

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

**CRISTHIANNE MOLINERO ANDRADE RATKEVICIUS**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL ESPECÍFICA AO  
*TOXOPLASMA GONDII* EM PACIENTES IMUNOMODULADOS DEVIDO AO USO  
DE BLOQUEADORES DE TNF**

UBERABA - MG

2021

**CRISTHIANNE MOLINERO ANDRADE RATKEVICIUS**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL ESPECÍFICA AO  
*TOXOPLASMA GONDII* EM PACIENTES IMUNOMODULADOS DEVIDO AO USO  
DE BLOQUEADORES DE TNF**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

UBERABA - MG

2021

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

R183a Ratkevicius, Cristhianne Molinero Andrade  
Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados devido ao uso de bloqueadores de TNF / Cristhianne Molinero Andrade Ratkevicius. -- 2021.  
94 f. : il., fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021  
Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

1. Toxoplasma. 2. Toxoplasmose. 3. Inibidores do fator de necrose tumoral. 4. Imunoglobulinas. 5. Imunossupressão. 6. Imunidade I. Rodrigues Júnior, Virmondes. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.993.1

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho para minha família:*

- meus avós, João e Margarida, que não estão mais aqui, mas ainda assim permanecem comigo, através de todos os ensinamentos que recebi.*
- meus pais, Ângela e Frontoário, que são meu exemplo de força, coragem, fé, resiliência, determinação, amor e lealdade; e que sempre me mostraram que não importa o tamanho da dificuldade e sim o tamanho da sua capacidade de lutar e vontade vencer.*
- meu esposo, que sempre me apoiou em todos os meus projetos (de vida e profissionais) com amor e paciência.*
- meus dois filhos, que amo mais que tudo: meu anjinho, que infelizmente não tive a sorte de conhecer, mas ainda assim me ensinou tanto em tão pouco tempo; e minha princesinha Milena, que ilumina minha vida com sua alegria e me dá forças para buscar meus objetivos.*

***Amo vocês mais que a mim mesma!***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me conceder saúde (principalmente em tempos tão difíceis como esses de pandemia), por sempre me guiar e por colocar ao longo do meu caminho pessoas maravilhosas.

Aos meus pais por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e por lutarem para me proporcionar condições de seguir na profissão que escolhi e por sempre acreditarem em mim!

À minha filha por me fazer reviver a infância através de suas experiências e me ajudar ver a vida de forma mais leve; por me lembrar todos os dias sobre a importância de não ter medo de errar, nem de tentar várias e várias vezes e sempre celebrar cada pequena conquista. E principalmente por ter me dado a oportunidade de desenvolver o projeto mais difícil, mais importante e mais gratificante: ser mãe!

Ao meu esposo pela compreensão com meu cansaço e falta de tempo e pelo apoio ao longo dessa trajetória.

Aos meus avós, por terem amparado à mim e à minha mãe enquanto puderam, minha eterna gratidão e amor. Sinto falta de vocês todos os dias!

Ao professor Dr. Virmondes Rodrigues Júnior, meu orientador, por ter aberto as portas do laboratório de imunologia e permitido que eu trabalhasse em suas linhas de pesquisa, pela paciência em acompanhar toda a evolução dessa tese e principalmente pela confiança depositada em mim e oportunidade de aprendizado com um pesquisador incrível.

À professora Dra. Denise pela oportunidade de auxiliá-la nos estágios práticos e por me ensinar tanto sobre docência, que foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional; pela paciência, atenção e disposição em ajudar sempre.

Ao Dr. Reginaldo e à Rosa, sua secretária, pela ajuda com o recrutamento dos pacientes, imprescindível para a realização deste projeto.

À minha amiga, mestre Aline Caroline de Lima Marques e ao Dr. Rodolfo Timóteo Pessato pelo auxílio com a coleta das amostras e dados dos pacientes.

À professora Dra. Renata Alves Pereira-Balvedi por me permitir aprender uma nova técnica e participar de projetos com seu grupo e pela supervisão no projeto de desenvolvimento tecnológico desenvolvido em paralelo ao doutorado, que foram essenciais para minha evolução acadêmica e pessoal.

À minha amiga e parceira de bancada, Beatriz Rodrigues Martins, pela troca de experiências, ensinamentos e por toda a ajuda durante o doutorado e todas as colaborações que temos feito juntas.

Ao professor Dr. Hélio Moraes de Souza, à professora Dra. Fernanda Bernadelli De Vito e ao professor Dr. Marcos Vinícius da Silva pelo auxílio com o citômetro de fluxo.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Imunologia e do Laboratório de Parasitologia pelo bom convívio.

Aos pacientes da Reumatologia, que mesmo com dor constante, sempre me procuravam com um sorriso no rosto e se disponibilizavam a fazer parte da pesquisa.

Aos secretários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Tuânia e André, pela disponibilidade e boa vontade em ajudar em tudo que fosse necessário.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) por proporcionar toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos durante o doutorado; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, incentivaram ou contribuíram para a realização deste estudo.

"Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade."

**- Marie Curie**

## RESUMO

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais prevalentes no Brasil e no mundo e pode trazer consequências graves em imunossuprimidos. Por essa razão, existe uma grande preocupação com a prevenção e com o monitoramento de toxoplasmose aguda nesses grupos de pacientes. Nos últimos anos, os antagonistas de TNF têm sido utilizados para o tratamento de doenças autoimunes (DA) e proporcionado um melhor controle dos sintomas e qualidade de vida para esses indivíduos. No entanto, durante a fase crônica de toxoplasmose o IFN- $\gamma$  e seu receptor, IFN- $\gamma$ R, necessitam da atuação também de TNF- $\alpha$  e TNFR para a manutenção da resistência e latência da doença, e vários estudos demonstraram risco de reativação de infecções latentes, incluindo a toxoplasmose, em pacientes com DA em uso de imunomoduladores, devido à diminuição da vigilância dessas citocinas. No presente estudo, objetivou-se verificar se pacientes portadores de doenças autoimunes e em uso de antagonistas de TNF possuem algum indício de risco aumentado de reativação de toxoplasmose. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue periférico dos pacientes que já tiveram contato com o *Toxoplasma gondii* (IgG<sup>+</sup>), portadores de doenças autoimunes que estavam em uso de drogas sintéticas (DS) e/ou imunobiológicos (IB) e de indivíduos do grupo controle (GC), e as células mononucleares do sangue periférico foram separadas e avaliadas após estimulação com antígenos solúveis totais de *Toxoplasma gondii* e com anti-CD3 e anti-CD28 ou sem nenhum estímulo, nos tempos de 48 e 96 horas. Foram avaliados os seguintes marcadores: CD69<sup>+</sup> e CD28<sup>+</sup> para ativação e PD-1 para exaustão; expressão intracelular de IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10 por CD4<sup>+</sup> e presença de células T CD4<sup>+</sup> regulatórias, pela marcação de CD25<sup>+</sup>, FOXP3 e LAP. A produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 foi dosada em sobrenadante de cultura após 96 horas. As sorologias para IgG total e IgG1 também foram avaliadas. Observou-se que não houve diferença nos níveis de IgG total e IgG1 entre os grupos, porém foi possível observar que a avidéz de IgG1 estava diminuída no IB em relação ao GC. Todos os grupos apresentaram forte correlação entre a positividade de IgG e IgG1. Com relação à análise celular, foi visto que linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando PD-1 estão aumentadas em indivíduos com DA e em uso de DMARDs. Foi verificado ainda que o tratamento com bloqueadores de TNF pareceu não exercer influência sobre as populações das células T regulatórias estudadas e não interferiu nem na expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10 por células CD4<sup>+</sup>, nem na produção de citocinas por PBMCs de pacientes com DA. Dessa forma, podemos concluir que aparentemente o uso de imunobiológicos isoladamente não é

suficiente para desequilibrar a imunidade a ponto de prejudicar a resposta à infecção por *Toxoplasma gondii* e predispor a reativação de toxoplasmose.

Palavras-chave: Bloqueadores de TNF, Imunoglobulinas, *Toxoplasma gondii*, Imunossupressão, Toxoplasmose, Resposta Imune.

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is one of the most prevalent zoonoses in Brazil and in the world and can have serious consequences in immunosuppressed patients. For this reason, there is great concern with the prevention and monitoring of acute toxoplasmosis in these groups of patients. In recent years, TNF antagonists have been used to treat autoimmune diseases (AD) and provide better symptom control and quality of life for these individuals. However, during the chronic phase of toxoplasmosis, IFN- $\gamma$  and its receptor, IFN- $\gamma$ R, also need the action of TNF- $\alpha$  and TNFR to maintain disease resistance and latency, and several studies have shown risk of reactivation of latent infections, including toxoplasmosis, in patients with AD using immunomodulators, due to the decreased surveillance of these cytokines.. In the present study, the objective was to verify whether patients with autoimmune diseases and using TNF antagonists have any indication of an increased risk of toxoplasmosis reactivation. For this purpose, peripheral blood samples were collected from patients who had already had contact with *Toxoplasma gondii* (IgG+), in addition to autoimmune diseases who were using synthetic (DS) and/or immunobiological drugs (IB) and from individuals in the control group (CG). Peripheral blood mononuclear cells were separated and evaluated after stimulation with total antigens free of *Toxoplasma gondii* and with anti-CD3 and anti-CD28 or without any stimulus, at 48 and 96 hours. The following markers were evaluated: CD69+ and CD28+ for activation and PD-1 for exhaustion; intracellular expression of IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-10 by CD4+ and presence of regulatory CD4+ T cells by labeling CD25+, FOXP3 and LAP. The production of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 was measured in culture supernatant after 96 hours. Serology for total IgG and IgG1 were also evaluated. It was observed that there was no difference in the levels of total IgG and IgG1 between the groups, but it was possible to observe that the IgG1 avidity was reduced in the IB compared to the CG. All groups showed a strong correlation between IgG and IgG1 positivity. Regarding cell analysis, it was seen that CD4<sup>+</sup> T lymphocytes expressing PD-1 are increased in individuals with AD and using DMARDs. It was also verified that treatment with TNF blockers did not seem to influence the populations of regulatory T cells studied and did not interfere with the expression of the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-10 by CD4+ cells, nor with the production of cytokines by PBMCs from AD patients. Thus, we can conclude that apparently the use of immunobiologicals alone is not enough to unbalance immunity to the point of impairing the response to *Toxoplasma gondii* infection and predisposing to toxoplasmosis reactivation.

Keywords: TNF Blockers, Immunoglobulins, *Toxoplasma gondii*, Immunosuppression, Toxoplasmosis, Immune Response.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1** - Distribuição dos grupos de pacientes do estudo de acordo com a medicação em uso.....43
- Quadro 2** - Marcações utilizadas no protocolo de citometria.....49
- Quadro 3** - Descrição dos medicamentos dos grupos IB e DS. ....54
- Figura 1** - **Ciclo Biológico de *Toxoplasma gondii***. Fonte: (“CDC - DPDx - Toxoplasmosis”, 2020).....21
- Figura 2** - **Antígenos solúveis totais de *Toxoplasma gondii***. Eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando as bandas dos antígenos solúveis totais de *Toxoplasma gondii* após protocolo de extração. \*MPM, marcador de peso molecular.....45
- Figura 3** - **Avaliação da imunidade humoral, avaliada pela produção de anticorpos específicos para o *Toxoplasma gondii***. (A) Níveis de anticorpos IgG total anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), (B) Índice Aidez dos anticorpos IgG total anti-*T. gondii*, expresso em porcentagem (%), (C) Níveis da subclasse IgG1 anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), (D) Índice Aidez da subclasse IgG1 anti-*T. gondii*, expresso em porcentagem (%), (E) Correlação entre os níveis dos anticorpos IgG total e da subclasse IgG1, nos grupos GC, DS e IB. Análise entre grupos por Kruskal-Wallis (A e C) e por Ordinary one-way ANOVA (B e D) e análise de correlação por teste de Spearman, onde r expressa o coeficiente de correlação. As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartis ou média com desvio padrão. Dados estatisticamente significantes, \*p < 0,05....56
- Figura 4** - **Ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+, avaliada pela expressão do receptor de superfície celular CD69**. (A) Seleção da população de linfócitos totais, (B) seleção das populações de células T CD4+ e CD8+, dentre as populações de linfócitos totais, (C) seleção das células CD4+ marcadas com CD69+, dentre as células CD4+ totais, (D) seleção das células CD8+ marcadas com CD69+, dentre as células CD8+ totais, (E) percentual de CD4+CD69+ e (F) CD8+ CD69+ após 48h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, STAg e ausência de estímulo nos grupos GC, DS e IB, por citometria de fluxo. Os números apresentados dentro dos gráficos (A-D) demonstram o percentual de células presentes em cada seleção descrita. Análise entre estímulos por Wilcoxon e entre grupos por Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartis. Dados estatisticamente significantes, \*p < 0,05; \*\*p < 0,005 e \*\*\*p < 0,0005.....58
- Figura 5** - **Ativação e exaustão de linfócitos T CD4+ e CD8+, avaliada pela expressão dos receptores de superfície celular CD28 e PD-1**. (A) Seleção da população de linfócitos totais, (B) seleção das populações de células T CD4+ e CD8+, dentre as populações de linfócitos totais, (C) seleção das células CD4+ marcadas com PD-1 (Q1 + Q2), CD28+ (Q2 + Q3) e duplamente marcadas com PD-1 e CD28+ (Q2), (D) seleção das células CD8+ marcadas com PD-1 (Q1 + Q2), CD28+ (Q2 + Q3) e duplamente marcadas com PD-1 e CD28+ (Q2), (E)

percentual de CD4<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>, (F) CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>, (G) CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>, (H) CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (I) CD4<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> e (J) CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> após 96h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, STAg e ausência de estímulo nos grupos GC, DS e IB, por citometria de fluxo. Os números apresentados dentro dos gráficos (A-D) demonstram o percentual de células presentes em cada seleção descrita. Análise entre estímulos por Wilcoxon (E, G, H, I e J) e por Paired T test (F) e entre grupos por Kruskal-Wallis (E, G, H, I e J) e Ordinary one-way ANOVA (F). As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartis ou média com desvio padrão. Dados estatisticamente significantes, \*p < 0,05; \*\*p < 0,005, \*\*\*p < 0,0005 e ####p < 0,0001.....61

**Figura 6 - Perfis de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, avaliado pela expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10.** (A) Seleção da população de linfócitos totais, (B) seleção das populações de células T CD4<sup>+</sup>, dentre as populações de linfócitos totais, (C) seleção das células CD4<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  (Q1 + Q2), IL-17 (Q2 + Q3) e duplamente marcadas com IFN- $\gamma$  e IL-17 (Q2), (D) seleção das células CD4<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  (Q5 + Q6), IL-10 (Q6 + Q7) e duplamente marcadas com IFN- $\gamma$  e IL-10 (Q6), (E) seleção das células CD4<sup>+</sup> expressando IL-17 (Q9 + Q10), IL-10 (Q10 + Q11) e duplamente marcadas com IL-17 e IL-10 (Q10), (F) percentual de CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, (G) CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> (H) CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>, (I) CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>, (J) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> (K) IL-17<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> após 96h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, STAg e ausência de estímulo nos grupos GC, DS e IB, por citometria de fluxo. Os números apresentados dentro dos gráficos (A-E) demonstram o percentual de células presentes em cada seleção descrita. Análise entre estímulos por Wilcoxon e entre grupos por Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartis. Dados estatisticamente significantes, \*p < 0,05; \*\*p < 0,005 e \*\*\*p < 0,0005.....64

**Figura 7 - Perfil de linfócitos T CD4<sup>+</sup> regulatórios, avaliados pela expressão da cadeia alpha do receptor de IL-2 (CD25), LAP e do fator de transcrição Foxp3.** (A) Seleção da população de linfócitos totais, (B) seleção das populações de células T CD4<sup>+</sup>, dentre as populações de linfócitos totais, (C) seleção das células CD25<sup>-</sup>, CD25<sup>Low</sup> e CD25<sup>High</sup>, dentre as populações de células CD4<sup>+</sup>, (D) seleção das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>, expressando FOXP3 (Q1 + Q2), LAP (Q2 + Q3) e duplamente marcadas com FOXP3 e LAP (Q2), (E) percentual de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> totais, (F) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> Foxp3<sup>+</sup> (G) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> LAP<sup>+</sup> e (H) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> após 96h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, STAg e ausência de estímulo nos grupos GC, DS e IB, por citometria de fluxo. Os números apresentados dentro dos gráficos (A-D) demonstram o percentual de células presentes em cada seleção descrita. Análise entre estímulos por Wilcoxon e entre grupos por Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartis. Dados estatisticamente significantes, \*p < 0,05; \*\*p < 0,005, \*\*\*p < 0,0005 e ####p < 0,0001. .... 67

**Figura 8 - Produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células.** Níveis das citocinas (A) IL-2, (B) IFN- $\gamma$ , (C) IL-6, (D) TNF- $\alpha$ , (E) IL-4, (F) IL-10 e (G) IL-17, expressos em pg/mL, quantificados após 96h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, STAg e ausência de estímulo nos grupos GC, DS e IB, por CBA. Análise entre estímulos por Wilcoxon (exceto em C, Paired T test) e entre grupos por Kruskal-Wallis (exceto em C, Ordinary one-way

ANOVA). As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartis ou média com desvio padrão. Dados estatisticamente significantes, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$  e ### $p < 0,0001$ ..... 69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: Porcento

°C: Grau Celsius

$\alpha$ : Alfa

$\beta$ : Beta

$\gamma$ : Gama

$\lambda$ : Lambda

$\mu\text{g}$ : Micrograma (s)

$\mu\text{L}$ : Microlitro (s)

$\mu\text{m}$ : Micrometro (s)

Ag: Antígeno

AGHU: Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ALEXA: *Alexa Fluor*® 488 e *Alexa Fluor*® 647

APC: *Allophycocyanin*

B: Branco

BB515: *Brilliant*™ *Blue 515*

BSA: Albumina bovina sérica

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CD: *Cluster of differentiation*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CS: Controle de sintomas

CTL: Linfócito T Citolítico

DMARDs: Drogas anti-reumáticas modificadoras do curso da doença

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade óptica

DS: Drogas sintéticas

EDTA: Ácido etileno tetra-acético

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

et al: e colaboradores

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

GC: Grupo controle  
HBV: Vírus da hepatite B  
HCV: Vírus da hepatite C  
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana  
HLA: *Human leukocyte antigen*  
HRP: Peroxidase  
Hz: Hertz  
IA: Índice Avidéz  
IB: Imunobiológicos  
IE: Índice ELISA  
IgG: Imunoglobulina de classe G  
IgM: Imunoglobulina de classe M  
IL: Interleucina  
ILCs: *Innate lymphoid cells*  
IFN: Interferon  
g: Força relativa da gravidade  
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível  
M: Molar  
mg: Miligrama (s)  
MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal  
mL: Mililitro (s)  
mm: Milímetro (s)  
mm<sup>3</sup>: Milímetros cúbicos  
mM: Milimolar  
mRNA: Ácido Ribonucléico mensageiro  
MTX: Metotrexato  
n: Número  
NK: *Natural Killer*  
nm: Nanômetro (s)  
NO: Óxido Nítrico  
ns: Não significativo  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
OPD: substrato enzimático 1,2 *orthophenylenediamine*  
PBMCs: Células Mononucleares do sangue periférico

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PBS-AB10%: Solução salina tamponada com fosfato contendo soro humano AB a 10%

PBS-T: Solução salina tamponada com fosfato contendo Tween 20 a 0,05%

PBS-T-M5%: Solução salina tamponada com fosfato contendo Tween 20 a 0,05% e leite em pó desnatado a 5%

pg: picograma (s)

PE: *Phycoerythrin*

PE-Cy7: PE-Cy<sup>TM</sup>7 combina PE e *cyanine dye* Cy7.

pH: potencial Hidrogeniônico

RH: Cepa tipo I de *Toxoplasma gondii*, altamente virulenta

rpm: Rotações por minuto

RPMI: Meio de cultura idealizado no *Roswell Park Memorial Institute*

STAg: Antígenos solúveis de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

STAT: *Signal Transduction and Activation of Transcription*

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

*T. gondii*: *Toxoplasma gondii*

Th: linfócito T *helper*

TMB: 3,3',5,5'-*Tetramethylbenzidine* - Substrato líquido tetrametilbenzidina

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa

Treg: Célula T Reguladora

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 TOXOPLASMOSE.....	19
1.1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	20
1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	22
1.3 PERFIL DE RESPOSTA IMUNE CONTRA O <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	25
1.3.1 <i>Dinâmica de Produção de Citocinas na Resposta Imune</i> .....	29
1.4 IMUNOSSUPRESSÃO POR IMUNOMODULADORES BIOLÓGICOS EM PACIENTES COM DOENÇAS AUTOIMUNES.....	32
1.4.1 <i>Imunomoduladores Biológicos Bloqueadores de TNF-<math>\alpha</math> e a Reagudização de Doenças Latentes em Pacientes Imunossuprimidos</i> .....	36
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>39</b>
<b>3. HIPÓTESE .....</b>	<b>40</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 OBJETIVOS GERAIS .....	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>5. METODOLOGIA .....</b>	<b>42</b>
5.1 DESENHO DA PESQUISA .....	42
5.2 COLETA DAS AMOSTRAS E DIVISÃO DOS GRUPOS.....	42
5.3 MANUTENÇÃO DE CULTURAS DE <i>Toxoplasma gondii</i> E OBTENÇÃO DO PARASITO .....	44
5.3.1 <i>Preparo de Antígenos Solúveis de Toxoplasma gondii (STAg) para ensaios imunoenzimáticos e para cultura de células</i> .....	44
5.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	46
5.4.1 <i>Detecção de IgG Total e IgG1 no soro por ELISA indireto</i> .....	46
5.4.2 <i>ELISA-AVIDEZ para IgG total e subclasse IgG1 anti-T. gondii</i> .....	47
5.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs) .....	47
5.6 CULTURA DE CÉLULAS.....	48
5.6.1 <i>Obtenção de sobrenadante de cultura de células</i> .....	48
5.7 CITOMETRIA DE FLUXO .....	48

5.8 DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE POR CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA).....	51
5.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	52
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS.....	53
6.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG TOTAL E A SUBCLASSE IGG1 ANTI- <i>TOXOPLASMA GONDII</i> E AVIDEZ DE IGG TOTAL E IGG1 .....	54
6.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO E EXAUSTÃO EM CÉLULAS T CD4 <sup>+</sup> .....	56
6.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO INTRACELULAR DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$ , IL-17 E IL-10 POR CÉLULAS CD4 <sup>+</sup> .....	61
6.5 ANÁLISE DE POPULAÇÕES T CD4 <sup>+</sup> REGULATÓRIAS .....	65
6.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR PBMCS DE PACIENTES COM DA EM SOBRENADANTE DE CULTURA .....	67
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>77</b>
<b>9. CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>94</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais prevalentes no Brasil e no mundo, apresentando distribuição variada de acordo com a população estudada. Embora seja uma doença autolimitada em imunocompetentes, pode trazer graves consequências em imunossuprimidos, o que faz com que tenha grande importância médica (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011; PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009).

A atuação do sistema imune é determinante para a manutenção da latência da toxoplasmose. Por essa razão, existe uma grande preocupação com a prevenção e com o monitoramento de toxoplasmose aguda em pacientes que apresentam algum tipo de comprometimento imunológico, tais como transplantados, HIV-positivos que desenvolveram Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), gestantes e recém-nascidos, uma vez que já está bem estabelecida a gravidade das manifestações nesses grupos (ISA et al., 2016; PASSOS; ARAÚJO FILHO; ANDRADE JUNIOR, 2000; STRAY-PEDERSEN, 1993). Nesse contexto, o tratamento com anticorpos neutralizantes de citocinas específicas se mostrou revolucionário para o controle da evolução das doenças autoimunes (ELLIOTT et al., 1994), porém já existem alguns registros de complicações, sendo a principal delas a reativação de infecções oportunistas (GÓMEZ-REINO; CARMONA; DESCALZO, 2007).

A realização de sorologia para toxoplasmose está entre as recomendações do Ministério da Saúde para o monitoramento de alguns desses grupos de risco para o desenvolvimento da doença (SAÚDE, 2013, 2016), porém ainda não se sabe ao certo até que ponto há o risco de reativação de toxoplasmose devido ao uso de drogas imunossupressoras e, portanto, não há também nenhuma recomendação para que se faça avaliação antes do uso desses medicamentos. Sabendo-se que trata-se de uma zoonose de grande impacto em imunossuprimidos, torna-se imprescindível compreender como ocorre a modulação do sistema imune em indivíduos que fazem uso desses medicamentos imunobiológicos; quais alterações ocorrem no perfil celular e padrão de citocinas secretadas frente aos antígenos do *Toxoplasma gondii* após a introdução dessa terapia, qual o real risco de reagudização dessa doença nesses pacientes e ainda qual a participação da imunidade humoral através da produção de anticorpos. E por fim, como esses dados podem ser utilizados para auxiliar no monitoramento do tratamento desses pacientes, caso se comprove um alto risco de desenvolvimento de toxoplasmose aguda.

