França, T. C. C. Toxoplasmose: perspectivas no estudo de novos alvos terapêuticos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 4, p. 434-455, 2012.

MAREZE, M.; NASCIMENTO BENITEZ, A. DO; PÉROLA DRULLA BRANDÃO, A.; PINTO-FERREIRA, F.; MIURA, A. C.; CARDOSO MARTINS, F. D.; CALDART, E. T.; BIONDO, A. W.; FREIRE, R. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1-14, 2019.

MATTOS, C. C. B.; SPEGIORIN, L. C. J. F.; MEIRA, C. S.; SILVA, T. C.; FERREIRA, A. I. C.; NAKASHIMA, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MATTOS, L. C. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. **São Paulo Medical Journal**, v. 129, n. 4, p. 261-266, 2011.

MEIRELLES FILHO, J. Toxoplasmose e gravidez: inquérito sorológico em gestantes e seus recém-nascidos na Maternidade-Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 95, p. 393-401, 1985.

MELAMED, J.; ECKERT, G. U.; SPADONI, V. S.; LAGO, E. G.; UBERTI, F. Ocular manifestations of congenital toxoplasmosis. **Eye**, v. 24, n. 4, p. 528-534, 2010.

MELO INAGAKI, A. D. DE; CARDOSO, N. P.; LOPES, R. J. P. L.; ALVES, J. A. B.; MESQUITA, J. R. F.; ARAÚJO, K. C. G. M. DE; KATAGIRI, S. Análise espacial da prevalência de toxoplasmose em gestantes de Aracaju, Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 36, n. 12, p. 535–540, 2014.

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**, v. 28, p. 6-11, 1986.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 1ª edição, ed. EDUFU, 2005. p. 81-111.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 4, p. 554-566, 2008.

MORISSET, A. S.; DUBÉ, M. C.; CÔTÉ, J. A.; ROBITAILLE, J.; WEISNAGEL, S. J.; TCHERNOF, A. Circulating interleukin-6 concentrations during and after gestational diabetes mellitus. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 90, n. 5, p. 524–530, 2011.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological reviews**, Copenhagen, v. 240, p. 269-285, 2011.

NASCIMENTO, F. S.; SUZUKI, L. A.; BRANCO, N.; FRANCO, R. M. B.; ANDRADE, P. D.; COSTA, S. C. B.; PEDRO, M. N.; ROSSI, C. L. Toxoplasma-specific IgG subclass antibody response in cerebrospinal fluid samples from patients with cerebral toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 439–442, 2015.

NICOLLE, C. ; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Compte Rendu de l'Academie des Sciences Paris**, v.148, p. 369-372, 1909.

NISHIYAMA, S.; PRADIPTA, A.; MA, J. S.; SASAI, M.; YAMAMOTO, M. T cell-derived interferon- γ is required for host defense to *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, v. 75, 102049, 2020.

NÓBREGA, M. C.; MAGALHÃES, V.; ALBUQUERQUE, Y.; MAGALHÃES, C.; ARCOVERDE, C.; CASTRO, C. Toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 59, p. 23-29, 1999.

OLBRICH NETO, J.; ALVES MEIRA, D. 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, n. 1, p.28-32, 2004.

OLIVEIRA, A. C. M.; BORGES, H. D. S.; CARVALHO, F. R.; MACÊDO-JUNIOR, A. G.; MOTA, C. M.; OLIVEIRA, A. M. M.; SANTIAGO, F. M.; ARAÚJO, C. G. A.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; ABDALLAH, V. O. S.; MINEO, J. R. Evaluation of colostrum as an alternative biological sample for the diagnosis of human congenital toxoplasmosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 519, 2015.

OLIVEIRA, J. E. P.; MONTENEGRO JUNIOR, R. M.; VENCIO, S. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo : Editora Clannad, 2017.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 71–109, 2011.

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, n. 12, p. 1385–1394, 2009.

PARK, J.; DELONG, J. H.; KNOX, J. J.; KONRADT, C.; WOJNO, D. T.; HUNTER, C. A. Impact of interleukin-27p28 on T and B cell responses during toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 12, p. 1–11, 2019.