## 1 1.1 TOXOPLASMOSE

2  
3 A Toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que é  
4 um parasito intracelular obrigatório e pertence à família Sarcocystidae, classe Sporozoa, filo  
5 Apicomplexa. Esse parasito foi descrito pela primeira vez em 1908 através de estudos feitos  
6 por Splendore no Brasil utilizando-se coelhos e simultaneamente na Tunísia, utilizando-se  
7 roedores, pelos autores Nicolle e Manceaux. Apenas cerca de 15 anos depois, em 1923, foi  
8 relatado o primeiro caso de transmissão de toxoplasmose em uma criança de 11 meses, que  
9 veio a falecer em decorrência da doença e que apresentou vários acometimentos que  
10 posteriormente foram atribuídos como provenientes da infecção pelo *Toxoplasma gondii*  
11 (NICOLLE; MANCEAUX, 1909; REMINGTON et al., 2006; SPLENDORE, 1908).

12 Essa zoonose apresenta distribuição mundial e acredita-se que cerca de um terço da  
13 população mundial já teve contato com o parasito, apresentando a infecção de forma crônica.  
14 Sua prevalência não é homogênea entre os continentes, variando de 10 a 80% dependendo da  
15 região geográfica, do país e da população estudada. Em alguns países da África e da América  
16 Latina, a positividade para a infecção por *Toxoplasma gondii* pode chegar a 60% ou mais,  
17 demonstrando os índices mais altos. Já países da Europa apresentam entre 30 a 50% de  
18 prevalência da doença, enquanto América do Norte e alguns países da Ásia, Europa (norte) e  
19 África apresentam índices baixos, variando entre 10 a 30%. No Brasil, estima-se que  
20 aproximadamente 60% da população esteja infectada com o *Toxoplasma gondii* (PAPPAS;  
21 ROUSSOS; FALAGAS, 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

22 Vários fatores podem influenciar na distribuição do parasito, tais como  
23 socioeconômicos e culturais, climáticos, condições de higiene e hábitos alimentares  
24 (AVELAR et al., 2018; VARELLA et al., 2003; WILKING et al., 2016). Contudo, a grande  
25 importância dessa zoonose se deve a sua prevalência e maior morbidade principalmente em  
26 gestantes e recém-nascidos com infecção congênita (KOSKINIEMI, 1989; STRAY-  
27 PEDERSEN, 1993) e em pacientes imunossuprimidos, dentre os quais destacam-se pacientes  
28 HIV positivos que desenvolveram AIDS (PASSOS; ARAÚJO FILHO; ANDRADE JUNIOR,  
29 2000), pacientes transplantados (ISA et al., 2016) e pacientes com doenças autoimunes em  
30 uso de drogas imunossupressoras, modificadoras do curso da doença (PULIVARTHI et al.,  
31 2015).

32

### 1 1.1.1 *Toxoplasma gondii*

2

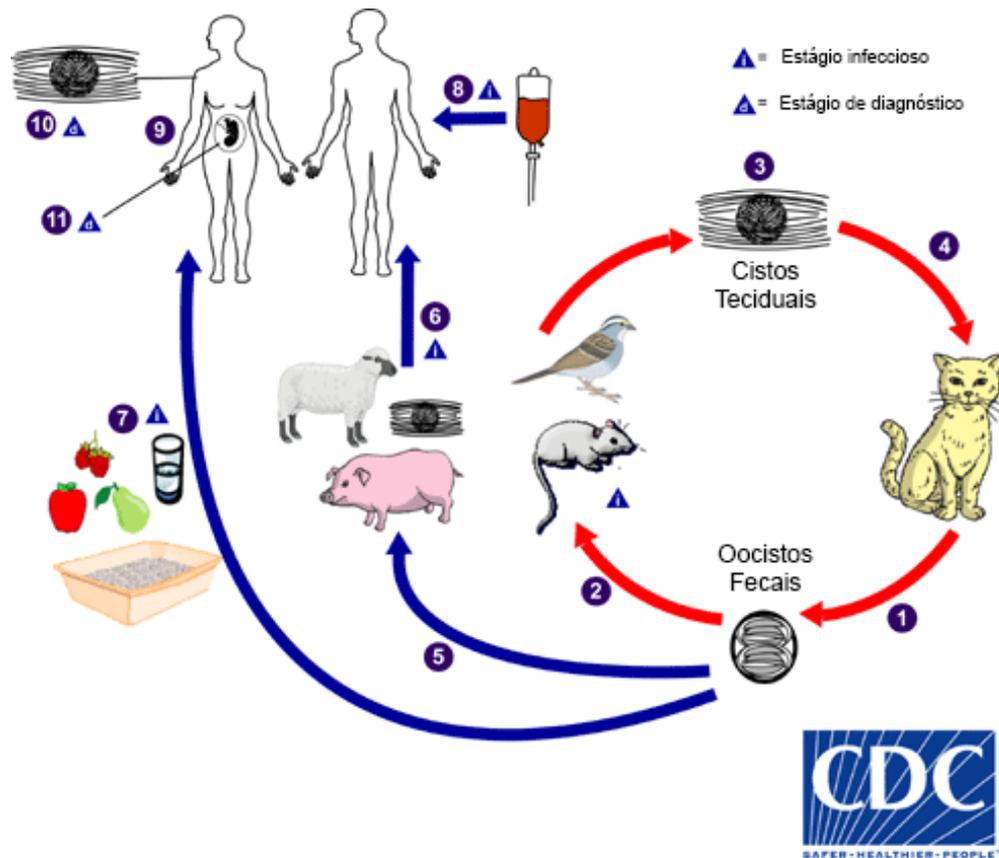
3 Embora o parasito tenha sido descoberto no início do século XX, foi na década de 50  
4 que estudos mais detalhados sobre a morfologia e reprodução do parasito começaram a  
5 ocorrer. Em 1954 foram descritas várias organelas antes desconhecidas, como os conóides e  
6 micronemas (GUSTAFSON; AGAR; CRAMER, 1954), enquanto em 1958 foi observada e  
7 descrita pela primeira vez que a reprodução do *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ocorre por  
8 endodigenia, em que uma célula mãe forma duas células filhas, posteriormente também  
9 descrita em maiores detalhes em 1962 (GAVIN; WANKO; JACOBS, 1962; GOLDMAN;  
10 CARVER; SULZER, 1958; LUDVÍK, 1958).

11 *Toxoplasma gondii* em sua forma livre é alongado, apresentando forma muito  
12 semelhante a uma lua crescente, exceto pelo seu posterior que é levemente arredondado. É  
13 protegido por uma membrana externa, que envolve todo o parasito, e uma membrana interna,  
14 mais espessa, que se inicia no anel polar anterior e termina no anel polar posterior, assim  
15 como os microtúbulos presentes no citoplasma do parasito. A membrana externa possui uma  
16 invaginação na borda lateral anterior ao núcleo, conhecida como microporo. Na extremidade  
17 anterior há estruturas como as micronemas e o conóide, que fica dentro do anel polar, sendo  
18 composta ainda por túbulos em espiral e roptrias, que são aproximadamente 8 no parasito. O  
19 retículo endoplasmático fica lateral ao núcleo, situado na extremidade posterior, assim como a  
20 mitocôndria logo abaixo, que possui cristas tubulares e é longa e ramificada (SHEFFIELD;  
21 MELTON, 1968).

22 Esse parasito possui a capacidade de infectar células nucleadas e tecidos de qualquer  
23 animal de “sangue quente”, incluindo humanos, através do complexo apical (conóide, anel  
24 polar, microtúbulos, roptrias, micronemas e grânulos densos), que promovem a invasão na  
25 célula hospedeira (DUBEY, 1998; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

26 Existem três formas infectantes distintas de *Toxoplasma gondii*: os oocistos contendo  
27 esporozoítos, produzidos no intestino de felídeos infectados e eliminados para o meio externo  
28 ainda imaturos juntamente com as fezes; os taquizoítos, anteriormente denominados  
29 trofozoítos, que são a forma proliferativa ou livre e estão presentes na fase aguda da doença; e  
30 os cistos contendo bradizoítos, que podem permanecer indeterminadamente no hospedeiro e  
31 são a forma de resistência de *T. gondii* (DUBEY; BEATTIE, 1988; FRENKEL, J. K.;  
32 DUBEY, J. P.; MILLER, 1970; FRENKEL, 1973; SHEFFIELD, H. G.; MELTON, 1970).

1 Seu ciclo biológico (**Figura 1**) é constituído de duas fases (heteroxênico), sendo os  
 2 felídeos os hospedeiros definitivos; enquanto aves e mamíferos em geral, incluindo o homem,  
 3 estão entre os hospedeiros intermediários. Dessa forma, nos primeiros acontecem as fases  
 4 sexuada e assexuada do ciclo e nos demais, apenas a fase assexuada (DUBEY; FRENKEL,  
 5 1972; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, 1970; HUTCHISON et al., 1970).



**Figura 1:** Ciclo Biológico de *Toxoplasma gondii*. Fonte: (“CDC - DPDx - Toxoplasmosis”, 2020).

6 Quando o hospedeiro definitivo ingere uma das formas – esporozoítos, taquizoítos ou  
 7 bradizoítos – ocorre a invasão das células epiteliais do intestino delgado, onde inicia-se a  
 8 esquizogonia (proliferação por endodiogenia) que origina vários merozoítos que recebem o  
 9 nome de esquizonte maduro. O esquizonte se rompe e libera os merozoítos, que penetram  
 10 novas células e em seguida se diferenciam em gamontes, originando os microgametas móveis  
 11 (gametas masculinos) e os macrogametas imóveis (gametas femininos). A fecundação entre  
 12 os dois origina o zigoto, que em seguida forma o oocisto imaturo, que é então eliminado  
 13 juntamente com as fezes e, no meio externo, sofre o processo de esporogonia, tornando-se  
 14 maduro (DUBEY; FRENKEL, 1972; KAWAZOE; NEVES, 2002).

1 Quando o hospedeiro intermediário ingere acidentalmente alimentos ou água  
2 infectados por oocistos contendo esporozoítos ou carne crua ou malpassada contendo  
3 bradizoítos, estes passam pelo epitélio intestinal e então se multiplicam por endodiogenia  
4 após invadir as células do indivíduo. Os taquizoítos formados rompem a célula infectada e  
5 infectam novas células, causando diversos tipos de sintomas de fase aguda. A ação do sistema  
6 imune abranda a invasão e promove o encistamento, caracterizando a fase crônica (DUBEY,  
7 1997; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Estima-se que o tempo para a formação de cistos  
8 varia de acordo com a forma presente no momento da contaminação. Em animais infectados  
9 em laboratório, observou-se que ocorre formação de cistos de *T. gondii* cerca de 5 dias após  
10 inoculação com a forma livre (taquizoítos), de 7 a 9 dias, com bradizoítos e 9 a 10 dias, com  
11 oocistos; e que os cistos possuem uma maior afinidade por tecido cerebral e musculatura do  
12 que por órgãos como rins, fígado, baço ou pulmão, nas cobaias infectadas inicialmente com  
13 taquizoítos (DUBEY; FRENKEL, 1976). Vale ressaltar que outras formas de transmissão  
14 para o homem são transmissão vertical ou transplacentária, amamentação, por saliva,  
15 esperma, acidentes laboratoriais com pérfuro-cortantes e transfusão sanguínea, todos mais  
16 raros (AMATO; MARCHI, 2002; DUBEY, 1998).

## 18 1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

20 A toxoplasmose pode causar desde manifestações clínicas leves até acometimentos  
21 mais graves; e pode também ser assintomática. O sistema imune pode promover resposta  
22 contra a infecção por *Toxoplasma gondii*, produzir anticorpos e ainda assim não haver  
23 manifestação de sintomas nos indivíduos acometidos. De fato, a maioria dos indivíduos  
24 imunocompetentes infectados permanecem com bradizoítos em seus tecidos durante toda sua  
25 vida, sem causar qualquer transtorno (DUBEY; DESMONTS, 1987; DUBEY; LINDSAY;  
26 SPEER, 1998). Dentre os sintomas comuns durante a fase aguda estão fadiga, cefaleia, febre e  
27 por vezes linfadenopatia, que se resolvem em poucos dias. Raramente indivíduos  
28 imunocompetentes desenvolvem manifestações mais graves da doença, porém podem ocorrer;  
29 existem casos documentados de pneumonia, infecções cardíacas, toxoplasmose disseminada e  
30 principalmente toxoplasmose ocular (LEAL et al., 2007; NUNURA et al., 2010; PARK;  
31 HAN; NAM, 2011; PERGOLA; CASCONI; RUSSO, 2010).

32 A toxoplasmose ocular pode ocorrer tanto como recorrência de uma infecção  
33 congênita quanto devido a uma infecção adquirida, sendo uma das manifestações mais  
34 frequentes também em indivíduos imunocompetentes. Dentre os acometimentos oculares

1 estão inclusos retinocoroidite, vitrite e uveíte anterior; além de descolamento vítreo parcial ou  
2 total, espessamento da parede da retina e descolamento de retina não regmatogênico, papilite  
3 e periflebite em alguns casos (PARK; HAN; NAM, 2011).

4 Alguns fatores podem ser determinantes para essas variações, tais como a carga  
5 parasitária, a cepa do parasito, a idade do indivíduo e condições do sistema imune. As cepas  
6 do tipo I, por exemplo, são mais virulentas e possuem multiplicação mais rápida do que as  
7 cepas tipo II (AVELAR et al., 2018; HOWE; DAVID SIBLEY, 1995). Contudo, dentre esses  
8 fatores o mais importante para o curso da infecção é o grau de comprometimento do sistema  
9 imune. A toxoplasmose possui grande impacto em fetos e recém-nascidos com infecção  
10 congênita e em indivíduos imunodeprimidos ou imunossuprimidos, apresentando maior  
11 morbidade e mortalidade nesses indivíduos (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

12 Uma das formas mais grave e mais preocupante de toxoplasmose é a infecção  
13 congênita, que pode apresentar diferentes acometimentos para o feto ou bebê de acordo com o  
14 tempo de gestação em que a mulher contraiu a infecção. A probabilidade de transmissão  
15 transplacentária durante o último trimestre é maior, porém as alterações e possíveis sequelas  
16 são menos graves do que as que podem ocorrer no início da gestação (LINDSAY; DUBEY,  
17 2011).

18 Dentre as alterações mais observadas no período perinatal estão coriorretinite,  
19 hidrocefalia, calcificações cerebrais, doença sistêmica, microcefalia, além de danos  
20 oftalmológicos como maculares observados ao nascimento, que podem ser amenizadas se as  
21 crianças forem acompanhadas e tratadas adequadamente a longo prazo. Contudo, crianças que  
22 nascem aparentemente sem sequelas ou mesmo aquelas que fizeram o tratamento podem  
23 desenvolver episódios de convulsões afebris e mesmo desenvolver novas lesões na retina (MC  
24 AULEY et al., 1994).

25 Outro grupo muito acometido por toxoplasmose, seja primeira infecção ou reativação,  
26 são os pacientes HIV positivos, com manifestação de AIDS. A destruição de linfócitos T CD4  
27 – que são extremamente importantes na organização de respostas contra patógenos –  
28 decorrente dessa condição causa uma consequente diminuição da vigilância do sistema imune.  
29 Com isso, esses pacientes ficam mais “expostos” aos danos que *Toxoplasma gondii* pode  
30 causar, podendo levar ao desenvolvimento de manifestações como encefalite toxoplásmica.  
31 Essa alteração está diretamente relacionada a contagens de T CD4 menores que 100 células  
32 por milímetro cúbico ( $\text{mm}^3$ ) e representa um importante risco de mortalidade nesses casos  
33 (NISSAPATORN et al., 2004), uma vez que pode ocorrer uma diminuição da produção de  
34 IFN- $\gamma$ , culminando na dificuldade de contenção parasitária, e ao mesmo tempo um aumento

1 de TNF- $\alpha$  que, em excesso e sem ação sinérgica com o IFN- $\gamma$ , pode causar uma resposta  
2 inflamatória exacerbada mais prejudicial do que eficaz contra a infecção. Contudo, é  
3 importante ressaltar que esse desequilíbrio nessas citocinas também pode ser observado em  
4 indivíduos com toxoplasmose ocular não infectados com HIV (MEIRA et al., 2015, 2014).  
5 Dentre os principais sintomas presentes na associação de AIDS com toxoplasmose cerebral  
6 estão dores de cabeça, desaceleração psicomotora, hemiparesia, confusão, febre, alteração de  
7 consciência, convulsões, alteração do nervo craniano, alteração visual, entre outros, sendo que  
8 alguns pacientes só descobrem o diagnóstico de HIV positivo devido aos sintomas de  
9 neurotoxoplasmose. Contudo, o adequado tratamento anti-toxoplasmose e a introdução da  
10 terapia antirretroviral altamente ativa (highly active antiretroviral therapy - HAART)  
11 contribuem para uma resposta parcial ou mesmo completa ao tratamento dos acometimentos  
12 neurológicos (VIDAL et al., 2005).

13 Em pacientes transplantados também existe o risco de acometimento por  
14 toxoplasmose, estando entre os sintomas mais comuns febre e convulsões e o órgão mais  
15 acometido é o cérebro. Muitas vezes a identificação da doença só ocorre após o óbito. Além  
16 disso, uma preocupação recorrente com esses indivíduos é que a infecção pode ocorrer tanto a  
17 partir do doador como do receptor com toxoplasmose latente, ou seja, primeira infecção do  
18 receptor negativo a partir do doador com sorologia positiva ou reagudização da infecção a  
19 partir do receptor com sorologia positiva para a doença (DE MEDEIROS et al., 2001). Dentre  
20 os tipos de transplantes destaca-se o de coração e coração/pulmão que apresenta alto risco de  
21 infecção primária de toxoplasmose em doadores positivos e receptores negativos; e o  
22 transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas quando se trata de reativação de  
23 infecção latente no receptor (DEROUIN; PELLOUX, 2008). Indivíduos diagnosticados com  
24 câncer e em uso de quimioterapia também apresentam grande risco de desenvolvimento de  
25 toxoplasmose, muitas vezes apresentando parasitemia logo após o tratamento com drogas  
26 antineoplásicas (KHABAZ; ELKHATEEB; AL-ALAMI, 2011).

27 Um outro grupo que têm se destacado devido ao seu estado de imunossupressão são  
28 pacientes que possuem doenças autoimunes e fazem uso de medicamentos imunomoduladores  
29 para o controle da resposta inflamatória exacerbada e destruição tecidual gerada nessas  
30 condições. O uso dessas drogas causa uma imunossupressão que, se não monitorada, pode  
31 aumentar o risco de infecções oportunistas, incluindo infecções fúngicas, virais, tuberculose,  
32 outras infecções por micobactérias e toxoplasmose (MOTA et al., 2015a; PULIVARTHI et  
33 al., 2015).

34

---

### 1 1.3 PERFIL DE RESPOSTA IMUNE CONTRA O *TOXOPLASMA GONDII*

2  
3 A resposta imune contra o *Toxoplasma gondii* é desempenhada, assim como na  
4 maioria das infecções, inicialmente pela imunidade inata, seguida pela ativação dos  
5 mecanismos humoral e celular da imunidade adaptativa. Os receptores de reconhecimento de  
6 padrões (*pattern recognition receptors* – PRRs), como os receptores semelhantes a Toll –  
7 *Toll like receptors* (TLR), receptores semelhantes a NOD (*NOD-like receptors*) e lectinas tipo  
8 C (*C-type lectins*) têm uma participação primordial na ativação de respostas contra patógenos,  
9 através da produção de citocinas pró-inflamatórias (SASAI; YAMAMOTO, 2019).

10 Durante a resposta imune inata ao *T. gondii* os TLRs – que apresentam 10 tipos de  
11 receptores em humanos e 13 em camundongos, mantêm o primeiro contato com o parasito  
12 (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). Os TLRs são capazes de  
13 reconhecer e se ligar em componentes associados aos patógenos e promover uma rápida  
14 resposta contra o agente invasor (SASAI; YAMAMOTO, 2019). Essa ligação desencadeia  
15 uma cascata de sinalização que é, em grande parte, dependente do fator de diferenciação  
16 mielóide 88 – *Myeloid Differentiation factor 88* (MyD88) –, uma proteína adaptadora  
17 utilizada por vários membros da família dos receptores TLR (MEDZHITOV et al., 1998), e  
18 essencial para a adequada produção precoce de IL-12 pelas células apresentadoras de  
19 antígenos (APCs) (SCANGA et al., 2002).

20 MyD88 é tão importante que camundongos geneticamente modificados ou *Knockout*  
21 para o gene codificador dessa molécula são incapazes de sobreviver à fase aguda da infecção  
22 pelo *T. gondii*, pois a redução na produção de IL-12 por neutrófilos, macrófagos e células  
23 dendríticas (DCs) e, conseqüentemente, na resposta contra o parasito facilita também a sua  
24 proliferação. Sua deficiência pode ainda interferir negativamente na imunidade celular  
25 mediada por células, por prejudicar indiretamente a produção de IFN- $\gamma$  secretado em resposta  
26 à IL-12; podendo, portanto, contribuir para uma resposta Th1 insuficiente (SCANGA et al.,  
27 2002). Além disso, a deficiência de MyD88 ou TLR2 pode prejudicar a produção de óxido  
28 nítrico (NO) pelas células, assim como aumentar os níveis de citocinas do perfil Th2 como  
29 IL-4 e IL-10 (MUN et al., 2003); contudo, embora a importância de MyD88 esteja bem  
30 descrita, existem divergências quanto ao nível de participação de TLR2 nas respostas contra o  
31 *T. gondii* (MUN et al., 2003; SCANGA et al., 2002).

32 A ligação nos receptores TLR também induzem a ativação do fator de transcrição  
33 nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) através da quinase associada ao receptor de interleucina-1 – *Interleukin-1*  
34 *receptor-associated kinase* (IRAK) – e da proteína adaptadora receptor de TNF associado ao

1 fator 6 – *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6) (MEDZHITOV et al., 1998); e expressão  
2 de genes para citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e IL-1, além de B7.1, que é uma  
3 molécula coestimulatória essencial para a ativação de linfócitos T naive (MEDZHITOV;  
4 PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997).

5 Dentre os TLRs que participam da resposta anti-*T. gondii* destacam-se TLR11 e  
6 TLR12 (descritos apenas em camundongos) que reconhecem a profilina do parasito através da  
7 formação de heterodímeros entre si e, assim como TLR3, TLR7 e TLR9, sua ativação também  
8 é mediada pelo gene UNC93B1. Enquanto estudos sugerem que a deficiência desses três  
9 últimos receptores resulta na diminuição da produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  (MELO et al., 2010),  
10 outros atribuem esse efeito aos TLRs 7, 9 e 11 (ANDRADE et al., 2013). TLR4 e TLR2  
11 também parecem ter alguma participação no reconhecimento de proteínas ancoradas por  
12 glicosilfosfatidilinositol (GPI) presentes na superfície do *Toxoplasma gondii*, resultando na  
13 liberação de NO mais especificamente pelo reconhecimento por TLR2 (DEBIERRE-  
14 GROCKIEGO et al., 2007; MUN et al., 2003). Contudo, os genes codificantes de TLR11 e 12  
15 não são funcionais em humanos, pressupondo-se portanto que o TLR7, responsável pelo  
16 reconhecimento de RNA, e o TLR9, por DNA, seriam os principais atuantes na resposta  
17 contra a toxoplasmose humana, provavelmente associados a outros receptores (ANDRADE et  
18 al., 2013).

19 Outro fator relacionado a imunidade contra o *T. gondii* é a ligação do receptor de  
20 quimiocina CC do tipo 5 (CCR5) que induz a produção de IL-12 contra o *T. gondii* em células  
21 dendríticas e utiliza a via de sinalização pela proteína G (ALIBERTI et al., 2000). Embora  
22 seja uma via diferente de MyD88, ambas podem atuar em sinergia, promovendo a  
23 potencialização da resposta (SCANGA et al., 2002).

24 Com relação às principais células presentes durante a resposta imune inata, destacam-  
25 se as células dendríticas, uma vez que têm a capacidade de migrar até os órgãos linfoides para  
26 apresentação de antígenos aos linfócitos T *naive* e, ao mesmo tempo, produzir respostas  
27 rápidas através da secreção de IL-12, apenas poucas horas após o contato inicial com o  
28 patógeno, induzindo assim o início da resposta imune mediada por células (SOUSA et al.,  
29 1997). Há ainda as células linfoides inatas (*innate lymphoid cells* – ILCs) – que são divididas  
30 em ILC1s, ILC2s e ILC3s – em que destacam-se as ILC1s que auxiliam na produção de IFN- $\gamma$   
31 e TNF- $\alpha$  em resposta à presença de *Toxoplasma gondii* (KLOSE et al., 2014; SASAI;  
32 YAMAMOTO, 2019).