PAUL, M. Immunoglobulin G avidity in diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy and ocular toxoplasmosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 4, p. 514–518, 1999.

PENA, L. T.; DISCACCIATI, M. G. Importância do teste de avidéz da imunoglobulina G (IgG) anti- *Toxoplasma gondii* no diagnóstico da toxoplasmose em gestantes. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 2, p. 137-43, 2013.

PENDELOSKI, K. P. T.; MATTAR, R.; TORLONI, M. R.; GOMES, C. P.; ALEXANDRE, S. M.; DAHER, S. Immunoregulatory molecules in patients with gestational diabetes *mellitus*. **Endocrine**, v. 50, n. 1, p. 99–109, 2015.

PORTER, S. B.; SANDE, M. A. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v.327, p.1643-1648, 1992.

PORTO, A. M. F.; AMORIM, M. M. R. DE; COELHO, I. C. N.; SANTOS, L. C. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes atendidas em maternidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 2008.

REICHE, E. M.; MORIMOTO, H. K.; FARIAS, G. N.; HISATSUGU, K. R.; GELLER, L.; GOMES, A. C.; INOUE, H. Y.; RODRIGUES, G.; MATSUO, T. Prevalence of American trypanosomiasis, syphilis, toxoplasmosis, rubella, hepatitis B, hepatitis C, human immunodeficiency virus infection, assayed through serological tests among pregnant patients, from 1996 to 1998, at the Regional University Hospital N. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 6, p. 519-527, 2000.

REMYINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON JS, KLEIN JO, WILSON CB, BAKER CJ, eds. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**, 6.ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders, 2006. p. 948-1091.

REY, L. C.; RAMALHO, I. L. C. Seroprevalence of toxoplasmosis in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 41, n. 3, p. 171-174, 1999.

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**, v. 27, n. 19, p. 2570-2579, 2009.

ROBERTSON, S. A.; CARE, A. S.; MOLDENHAUER, L. M. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 10, p. 4224–4235, 2018.

SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 44, p. 805–814, 2012.

SAITO, S.; NAKASHIMA, A.; SHIMA, T.; ITO, M. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 601–610, 2010.

SAKI, J.; SHAFIEENIA, S.; FOROUTAN-RAD, M. Seroprevalence of toxoplasmosis in diabetic pregnant women in southwestern of Iran. **Journal of Parasitic Diseases : Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 1586–1589, 2016.

SALMI, A.; ZAKI, M. N.; ZAKARIA; NOR ALIZA, G.; RASOOL, H. G. Arterial stiffness, inflammatory and pro-atherogenic markers in gestational diabetes *mellitus*. **Vasa**, v. 41, n. 2, p. 96-104, 2012.

SANDRIN, L, N, A.; PONZI, C, C.; BINDA, G.; NARDI, A. Perfil epidemiológico de toxoplasmose em gestantes. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 6, p. 486-9, 2012.

SARDARIAN, K.; MAGHSOOD, A. H.; FARIMANI, M.; HAJILOII, M.; SAIDIJAM, M.; REZAEPOOR, M.; MAHAKI, H.; ZAMANI, A. Evaluation of *Toxoplasma gondii* B1 gene

in placental tissues of pregnant women with acute toxoplasmosis. **Advanced Biomedical Research**, v. 7, 119, 2018.

SASAI, M.; PRADIPTA, A.; YAMAMOTO, M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 113–119, 2018.

SASAI, M.; YAMAMOTO, M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 51, n. 12, p. 156, 2019.

SAUCEDO, R.; ZARATE, A.; BASURTO, L.; HERNANDEZ, M.; PUELLO, E.; GALVAN, R.; CAMPOS, S. Relationship between circulating adipokines and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes. **Archives of Medical Research**, v. 42, n. 4, p. 318-323, 2011.

SCHLÜTER, D.; KWOK, L.-Y.; LÜTJEN, S.; SOLTEK, S.; HOFFMANN, S.; KÖRNER, H.; DECKERT, M. Both lymphotoxin- α and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 12, p.6172-6182, 2003.