33 Dessa forma, com a ativação da imunidade celular devido a produção de citocinas  
34 como o TNF- $\alpha$  e IL-12 associadas à presença do parasito e, o consequente aumento de IFN- $\gamma$

1 por células NK e linfócitos, há a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para o perfil Th1. Essas  
2 citocinas são capazes de orquestrar importantes mecanismos efetores que agem impedindo a  
3 multiplicação do parasito e, com isso, auxiliam na limitação dos danos causados na fase aguda  
4 da doença (JOHNSON; SAYLES, 1997; LÜDER; BOHNE; SOLDATI, 2001; SUZUKI et al.,  
5 1988). Um estudo demonstrou que a presença de células T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>, assim como da  
6 citocina IFN- $\gamma$ , é essencial para a contenção do parasito, de modo que, quando as duas  
7 linhagens ou o IFN- $\gamma$  são bloqueados pode ocorrer a reativação da toxoplasmose antes em  
8 estado de latência (GAZZINELLI et al., 1992). Além disso, a diminuição das citocinas chave  
9 do perfil Th1, IL-12 e IFN- $\gamma$ , durante a fase aguda da doença podem implicar na inibição da  
10 apresentação de antígenos, o que resulta no prejuízo da resposta imune celular e consequente  
11 aumento da multiplicação dos parasitos. A diminuição desse perfil pode promover ainda o  
12 aumento de citocinas como IL-4 e IL-10 (GAZZINELLI et al., 1994). Nesse contexto, a  
13 reativação de algumas manifestações clínicas da Toxoplasmose, como por exemplo  
14 toxoplasmose congênita, é de fato acompanhada do predomínio do perfil Th2 (KAHI et al.,  
15 1999).

16 O aumento no número de parasitos, assim como as alterações provenientes dessa  
17 multiplicação, ocorre porque é a ação dessa resposta celular efetiva que promove a formação  
18 de cistos contendo bradizoítos, que é a forma presente na toxoplasmose latente e, qualquer  
19 prejuízo nessa resposta leva a não formação (em caso de primeira infecção) ou ruptura dos  
20 cistos (em caso de reativação) geralmente resultando em desenvolvimento de manifestações  
21 graves, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (BOHNE; HEESEMANN;  
22 GROSS, 1993, 1994; LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002; SOETE et al., 1993).

23 Embora a imunidade celular tenha participação central na defesa contra o *Toxoplasma*  
24 *gondii* por se tratar de um parasito intracelular obrigatório (GAZZINELLI et al., 1992;  
25 MOSMANN et al., 1986), a resposta humoral também possui extrema importância durante a  
26 fase aguda, tanto no que se refere a diagnóstico laboratorial através da dosagem de anticorpos  
27 produzidos por plasmócitos frente a infecção como no combate a taquizoítos pela resposta  
28 antígeno-específica (SABIN; FELDMAN, 1948). Os anticorpos produzidos se ligam em  
29 taquizoítos livres na corrente sanguínea e podem afetar a entrada de taquizoítos nas células,  
30 o que acredita-se ser mais eficaz na destruição do parasito do que o auxílio ao sistema  
31 complemento e às células fagocíticas através da opsonização (SAYLES; GIBSON;  
32 JOHNSON, 2000). Um estudo de Castellano e colaboradores (2009) mostrou que pacientes  
33 com leishmaniose apresentaram altos níveis circulantes de IgG anti-leishmania,

1 principalmente naqueles com lesões, e que esse aumento se correlacionou positivamente com  
2 os níveis de citocinas do perfil Th1 (CASTELLANO et al., 2009).

3 Na toxoplasmose, camundongos deficientes em células B infectados oralmente com  
4 cistos de *T. gondii* conseguiram sobreviver a fase aguda da infecção; contudo sucumbiram  
5 poucas semanas depois apresentando uma sobrevida inferior a camundongos que não possuem  
6 deficiência nessas células, além de maior quantidade de cistos e taquizoítos no cérebro,  
7 acompanhados por áreas de inflamação e necrose, apesar de apresentarem níveis de IFN-  $\gamma$ ,  
8 IL-10 e NO no cérebro e sérico de IFN-  $\gamma$  semelhantes ao do grupo controle. Entretanto,  
9 quando esses animais receberam tratamento com anticorpos IgG anti-*T.gondii* houve um  
10 aumento em sua sobrevida, demonstrando que a resposta imune humoral é essencial para  
11 auxiliar na diminuição da multiplicação de parasitos, principalmente no cérebro (KANG;  
12 REMINGTON; SUZUKI, 2000). Outro estudo mostrou que camundongos com deficiência de  
13 linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados com taquizoítos apresentam baixa produção sérica de IgG2a e  
14 que a administração dessa imunoglobulina específica para o *T. gondii*, embora apenas durante  
15 o tempo de tratamento, foi capaz de aumentar a sobrevida desses animais, o que confirma a  
16 importância da participação de anticorpos na resposta anti-*T. gondii* (JOHNSON; SAYLES,  
17 2002).

18 Além disso, uma vez que a infecção na maioria das vezes é assintomática em  
19 imunocompetentes, mas pode apresentar acometimentos desde leves até graves em gestantes,  
20 recém-nascidos e imunodeprimidos/imunossuprimidos em geral (MUNOZ; LIESENFELD;  
21 HEIMESAAT, 2011), a avaliação da produção de anticorpos IgM durante a fase aguda e de  
22 IgG durante a fase crônica específicos contra o *T. gondii* é de extrema importância para a  
23 determinação do estágio da infecção (CAMARGO et al., 1991; LIU et al., 2012).

24 Dessa forma, observa-se na fase aguda o surgimento da IgM logo após a primeira  
25 semana de infecção e, à medida que a doença vai cronificando, seus níveis séricos vão  
26 diminuindo gradativamente até sua negativação (DEL BONO et al., 1989; WIELAARD et al.,  
27 1983), enquanto a IgG passa a ser produzida entre uma e duas semanas de infecção, atinge  
28 valor máximo em seis semanas e posteriormente reduz novamente persistindo por toda a vida  
29 do indivíduo infectado (MONTROYA, 2002). Dentre as quatro subclasses de IgG, a IgG1 é  
30 considerada predominante na resposta contra o *T. gondii*, seguida pela IgG2 e IgG3 em bem  
31 menores quantidades e quase nenhuma produção de IgG4 (HUSKINSON et al., 1989).  
32 Contudo, a IgG4 têm sido observada em doenças autoimunes e já demonstrou grande  
33 participação em lesões de órgãos e tecidos de pacientes com pancreatite autoimune  
34 (KAMISAWA et al., 2003) – o que pode ser interessante para o estudo da relação dessa

1 imunoglobulina em casos de reativação de toxoplasmose em indivíduos com autoimunidade  
2 imunossuprimidos através de medicação para controle da inflamação.

3 Alguns indivíduos podem apresentar níveis altos de IgM na circulação sanguínea  
4 durante cerca de dois anos ou mais, que é um tempo maior que o esperado para a presença  
5 dessa imunoglobulina e, nesse caso, pode ser chamada de IgM residual. Contudo, os  
6 anticorpos IgG apresentam maior afinidade com seu antígeno específico à medida que sofrem  
7 maturação, de modo que, quanto maior o tempo de infecção, maior a avidéz dessa  
8 imunoglobulina pelo antígeno (DEL BONO et al., 1989; HOLLIMAN et al., 1994; RIBEIRO;  
9 MUTIS; FERNANDES, 2008). Dessa forma, uma outra avaliação bastante utilizada, mais  
10 comumente em gestantes, e muito importante para a determinação da fase da doença em que o  
11 indivíduo se encontra, principalmente nos casos de IgM residual, é a avidéz de IgG, já que  
12 uma baixa avidéz da ligação entre antígenos de *T. gondii* com a IgG indica que a infecção é  
13 recente; enquanto a alta avidéz significa que a exposição ao parasito ocorreu há mais tempo  
14 (CAMARGO et al., 1991). Outros métodos diagnósticos, tais como testes moleculares como a  
15 Reação em Cadeia da Polimerase - *Polymerase Chain Reaction* (PCR), têm sido amplamente  
16 utilizados para confirmação da presença de DNA do parasito após proliferação, indicando fase  
17 aguda (LAWRENCE BURG et al., 1989), seja sozinho ou em associação com a avaliação de  
18 anticorpos.

### 19 20 1.3.1 Dinâmica de Produção de Citocinas na Resposta Imune

21  
22 Células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) e linfócitos T CD4<sup>+</sup> são os  
23 principais produtores de citocinas. Essas moléculas possuem grande importância durante a  
24 resposta imune mediada por células, pois têm a capacidade de regulá-la de modo que, as  
25 células T auxiliares podem se diferenciar em subpopulações com funções bem distintas,  
26 dependendo do tipo de sinais que recebem e das citocinas que secretam em resposta ao  
27 reconhecimento de um antígeno. As primeiras subpopulações descobertas foram as T helper 1  
28 (Th1) e Th2 (MOSMANN et al., 1986). Linfócitos Th1 são especializados na resposta contra  
29 patógenos intracelulares e produzem principalmente IL-12 e IFN-  $\gamma$  – que são as mais  
30 utilizadas para identificar esse perfil – IL-2, TNF-  $\alpha$  e linfotóxina -  $\alpha$  (LT $\alpha$ ) (CHERWINSKI;  
31 SCHUMACHER; BROWN, 1987; HSIEH et al., 1993; MOSMANN et al., 1986). Sua  
32 diferenciação ocorre quando um antígeno é apresentado aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> pelas APCs  
33 profissionais que liberam IL-12 e, juntamente com outros sinais, promove a ativação de  
34 células T (HSIEH et al., 1993). Uma vez ativadas essas células liberam IL-2, que induz

1 proliferação celular e formação de células de memória, tanto CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>; e IFN- $\gamma$  que  
2 atua intensificando a ação de várias células (como os macrófagos) contra microorganismos,  
3 principalmente intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; HSIEH et al., 1993).

4 O perfil Th2 age na eliminação de microorganismos extracelulares, além de toxinas  
5 microbianas e, dessa forma, auxilia a resposta imune humoral, secretando principalmente IL-  
6 4, IL-5, IL-13 e IL-10 (CHERWINSKI; SCHUMACHER; BROWN, 1987; HSIEH et al.,  
7 1993; MOSMANN et al., 1986). Enquanto a IL-4 induz a mudança de isótipo para IgE em  
8 linfócitos B e a diferenciação e manutenção de Th2, a IL-5 ativa eosinófilos e a IL-13 auxilia  
9 no combate a microorganismos grandes como os helmintos, por exemplo (CHERWINSKI;  
10 SCHUMACHER; BROWN, 1987; VELDHONEN et al., 2008). Normalmente, quando não há  
11 presença de citocinas características do perfil Th1 as células se diferenciam em Th2, em  
12 consequência da presença de IL-4, que pode inibir a presença de citocinas mais específicas  
13 para respostas intracelulares (CHERWINSKI; SCHUMACHER; BROWN, 1987; HSIEH et  
14 al., 1993; MOSMANN et al., 1986).

15 As células T regulatórias ou Tregs agem controlando ou mesmo interrompendo a ação  
16 de outras populações celulares (CHEN et al., 1994). Sua identificação ocorre observando-se a  
17 presença da cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25<sup>+</sup>) (SAKAGUCHI et al., 1995) e FOXP3,  
18 que é um fator de transcrição (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003), associados a  
19 CD4<sup>+</sup> e produção das citocinas TGF-  $\beta$ , IL-10 (FUSS et al., 2002) e IL-35 (COLLISON et al.,  
20 2007), sendo o TGF-  $\beta$  a principal citocina atuante na regulação por Tregs tanto de perfis  
21 celulares quanto de células inflamatórias, de tal modo que sua diminuição além de interferir  
22 na diferenciação e manutenção dessas células (KEHRL et al., 1986), pode indiretamente  
23 permitir o agravamento de doenças autoimunes (POWRIE et al., 1996).

24 O perfil Th17 produz principalmente as citocinas IL-17, IL-6, IL-21, IL-22 e TNF e  
25 normalmente necessita de IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- $\beta$  para se diferenciar e se manter  
26 (BETTELLI et al., 2006; LANGRISH et al., 2005). Atua na resposta a bactérias extracelulares  
27 e fungos (INFANTE-DUARTE et al., 2000) e, tem importância em doenças autoimunes já  
28 que IL-17 pode estimular citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-8 e induzir inflamação  
29 (BETTELLI et al., 2006; PARK et al., 2005). Já foi observado também, em camundongos,  
30 que o bloqueio de IL-17 atenuou a encefalomielite autoimune experimental (EAE) devido a  
31 inibição da regulação positiva de quimiocinas nos tecidos nervosos, enquanto sua  
32 superexpressão induz a expressão de quimiocinas e provoca infiltrado inflamatório aumentado  
33 em tecidos pulmonares (PARK et al., 2005).

1            Outro perfil identificado, o Th9 tem participação na defesa contra helmintos, asma e  
2 alergias crônicas (semelhantemente ao Th2) e em doenças inflamatórias (KHAN et al., 2003;  
3 NICOLAIDES et al., 1997; VELDHOEN et al., 2008) e sua diferenciação ocorre devido a  
4 presença de TGF- $\beta$  e IL-4, que promovem a mudança de linfócitos T naives para esse perfil  
5 (VELDHOEN et al., 2008). Já o Th22, considerando a sua proximidade ao perfil Th17,  
6 apresenta predominantemente a produção da citocina IL-22, sendo esta importante alvo para  
7 a regulação do desenvolvimento de várias doenças autoimunes (ZHAO et al., 2013). Desse  
8 modo, foi verificado que uma quantidade aumentada de IL-22 está presente em muitos  
9 distúrbios autoimunes, tais como Lupus Eritrematoso Sistêmico, artrite reumatoide, doenças  
10 alérgicas, Púrpura Trombocitopênica Imune, Esclerose múltipla e entre outros. Assim,  
11 acredita-se que a IL-22 se relaciona positivamente à gravidade dessas doenças, estando  
12 sempre aumentada nesses casos, quando comparada aos controles saudáveis (FARD; AZIZI;  
13 MIRSHAFIEY, 2016; ZHAN et al., 2018; ZHAO et al., 2013).

14            Dessa forma, a resposta imune adaptativa possui vários subtipos celulares, com a  
15 produção de várias citocinas que podem ser benéficas ou prejudiciais de acordo com os níveis  
16 em que são produzidas e ainda interagir entre si positiva ou negativamente. Citocinas do perfil  
17 Th1, conhecidas pela proteção contra o *Toxoplasma gondii*, tais como IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ,  
18 além de IL-18, podem ser encontradas em níveis altíssimos em infecções letais em animais,  
19 enquanto em infecções agudas não letais essas mesmas citocinas apresentam uma produção  
20 equilibrada, evitando danos ao hospedeiro e ao mesmo tempo levando ao controle da infecção  
21 (MORDUE et al., 2001). Além disso, perfis celulares possuem uma certa regulação entre si,  
22 como já foi mostrado entre Th1 e Th2 onde a presença de um perfil inibe a presença do outro  
23 (MOSMANN et al., 1986) e também entre Treg e Th17, já que um inibe resposta  
24 inflamatórias exacerbadas e o outro as induz (BETTELLI et al., 2006). A presença de IL-4 e  
25 IFN- $\gamma$  também podem regular negativamente a expressão de IL-17, de modo que a  
26 diferenciação para Th17 ocorre, preferencialmente, na ausência de modulação de Th1 e Th2  
27 (PARK et al., 2005).

28            Em algumas doenças pode haver diferenças na presença de citocinas inclusive entre  
29 infecções primárias e recorrentes. Na toxoplasmose ocular, dosagens de citocinas em humor  
30 aquoso demonstraram a presença de IFN- $\gamma$  em ambos os casos, enquanto a IL-17 estava  
31 aumentada apenas em infecções primárias e o mais interessante é que o número de  
32 recorrências estava relacionado com a redução das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-13, TN- $\alpha$  e mesmo a  
33 IL-9, que não é uma citocina conhecida por ter algum papel em infecções por *T. gondii* até  
34 agora (THIEME et al., 2015).

1           Esse equilíbrio de citocinas tem sido explorado ao longo dos anos a fim de melhorar o  
2 tratamento de indivíduos com doenças autoimunes, diminuindo citocinas que contribuem para  
3 a progressão da doença (LIMA et al., 2015; MOTA et al., 2015a). Contudo, deve-se  
4 considerar que a interferência em algumas citocinas deve ser monitorada para que não haja  
5 efeitos colaterais indesejáveis. Já foi mostrado que alguns pacientes que utilizam  
6 bloqueadores de TNF para tratamento de artrite idiopática juvenil, por exemplo, podem  
7 apresentar mais genes reguladores de IFN- $\alpha$  e anticorpos anti-dsDNA, ambos relacionados ao  
8 Lúpus Eritematoso Sistêmico. Por isso, deve-se tomar cuidado para que a tentativa de controle  
9 de uma doença não predisponha a outro desequilíbrio na imunidade do indivíduo – embora  
10 esse seja um efeito colateral raro – (CHARLES et al., 2000; PALUCKA et al., 2005), ou  
11 mesmo para uma imunossupressão excessiva devido ao bloqueio de citocinas chave para  
12 determinadas respostas (MOTA et al., 2015; PULIVARTHI et al., 2015).

#### 13 14 1.4 IMUNOSSUPRESSÃO POR IMUNOMODULADORES BIOLÓGICOS EM 15 PACIENTES COM DOENÇAS AUTOIMUNES

16  
17           As doenças autoimunes são caracterizadas pela capacidade de o sistema imune do  
18 indivíduo reagir contra antígenos próprios e causar dano tecidual (ABBAS; LICHTMAN;  
19 PILLAI, 2019; SMITH; GERMOLEC, 1999). A classificação de doença autoimune era feita,  
20 inicialmente, através da observação de autoanticorpos ligados a células ou livres na corrente  
21 sanguínea, com a confirmação do antígeno causador da produção desses anticorpos e havia  
22 ainda a necessidade de confirmação através de experimentos em animais – para demonstrar o  
23 aparecimento de efeitos patológicos semelhantes aos ocorridos em humanos – (WITEBSKY  
24 et al., 1957), que foram posteriormente denominadas evidências diretas (presença de  
25 anticorpos ou células reativos ao próprio), indiretas (demonstradas por experimentação  
26 animal) e ainda a evidência circunstancial, denominada dessa forma pois apenas indica a  
27 possibilidade de doença autoimune devido a presença de sintomas clínicos característicos da  
28 doença (ROSE; BONA, 1993). Atualmente, sabe-se que são alterações no sistema imune que  
29 podem provocar a falha da autotolerância e conseqüentemente perda da capacidade de  
30 reconhecimento de estruturas próprias e que, além da susceptibilidade genética, alguns  
31 agentes infecciosos e fatores ambientais também podem contribuir como gatilhos para o  
32 desenvolvimento dessas doenças (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; SMITH;  
33 GERMOLEC, 1999).

1 Uma análise de vários artigos publicados sobre doenças autoimunes publicada por  
2 Jacobson e colaboradores, em 1997, demonstrou a incidência e a prevalência de 24 doenças  
3 autoimunes durante o período de 1965 a 1997 e foi observado que, até aquela data,  
4 aproximadamente 8,5 milhões de pessoas nos Estados Unidos foram acometidas por doenças  
5 autoimunes, representando naquela época 1 em cada 31 pessoas (3,2%). A porcentagem de  
6 mulheres acometidas foi maior do que em homens e dentre as doenças mais prevalentes  
7 apresentaram-se artrite reumatoide, anemia perniciosa, doença de Graves, vitiligo, tireoidites  
8 e diabetes melitus insulino-dependente (JACOBSON et al., 1997). Outro estudo fez um  
9 levantamento sobre a prevalência de 29 doenças autoimunes a partir de dados de artigos  
10 publicados em várias partes do mundo e calculou uma prevalência variando entre 7,6 a 9,4%  
11 que, segundo o autor, foi corrigida em relação à análise de Jacobson e colaboradores (1997) e  
12 a de Eaton e colaboradores (2007), que havia relatado aproximadamente 5% de prevalência de  
13 31 doenças autoimunes com base em informações na Dinamarca. A porcentagem de mulheres  
14 acometidas foi maior do que em homens em todos os estudos. Sugere-se ainda que, em geral,  
15 existe um padrão de co-ocorrência entre doenças autoimunes (COOPER; BYNUM;  
16 SOMERS, 2009; EATON et al., 2007). Outro ponto importante a se destacar é que é notável o  
17 aumento da prevalência e incidência de doenças autoimunes ao longo dos últimos 30 anos  
18 (LERNER; JEREMIAS; MATTHIAS, 2015).

19 Um outro estudo no Brasil, mais especificamente na microrregião de Águas Formosas,  
20 em Minas Gerais, encontrou uma prevalência de 0,67% na população de 24 doenças  
21 autoimunes revisadas; contudo, os dados avaliados só incluíram pacientes atendidos nos  
22 serviços públicos de saúde (TOLENTINO; DE OLIVEIRA; DE ASSIS, 2019). Essa variação  
23 entre estudos demonstra a dificuldade de estimar a prevalência de doenças autoimunes devido  
24 à escassez de informações ou dificuldade em acessá-las. Contudo, por se tratar de uma doença  
25 crônica e muitas vezes de difícil controle, essa prevalência mostra-se preocupante quando é  
26 considerada a população em geral.

27 Doenças autoimunes causam desequilíbrio nas funções imunológicas. Indivíduos com  
28 AR podem apresentar erosão de telômeros, causando encurtamento prematuro, em células T  
29 CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> periféricas e encurtamento de telômeros também em CD4<sup>+</sup> virgens de pacientes  
30 com menos de 40 anos de idade; alterações equivalentes às observadas em idosos, mostrando  
31 uma renovação celular mais intensa e, eventualmente, ocasionando prejuízo da replicação de  
32 células T em pacientes com essa doença (KOETZ et al., 2000).

33 Além disso, pacientes com artrite reumatoide (AR) comparados com indivíduos sem  
34 AR e acompanhados durante vários anos, demonstraram que a doença autoimune também

1 aumenta o risco de infecções nesses pacientes, principalmente em ossos, articulações, pele e  
2 tecidos moles e trato respiratório; e a taxa de mortalidade (DORAN et al., 2002b). Essa maior  
3 susceptibilidade a infecções pode estar associada tanto à própria doença autoimune em si  
4 (KOETZ et al., 2000), quanto ao uso de medicamentos imunossupressores para seu controle  
5 (SAAG et al., 1994).

6 Os medicamentos imunossupressores são utilizados para auxiliar no controle da  
7 doença autoimune através do bloqueio de componentes do sistema imune e variam  
8 mecanismos de ação de acordo com a doença para a qual são utilizadas (OSTENSEN, 1992).  
9 Dentre eles, destacam-se os imunomoduladores biológicos, que são moléculas recombinantes  
10 (proteínas) ou anticorpos monoclonais ou desenvolvidos para se ligarem em citocinas,  
11 receptores de citocinas ou células para controlar ou ao menos reduzir a evolução da doença  
12 autoimune. Enquanto os imunossupressores convencionais são chamados drogas anti-  
13 reumáticas modificadoras do curso da doença (Disease Modifying Antirheumatic Drugs –  
14 DMARDs) sintéticas, os imunobiológicos são também conhecidos como DMARDs, porém  
15 biológicas. Dentre as DMARDs sintéticas destacam-se o Metotrexato, Leflunomida, anti-  
16 maláricos, entre outros; enquanto entre as DMARDs biológicas mais utilizadas estão o anti-  
17 TNF-alfa, além de outras como anti-IL-6R, anti-CD20, inibidores de coestimulação do  
18 linfócito T, e várias outras opções disponíveis atualmente (GUMPEL, 1976; LIMA et al.,  
19 2015; MOTA et al., 2015b; SINGH et al., 2012a).

20 Ao longo do tratamento, podem ser feitas combinações entre duas ou mais drogas  
21 sintéticas e/ou entre DMARDs sintéticas e biológicas, de acordo com a necessidade do  
22 paciente e melhores efeitos observados, porém normalmente são feitas tentativas inicialmente  
23 com os medicamentos convencionais. No caso de uso de imunobiológicos, pode acontecer de  
24 a primeira escolha não surtir o efeito desejado ou ainda causar reações adversas, como  
25 infecções e reações infusionais, por exemplo, que também se destacam entre os motivos para  
26 a suspensão da droga, juntamente com a remissão da doença (LIMA et al., 2015).

27 No Brasil, de acordo com dados do registro nacional de pacientes em uso de terapias  
28 biológicas para doenças reumatológicas, BiobadaBrasil, dentre 1037 pacientes distribuídos  
29 entre os centros participantes do registro entre janeiro de 2009 e fevereiro de 2010, tanto nos  
30 pacientes recebendo biológicos (n = 750) quanto nos em uso de drogas sintéticas (n = 287), a  
31 artrite reumatoide foi a doença mais diagnosticada, seguida por espondilite anquilosante (EA),  
32 artrite psoriática (AP), espondilite relacionada à doença de Chron e espondilite diferenciada.  
33 Consta ainda que o inibidor de TNF mais utilizado foi o infliximabe e logo em seguida o  
34 adalimumabe e etanercepte e que os eventos adversos mais frequentes foram as infecções,

1 sendo no trato respiratório superior e trato urinário as mais comuns. Contudo, a suspensão da  
2 medicação foi muito mais frequente devido à falta de resposta ao tratamento do que por  
3 eventos adversos em si. Em conformidade com os demais estudos em outros países, a maioria  
4 dos pacientes eram do sexo feminino (TITTON et al., 2011).

5 Embora sejam boas alternativas para o controle das doenças autoimunes, vários  
6 estudos já demonstraram que o uso das DMARDs, sintéticas ou biológicas, pode causar  
7 imunossupressão e predispor o indivíduo a infecções oportunistas (MOTA et al., 2015;  
8 PULIVARTHI et al., 2015).

9 Dentre as sintéticas, já está bem descrito que o uso de corticosteroides a longo prazo  
10 pode causar diversos efeitos colaterais. A Prednisona é amplamente utilizada no tratamento de  
11 doenças autoimunes e pode desencadear problemas de saúde, tais como erosões ou fraturas  
12 ósseas, alterações gastrointestinais e infecções graves, além de outras complicações. Embora  
13 doses médias abaixo de 5 mg/dia sejam consideradas menos prejudiciais, acima dessa  
14 posologia o risco de desenvolvimento desses acometimentos aumenta proporcionalmente à  
15 dose utilizada (SAAG et al., 1994). O MTX, por sua vez, em indivíduos com AR está mais  
16 relacionado, na maioria das vezes, ao aumento das enzimas hepáticas – apesar de o estudo de  
17 Kremer e Lee (1986) não ter encontrado alterações histológicas nos pacientes biopsiados –, e  
18 também pode provocar problemas gastrointestinais. Contudo, apresenta baixo risco de  
19 desenvolvimento de infecções oportunistas quando administrado em doses entre 8 a 12 mg,  
20 consideradas seguras (KREMER; LEE, 1986; SALLIOT; VAN DER HEIJDE, 2009).

21 No entanto, deve-se levar em conta que raramente o tratamento é feito utilizando-se  
22 apenas uma droga, de modo que, associações entre MTX, Leflunomida, Hidroxicloroquina,  
23 sulfalazina, corticosteróides e até mesmo antagonistas de TNF- $\alpha$  podem ocorrer e já foram  
24 observadas complicações como herpes zoster disseminado, infecções pulmonares,  
25 gastroenterites, TB e casos mais graves como sepse (JENKS et al., 2007).

26 Além disso, risco de infecções oportunistas relacionadas a DMARDs é maior em  
27 indivíduos em uso de metotrexato, antagonistas de TNF ou ambos combinados, quando  
28 comparado ao uso de outras DMARDs; e quando comparados apenas os 3 grupos, a  
29 associação entre anti-TNF e MTX, assim como o imunobiológicos sozinho, apresentam maior  
30 risco do que o uso de apenas metotrexato (GREENBERG et al., 2010). O uso de prednisona  
31 também aumenta o risco de infecções (GREENBERG et al., 2010), sobretudo pela maior  
32 imunossupressão causada por doses mais altas desse corticoide (SAAG et al., 1994).

33 Contraditoriamente à sua função, o uso de imunobiológicos pode ainda causar o  
34 desenvolvimento de doenças autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistêmico, vasculites,

1 doença pulmonar intersticial, doenças oculares autoimunes, hepatitis autoimunes, miopatias  
2 inflamatórias, hepatites autoimunes e sarcoidose, inclusive tendo sido mostrado nessa última a  
3 resolução após a interrupção do tratamento com anti-TNF (BAHA et al., 2015; RAMOS-  
4 CASALS et al., 2007, 2008).

#### 6 *1.4.1 Imunomoduladores Biológicos Bloqueadores de TNF- $\alpha$ e a Reagudização de Doenças* 7 *Latentes em Pacientes Imunossuprimidos*

9 A utilização de anticorpos para bloquear funções de uma citocina específica  
10 revolucionou o tratamento de doenças autoimunes por mostrar bons resultados e possibilidade  
11 de um melhor controle da doença (ELLIOTT et al., 1994), sendo os anti-TNF- $\alpha$  cada vez mais  
12 utilizados ao longo dos anos. Os bloqueadores de TNF-alfa são: golimumab (Simponi®),  
13 adalimumab (Humira®), certolizumab pegol (Cimzia®), etanercept (Enbrel®) e infliximab  
14 (Remicade®). O Etanercept é uma proteína de fusão que contém a porção extracelular do  
15 receptor-2 de TNF (TNFR2) ligado à porção Fc da IgG humana e se liga ao TNF-alfa livre. O  
16 Adalimumab e Golimumab são anticorpos IgG1 anti-TNF-alfa humanos, enquanto o  
17 Infliximab é um anticorpo anti-TNF-alfa quimérico, contendo uma parte da porção Fc humana  
18 e aminoácidos murinos. O Golimumab pode se ligar tanto ao TNF-alfa livre quanto à forma  
19 transmembrana. Por último, o Certolizumab é uma porção Fab de um anticorpo humanizado  
20 ligado com polietilenoglicol (PEG), que serve para aumentar a meia-vida e solubilidade da  
21 droga (CHOY EH, 2001; TRACEY et al., 2008).

22 Quando um imunomodulador biológico é prescrito para um paciente para controle da  
23 doença autoimune, vários critérios devem ser atendidos e exames de triagem são realizados  
24 para descartar potenciais doenças imunossupressoras ou infecções em andamento. Contudo,  
25 também deve ser realizado um monitoramento para avaliação da eficácia do medicamento e  
26 do risco de reativação de doenças latentes ou ainda o risco de ocorrência de infecção primária  
27 devido à redução da imunidade causada pela medicação (MOTA et al., 2012, 2018).

28 Ao longo dos anos, têm se observado um alto risco de desenvolvimento de TB em  
29 pacientes em uso de bloqueadores de TNF- $\alpha$ . Um estudo demonstrou que 44 pacientes com  
30 doença inflamatória intestinal em tratamento com infliximabe ou adalimumabe  
31 desenvolveram tuberculose, principalmente extrapulmonar e disseminada, embora todos  
32 tenham realizado testes de triagem antes do início da terapia e obtido resultados negativos.  
33 Isso demonstra a necessidade de realização de exames de triagem não apenas inicialmente,  
34 mas também durante o tratamento. Contudo, foi observado que a reintrodução da medicação

1 anti-TNF após o tratamento contra tuberculose na maioria das vezes pode ser considerada, já  
2 que a recorrência da infecção é menos frequente após acompanhamento adequado (ABITBOL  
3 et al., 2016).

4 Analisando dados do Sistema de Notificação de Eventos Adversos (*Adverse Event*  
5 *Reporting System - AERS*) da agência federal de administração de drogas e alimentos (*Food*  
6 *and Drug Administration – FDA*) Keane e colaboradores (2001) encontraram 70 casos de  
7 tuberculose após tratamento com infliximabe que manifestaram sintomas em média após 12  
8 semanas do início do uso do IB (KEANE et al., 2001). Em 2004, Wallis e colaboradores  
9 também examinaram o banco de dados AERS da FDA a fim de comparar a quantidade de  
10 complicações associadas ao infliximabe e etanercept e viram que dentre 35 275 relatórios, 556  
11 foram referentes ao infliximabe e 83, ao etanercept e que o infliximabe apresentou uma taxa  
12 de relatos de eventos adversos de aproximadamente 0,23%, enquanto o etanercept teve bem  
13 menos eventos relatados em comparação (cerca de 0,07%). Além disso, todas as infecções  
14 relatadas, tais como listeriose, coccidioidomicose, histoplasmose, candidíase, aspergilose,  
15 *Mycobacterium tuberculosis* e demais espécies de micobactérias, entre outras, foram mais  
16 frequentes em pacientes em uso de infliximabe do que no etanercept, sendo a tuberculose o  
17 acometimento mais comum. Nesses relatórios havia ainda o relato de toxoplasmose em 5  
18 pacientes em uso de infliximabe. Isso mostra que algumas drogas biológicas podem  
19 apresentar maior risco de doenças oportunistas do que outras, sugere que o uso do Etanercept  
20 pode apresentar menor risco de infecções, especialmente granulomatosas em pacientes em uso  
21 de anti-TNF- $\alpha$  e principalmente, reafirma a necessidade de monitoramento do tratamento com  
22 IB e preocupação com a imunossupressão que pode ser desencadeada nesses pacientes  
23 (WALLIS et al., 2004).

24 Na toxoplasmose já existem casos relatados de pacientes em uso de  
25 imunossupressores, sintéticos, biológicos ou associações, em que houve o desenvolvimento  
26 de toxoplasmose cerebral. Pulivarthi e colaboradores relataram esse diagnóstico em uma  
27 mulher de 76 anos após uso de infliximabe associado com MTX para controle de AR, após a  
28 observação de sintomas como fraqueza progressiva do lado direito e dificuldade de falar, que  
29 foi confirmado apenas por biópsia cerebral (PULIVARTHI et al., 2015). Outro estudo  
30 também relatou toxoplasmose cerebral, porém após uso de adalimumab, com o paciente  
31 apresentando sintomas neurológicos inespecíficos como hemiparesia esquerda leve e paralisia  
32 fácil periférica bilateral e diagnóstico definitivo também por biópsia cerebral (NARDONE et  
33 al., 2014).

1 Experimentos realizados em camundongos infectados com *T. gondii* mostraram que o  
2 tratamento com etanercept diminuiu os níveis das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF, que  
3 inicialmente estavam aumentadas no soro desses animais devido à infecção pelo parasito;  
4 aumentou o número de cistos contendo bradizoítos no cérebro, promoveu piora dos sintomas  
5 clínicos e maior taxa de mortalidade. Os animais tratados com etanercept apresentaram ainda  
6 mais encefalite do que os que estavam apenas infectados com o *T. gondii*, que foi confirmada  
7 na análise dos tecidos cerebrais e, na análise por PCR, expressaram mais o gene SAG1,  
8 relacionado a taquizoítos, do que o gene BAG1, relacionados a bradizoítos, sugerindo uma  
9 conversão para fase aguda. Em macrófagos da linhagem RAW2647 previamente tratados com  
10 esse IB e infectados com o parasito também houve diminuição dessas mesmas citocinas e  
11 indícios de conversão de bradizoítos em taquizoítos, mas apenas em doses mais altas de  
12 etanercept (YANG et al., 2018).

13 A coriorretinite toxoplásmica, que também é uma manifestação comum em  
14 imunossuprimidos, vêm sendo descrita nesse grupo de pacientes. Lassoued e colaboradores  
15 (2007) relataram dois casos de coriorretinite toxoplásmica em indivíduos com aproximadamente  
16 40 anos de idade. Um dos pacientes fazia uso de MTX e infliximabe e a outra, de etanercept.  
17 Interessantemente, a IgM foi positiva no soro de apenas um dos pacientes. Análise feita no  
18 soro de 6 meses antes desse paciente foi negativa para IgM e IgG, demonstrando uma  
19 infecção recente; enquanto a paciente que foi negativa para IgM apresentou anticorpos IgG  
20 positivos no ato do diagnóstico (LASSOUED et al., 2007). Esses estudos e relatos  
21 demonstram que pacientes em uso dessas drogas podem apresentar risco de desenvolver tanto  
22 uma infecção primária quanto uma reativação de uma infecção latente, de modo que se torna  
23 interessante que o rastreio para toxoplasmose seja feito antes do início do tratamento e não  
24 apenas caso apresentem sintomas neurológicos e/ou de alterações oculares durante o  
25 monitoramento da doença autoimune.

**1 2. JUSTIFICATIVA**

2

3           A presença de relatos de reativação de toxoplasmose, associada à escassez de dados  
4 sobre a manutenção da toxoplasmose latente antes e durante a terapia com imunobiológicos,  
5 atentam para a necessidade do desenvolvimento de mais estudos demonstrando uma avaliação  
6 detalhada do comportamento da resposta imune contra o *T. gondii* nesses pacientes e a análise  
7 do risco de reativação dessa doença, além da real necessidade de triagem, monitoramento e  
8 possivelmente tratamento anti-parasitário antes do início do controle da doença autoimune  
9 com essas drogas.

### 1 **3. HIPÓTESE**

2

3           A hipótese desse estudo foi que pacientes portadores de doenças autoimunes e em uso  
4 de antagonistas de TNF possuem um risco aumentado para a reativação de toxoplasmose, uma  
5 vez que a inibição dessa citocina pode predispor à quebra da manutenção da cronicidade da  
6 doença, com a consequente conversão de bradizoítos em taquizoítos, e prejuízo da resposta  
7 anti-*T. gondii*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a resposta imune celular e humoral anti-*Toxoplasma gondii* de pacientes soropositivos para toxoplasmose, em uso de terapias imunossupressoras para o tratamento de doenças autoimunes.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Detectar a presença dos anticorpos IgG e subclasse IgG1 anti - *Toxoplasma gondii* em amostras de soro de pacientes positivos para toxoplasmose, em uso de drogas imunomoduladoras sintéticas e/ou biológicas e comparar os níveis de anticorpos com o grupo controle.

2- Avaliar o perfil de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos pacientes soropositivos para toxoplasmose, em uso de drogas imunomoduladoras sintéticas e/ou biológicas, após estímulo *in vitro* com anti-CD3/anti-CD28 e com antígenos solúveis de *T. gondii* da cepa RH do parasito, por meio de:

- marcador de ativação precoce CD69, após 48 horas de cultura.
- marcador de ativação CD28 e de exaustão PD-1, após 96 horas de cultura.
- expressão de CD25, LAP e Foxp3 em células T CD4<sup>+</sup>, após 96 horas de cultura.
- expressão intracelular de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10 em células T CD4<sup>+</sup>, após 96 horas de cultura.

3- Avaliar os níveis das citocinas, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17, produzidas por células mononucleares do sangue periférico – *peripheral blood mononuclear cells* – (PBMCs) dos pacientes soropositivos para toxoplasmose, em uso de drogas imunomoduladoras sintéticas e/ou biológicas, após estímulo *in vitro* com anti-CD3/anti-CD28 e com antígenos solúveis de *T. gondii* da cepa do RH do parasito.

4 – Comparar o perfil de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e de citocinas produzidas dos pacientes em uso de drogas sintéticas e/ou biológicas com o grupo controle.

---

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 DESENHO DA PESQUISA

Pacientes atendidos pelo serviço de Reumatologia do ambulatório Maria da Glória, no Hospital das Clínicas da UFTM, na cidade de Uberaba-MG, com diagnóstico confirmado de doença autoimune, em uso de terapias imunossupressoras para seu controle e sorologia positiva para toxoplasmose (IgG<sup>+</sup>), foram convidados a participarem do estudo. Indivíduos com sorologia positiva para *T. gondii* e sem doença autoimune, atendidos nos demais setores do ambulatório Maria da Glória da UFTM, foram convidados a integrarem o grupo controle.

Foram coletadas amostras de sangue periférico e os seguintes dados de cada paciente: idade, data de nascimento, sexo, escolaridade, renda familiar, tabagismo, alcoolismo e uso de medicamentos (**Apêndice A**).

Adicionalmente, pesquisa de prontuário online pelo Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários (AGHU) foi realizada para a verificação dos seguintes dados: doença autoimune diagnosticada, data do diagnóstico, tempo de tratamento e tipo de medicação utilizada para seu controle; presença de outras comorbidades associadas, especialmente infectocontagiosas (por exemplo, HIV, HCV, HBV, entre outros), que possam imunossuprimir o sistema imunológico.

Todos os pacientes foram informados sobre o objetivo do estudo e somente foram inclusos os que aceitaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo A**). Esse projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), sob o parecer número 1.870.741 (**Anexo B**).

### 5.2 COLETA DAS AMOSTRAS E DIVISÃO DOS GRUPOS

As coletas foram realizadas entre os anos de 2017 e 2020. Inicialmente, 110 pacientes responderam o questionário e uma pequena amostra de sangue (2 a 5mL) foi coletada em tubos contendo ácido etileno tetra-acético – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) ou tubo sem anticoagulante para a realização do exame para diagnóstico de toxoplasmose. Os pacientes que apresentaram IgG anti-*T. gondii* positiva foram selecionados para a realização dos experimentos e, cerca de 3 a 4 meses depois quando retornaram ao ambulatório, foram chamados para uma segunda coleta desde que estivessem tomando a medicação

1 adequadamente e não apresentassem nenhum diagnóstico de doença oportunista ou qualquer  
 2 outra condição aguda que pudesse interferir na análises da resposta *in vitro* contra  
 3 *Toxoplasma gondii*, como por exemplo, gripes, infarto recente, fratura óssea, entre outros.  
 4 Cerca de 20 mililitros (mL) de sangue periférico foi coletado em tubos contendo heparina e 2  
 5 mL, em EDTA ou tubo sem anticoagulante; e os dados do questionário foram atualizados  
 6 quanto a possíveis alterações na medicação e última data de administração, no caso de  
 7 imunobiológicos. Os demais pacientes que foram negativos para toxoplasmose foram  
 8 chamados novamente apenas no ano seguinte para a realização de uma nova sorologia.

9 Os participantes da pesquisa foram então divididos em grupos de acordo com o tipo de  
 10 medicação que estavam utilizando: drogas de base convencionais ou imunomoduladores  
 11 biológicos. Dentre as drogas de base convencionais estão os medicamentos para controle de  
 12 sintomas como os analgésicos, os anti-inflamatórios não esteroides e os corticosteroides  
 13 (apresentam ação imunossupressora quando em uso prolongado). Estão inclusas também as  
 14 drogas anti-reumáticas modificadoras do curso da doença – *Disease Modifying Antirheumatic*  
 15 *Drugs* (DMARDs) sintéticas (GUMPEL, 1976), tais como sulfassalazina, sulfato de  
 16 hidroxicloroquina, leflunomida e o metotrexato (MTX). Já os imunomoduladores biológicos  
 17 são considerados DMARDs biológicas e estão entre eles o infliximabe, etanercepte,  
 18 certolizumabe pegol, golimumabe e o adalimumabe, todos bloqueadores da citocina TNF- $\alpha$   
 19 (SINGH et al., 2012b), que foi o foco do presente estudo.

20 Dessa forma, foram formados 3 grupos distintos, conforme pode ser observado no  
 21 **quadro 1:**

22 **Quadro 1** - Distribuição dos grupos de pacientes do estudo de acordo com a medicação em uso.

Grupos		Pacientes por grupo (n)	Critérios de inclusão*
DS	Drogas Sintéticas	14	- IgG anti- <i>T. gondii</i> positiva; - uso de DMARDs sintéticas e/ou corticosteroides associados ou não a medicamentos para controles de sintomas..
IB	Imunobiológicos	16	- IgG anti- <i>T. gondii</i> positiva; - uso de imunomoduladores biológicos associados ou não a DMARDs sintéticas e/ou corticosteroides e/ou medicamentos para controles de sintomas.
GC	Grupo Controle	13	- IgG anti- <i>T. gondii</i> positiva; - nenhum uso de DMARDs ou corticoides. - possibilidade de doença autoimune descartada.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020. \*Apenas indivíduos entre 18 e 60 anos.

1 Já os critérios utilizados para exclusão de pacientes no estudo foram:

2 - Pacientes que apresentaram alguma doença crônica transmissível, ou imunocompro-  
3 metimento não associado aos critérios estabelecidos neste estudo, constatados durante  
4 preenchimento do questionário (**Apêndice A**) ou durante a revisão de prontuários online.

5 - Pacientes com anticorpos IgG anti-*T. gondii* negativa.

6 - Indivíduos que não concordaram com a participação na pesquisa ou não assinaram o  
7 TCLE.

8 O soro e/ou plasma obtidos foram distribuídos em alíquotas e armazenado a -80°C até  
9 a realização dos testes sorológicos. O sangue total foi utilizado para a separação de células  
10 para a cultura.

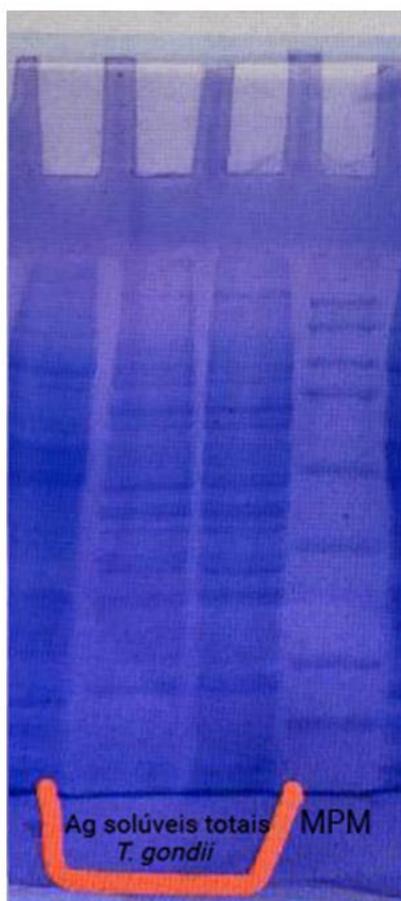
### 12 5.3 MANUTENÇÃO DE CULTURAS DE *TOXOPLASMA GONDII* E OBTENÇÃO DO 13 PARASITO

15 As formas taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidas em cultura celular,  
16 usando linhagens de células HeLa (RIBEIRO et al., 2009). As células foram infectadas com  
17 taquizoítos de *T. gondii* e mantidas por passagens seriadas em meio *Roswell Park Memorial*  
18 *Institute* (RPMI, Gibco, EUA) com 5% de Soro Fetal Bovino, a cada 48-72 horas. Os  
19 parasitos livres foram coletados por descamação da monocamada celular (*cell scraper*) e  
20 parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 13 x 4 mm e centrifugação  
21 rápida (70 x *g* por 2 minutos a 4°C) para remover restos celulares. O sobrenadante foi  
22 coletado e lavado por duas vezes (900 x *g* por 10 minutos a 4°C) com solução salina  
23 tamponada com fosfato 0,01 M – *Phosphate-Buffered Saline* (PBS, pH 7,2). O sedimento  
24 final da suspensão parasitária foi ressuspensionado em PBS e os parasitos contados em câmara de  
25 Neubauer, utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% (Sigma Chemical Co.,  
26 St. Louis, EUA). Os parasitos foram armazenados a -20°C até a preparação do antígeno  
27 solúvel de *T. gondii*.

#### 29 5.3.1 Preparo de Antígenos Solúveis de *Toxoplasma gondii* (STAg) para ensaios 30 imunoenzimáticos e para cultura de células

32 Antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii* (STAg) para ensaios imunoenzimáticos  
33 foram preparados como descrito anteriormente por Scott e colaboradores (SCOTT et al.,  
34 1987), com modificações. Suspensões parasitárias contendo aproximadamente 10<sup>8</sup>

1 taquizoítos/mL foram ressuspensas em água ultrapura contendo o coquetel de inibidores de  
2 proteases COMPLETE™ (COMPLETE™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche  
3 Applied Science, Suíça) e submetidas a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio  
4 líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Em seguida, passaram por 8 ciclos de  
5 ultrassom a 60Hz, em banho de gelo, por 5 minutos. Após centrifugação a 10.000 x g por 30  
6 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e alíquotado. Para a utilização em cultura de  
7 células o mesmo protocolo foi seguido, apenas com a exclusão do coquetel de inibidores de  
8 proteases COMPLETE™ e com a adição de uma etapa de filtração do antígeno para cultura  
9 em membrana com poro de 0,22 µm (Millipore, EUA), alíquotado dentro da capela de fluxo  
10 laminar. Foi realizada a determinação da concentração proteica (BRADFORD, 1976) de  
11 ambos os antígenos solúveis totais e armazenadas alíquotas a -80°C até utilização posterior. A  
12 **figura 2** mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida dos antígenos solúveis totais obtidos:



**Figura 2 - Antígenos solúveis totais de *Toxoplasma gondii*.** Eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando as bandas dos antígenos solúveis totais de *Toxoplasma gondii* após protocolo de extração. \*MPM, marcador de peso molecular.

---

## 5.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*TOXOPLASMA GONDII*

Os testes para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* nas amostras de soro dos pacientes foram realizados através do ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA), previamente padronizado segundo técnica descrita anteriormente, com modificações (MINEO et al., 1986).

### 5.4.1 Detecção de IgG Total e IgG1 no soro por ELISA indireto

Os testes de detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, IgG total e sua subclasse, IgG1, nas amostras de soro dos pacientes foram realizados por meio do ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA).