SCHÖBER, L.; RADNAI, D.; SPRATTE, J.; KISIELEWICZ, A.; SCHMITT, E.; MAHNKE, K.; FLUHR, H.; UHLMANN, L.; SOHN, C.; STEINBORN, A. The role of regulatory T cell (Treg) subsets in gestational diabetes *mellitus*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 177, n. 1, p. 76–85, 2014.

SCOTT, P.; PEARCE, 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**, v. 139, n. 1, p. 221-227, 1987.

SEGUNDO, G. R. S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 50, n. 1, p. 50-53, 2004.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 6, p. 504-512, 2006.

SIDDIQUI, S.; WAGHDHARE, S.; GOEL, C.; PANDA, M.; SONEJA, H.; SUNDAR, J.; BANERJEE, M.; JHA, S.; DUBEY, S. Augmentation of IL-6 production contributes to development of gestational diabetes *mellitus*: an Indian study. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 13, n. 2, p. 895–899, 2019.

SIFNAIOS, E.; MASTORAKOS, G.; PSARRA, K.; PANAGOPOULOS, N. D.; PANOULIS, K.; VITORATOS, N.; RIZOS, D.; CREATSAS, G. Gestational diabetes and T-cell (Th1/Th2/Th17/Treg) immune profile. **In Vivo**, v. 33, n. 1, p. 31–40, 2019.

SILVA, J. L. A.; REZENDE-OLIVEIRA, K.; SILVA, M. V. DA; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C.; CREMA PEGHINI, B.; SILVA, N. M.; MINEO, J. R.; RODRIGUES JÚNIOR, V. IL-17-expressing CD4+and CD8+T lymphocytes in human toxoplasmosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 573825, 2014.

SILVA, L. R.; OKAZAKI, E. L, F, J. Enfermagem e a prevenção da toxoplasmose durante a gestação. **Revista de Enfermagem da Unisa**, v. 13, n. 1, p. 43-7, 2012.

SIMISTER, N. E. Placental transport of immunoglobulin G. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p. 3365-3369, 2003.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E. S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

SOUZA-E-SILVA, C. H. DE; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; ANDRADE, G. Q. DE; CARELLOS, E. V. M. H.; CASTRO ROMANELLI, R. M. DE; RESENDE, L. M. E. DE; JANUÁRIO, J. N.; CARNEIRO, M.; AGUIAR VASCONCELOS CARNEIRO, A. C. DE; ALMEIDA VITOR, R. W. DE. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 1, p. 13–16, 2013.

SPALDING, S. M.; REIS ANNENDOEIRA, M. R.; KLEIN, C. H.; RIBEIRO, L. C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. p. 173-177, 2005.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. **Nota preliminare pel. Rev Soc Scient São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.

SUN, J.; TANG, D. N.; FU, T.; SHARMA, P. Identification of human regulatory T cells in the setting of T-cell activation and anti-CTLA-4 immunotherapy on the basis of expression of latency-associated peptide. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 2, p. 122–130, 2012.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, Nov. 2000.

TOMBÁČZ, K.; BURGESS, G.; HOLDER, A.; WERNERS, A.; WERLING, D. *Toxoplasma gondii* profilin does not stimulate an innate immune response through bovine or human TLR5. **Innate Immunity**, v. 24, n. 7, p. 422-429, 2018.

TRUJILLO, J.; VIGO, A.; REICHELT, A.; DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I. Fasting plasma glucose to avoid a full OGTT in the diagnosis of gestational diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, n. 3, p. 322–326, 2014.

VAMBERGUE, A.; DOGNIN, C.; BOULOGNE, A.; RE'JOU, M. C.; BIAUSQUE, S.; FONTAINE, P. Increasing incidence of abnormal glucose tolerance in women with prior abnormal glucose tolerance during pregnancy: DIAGEST 2 study. **Diabetic Medicine**, v. 25, n. 1, p. 58–64, 2008.

VARELLA, I. S.; WAGNER, M. B.; DARELA, A. C.; NUNES, L. M.; MÜLLER, R. W. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. **Jornal de Pediatria**, v.79, n. 1, p. 69-74, 2003.

VILLENA, I.; ANCELLE, T.; DELMAS, C.; GARCIA, P.; BRÉZIN, A. P.; THULLIEZ, P.; WALLON, M.; KING, L.; GOULET, V. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. **Eurosurveillance**, v. 15, n.25, pii: 19600, 2010.