Placas de alta afinidade (Thermo Scientific™ Nunc™, EUA) foram sensibilizadas com STAg (10µg / mL) diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 h a 4 ° C. Posteriormente, a placa para teste de IgG foi lavada 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueada com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP, PBS -T-M5 %) por 1 h em temperatura ambiente. Após nova lavagem, as amostras de soro foram diluídas 1:64 em PBS-T-M5% e incubadas por uma hora a 37 ° C. Após 6 lavagens, o anticorpo IgG anti-humano (1:2000) conjugado com peroxidase (IgG / HRP, DAKO) foi adicionado e incubado durante 1 hora a 37 ° C. Após nova lavagem, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático 1,2 ortofenilenodiamina (OPD, Dako) com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) diluídos em água.

Para a avaliação da IgG1, o mesmo processo foi seguido para a sensibilização das placas e lavagens. O bloqueio foi realizado com PBS-T contendo 1% de albumina de sérica bovina (1% PBS-T-BSA) por 1 h em temperatura ambiente. Após as lavagens, as amostras de soro também foram diluídas na proporção 1:64 em 1% PBS-T-BSA e incubadas por 2 h a 37°C. Após 6 lavagens, o anti-IgG1 humano (1: 1000, BD Pharmingen™), conjugado com biotina, foi incubado durante 1 h a 37 ° C. As placas foram então lavadas 6 vezes, e estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionada (1: 1000) e incubada por 30 min no escuro à temperatura ambiente. Depois de lavar novamente, a reação foi revelada.

Os valores de densidade óptica (OD) foram determinados num leitor de placas de microtitulação a 490 nm. Tanto o controle positivo quanto o negativo foram incluídos na

1 placa. Os níveis de anticorpos foram expressos no índice ELISA (IE), de acordo com a  
2 fórmula  $IE = DO \text{ amostra} / \text{cut off}$ , onde o cut off foi calculado como a DO média dos soros  
3 de controle negativo mais 3 desvios padrões. Valores de  $IE > 1,2$  foram considerados positivos  
4 para IgG total e IgG1, enquanto valores limítrofes de reatividade próximos a  $IE = 1,0$  não  
5 foram considerados positivos.

#### 6 7 5.4.2 ELISA-AVIDEZ para IgG total e subclasse IgG1 anti-*T. gondii*

8  
9 Também foi realizado um teste para avaliação da avidéz da subclasse IgG total e IgG1.  
10 Para isso, o mesmo procedimento de ELISA foi realizado para amostras de soro positivas,  
11 exceto pelo aumento de uma etapa após a incubação com amostras de pacientes, onde a  
12 diluição da solução de uréia 8 M em PBS 1x foi colocada em uma das placas, enquanto na  
13 outra placa foi colocada apenas PBS1x - para que pudesse servir como placa de controle - por  
14 15 min em temperatura ambiente para avaliação da força de ligação entre os pacientes e os  
15 antígenos de *Toxoplasma gondii*.

16 Os resultados desse teste foram expressos com o Índice de Avidéz, de acordo com a  
17 fórmula  $IA = IE \text{ da cavidade de uréia} / IE \text{ da cavidade sem uréia} \times 100$ . A interpretação para  
18 os resultados obtidos para a avidéz percentual do anticorpo IgG1 e IgG foi da seguinte forma:  
19 0 - 30%, baixa avidéz - sugere infecção recente adquirida nos últimos três meses; 31 - 59%,  
20 avidéz moderada - não foi possível definir o período de infecção, caracterizado como  
21 indeterminado; 60-100%; alta avidéz - sugere que a infecção foi adquirida há mais de três  
22 meses (HEDMAN et al., 1993).

#### 23 24 5.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO 25 (PBMCS)

26  
27 As células mononucleares do sangue periférico foram separadas por gradiente de  
28 densidade utilizando-se Ficoll-Hypaque® (Sigma-Aldrich, EUA), um polímero hidrofílico de  
29 sacarose indicado para separar células de densidades semelhantes e tamanhos diferentes, sem  
30 que ocorra dano à integridade funcional e morfológica das membranas. O sangue periférico  
31 coletado dos pacientes (20 mL) em tubos contendo heparina foi cuidadosamente colocado  
32 sobre 10 mL de uma solução de Ficoll-Hypaque em tubos plásticos cônicos de centrifugação  
33 tipo Falcon (Sarstedt, Alemanha) de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a  $430 \times g$  por 30  
34 minutos, a  $25^\circ\text{C}$ . Ao final da centrifugação o “anel” de células formado na interface Ficoll-

1 plasma foi coletado cuidadosamente com pipeta de Pasteur ou pipeta graduada de 5mL estéril  
2 e transferido para outro tubo cônico de 50 mL. O excesso de Ficoll foi removido lavando-se  
3 as células por três vezes com meio RPMI incompleto por centrifugação, sendo a primeira  
4 lavagem a 380 x g com 20mL de meio e as demais a 300 x g com apenas 10mL, por 10  
5 minutos a 25°C. A quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de  
6 Neubauer e o volume do meio adicionado foi ajustado para se obter  $2 \times 10^6$  células/mL para  
7 cultura de células em placas de 24 poços (Sarstedt, Alemanha). As células foram então  
8 ressuspensas em RPMI completo, contendo 50mM de hepes, 24mM de bicarbonato de sódio,  
9 10% de soro fetal bovino inativado, 2mM de L-glutamina, 40 $\mu$ g/mL de gentamicina. Todos os  
10 procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar.

## 12 5.6 CULTURA DE CÉLULAS

14 Após a separação das PBMCs, 1ml da suspensão de células foi adicionado a cada poço  
15 da placa de cultura de 24 poços (Sarstedt, Alemanha). As células foram incubadas em 3  
16 condições: 1 $\mu$ g/mL de  $\alpha$ CD3 (BD Pharmigen™, EUA) e 0,5  $\mu$ g/mL de  $\alpha$ CD28 (BD  
17 Pharmigen™, EUA); 5 $\mu$ g/mL de antígeno de *T. gondii* (STAg, cepa RH) e ausência de  
18 estímulo. Após o período de 48 e 96 horas em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, as células foram  
19 retiradas da placa e analisadas através de citometria de fluxo.

### 21 5.6.1 Obtenção de sobrenadante de cultura de células

23 Os sobrenadantes foram obtidos, cultivando-se as PBMCs dos pacientes como descrito  
24 anteriormente. Decorrido os tempos de cultura estabelecidos, os sobrenadantes após 48h e 96  
25 h foram coletados e estocados a -80°C para posterior quantificação das citocinas.

## 27 5.7 CITOMETRIA DE FLUXO

29 Após a coleta do sobrenadante de 48 horas, as PBMCs contidas em cada condição de  
30 cultura,  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28, STAg e ausência de estímulo, de cada paciente foram retiradas da placa  
31 de cultura e divididas em 2 poços de microplaca com fundo em U (SARSTEDT, Alemanha)  
32 diluídas em PBS contendo soro AB a 10% (PBS-AB10%) a um volume final de 100  $\mu$ L por  
33 poço, sendo o primeiro contendo células sem marcação ou branco (B) e o segundo contendo  
34 células para serem marcadas. Já as PBMCs de cada paciente cultivadas por 96 horas foram

1 previamente incubadas por 5 horas com solução Golgistop™ (BD Biosciences, EUA) para  
 2 acumular a maioria das citocinas no Complexo de Golgi ou no retículo endoplasmático  
 3 rugoso através do bloqueio dos processos de transporte intracelular e, dessa forma, permitir  
 4 uma melhor detecção de citocinas intracelulares. Posteriormente foi coletado o sobrenadante e  
 5 as células foram retiradas da placa de cultura e divididas em 5 poços de microplaca com  
 6 fundo em U, 100µL/poço diluídas em PBS-AB10%, sendo um poço contendo o branco e os  
 7 demais contendo as células para serem marcadas, para cada uma das 3 condições de cultura.

8 As células foram então incubadas em PBS-AB10% por 30 minutos a temperatura  
 9 ambiente, para realização do bloqueio de possíveis ligações inespecíficas. Após o bloqueio, a  
 10 placa foi centrifugada a 600 x g por 5 minutos, a 4°C, aceleração e desaceleração lentas. Os  
 11 anticorpos para marcação extracelular foram agrupados de acordo com que tipo de célula e/ou  
 12 função deveria ser mostrado e, para tanto, foram pipetados, ao abrigo da luz, em PBS-AB10%  
 13 formando um mix de anticorpos que foi então distribuído em seus respectivos poços, 100  
 14 µL/poço em cada umas das condições de cada um dos pacientes. As marcações extracelulares  
 15 feitas na citometria após 48 horas e as marcações intra e extracelulares feitas após 96 horas  
 16 podem ser visualizadas no **quadro 2**.

**Quadro 2** - Marcações utilizadas no protocolo de citometria.

Poços/Tubos	Tempo de Cultura	Marcação Extracelular*	Marcação Intracelular*	Identificação/ Função exercida
B	48 h	-----	-----	-----
1	48 h	CD8 BB515	-----	Linfócitos T citotóxicos
		CD69 PE		Ativação celular precoce
		CD4 PE-Cy7		Linfócitos T auxiliares
B	96 h	-----	-----	-----
2	96 h	CD8 BB515	-----	Linfócitos T citotóxicos
		PD1 PE (CD279)		Proteína de morte celular programada
		CD4 PE-Cy7		Linfócitos T auxiliares
		CD28 APC		Molécula coestimulatória presente em células T ativadas

3	96 h	CD25 FITC (IL-2RA)	-----	Linfócitos ativados; caracteriza Treg quando associado a CD4+ FOXP3+
		-----	FOXP3 PE	Fator de transcrição presente em células T regulatórias
		CD4 PE-Cy7	-----	Linfócitos T auxiliares
		LAP Alexa 647	-----	Expresso na superfície de células Treg ativadas e dependentes de TGF- $\beta$ e IL-10
4	96 h	-----	IL-17 Alexa 488	Citocina do perfil Th17
		-----	IL-10 PE	Inibe a síntese de outras citocinas, principalmente IFN- $\gamma$ e TNF
		CD4 PE-Cy7	-----	Linfócitos T auxiliares
		-----	IFN Alexa 647	Citocina do perfil Th1

**Fonte:** Elaborado pela autora, 2020. \*Todos os anticorpos utilizados são da marca BD Pharmigen™, EUA. BB515, azul brilhante 515; PE, ficoeritrina; PE-Cy7, ficoeritrina cianina 7; APC, alofocianina; FITC, isotiocianato de fluoresceína; Alexa 647, Alexa Fluor 647; Alexa 488, Alexa fluor 488.

1 Após a marcação extracelular, as células foram incubadas a 4°C por 30 minutos, ao  
2 abrigo da luz. Em seguida, a placa foi centrifugada a 600 x g por 5 min, a 4°C, aceleração e  
3 desaceleração lentas, lavada com PBS1x e centrifugada novamente nas mesmas condições.  
4 Após a lavagem as células pós 48h foram fixadas para posterior leitura, enquanto no protocolo  
5 realizado de 96h as células foram incubadas com solução de permeabilização e fixação BD  
6 Cytotfix/Cytoperm™ (BD Bioscience, EUA), 100 $\mu$ L/poço, por 30 minutos a 4°C, no escuro,  
7 para possibilitar a marcação de intracelular de citocinas. Decorrido o tempo, foi realizada uma  
8 nova centrifugação a 600 x g por 5 min, a 4°C, a placa foi lavada com o tampão de lavagem e  
9 permeabilizante celular BD Perm/Wash™ (BD Bioscience, EUA) diluído 1:10 devido a  
10 importância de manter as células na presença de saponina durante a marcação de citocinas.  
11 Após lavagem seguida de centrifugação, os anticorpos para marcação intracelular foram  
12 agrupados de acordo com a citocina ou fator de transcrição que deveria ser mostrado e, para  
13 tanto, foram pipetados em tampão BD Perm/Wash™, ao abrigo da luz, formando um mix de  
14 anticorpos que foi então distribuído em seus respectivos poços, 100  $\mu$ L/poço em cada umas  
15 das condições de cada um dos pacientes. As células foram novamente incubadas a 4°C por 30  
16 minutos, ao abrigo da luz; e lavadas em solução tampão (BD Perm/Wash™) para a remoção  
17 do excesso de marcadores e logo depois com PBS1x. Após centrifugação, o sobrenadante foi  
18 retirado e as células ressuspensas em 150  $\mu$ L de fixador paraformaldeído a 4%.  
19 Posteriormente as células foram passadas para tubos para que a leitura no citômetro de fluxo  
20 BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, EUA) pudesse ser realizada e a aquisição de 50.000

1 eventos por tubo foi visualizada através do software CellQuest (BD Biosciences, EUA).  
2 Foram utilizados anticorpos apropriados para os isotipos controles. A análise da aquisição  
3 (**figuras 4A-D; 5A-D; 6A-E; 7A-D**) foi realizada no programa FlowJo versão 10.6.1 (BD  
4 Biosciences, EUA).

## 5 6 5.8 DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE POR CYTOMETRIC BEAD 7 ARRAY (CBA)

8  
9 As citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17 presente nos sobrenadantes  
10 de cultura foram simultaneamente quantificadas pela técnica de CBA (BD™ CBA Human  
11 Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, EUA), que utiliza bead específicas para cada citocina para  
12 detectá-las simultaneamente dentro de uma mesma amostra. Para essa análise foram  
13 selecionados 10 indivíduos do grupo controle (GC), 10 pacientes do grupo em uso de  
14 DMARDs sintéticas (DS) e 09, do grupo em uso de imunomoduladores biológicos (IB),  
15 selecionados de acordo com a doença de base e tempo do uso de medicação, e dosados os  
16 níveis de citocinas das três condições de estímulo,  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28, STAg e ausência de  
17 estímulo, no sobrenadante após 96 horas de estímulo.

18 As beads de captura, que vêm prontas para uso e guardadas individualmente, possuem  
19 com anticorpos específicos para cada citocina conjugados com ficoeritrina em diferentes  
20 intensidades. Essas beads foram vortexadas por 3 a 5 segundos e, após cálculo da quantidade  
21 necessária de cada uma para a realização da dosagem das condições de estímulo e da curva  
22 padrão do experimento, foram alíquotadas em um tubo de ensaio e reservadas em local  
23 escuro, à temperatura ambiente. O padrão liofilizado foi reconstituído, mantido à temperatura  
24 ambiente por 15 minutos sob leve homogeneização e, logo em seguida foi preparada a curva  
25 de calibração em tubos de ensaio com volume final de 300 $\mu$ L cada, de modo que o valor mais  
26 alto da curva foi 5000 pg/mL e o mais baixo feito apenas com o diluente (branco).

27 Em uma placa para cultura de células, com fundo em U, contendo 96 poços (Greiner  
28 Bio-One, Áustria) foram distribuídos 50 $\mu$ L de cada amostra e dos padrões, 20 $\mu$ L do pool de  
29 beads de captura e 20 $\mu$ L do mix de detecção (pronto para uso). A placa foi então incubada por  
30 3 horas à temperatura ambiente, no escuro.

31 Após a incubação a placa foi lavada com 150 $\mu$ L de solução de lavagem (Wash Buffer)  
32 presente no kit e centrifugada a 400 xg por 6 minutos. O sobrenadante foi aspirado,  
33 cuidadosamente, e as beads ligadas com as citocinas foram ressuspensas em 200 $\mu$ L do

1 Wash Buffer e transferidas para tubos de citometria para aquisição que foi feita no mesmo dia  
2 no citômetro de fluxo FACSCalibur BD (BD Biosciences, EUA).

3 A análise da aquisição foi realizada no programa FCAP Array™ versão 2.0 (BD  
4 Biosciences, EUA) e a concentração das citocinas foi estimada por análise de regressão linear  
5 com as fluorescências obtidas na curva padrão de cada citocina e expressas em pg/mL.

6

## 7 5.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS

8

9 A análise estatística de todos os dados foi realizada utilizando-se o *software GraphPad*  
10 *Prism* versão 7.04 (GraphPad Software Inc., EUA). Foi utilizado o teste não paramétrico  
11 Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para os dados que não seguiram distribuição normal e  
12 One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey quando a distribuição foi normal. Para as análises  
13 de amostras pareadas foi utilizado o teste de Wilcoxon quando a distribuição não foi normal e  
14 o T Pareado para amostras com distribuição normal.

15 As análises de correlação foram feitas com o teste de correlação de Spearman. Os  
16 valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS

A média de idade entre os indivíduos testados foi 50,14 ( $\pm$  8,25) para o grupo DS; 48,38 ( $\pm$  11,39) para o IB e 38 ( $\pm$  10,00) para o grupo controle. As demais características estão descritas abaixo na **tabela 1**, enquanto o **quadro 3** apresenta os esquemas de tratamento e tempo de utilização dos medicamentos dos pacientes.

**Tabela 1.** Descrição dos grupos de estudo e grupo controle.

	Características gerais		
	N (%)		
	GC (n = 13)	DS (n = 14)	IB (n = 16)
<b>Gênero</b>			
Feminino	9 (69,2)	12 (85,7)	11 (68,8)
Masculino	4 (30,8)	2 (14,3)	5 (31,2)
<b>Idade</b>			
17 – 30	4 (30,8)	0 (0)	1 (6,2)
31 – 45	7 (53,8)	2 (14,3)	5 (31,3)
46 – 60	2 (15,4)	12 (85,7)	10 (62,5)
<b>Doença autoimune</b>			
Artrite Reumatoide	-----	11 (78,6)	7 (43,8)
Artrite Reumatoide + AIJ	-----	1 (7,1)	0 (0)
Artrite Reumatoide + Doença de Chron	-----	0 (0)	1 (6,2)
Artrite Idiopática Juvenil (AIJ)	-----	0 (0)	1 (6,2)
Artrite Psoriásica + Psoríase	-----	1 (7,1)	3 (18,8)
Espondilite Anquilosante	-----	0 (0)	4 (25)
Artrite Reumatoide + Lúpus? Ou Sjogren (HD)	-----	1 (7,1)	0 (0)

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

**Quadro 3** - Descrição dos medicamentos dos grupos IB e DS.

Imunomoduladores biológicos (n = 16)	Tempo de utilização						
	Até 3 meses	4 a 6 meses	7 a 12 meses	13 a 24 meses	25 a 60 meses	61 a 120 meses	Mais de 120 meses
Adalimumabe				2			1
Adalimumabe, Leflunomida e PDN					1		
Certolizumabe					1		
Certolizumabe e PDN		1					
Certolizumabe, HQN e PDN					1		
Certolizumabe, MTX, Mesalazina e Arpadol					1		
Etanercepte					2	1	
Etanercepte e MTX						1	
Golimumabe e MTX					1		
Infliximabe e MTX				1		1	
Infliximabe e PDN					1		
<b>Drogas Sintéticas (n = 14)</b>							
Corticóide (Dexametasona ou Prednisona)		2					
MTX				1	2		
MTX e Hidroxicloroquina					1		
MTX, Hidroxicloroquina e Prednisona		1			4		
MTX e Leflunomida						1	
MTX e Prednisona					2		

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

1 6.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG TOTAL E A SUBCLASSE IGG1 ANTI-  
 2 *TOXOPLASMA GONDII* E AVIDEZ DE IGG TOTAL E IGG1

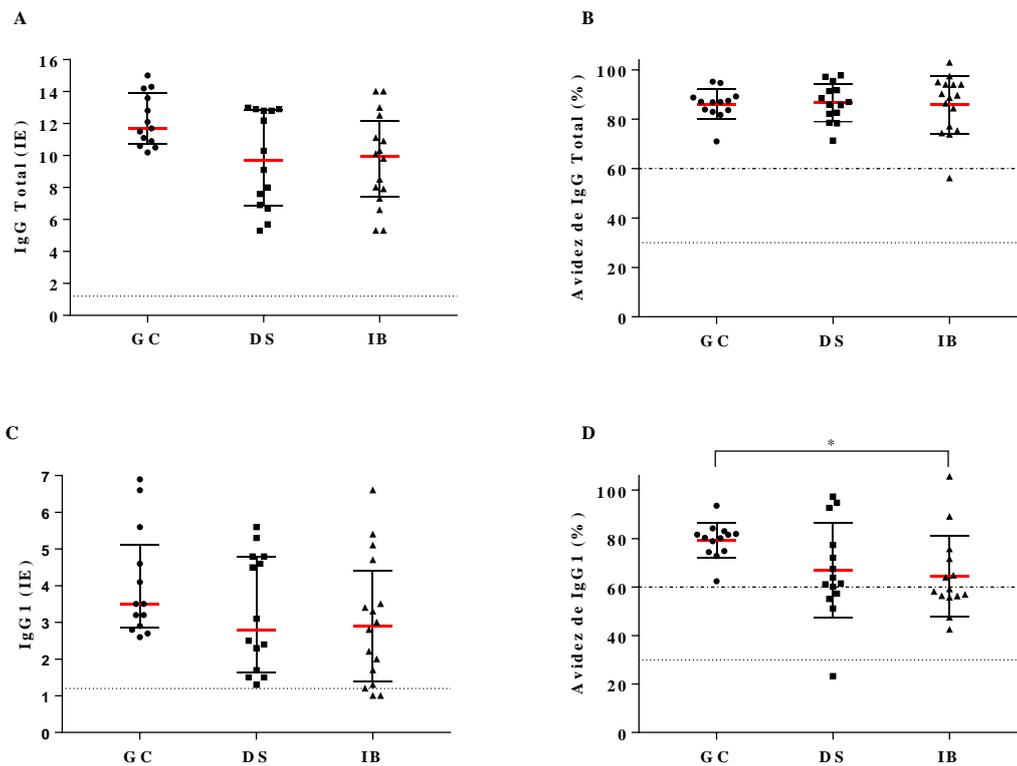
3

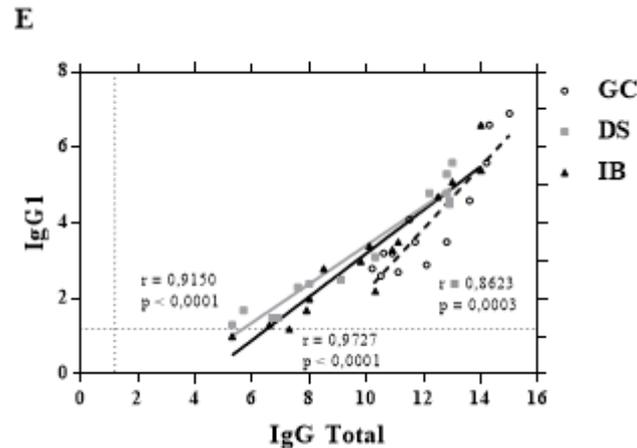
4 Os pacientes que tiveram contato prévio com o *Toxoplasma gondii* foram selecionados  
 5 a partir da avaliação da sorologia para IgG total anti-*T.gondii*, conforme pode ser observado  
 6 na **figura 3A**.

7 Quando os níveis de IgG total foram comparados entre os grupos, não houve diferença  
 8 significativa, contudo, foi observado uma forte tendência à diminuição no grupo IB quando

1 comparado ao GC ( $p = 0,0554$ ) (**figura 3A**). Todos os indivíduos do GC e a maioria dos  
 2 pacientes estavam com a infecção em fase crônica, pois apresentaram anticorpos alta avidez  
 3 de IgG total, sendo que apenas um paciente estava com avidez moderada (não sendo possível  
 4 determinar o tempo de infecção) e, portanto, não houveram variações significativas na  
 5 avaliação da avidez (**figura 3B**).

6 A presença da subclasse IgG1, que é descrita na literatura como a mais frequente na  
 7 resposta anti-*T. gondii* (HUSKINSON et al., 1989), também foi avaliada. Os níveis de IgG1  
 8 sérica (**figuras 3C**) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na  
 9 comparação entre os grupos, porém no teste de avidez de IgG1 foi possível observar que a  
 10 avidez desses anticorpos estava diminuída no IB em relação ao GC ( $p = 0,0482$ ) (**figura 3D**).  
 11 Foi realizada ainda uma correlação entre os níveis de IgG total e IgG1 de cada grupo e  
 12 verificou-se uma forte correlação positiva entre a positividade de ambas, sendo  $p = 0,0003$  e  $r$   
 13  $= 0,8623$  no GC;  $p < 0,0001$  e  $r = 0,9150$  no DS e  $p < 0,0001$  e  $r = 0,9727$  no IB (**figura 3E**).





**Figura 3 - Avaliação da imunidade humoral, avaliada pela produção de anticorpos específicos para o *Toxoplasma gondii*.** (A) Níveis de anticorpos IgG total anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), (B) Índice Avidéz dos anticorpos IgG total anti-*T. gondii*, expresso em porcentagem (%), (C) Níveis da subclasse IgG1 anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), (D) Índice Avidéz da subclasse IgG1 anti-*T. gondii*, expresso em porcentagem (%), (E) Correlação entre os níveis dos anticorpos IgG total e da subclasse IgG1, nos grupos GC, DS e IB. Análise entre grupos por Kruskal-Wallis (A e C) e por Ordinary one-way ANOVA (B e D) e análise de correlação por teste de Spearman, onde  $r$  expressa o coeficiente de correlação. As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartis ou média com desvio padrão. Dados estatisticamente significantes,  $*p < 0,05$ .

### 2 6.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO E EXAUSTÃO EM 3 CÉLULAS T CD4<sup>+</sup>

4  
5 Durante a realização da citometria de fluxo, as células foram marcadas para que  
6 fossem avaliadas quanto ao percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e ativação celular após  
7 48h e 96h, exaustão após 96h e quanto a possibilidade de presença dos perfis de Th1, Treg e  
8 Th17. Esses resultados obtidos foram analisados quanto ao ganho ou perda de células nos  
9 estímulos utilizados quando comparados com as células que não foram estimuladas dentro do  
10 próprio grupo; e foram também descritas as diferenças obtidas em um mesmo estímulo entre  
11 os grupos de estudo, DS e IB, quando comparados ao GC e entre si.

12 A ativação precoce demonstrada por CD69<sup>+</sup> nos linfócitos CD4<sup>+</sup> demonstrou um  
13 aumento significativo do percentual de células no estímulo  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 em relação ao meio  
14 (sem estímulo) nos grupos DS e IB ( $p = 0,0017$  e  $p = 0,0076$ , respectivamente), enquanto no  
15 GC houve apenas uma tendência ao aumento nesse mesmo estímulo ( $p = 0,0681$ ). Não houve  
16 diferença no STAg nem entre os estímulos e nem entre os grupos avaliados (**figura 4E**),  
17 assim como não houve diferença nos outros dois estímulos entre os grupos avaliados. Na  
18 ativação precoce em linfócitos CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) observou-se aumento no  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 em  
19 relação ao meio em todos os grupos ( $p = 0,0007$  no GC,  $p = 0,0009$  no DS e  $p = 0,0003$  no



**Figura 4 - Ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+, avaliada pela expressão do receptor de superfície celular CD69.** (A) Seleção da população de linfócitos totais, (B) seleção das populações de células T CD4+ e CD8+, dentre as populações de linfócitos totais, (C) seleção das células CD4+ marcadas com CD69+, dentre as células CD4+ totais, (D) seleção das células CD8+ marcadas com CD69+, dentre as células CD8+ totais, (E) percentual de CD4+CD69+ e (F) CD8+ CD69+ após 48h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, STAg e ausência de estímulo nos grupos GC, DS e IB, por citometria de fluxo. Os números apresentados dentro dos gráficos (A-D) demonstram o percentual de células presentes em cada seleção descrita. Análise entre estímulos por Wilcoxon e entre grupos por Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartis. Dados estatisticamente significantes, \*p < 0,05; \*\*p < 0,005 e \*\*\*p < 0,0005.

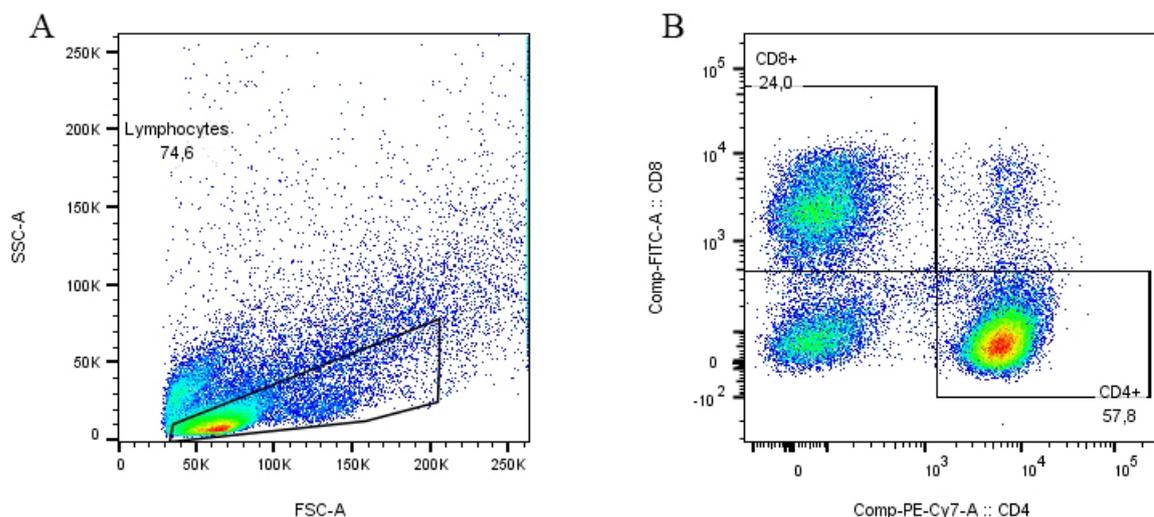
1 Após 96h os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram analisados novamente. O percentual de  
 2 CD4<sup>+</sup> expressando CD28<sup>+</sup>, molécula co-estimulatória que interage com a B7 presentes nas  
 3 APCs (SHARPE; FREEMAN, 2002), demonstrou-se reduzido no estímulo  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28  
 4 quando comparado à ausência de estímulos em todos os grupos (p = 0,0002 no GC, DS e IB),  
 5 enquanto no STAg houve uma tendência ao aumento no GC (p = 0,0574) e uma tendência à  
 6 redução no DS (p = 0,0676). Não houve diferenças significativas nas análises entre grupos  
 7 (**figura 5E**). Com relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>, o  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 mostrou percentual  
 8 menor em relação ao meio no GC (p = 0,0141), DS (p = 0,0209) e IB (p = 0,0152) e nenhuma  
 9 alteração significativa em nenhum dos grupos no STAg. O percentual celular no estímulo com  
 10  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 no IB apresentou-se reduzido em relação ao mesmo estímulo no GC (p =  
 11 0,0306) assim como o STAg, também na comparação entre IB x GC (p = 0,0362), nas  
 12 análises entre grupos (**figura 5F**).

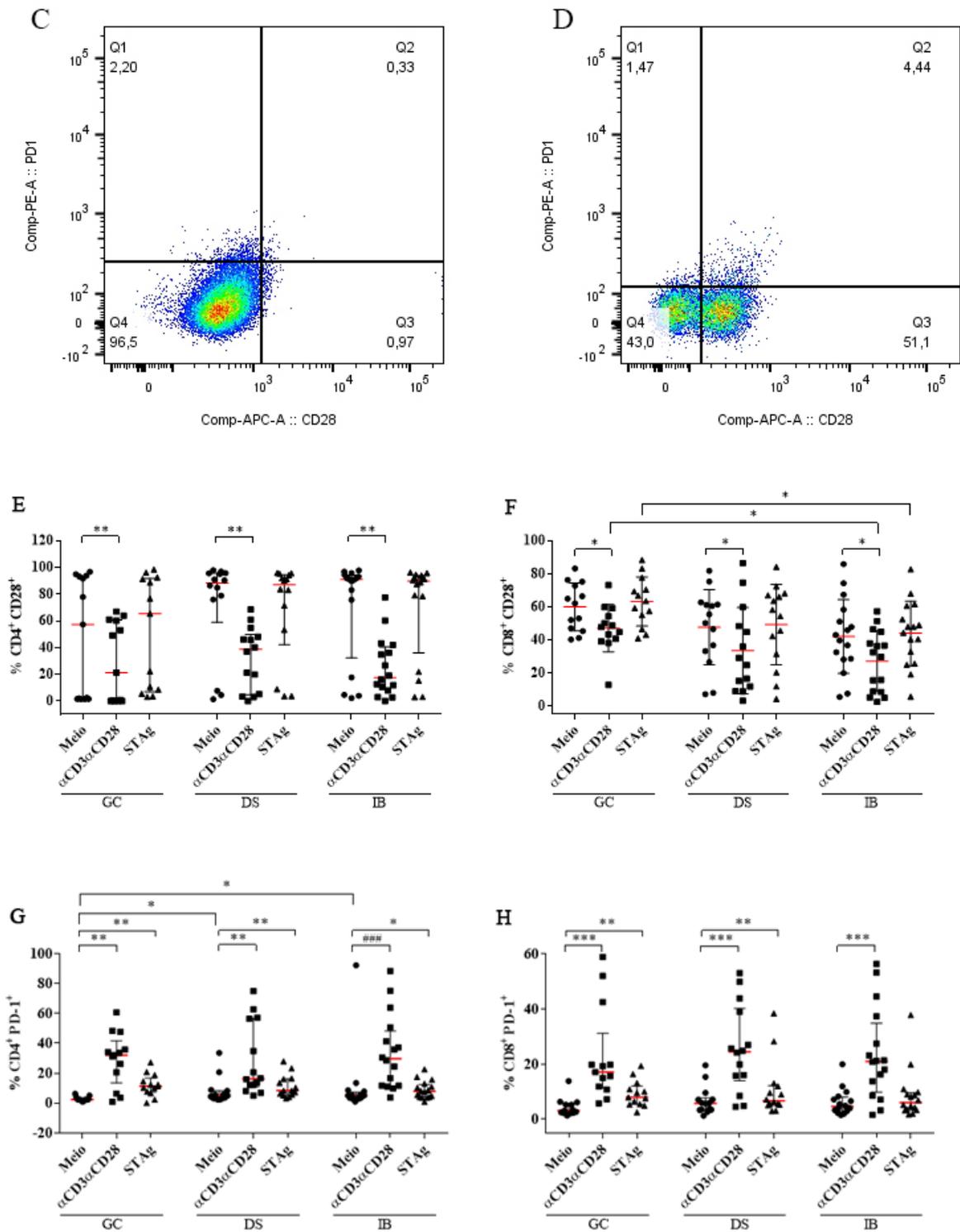
13 A exaustão celular também foi avaliada pela expressão de proteína de morte celular  
 14 programada 1 – Programmed cell death protein 1 (PD-1). Em T CD4<sup>+</sup> foi evidente o aumento  
 15 de células expressando essa proteína após estimuladas com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 quando comparadas  
 16 às células sem nenhum estímulo nos três grupos (p = 0,0005 no GC, p = 0,0012 no DS e p <  
 17 0,0001 no IB). Esse aumento na expressão de PD-1 também foi observado nas células  
 18 estimuladas com STAg quando comparadas com a ausência de estímulo nos três grupos (p =  
 19 0,0005 no GC, p = 0,0419 no DS e p = 0,0076 no IB). Porém quando a expressão foi  
 20 comparada entre grupos, houve diferença estatística apenas entre as células não estimuladas  
 21 do DS em relação ao GC (p = 0,0082) e do IB em relação ao GC (p = 0,0121) (**figura 5G**).  
 22 Nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> houve o mesmo aumento de expressão de PD-1 nas células  
 23 estimuladas com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 quando comparadas a ausência de estímulo nos três grupos (p  
 24 = 0,0002 no GC, p = 0,0001 no DS e p = 0,0003 no IB); assim como nas células estimuladas  
 25 com STAg em relação ao Meio, embora esse aumento tenha ocorrido apenas no GC (p =

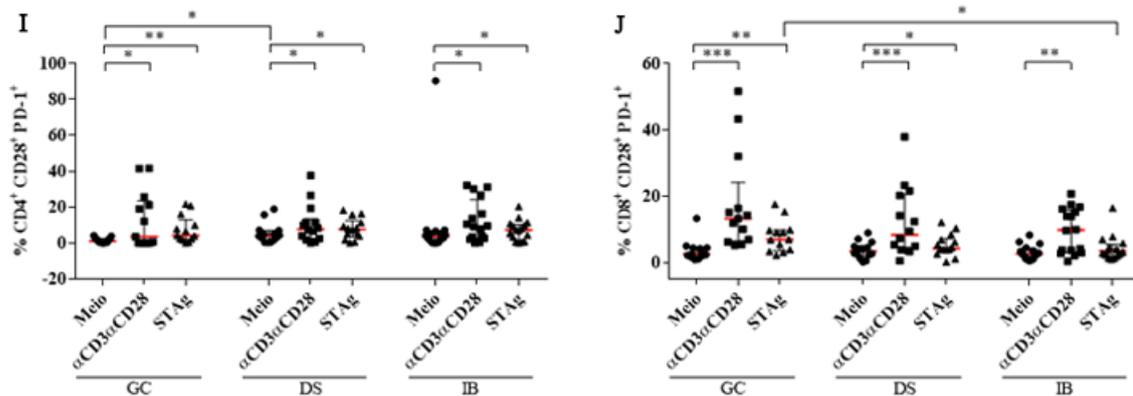
1 0,0034) e no DS ( $p = 0,0012$ ). Não houve diferenças estatisticamente significativas em células  
2 CD8+ expressando PD-1 na análise entre grupos (**figura 5H**).

3 Células expressando ambas as moléculas, CD28+ e PD-1 também foram analisadas.  
4 Observou-se aumento da dupla expressão nos linfócitos T CD4+ estimulados com  
5  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 quando comparado às células não estimuladas em todos os grupos, sendo  $p =$   
6 0,0327 para o GC,  $p = 0,0494$  para o DS e  $p = 0,0110$  para o IB. Esse mesmo aumento foi  
7 observado também na análise do STAg x Meio nos 3 grupos: GC ( $p = 0,0005$ ), DS ( $p =$   
8 0,0419) e IB ( $p = 0,0063$ ). Na análise entre os grupos, apenas as células não estimuladas  
9 apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o DS e o GC, demonstrando um  
10 aumento no percentual de células com dupla expressão no DS ( $p = 0,0366$ ) (**figura 5I**).

11 A avaliação de CD8+ duplo positivas mostrou aumento no percentual dessas células  
12 no estímulo  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 em relação ao meio nos grupos GC ( $p = 0,0002$ ), DS ( $p = 0,0001$ ) e  
13 IB ( $p = 0,0021$ ) e no STAg em relação ao meio no GC ( $p = 0,0034$ ) e DS (0,0105). Quando  
14 realizada a análise entre grupos, observou-se uma diminuição no percentual de células  
15 estimuladas com STAg que apresentaram essa dupla marcação no IB quando comparado ao  
16 GC ( $p = 0,0443$ ) (**figura 5J**).







**Figura 5 - Ativação e exaustão de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, avaliada pela expressão dos receptores de superfície celular CD28 e PD-1.** (A) Seleção da população de linfócitos totais, (B) seleção das populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, dentre as populações de linfócitos totais, (C) seleção das células CD4<sup>+</sup> marcadas com PD-1 (Q1 + Q2), CD28<sup>+</sup> (Q2 + Q3) e duplamente marcadas com PD-1 e CD28<sup>+</sup> (Q2), (D) seleção das células CD8<sup>+</sup> marcadas com PD-1 (Q1 + Q2), CD28<sup>+</sup> (Q2 + Q3) e duplamente marcadas com PD-1 e CD28<sup>+</sup> (Q2), (E) percentual de CD4<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>, (F) CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>, (G) CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>, (H) CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (I) CD4<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> e (J) CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> após 96h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, STAg e ausência de estímulo nos grupos GC, DS e IB, por citometria de fluxo. Os números apresentados dentro dos gráficos (A-D) demonstram o percentual de células presentes em cada seleção descrita. Análise entre estímulos por Wilcoxon (E, G, H, I e J) e por Paired T test (F) e entre grupos por Kruskal-Wallis (E, G, H, I e J) e Ordinary one-way ANOVA (F). As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartil ou média com desvio padrão. Dados estatisticamente significantes, \*p < 0,05; \*\*p < 0,005, \*\*\*p < 0,0005 e ###p < 0,0001.

#### 1 6.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO INTRACELULAR DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$ , IL-17 E 2 IL-10 POR CÉLULAS CD4<sup>+</sup>

3

4 As células T CD4<sup>+</sup> foram avaliadas também quanto à sua expressão de IFN- $\gamma$ , IL-17,  
5 IL-10 e dupla expressão dessas citocinas. As células produtoras de IFN- $\gamma$  apresentaram  
6 aumento em seu percentual após estímulo com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 em relação às não estimuladas  
7 no GC (p = 0,0002), DS (p = 0,0353) e IB (p = 0,0013). Esse mesmo aumento em relação ao  
8 meio foi observado após estímulo com STAg no GC (p = 0,0002) e no IB (p = 0,0013), mas  
9 não no DS. A análise entre grupos não mostrou diferenças significativas (**figura 6F**).

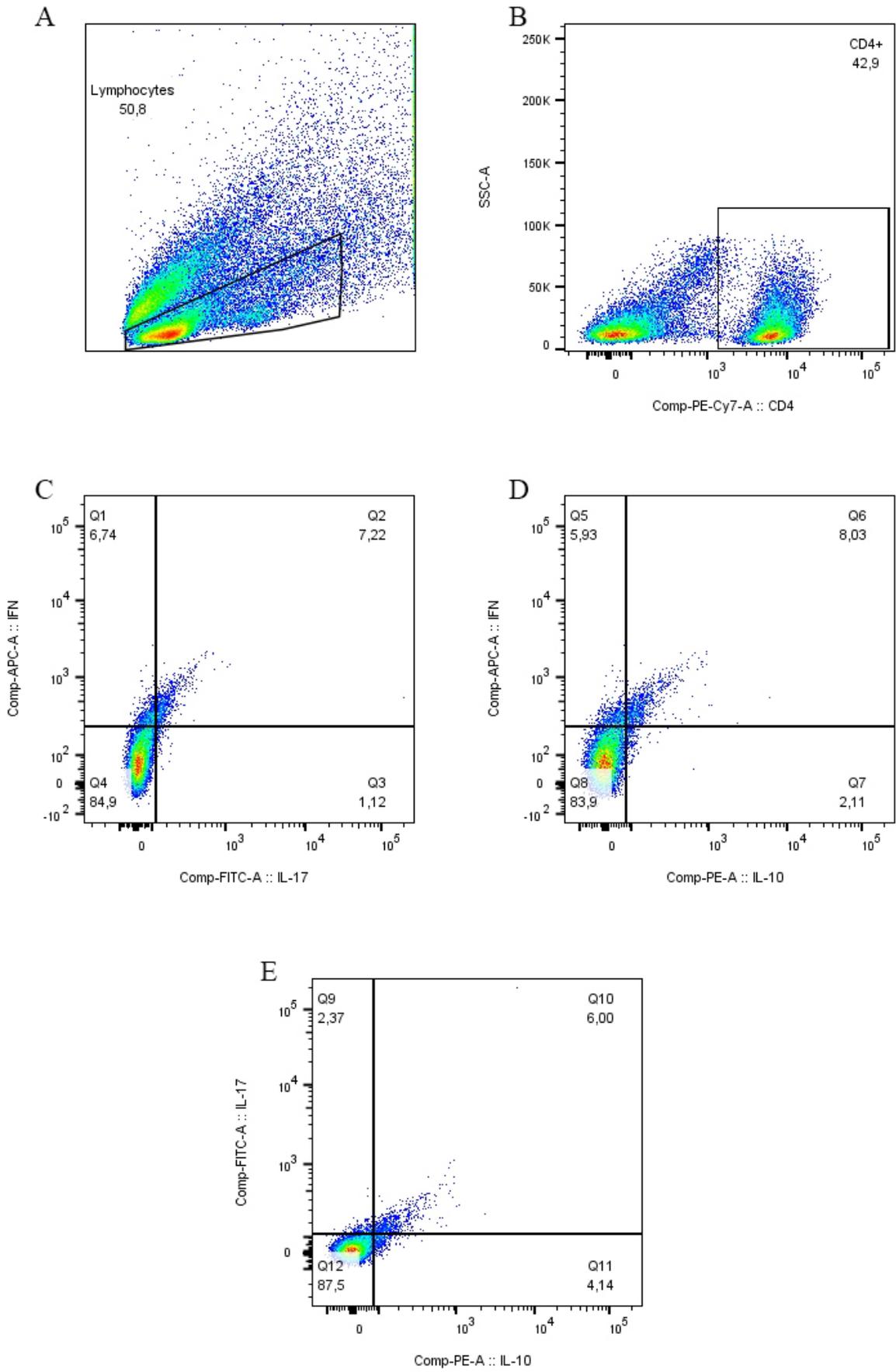
10 O percentual de CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> nas células estimuladas com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 foi maior em  
11 relação às não estimuladas no GC (p = 0,0061) e no IB (p = 0,0016). O mesmo ocorreu nas  
12 células após estímulo com STAg (p = 0,0215 no GC e p = 0,0335 no IB). Contudo, não houve  
13 diferenças nos estímulos na análise entre os grupos pesquisados (**figura 6G**).

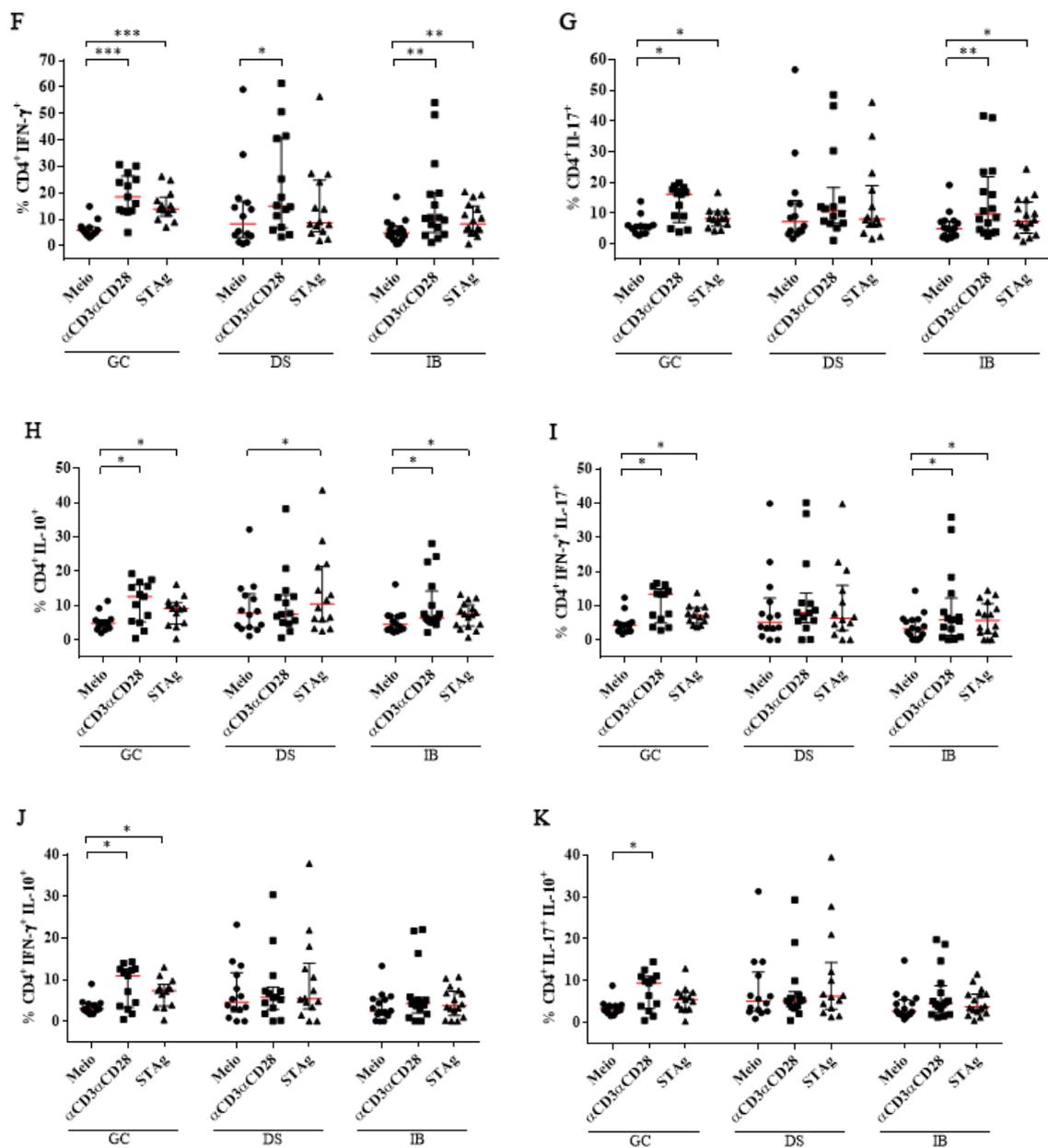
14 A expressão intracelular de IL-10 mostrou-se aumentada nas células CD4<sup>+</sup> após  
15 estímulo com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 em relação ao meio nos grupos GC (p = 0,0134) e IB (p = 0,0076)

---

1 e após estímulo com STAg também em relação ao meio no GC ( $p = 0,0327$ ), DS ( $p = 0,0245$ )  
2 e IB ( $p = 0,0250$ ) (**figura 6H**) e nenhuma diferença na comparação entre grupos.