VILLENA, I.; CHEMLA, C.; QUEREUX, C.; DUPOUY, D.; LEROUX, B.; FOU DRINIER, F.; PINON, J. M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an immunocompetent woman infected before conception. Reims Toxoplasmosis Group. **Prenatal Diagnosis**, v. 18, n. 10, p. 1079-1081, 1998.

VOGEL, N.; KIRISITS, M.; MICHAEL, E.; BACH, H.; HOSTETTER, M.; BOYER, K.; SIMPSON, R.; HOLFELS, E.; HOPKINS, J.; MACK, D.; METS, M. B.; SWISHER, C. N.; PATEL, D.; ROIZEN, N.; STEIN, L.; STEIN, M.; WITHERS, S.; MUI, E.; EGWUAGU, C.; REMINGTON, J.; DORFMAN, R.; McLEOD, R. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 1055-1060, 1996.

WHO. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: a World Health Organization Guideline. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 3, p.341-363, 2014.

XU, L.; YU, Y.; SANG, R.; GE, B.; WANG, M.; ZHOU, H.; ZHANG, X. Inonotus obliquus polysaccharide protects against adverse pregnancy caused by *Toxoplasma gondii* infection through regulating Th17/Treg balance via TLR4/NF-kappaB pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p.832-840, 2020.

YAP, B. G. S.; SHER, A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for Interferon (IFN)- γ - and Tumor Necrosis Factor (TNF)- α -dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 7, p. 1083–1092, 1999.

YAP, G. S.; SCHAR TON-KERSTEN, T.; CHAREST, H.; SHER, A. Decreased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 3, p.1340-1345, 1998.

ZHANG, H.; HU, X.; LIU, X.; ZHANG, R.; FU, Q.; XU, X. The Treg/Th17 Imbalance in *Toxoplasma gondii*-Infected Pregnant Mice. **American Journal of Reproductive**

Immunology, v. 67, n. 2, p. 112–121, 2012.

ZHANG, K.; LIN, G.; HAN, Y.; LI, J. Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization. **Clinica Chimica Acta**, v. 461, p. 83–89, 2016.

ZHAO, M.; ZHANG, H.; LIU, X.; JIANG, Y.; REN, L.; HU, X. The effect of TGF- β on treg cells in adverse pregnancy outcome upon *Toxoplasma gondii* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 901, 2017

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - UFTM



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

Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores:

A toxoplasmose é uma doença causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, que faz parte do Reino Protista, Sub-reino Protozoa e Filo Apicomplexa (TENTER; HECKEROTH; WEISS; 2000, MONTOYA; LIESENFELD, 2004), e é caracterizado por possuir um complexo apical composto de roptrias, micronemas, grânulos densos e elementos do citoesqueleto (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011, MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Existem três formas infectantes do *T. gondii*, que são os esporozoítos encontrados dentro dos oocistos, produzidos no intestino de felinos infectados e eliminados para o meio externo juntamente com as fezes, cada oocisto apresenta 2 esporocistos com 4 esporozoítos, e representam a forma de resistência do *T. gondii*; os taquizoítos são formas de replicação rápida e são encontrados no sangue e demais líquidos orgânicos durante a fase aguda da doença, contaminando órgãos como olhos, músculos, coração, placenta e sistema nervoso central; e por fim os bradizoítos que são morfologicamente idênticos aos taquizoítos, contudo apresentam multiplicação lenta de baixo metabolismo, são encontrados dentro de cistos teciduais na fase crônica da doença, presente em vários tecidos, tais como, os músculos esqueléticos e cardíacos, células do sistema nervoso e retina, e podem

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

UF: MG

Município: UBERABA

CEP: 38.025-100

Telefone: (34)3700-6776

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - UFTM



Continuação 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

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERABA, 16 de Dezembro de 2016

Assinado por:
Marly Aparecida Spadotto Balarin
(Coordenador)

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

UF: MG

Município: UBERABA

CEP: 38.025-100

Telefone: (34)3700-6776

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

ANEXO II



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP
Rua Madre Maria José, 122 - 2º. Andar - Bairro Nossa Senhora da Abadia
CEP: 38025-100 – Uberaba(MG) Telefone: (0**34) 3700-6776
E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTES MAIORES DE IDADE

Título do Projeto:

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

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Você está sendo convidada a participar do estudo “Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados”, por ser paciente do Ambulatório Ginecologia e Obstetrícia.