3 Com relação à dupla expressão intracelular de citocinas, a avaliação de  $CD4^+ IFN-\gamma^+$   
4  $IL-17^+$  demonstrou aumento no percentual de células estimuladas com  $\alpha CD3\alpha CD28$  e com  
5 STAg em relação aos linfócitos não estimulados nos grupos GC ( $p = 0,0061$  e  $p = 0,0327$ ,  
6 respectivamente) e IB ( $p = 0,0063$  e  $p = 0,0290$ , respectivamente). Porém não apresentou  
7 diferenças na avaliação entre grupos (**figura 6I**). Por sua vez, células duplo produtoras de  
8  $IFN-\gamma^+$  e  $IL-10$  mostraram aumento em seu percentual apenas no GC, quando comparado o  
9  $\alpha CD3\alpha CD28$  e o STAg com as células não estimuladas ( $p = 0,0081$  e  $p = 0,0134$ ,  
10 respectivamente); enquanto no IB houve apenas uma tendência ao aumento do percentual de  
11 células estimuladas com STAg em relação ao meio ( $p = 0,0730$ ). Porém a análise entre grupos  
12 não mostrou nenhuma diferença significativa (**figura 6J**). Por fim, os linfócitos  $CD4^+ IL-17^+$   
13  $IL-10^+$  mostraram um aumento significativo apenas no GC, quando as células estimuladas  
14 com  $\alpha CD3\alpha CD28$  foram comparadas às não estimuladas ( $p = 0,0105$ ); e uma tendência ao  
15 aumento no STAg X meio no GC ( $p = 0,0574$ ) e no  $\alpha CD3\alpha CD28$  x meio no IB ( $p = 0,0761$ ).  
16 Da mesma forma que as anteriores, não houveram alterações significativas quando analisadas  
17 as diferenças entre os grupos em cada estímulo (**figura 6K**).





**Figura 6 - Perfis de linfócitos T CD4+, avaliados pela expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10.** (A) Seleção da população de linfócitos totais, (B) seleção das populações de células T CD4+, dentre as populações de linfócitos totais, (C) seleção das células CD4+ expressando IFN- $\gamma$  (Q1 + Q2), IL-17 (Q2 + Q3) e duplamente marcadas com IFN- $\gamma$  e IL-17 (Q2), (D) seleção das células CD4+ expressando IFN- $\gamma$  (Q5 + Q6), IL-10 (Q6 + Q7) e duplamente marcadas com IFN- $\gamma$  e IL-10 (Q6), (E) seleção das células CD4+ expressando IL-17 (Q9 + Q10), IL-10 (Q10 + Q11) e duplamente marcadas com IL-17 e IL-10 (Q10), (F) percentual de CD4+ IFN- $\gamma$ +, (G) CD4+ IL-17+ (H) CD4+ IL-10+, (I) CD4+ IFN- $\gamma$ + IL-17+, (J) IFN- $\gamma$ + IL-10+ (K) IL-17+ IL-10+ após 96h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, STAg e ausência de estímulo nos grupos GC, DS e IB, por citometria de fluxo. Os números apresentados dentro dos gráficos (A-E) demonstram o percentual de células presentes em cada seleção descrita. Análise entre estímulos por Wilcoxon e entre grupos por Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartil. Dados estatisticamente significantes, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0005$ .

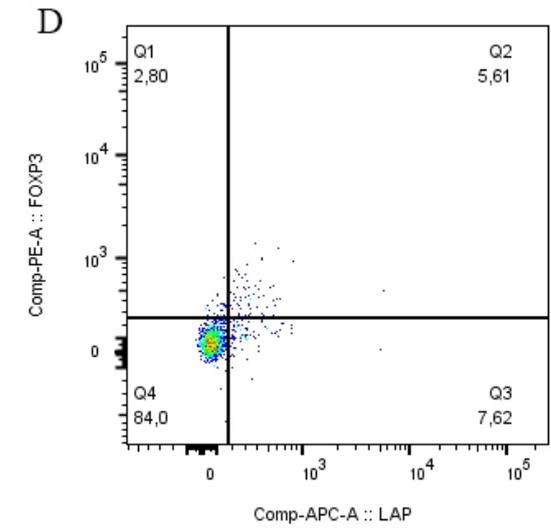
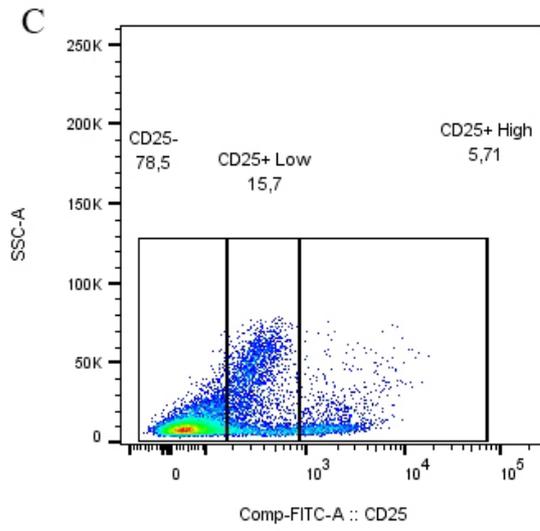
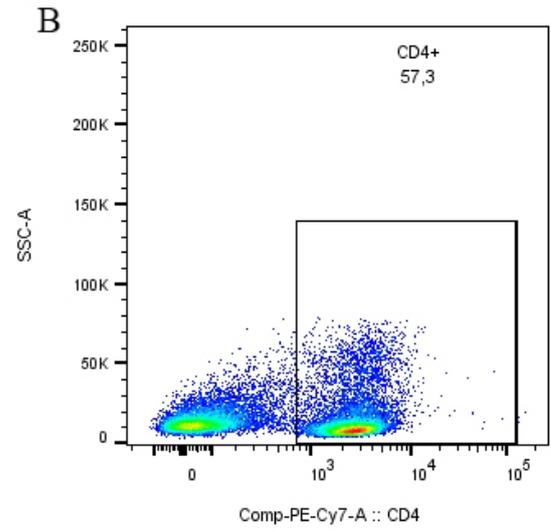
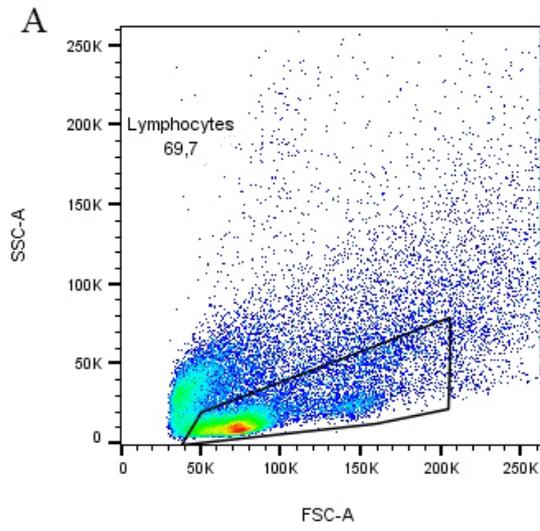
---

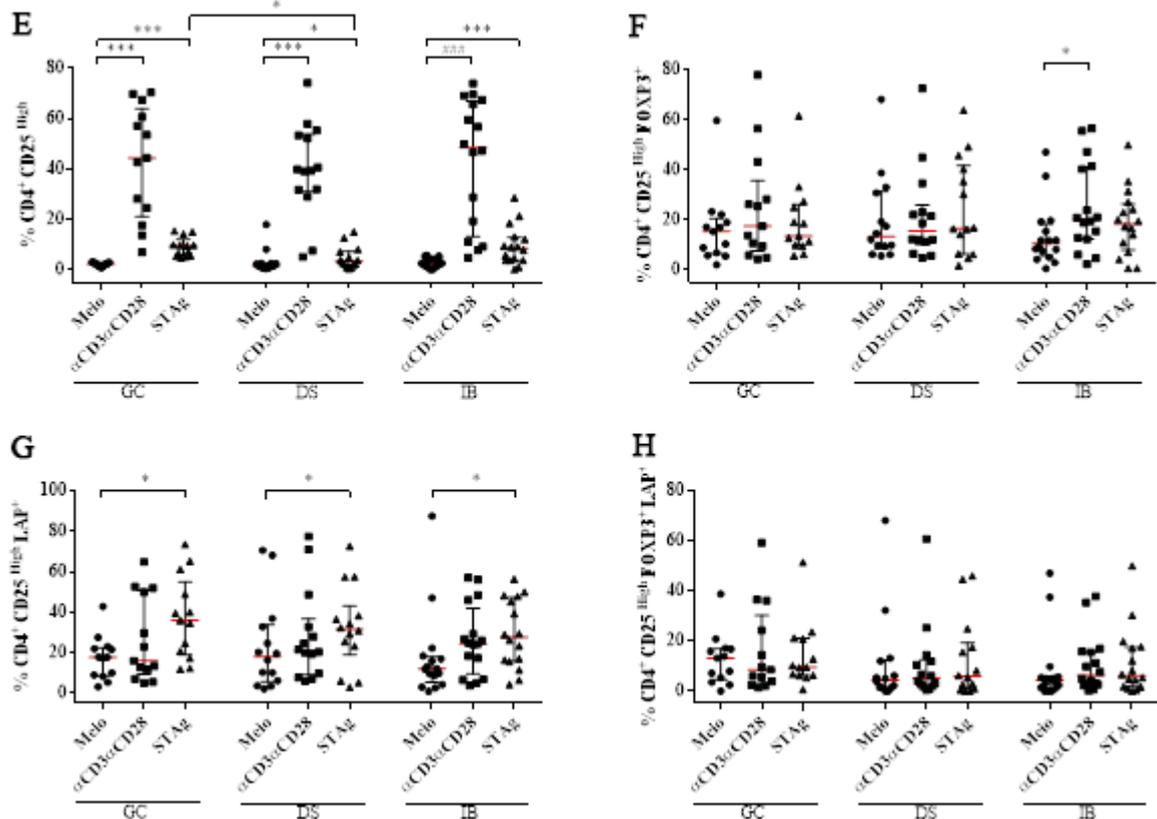
## 6.5 ANÁLISE DE POPULAÇÕES T CD4<sup>+</sup> REGULATÓRIAS

O perfil de linfócitos T regulatórios também foi analisado e para tanto, as células T CD4<sup>+</sup> foram avaliadas quanto a presença da subunidade alfa do receptor de interleucina-2 ou CD25, do fator de transcrição Foxp3 e do peptídeo associado à latência – *latency-associated peptide* (LAP). Durante a análise da citometria, as células foram separadas em CD25<sup>High</sup>, CD25<sup>Low</sup> e CD25 negativas, sendo consideradas como Tregs clássicas aquelas marcadas como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

Foi observado um aumento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> nos estímulos:  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 em relação às células sem nenhum estímulo nos três grupos ( $p = 0,0002$  no GC,  $p = 0,0001$  no DS e  $p < 0,0001$  no IB), assim como no STAg também quando comparado ao meio nos grupos GC, DS e IB ( $p = 0,0002$ ,  $p = 0,0494$  e  $p = 0,0004$ , respectivamente). Quando analisada a diferença entre grupos, o percentual dessas células mostrou-se diminuído após estimuladas com STAg no grupo DS quando comparado ao GC ( $p = 0,0177$ ); contudo não houve diferenças no IB (**figura 7E**).

Células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup> demonstraram um aumento em seu percentual no estímulo com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 em relação ao meio apenas no IB ( $p = 0,0335$ ) e não apresentou alterações significativas na análise entre grupos (**figura 7F**). Por sua vez, células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>LAP<sup>+</sup> apresentaram aumento em seu percentual quando estimuladas com STAg em comparação àquelas sem estímulo nenhum em todos os grupos:  $p = 0,0105$  no GC,  $p = 0,0419$  no DS e  $p = 0,0060$  no IB e também não apresentaram ganho ou perda em nenhum estímulo quando comparados entre os grupos (**figura 7G**). Contudo, as células T regulatórias expressando Foxp3<sup>+</sup> e LAP<sup>+</sup> não demonstraram diferenças significativas entre os estímulos dos grupos, apenas uma tendência ao aumento no STAg quando comparado ao meio no grupo IB (0,0730), e nenhuma diferença na análise entre os grupos (**figura 7H**).





**Figura 7 - Perfil de linfócitos T CD4<sup>+</sup> regulatórios, avaliados pela expressão da cadeia alpha do receptor de IL-2 (CD25), LAP e do fator de transcrição Foxp3.** (A) Seleção da população de linfócitos totais, (B) seleção das populações de células T CD4<sup>+</sup>, dentre as populações de linfócitos totais, (C) seleção das células CD25<sup>-</sup>, CD25<sup>Low</sup> e CD25<sup>High</sup>, dentre as populações de células CD4<sup>+</sup>, (D) seleção das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>, expressando FOXP3 (Q1 + Q2), LAP (Q2 + Q3) e duplamente marcadas com FOXP3 e LAP (Q2), (E) percentual de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> totais, (F) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> Foxp3<sup>+</sup> (G) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> LAP<sup>+</sup> e (H) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> após 96h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, STAg e ausência de estímulo nos grupos GC, DS e IB, por citometria de fluxo. Os números apresentados dentro dos gráficos (A-D) demonstram o percentual de células presentes em cada seleção descrita. Análise entre estímulos por Wilcoxon e entre grupos por Kruskal-Wallis. As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartis. Dados estatisticamente significantes, \*p < 0,05; \*\*p < 0,005, \*\*\*p < 0,0005 e ####p < 0,0001.

## 1 6.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR PBMCs DE PACIENTES COM 2 DA EM SOBRENADANTE DE CULTURA

3

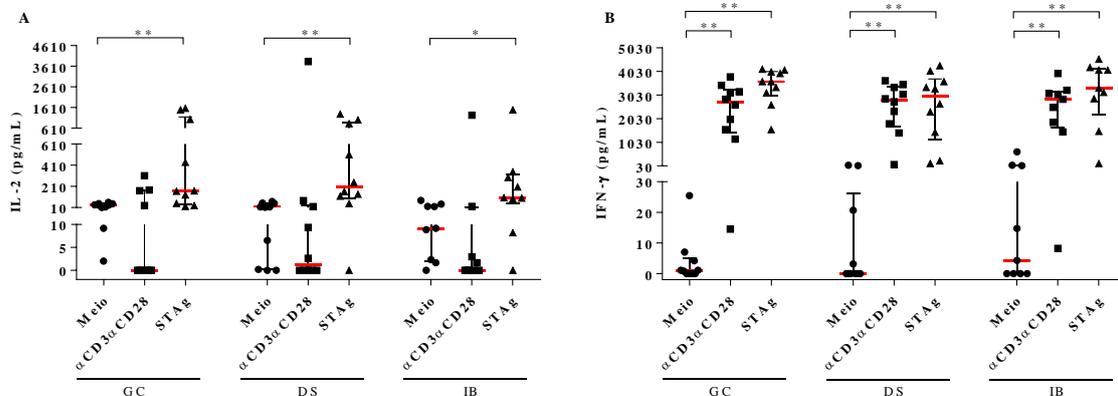
4 O sobrenadante foi analisado para verificar a presença das citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6,  
5 TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17 após 96 horas de cultura de células. Na análise da produção de IL-  
6 2 observou-se um aumento dessa citocina no STAg quando comparado à ausência de estímulo  
7 nos três grupos, sendo p = 0,0039 no GC e no DS e p = 0,0195 no IB (**figura 8A**). A próxima  
8 citocina analisada foi o IFN- $\gamma$ , que demonstrou aumento significativo em sua produção no  
9  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 e no STAg em relação ao meio em todos os grupos (p = 0,0020 no GC e DS e p  
10 = 0,0039 no IB, para ambos os estímulos), conforme mostra a **figura 8B**.

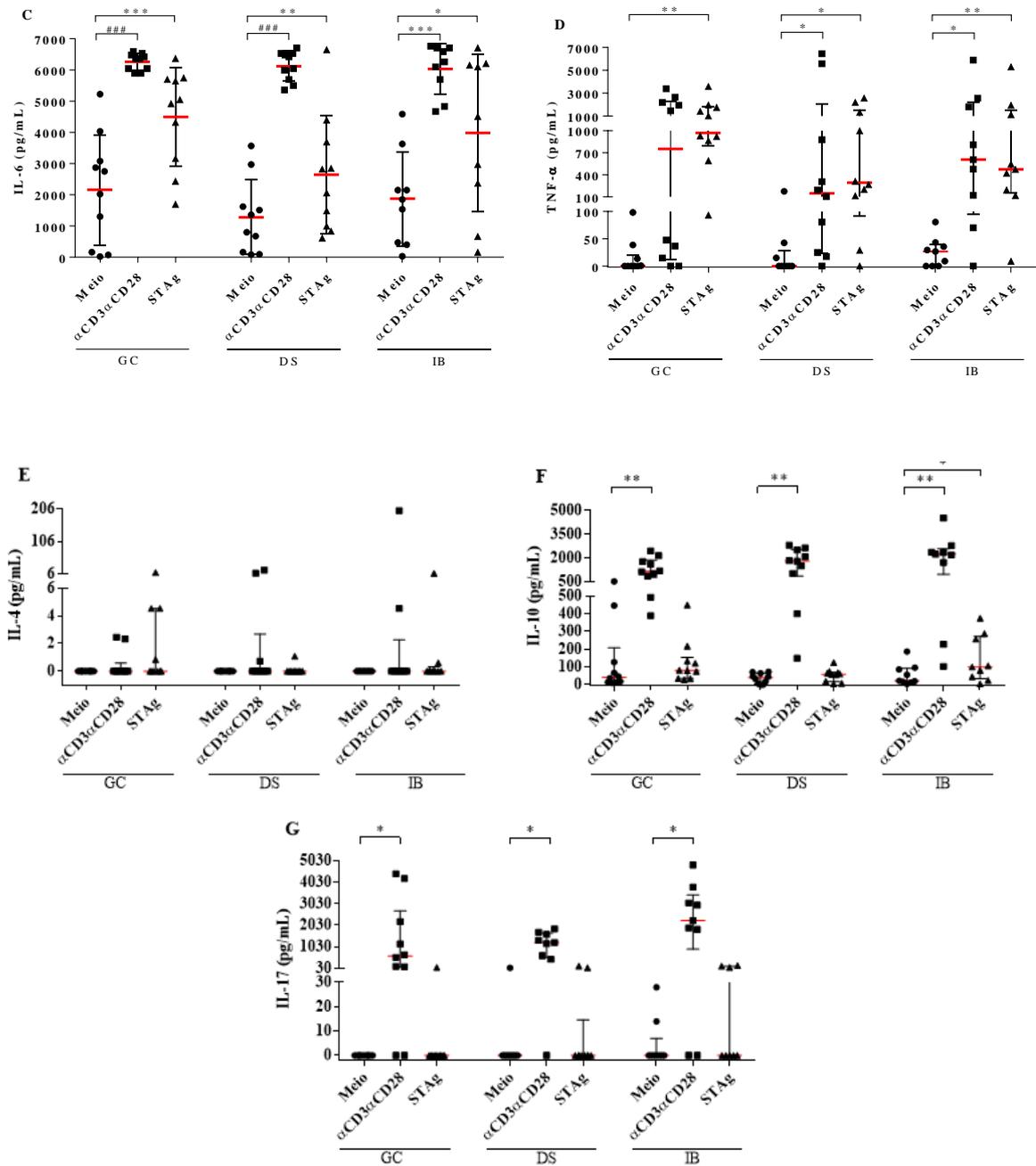
Assim como no IFN- $\gamma$ , a IL-6 demonstrou aumento de sua produção nos dois estímulos, quando comparados à sua produção nas células não estimuladas, em todos os grupos. As diferenças significativas para o  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 foram  $p < 0,0001$  para o GC e DS e  $p = 0,0001$  para o IB; enquanto para o STAg foram  $p = 0,0004$ ,  $p = 0,0043$  e  $p = 0,0261$  para o GC, DS e IB, respectivamente (**figura 8C**). O TNF- $\alpha$ , por sua vez, obteve aumento de sua produção após estímulo das células com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 em relação ao meio nos grupos DS e IB ( $p = 0,0078$  para ambos) e uma tendência ao aumento de sua produção no GC ( $p = 0,0742$ ). O estímulo com STAg também resultou no aumento dessa citocina nos três grupos, sendo  $p = 0,0020$  no GC,  $p = 0,0078$  no DS e  $p = 0,0039$  no IB (**figura 8D**).

A análise da IL-4 não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os estímulos quando comparados com as células não estimuladas em nenhum dos grupos (**figura 8E**). Já a IL-10 mostrou aumento significativo de sua produção após estímulo com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 quando comparado à ausência de estímulos nos três grupos: GC e DS ( $p = 0,0020$ ) e IB ( $p = 0,0039$ ). Contudo apenas o IB demonstrou aumento de produção dessa citocina no STAg em comparação ao meio ( $p = 0,0078$ ) (**figura 8F**).

Por fim, a IL-17 mostrou-se aumentada apenas no  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 quando comparado ao meio, de forma estatisticamente significativa nos três grupos ( $p = 0,0078$  no GC e DS e  $p = 0,0156$  no IB), conforme mostra a **figura 8G**.

A análise da produção de citocinas em um mesmo estímulo entre os grupos de estudo também foi realizada, porém não foram demonstrados aumento ou diminuição de nenhuma das citocinas pesquisadas (**figura 8A-G**).





**Figura 8 - Produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células.** Níveis das citocinas (A) IL-2, (B) IFN- $\gamma$ , (C) IL-6, (D) TNF- $\alpha$ , (E) IL-4, (F) IL-10 e (G) IL-17, expressos em pg/mL, quantificados após 96h de estímulo com anti-CD3 e anti-CD28, STAg e ausência de estímulo nos grupos GC, DS e IB, por CBA. Análise entre estímulos por Wilcoxon (exceto em C, Paired T test) e entre grupos por Kruskal-Wallis (exceto em C, Ordinary one-way ANOVA). As barras horizontais representam as medianas com intervalos de interquartis ou média com desvio padrão. Dados estatisticamente significantes, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$  e ### $p < 0,0001$ .

---

## 7. DISCUSSÃO

Uma resposta apropriada contra *Toxoplasma gondii* depende da ação de citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que são predominantemente do perfil Th1, além de outras citocinas pró-inflamatórias (GAZZINELLI et al., 1994). Por sua vez, o controle das doenças autoimunes requer exatamente a redução da ação excessiva de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos acometidos por essas patologias. Nesse contexto, os bloqueadores de TNF são considerados um grande avanço no combate às doenças autoimunes, contribuindo para seu controle e proporcionando uma boa qualidade de vida para os pacientes na maioria dos casos (MOTA et al., 2012). Contudo, existem alguns casos em que a medicação pode não funcionar como esperado (falha terapêutica) (LIMA et al., 2015), ou ainda funcionar, mas causar uma imunossupressão que predispõe o indivíduo a doenças oportunistas (PULIVARTHI et al., 2015).

Anteriormente em nosso laboratório, foi mostrado que o uso de Infliximabe, um bloqueador de TNF- $\alpha$ , em modelo de granuloma *in vitro* utilizando PBMCs de pacientes com PPD positivo, tuberculose ativa ou tratados, foi capaz de promover uma modulação negativa dos perfis Treg, Th1 e Th2, avaliado através da observação da diminuição da produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12p40, IL-10 e IL-17 (SILVA et al., 2018). Dessa forma, dada a importância de um equilíbrio nas respostas imunes dos indivíduos para que não haja nem lesão tecidual, nem acometimento por doenças oportunistas, esse estudo procurou verificar se, assim como já foi mostrado na tuberculose, o uso desses medicamentos imunossupressores em pacientes portadores de doenças autoimunes traz algum prejuízo em sua capacidade de responder contra *Toxoplasma gondii*.

Existem relatos de indivíduos que podem desenvolver sintomas neurológicos ou oculares (HOSSEININEJAD et al., 2018; PULIVARTHI et al., 2015), contudo esse é o primeiro estudo, até onde sabemos, que tentou estabelecer quais alterações imunológicas estão relacionadas com uma possível reativação. Por essa razão, aqui tentamos avaliar alguns parâmetros de expressão celular e produção de citocinas *in vitro* após um estímulo inespecífico e um estímulo com antígenos solúveis totais de *Toxoplasma gondii*.

Em nosso estudo encontramos que células CD4<sup>+</sup> expressando o marcador de exaustão PD-1 estavam aumentadas em pacientes em uso de drogas sintéticas e biológicas quando comparados à indivíduos saudáveis; contudo essa exaustão foi observada apenas na ausência de estímulos. Já foi demonstrado que o aumento de PD-1 ocorre em resposta à exaustão em linfócitos T (BARBER et al., 2006; KEIR et al., 2008). Por essa razão, o PD-1 está envolvido

1 também em mecanismos de autoimunidade e tolerância periférica e há estudos inclusive  
2 associando-o ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas para amenizar os efeitos de  
3 algumas doenças autoimunes (KEIR et al., 2008). Essa alteração que encontramos confirma  
4 sua relação de aumento de expressão em doenças autoimunes, conforme já foi descrito na  
5 literatura (KEIR et al., 2008), uma vez que as células desses pacientes podem demonstrar  
6 sinais de exaustão devido a estarem constantemente ativadas. Outra explicação para o  
7 aumento de sua expressão pode ser devido à tentativa de diminuição da ativação de células T,  
8 de modo a torná-las menos reativas, diminuindo os efeitos inflamatórios observados em  
9 doenças autoimunes (YOKOSUKA et al., 2012).