Durante a gravidez, a mulher pode desenvolver diabetes gestacional, que é um aumento no nível de glicose do sangue, e isso pode gerar complicações para a mãe e o bebê. Além disso, a toxoplasmose é uma doença que a gestante pode contrair e também causar graves danos ao bebê. Por isso é importante a realização do pré-natal, pois acompanha os níveis de glicose no sangue da mulher, bem como realizam-se exames para toxoplasmose. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar alguns dos mecanismos de defesa de gestantes que já tiveram contato com toxoplasmose, associado ou não a altos níveis de glicose no sangue (DM+ ou DM-). Sendo o grupo controle negativo as pacientes sem toxoplasmose e sem diabetes mellitus gestacional. 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.

Espera-se que o benefício decorrente da sua participação nesta pesquisa seja a descoberta de informações importantes da associação entre altos níveis de glicose no sangue e o surgimento de complicações da toxoplasmose para o bebê, que serão úteis para tomar os devidos cuidados com relação à necessidade de acompanhamento e 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.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG
Comitê de Ética em Pesquisa- CEP
 Rua Madre Maria José, 122 - 2º. Andar - Bairro Nossa Senhora da Abadia
 CEP: 38025-100 – Uberaba(MG) Telefone: (0**34) 3700-6776
 E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

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

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores

Pesquisadoras:
 Aline Caroline de Lima Marques
 Ana Carolina de Moraes 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.

ANEXO III

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
Rua Madre Maria José, 122 - 2º. Andar - Bairro Nossa Senhora da Abadia
CEP: 38025-100 – Uberaba(MG) Telefone: (0**34) 3700-6776
E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
COLETA DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL**

Título do Projeto:

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

TERMO DE ESCLARECIMENTO

Solicitamos o seu consentimento para a coleta de sangue de cordão umbilical do seu Recém-nascido, para a participação no estudo “Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados”.

Durante a gravidez, a mulher pode desenvolver diabetes gestacional, que é um aumento no nível de glicose do sangue, e isso pode gerar complicações para a mãe e o bebê. Além disso, a toxoplasmose é uma doença que a gestante pode contrair e também causar graves danos ao bebê. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar alguns dos mecanismos de defesa dos recém-nascidos, cujas mães já tiveram contato com toxoplasmose, associado ou não a altos níveis de glicose no sangue (DM+ ou DM-). Sendo o grupo controle negativo as pacientes sem toxoplasmose e sem diabetes mellitus gestacional. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua autorização é importante. Não será feito nenhum procedimento que traga qualquer desconforto ou risco à vida do seu bebê, apenas iremos coletar uma amostra de sangue do cordão umbilical, após o parto.

Espera-se que o benefício decorrente da sua autorização para a coleta dessa amostra seja a descoberta de informações sobre possíveis complicações da toxoplasmose para o bebê, que serão úteis para tomar os devidos cuidados com relação à necessidade de acompanhamento e tratamento.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento ou do seu bebê. Pela sua autorização 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 ou o nome de seu bebê, não aparecerão em qualquer momento do estudo, pois vocês serão identificados com um número.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - Uberaba-MG
 Comitê de Ética em Pesquisa- CEP
 Rua Madre Maria José, 122 - 2º. Andar - Bairro Nossa Senhora da Abadia
 CEP: 38025-100 – Uberaba(MG) Telefone: (0**34) 3700-6776
 E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

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 será realizado. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha autorização a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento, nem o tratamento do meu bebê. Sei que meu nome, e o nome do meu bebê não serão divulgados, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu autorizo a coleta de sangue de cordão umbilical do meu recém-nascido. Receberei uma via deste Termo.

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

 Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

 Documento de Identidade

 Assinatura do pesquisador responsável

 Assinatura do pesquisador orientador

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.