10 Existem também evidências de que a infecção crônica por *Toxoplasma gondii* pode  
11 promover a exaustão celular e aumento de expressão de PD-1 principalmente na presença de  
12 bradizoítos, mostrados em camundongos (BHADRA et al., 2011; BHADRA; GIGLEY;  
13 KHAN, 2012; XIAO et al., 2018). De fato, quando analisamos as células estimuladas com  
14 STAg em relação às não estimuladas, podemos observar que há um aumento de exaustão de  
15 CD4<sup>+</sup> nos 3 grupos e de CD8<sup>+</sup> no GC e DS, apesar de essa alteração também ter ocorrido após  
16 exposição ao mitógeno nos 3 grupos para ambas as populações celulares.

17 Um estudo mostrou que células CD8<sup>+</sup> específicas para o vírus da coriomeningite  
18 linfocitária demonstraram aumento de expressão desse receptor acompanhado de proliferação  
19 prejudicada e diminuição em produção de citocinas em células efectoras. Um dos seus ligantes,  
20 o PD-L1 também estava aumentado em esplenócitos de camundongos infectados e o bloqueio  
21 de PD-L1 com anticorpos foi capaz de aumentar novamente as respostas nessas células,  
22 inclusive aumentando produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e diminuindo a carga viral em  
23 órgãos desses animais, mesmo na ausência de linfócitos CD4<sup>+</sup>. O anti-PD-L1 permitiu  
24 também um aumento de proliferação dessa população, por não permitir comunicação do PD-1  
25 com seu ligante, uma vez que ele ainda permanece expresso na superfície celular. O bloqueio  
26 do próprio PD-1 é capaz de melhorar novamente a exaustão em CD8<sup>+</sup>, embora em menor  
27 proporção (BARBER et al., 2006). Na toxoplasmose, foi demonstrado que a expressão de PD-  
28 1 em células T CD8<sup>+</sup> está relacionada com aumento de apoptose e diminuição da proliferação  
29 (BHADRA et al., 2011). Além disso, camundongos infectados com *T. gondii* e em fase  
30 crônica que apresentavam anticorpos contra MAG1 – que é um antígeno presente no cisto  
31 contendo bradizoítos – expressaram níveis mais altos de PD-1 e seus dois ligantes, PD-L1 e  
32 PD-L2 e foi visto que quanto maior a quantidade de cistos, maior os níveis de anticorpos e  
33 maior foi a expressão dessas moléculas. Porém, uma vez tratados com anti-PD-L1 houve  
34 diminuição do número de cistos cerebrais contendo bradizoítos e diminuição da expressão da

1 proteína BAG1, também presente em bradizoítos. Outro ponto positivo foi que esse bloqueio  
2 promoveu um aumento de citocinas como IL-12p70 e IL-10, que foram correlacionadas com a  
3 diminuição dos cistos (XIAO et al., 2018).

4 Aqui observamos que não houve nenhum aumento na expressão de PD-1 nos grupos  
5 DS e IB em comparação ao GC em CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> após os estímulos com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 e  
6 STAg, sugerindo que ainda podem ter capacidade de resposta quando estimuladas, embora  
7 estejam previamente exaustas devido aos efeitos inflamatórios da doença autoimune. Outro  
8 fator a se considerar é que embora a via de PD-1 e PD-L1 possa prejudicar uma resposta  
9 adequada, há um mecanismo de proteção envolvido que tenta evitar que as células fiquem  
10 permanentemente ativadas, já que camundongos knockout para PD-1 são capazes de  
11 responder contra uma infecção viral aguda de coriomeningite linfocitária normalmente; porém  
12 quando infectados com a linhagem de infecção viral crônica, morrem devido a danos celulares  
13 (BARBER et al., 2006). No caso dos indivíduos estudados em DS e IB há que se pensar em  
14 um equilíbrio, uma vez que há a necessidade de certa regulação negativa, mas não tão  
15 exacerbada a ponto de interferir em uma resposta antiviral ou antiparasitária. Nesse contexto é  
16 interessante notar que o uso de bloqueadores de TNF- $\alpha$  como tratamento aparentemente não  
17 interfere negativamente nesse aspecto.

18 Além disso, células CD4<sup>+</sup> com expressão simultânea de CD28 e PD-1 estavam  
19 aumentadas na ausência de estímulos no DS, confirmando mais uma vez que a presença de  
20 PD-1 não inibiu completamente a presença de CD28 e uma possível ativação via CD28-B7.  
21 Isso pode ocorrer porque embora o PD-1 possa interferir na ativação de PCK- $\Theta$  mediada por  
22 CD28 e diminuir a ativação de células T, ao contrário do CTLA-4, ele não exclui a presença  
23 dessa molécula, não está posicionado em uma localização semelhante e portanto não compete  
24 com CD28 (YOKOSUKA et al., 2012). Dessa forma é possível que uma célula expresse  
25 ambas as moléculas mesmo que o PD-1 indiretamente prejudique a função adequada de  
26 CD28.

27 Quando se trata de Tregs, sabemos que a citocina TNF- $\alpha$  é capaz de comprometer a  
28 função adequada dessa população na artrite reumatoide, e um dos mecanismos é através da  
29 redução da fosforilação do fator de transcrição FoxP3, de modo que o tratamento com anti-  
30 TNF contribui para reestabelecer a função dessas células, revertendo esse efeito e ainda  
31 reduzindo a ação de IFN- $\gamma$  e IL-17 e promovendo um equilíbrio entre os perfis celulares (NIE  
32 et al., 2013).

33 Devido ao uso de bloqueadores de TNF que, apesar de ser uma das principais citocinas  
34 causadoras de inflamação em doenças autoimunes é também uma das responsáveis pela

1 manutenção da resposta anti-*T. gondii*, pensamos que pudesse haver uma redução no  
2 percentual de células expressando IFN- $\gamma$  e aumento de células do perfil T regulatório, contudo  
3 isso não ocorreu. Ao contrário, não só as células expressando IFN- $\gamma$  foram capazes de  
4 apresentar percentuais semelhantes nos grupos de estudo e no GC como houve uma  
5 diminuição da população CD4CD25<sup>High</sup> em pacientes em uso de drogas sintéticas, após  
6 estímulo com STAg, quando comparadas às células de indivíduos do grupo controle,  
7 sugerindo que pode haver a capacidade de desenvolvimento de uma resposta Th1 apropriada  
8 nesses pacientes frente à uma possível infecção pelo parasito. Contudo, quando o fator de  
9 transcrição FoxP3 e o LAP foram analisados nessa população, não houve diferenças  
10 significativas, de modo que não há como afirmar que todas essas células eram de fato  
11 pertencentes ao perfil regulatório.

12         Contrário aos nossos resultados, Yang e colaboradores (2020) encontraram que o  
13 percentual de células T regulatórias era menor em pacientes com espondilite anquilosante do  
14 que no grupo controle; porém após 12 semanas de tratamento com an bainuo, que é um  
15 receptor de TNF- $\alpha$  recombinante (etanercept biosimilar), verificaram que a medicação  
16 promoveu aumento do número dessas células (YANG et al., 2020). Isso também foi mostrado  
17 em modelo murinho de artrite em que o bloqueio de TNF foi acompanhado de aumento nessa  
18 população (BITON et al., 2011). O fato de termos encontrado uma diminuição ao invés de  
19 aumento de Tregs pode sugerir que os efeitos dos anti-TNF avaliados não se sobressaíram a  
20 uma resposta adequada aos estímulos. Durante a infecção por *T. gondii* há uma grande  
21 produção de IFN- $\gamma$ , expressão de T-bet e aumento de células do perfil Th1 e, com isso, ocorre  
22 a redução de Tregs Foxp3<sup>+</sup>, que deve ser equilibrada para que os efeitos inflamatórios  
23 causados pela defesa contra o parasito não aumentem a patogênese da doença (OLDENHOVE  
24 et al., 2009). Outra explicação para essa redução de Tregs seria que por algum motivo esses  
25 pacientes não apresentaram os efeitos máximos dos imunobiológicos, já que mesmo na  
26 ausência de estímulo as Tregs estavam diminuídas. Todavia, vale ressaltar que essa alteração  
27 nas células T regulatórias pode ou não ocorrer dependendo de como a doença evolui nesses  
28 indivíduos e até mesmo do tipo de bloqueador de TNF utilizado para o tratamento. Pacientes  
29 em uso de adalimumabe, por exemplo, podem apresentar aumento de Tregs, mas se a  
30 atividade da doença persiste apesar dos imunobiológicos, o aumento dessas células não é  
31 detectado (MCGOVERN et al., 2012). Além disso, existe variação na resposta imune de  
32 acordo com o tipo de bloqueador de TNF utilizado, já que esse aumento de Tregs devido ao  
33 uso de adalimumabe não ocorre no tratamento com etanercepte (MCGOVERN et al., 2012).

1 Por fim, quando avaliamos expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10, através de  
2 citometria de fluxo, vimos que a estimulação com STAg e com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 não aumentou,  
3 nem diminuiu a capacidade de expressão de citocinas em nenhum dos grupos, o que indica  
4 que o uso de medicação imunomoduladora, seja sintética ou biológica, ainda permite que a  
5 resposta seja semelhante àquela observada em indivíduos sem doença autoimune, tais como  
6 os que compuseram o GC. Em concordância com isso, uma análise de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>  
7 do sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide, colocadas em cultura e estimuladas  
8 com PMA e ionomicina ou com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 na presença de brefeldina A, verificou a  
9 expressão de citocinas de perfil Th1 e Th2, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 nessas  
10 células e concluiu que as porcentagens de expressão dessas citocinas foram muito  
11 semelhantes nos pacientes com AR quando comparados aos controles sem nenhum tipo de  
12 doença autoimune (BERNER et al., 2000). Assim como avaliamos possíveis diferenças entre  
13 as citocinas em pacientes em uso de imunobiológicos (IB), drogas sintéticas também  
14 imunossupressoras (DS) e GC, eles também avaliaram essas possíveis diferenças entre  
15 pacientes recebendo imunossupressores quando comparados àqueles que recebiam apenas  
16 antiinflamatórios não esteroidais e também não viram diferenças significativas na expressão  
17 de citocinas (BERNER et al., 2000).

18 Com relação à análises de citocinas no sobrenadante de cultura, um estudo analisou a  
19 produção da citocina IFN- $\gamma$  em resposta ao estímulo com o mitógeno Fitohemaglutinina  
20 (*Phytohemagglutinin* – PHA) em pacientes com doenças inflamatórias imuno-mediadas  
21 reumatológicas (*rheumatologic immune-mediated inflammatory diseases* – IMID) durante 1 a  
22 8 anos de uso prolongado de bloqueadores de TNF- $\alpha$ , e viram que ao longo desses anos  
23 houveram oscilações na produção de IFN- $\gamma$ , com os menores níveis na primeira dosagem e  
24 após 4 anos de uso, enquanto as dosagens após 1, 2 e 8 anos foram até maiores do que a  
25 inicial; e que não houveram diferenças entre a produção dessa citocina nos dois bloqueadores  
26 de TNF avaliados, Etanercept e Adalimumab e nem entre as duas doenças, artrite reumatoide  
27 e psoriática. Interessante também observar que, após 8 anos de uso desses imunobiológicos,  
28 não foram encontradas diferenças estatísticas na produção de IFN- $\gamma$  nesses indivíduos quando  
29 foram comparados com doadores saudáveis (SAUZULLO et al., 2018), assim como  
30 aconteceu em nosso estudo, que também não encontrou diferenças na produção de nenhuma  
31 das citocinas analisadas, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-17, no sobrenadante em  
32 IB e DS quando comparadas com GC, nem no estímulo com o mitógeno, nem no estímulo  
33 com antígeno de *T. gondii*.

1            Outro estudo avaliou os efeitos de um anti-TNF após 7 dias da aplicação da medicação  
2 e, ao contrário dos nossos resultados, os pesquisadores encontraram que a produção de TNF  
3 após estímulo com  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 foi menor em pacientes sem tratamento, em tratamento com  
4 metotrexato e com anti-TNF em relação ao grupo controle e a produção de IL-10 e IL-6 foi  
5 menor em pacientes tratados com metotrexato ou drogas biológicas. Encontraram ainda que  
6 células CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> estavam diminuídas em indivíduos com MTX e IB após estímulo com  
7  $\alpha$ CD3 $\alpha$ CD28 (FURIATI et al., 2019), enquanto nosso estudo não mostrou alterações na  
8 população CD4<sup>+</sup>, apenas em CD8<sup>+</sup>. Contudo, assim como observado em nosso estudo, Furiati  
9 e colaboradores (2019) também não observaram diferenças na produção de IFN- $\gamma$  e IL-17  
10 quando comparados os grupos controle, pacientes com psoríase sem tratamento e pacientes  
11 com psoríase em tratamento com DMARDs sintéticas ou biológicas (FURIATI et al., 2019).

12            Esses achados de expressão celular de citocinas e produção de citocinas demonstrando  
13 níveis semelhantes entre indivíduos em uso de drogas imunossupressoras e o grupo controle,  
14 embora preliminares, são surpreendentemente animadores, uma vez que podemos sugerir,  
15 pelo menos inicialmente, que o risco de reativação de toxoplasmose não é tão aumentado  
16 quanto o observado para reativação de tuberculose, por exemplo. De fato, só as alterações  
17 causadas pela doença autoimune são suficientes para aumentar o risco de infecções nesses  
18 pacientes em pelo menos duas vezes, incluindo tuberculose (DORAN et al., 2002a). Quando o  
19 tratamento é feito com imunobiológicos esse risco aumenta ainda mais, já tendo sido  
20 mostrado inclusive que, dependendo do tipo de bloqueador utilizado, pode chegar a cerca de  
21 30 vezes como mostrou Seong e colaboradores (2007) com relação ao uso de infliximabe  
22 (SEONG et al., 2007).

23            No entanto, há poucos estudos relacionando uso de terapias biológicas com o risco de  
24 reativação de toxoplasmose e, até onde sabemos, não há outros estudos mostrando detalhes  
25 das respostas imunes desses indivíduos frente a estímulos com antígenos de *T. gondii*, de  
26 modo que não seríamos capazes de estabelecer, com os resultados aqui observados, qual o  
27 grau de imunossupressão seria necessário para uma possível reativação. Contudo, sabe-se que  
28 em indivíduos com AIDS, que possuem uma imunodepressão bem mais acentuada que a  
29 imunossupressão causada pelas DMARDs utilizadas por pacientes com DA, o risco de  
30 acometimentos neurológicos desencadeados por reativação de tuberculose é bem maior que o  
31 risco de acometimentos causados por neurotoxoplasmose; de modo que observa-se que  
32 enquanto uma meningite tuberculosa é associada a níveis de CD4<sup>+</sup> abaixo de 400/mm<sup>3</sup>, para  
33 toxoplasmose seria apenas abaixo de 200/mm<sup>3</sup> (BOWEN et al., 2016). Seguindo essa linha de  
34 raciocínio, é possível entender porque embora existam relatos de manifestações neurológicas

1 e oculares em pacientes em uso de anti-TNF e demais imunobiológicos, ainda não há um  
2 monitoramento ou rastreio de toxoplasmose durante o tratamento, já que a princípio parece  
3 que outros fatores podem estar envolvidos nesse desequilíbrio na imunidade que causa a  
4 reativação em alguns desses pacientes.

---

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Num primeiro momento, acreditava-se que o bloqueio dessa citocina poderia predispor a um aumento no risco de reativação de toxoplasmose naqueles pacientes que já tiveram contato com o parasito, visto que existem vários relatos de casos de indivíduos em uso de imunobiológicos ou mesmo drogas imunossupressoras do tipo sintéticas que eventualmente apresentam sintomas de neurotoxoplasmose associado ou não a coriorretinite. Contudo, a avaliação dessa imunomodulação parece ser mais complicada do que inicialmente pensou-se.

Saliu e colaboradores (2006) mostraram que existem diferentes respostas frente aos diferentes tipos de bloqueadores de TNF; em cultura de células de indivíduos saudáveis estimulados com antígenos de *M. tuberculosis* ou PHA incubadas com bloqueadores de TNF foi demonstrado que tanto o adalimumab quanto o infliximabe foram capazes de inibir a ativação precoce de células T, avaliadas pela expressão de CD69<sup>+</sup>, enquanto o etanercept não foi capaz de fazer o mesmo. Além disso, foi observado que o bloqueio do TNF com infliximabe e adalimumabe podem suprimir a produção de IFN- $\gamma$ , enquanto novamente o etanercept não apresentou diferenças em relação a células não bloqueadas (SALIU et al., 2006). Além disso, é necessário considerar que a resposta imune pode variar mesmo em indivíduos sem doenças autoimunes. Nesse contexto, a doença autoimune entra como mais um fator de confusão, já que mesmo quando se avalia o uso de apenas um tipo de imunobiológico deve-se ter em mente que essa medicação é utilizada para várias doenças autoimunes, com diferentes fisiopatogênias. Há ainda a questão de outras comorbidades associadas que podem interferir na avaliação (embora tenhamos tentado ao máximo reduzir esse viés). E por fim, há de se considerar que se faz necessário uma avaliação com um painel de marcação celular mais amplo e um n maior.

Embora esse seja o primeiro estudo de avaliação de resposta celular realizado buscando uma associação entre imunomodulares para tratamento de doenças autoimunes e o risco de reativação de toxoplasmose, destacamos aqui que a imunossupressão causada pelos imunomoduladores biológico e até mesmo sintéticos, sozinha, aparentemente não é suficiente para desencadear uma reativação de toxoplasmose. Como perspectivas esperamos que mais estudos acerca do tema sejam realizados para esclarecer porque essa manifestação de toxoplasmose ocorre em alguns indivíduos e quais são os principais fatores preditores.

## 1 **9. CONCLUSÃO**

2

3 Com base nos resultados obtidos nesse estudo, acredita-se que o uso de  
4 imunomoduladores, isoladamente, não é suficiente para prejudicar a resposta imune frente à  
5 infecção por *Toxoplasma gondii* em indivíduos cronicamente infectados e causar reativação  
6 de toxoplasmose devido à baixa imunidade e que os casos descritos na literatura podem ter  
7 outros mecanismos de imunossupressão associados ao uso desses medicamentos.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9ª edição ed. [s.l.] Editora Elsevier Ltda, 2019.
- ABITBOL, Y. et al. us c rip t ce p te d us c te d Ac ce p. n. 10, p. 1–25, 2016.
- ALIBERTI, J. et al. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. **Nature Immunology**, v. 1, n. 1, p. 83–87, 2000.
- AMATO, N. V; MARCHI, C. R. Toxoplasmose. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. (Eds.). . **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. [s.l.] Atheneu, 2002. p. 160–77.
- ANDRADE, W. A. et al. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Cell host & microbe**, v. 13, n. 1, p. 42–53, 16 jan. 2013.
- AVELAR, J. B. et al. Epidemiological factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in postpartum women treated in the public healthcare system of Goiânia, state of Goiás, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 1, p. 57–62, 2018.
- BAHA, A. et al. A case of sarcoidosis associated with anti – Tumor necrosis factor treatment. **Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports**, v. 2015, p. 1–5, 2015.
- BARBER, D. L. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, v. 439, n. 7077, p. 682–687, 2006.
- BERNER, B. et al. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in rlaeumatoid arthritis by flow cytometry. **Journal of Rheumatology**, v. 27, n. 5, p. 1128–1135, 2000.
- BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T H 17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–38, 2006.
- BHADRA, R. et al. 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.
- BHADRA, R.; GIGLEY, J. P.; KHAN, I. A. PD-1-Mediated Attrition of Polyfunctional Memory CD8 + T Cells in Chronic Toxoplasma Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 1, p. 125–34, 2012.
- BITON, J. et al. Interplay between TNF and Regulatory T Cells in a TNF-Driven Murine Model of Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 186, p. 3899–3910, 2011.
- BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Induction of Bradyzoite-Specific *Toxoplasma gondii* Antigens in Gamma Interferon-Treated Mouse Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 3, p. 1141–1145, 1993.
- BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Reduced Replication of *Toxoplasma gondii* Is Necessary for Induction of Bradyzoite-Specific Antigens: a Possible Role for Nitric Oxide in Triggering Stage Conversion. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1761–1767, 1994.
- BOWEN, L. N. et al. HIV-associated opportunistic CNS infections: Pathophysiology, diagnosis and treatment. **Nature Reviews Neurology**, v. 12, n. 11, p. 662–674, 2016.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248–254, 1976.
- CAMARGO, M. E. et al. 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. 213–18, 1991.

CASTELLANO, L. R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production. **Human Immunology**, v. 70, n. 6, p. 383–90, 2009.

CHARLES, P. J. et al. Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor  $\alpha$ : Findings in open-label and randomized placebo-controlled trials. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 11, p. 2383–2390, 2000.

CHEN, Y. et al. Regulatory T Cell Clones Induced by Oral Tolerance : Suppression of Autoimmune Encephalomyelitis. **Science**, v. 265, n. 5176, p. 1237–40, 1994.

CHERWINSKI, B. Y. H. M.; SCHUMACHER, J. H.; BROWN, K. D. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further Differences in Lymphokine Synthesis between Th 1 and Th2 Clones Revealed by RNA Hybridization , Functionally Monospecific Bioassays , and Monoclonal Antibodies The diversity of lymphocytes was first ide. **The Journal of experimental medicine**, v. 166, n. 5, p. 1229–44, 1987.

CHOY EH, P. G. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* 344: 907-916. v. 344, n. 12, p. 907–916, 2001.

COLLISON, L. W. et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 566–69, 2007.

COOPER, G. S.; BYNUM, M. L. K.; SOMERS, E. C. Recent Insights in the Epidemiology of Autoimmune Diseases: Improved Prevalence Estimates and Understanding of Clustering of Diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 33, n. 3–4, p. 197–207, 2009.

DE MEDEIROS, B. C. et al. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: Report of 9 cases. **Transplant Infectious Disease**, v. 3, n. 1, p. 24–8, 2001.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. et al. Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1129–37, 15 jul. 2007.

DEL BONO, V. et al. Significance of Specific Immunoglobulin M in the Chronological Diagnosis of 38 Cases of Toxoplasmic Lymphadenopathy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 9, p. 2133–2135, 1989.

DEROUIN, F.; PELLOUX, H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 12, p. 1089–1101, 1 dez. 2008.

DORAN, M. F. et al. Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: A population-based study. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 9, p. 2287–2293, 2002a.

DORAN, M. F. et al. Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: A population-based study. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 9, p. 2287–2293, 1 set. 2002b.

DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: Stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592–602, 1997.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1019–24, 1998.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. [s.l.] CRC Press, Inc. Boca Raton, 1988.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 4, p. 337–39, 1987.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats. **The Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155–77, 1972.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and

the development of *Toxoplasma* cysts. **The Journal of protozoology**, v. 23, n. 4, p. 537–46, nov. 1976.

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, n. 2, p. 267–99, 1998.

EATON, W. W. et al. Epidemiology of Autoimmune Diseases in Denmark. **Journal of Autoimmunity**, v. 29, n. 1, p. 1–9, 2007.

ELLIOTT, M. J. et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor  $\alpha$  (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 344, n. 8930, p. 1105–1110, 1994.

FARD, N. A.; AZIZI, G.; MIRSHAFIEY, A. The potential role of T helper cell 22 and IL-22 in immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Innovations in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 7–8, p. 30–36, 2016.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, p. 330–36, 2003.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in Cats: Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893–96, 1970.

FRENKEL, J. K. *Toxoplasma* in and around Us. **BioScience**, v. 23, n. 6, p. 343–52, 1973.

FURIATI, S. C. et al. Th1, Th17, and Treg Responses are Differently Modulated by TNF- $\alpha$  Inhibitors and Methotrexate in Psoriasis Patients. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2019.

FUSS, I. J. et al. The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 2, p. 900–8, 15 jan. 2002.

GAVIN, M. A.; WANKO, T.; JACOBS, L. Electron Microscope Studies of Reproducing and Interkinetic *Toxoplasma*. **The Journal of Protozoology**, v. 9, n. 2, p. 222–234, 1 maio 1962.

GAZZINELLI, R. et al. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 149, n. 1, p. 175–80, 1 jul. 1992.

GAZZINELLI, R. T. et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 153, n. 6, p. 2533–43, 15 set. 1994.

GOLDMAN, M.; CARVER, R. K.; SULZER, A. J. Reproduction of *Toxoplasma gondii* by Internal Budding. **The Journal of Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 161–71, abr. 1958.

GÓMEZ-REINO, J. J.; CARMONA, L.; DESCALZO, M. Á. Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection. **Arthritis Care and Research**, v. 57, n. 5, p. 756–761, 2007.

GREENBERG, J. D. et al. Association of methotrexate and tumour necrosis factor antagonists with risk of infectious outcomes including opportunistic infections in the CORONA registry. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 2, p. 380–386, 2010.

GUMPEL, B. Y. J. M. CYCLOPHOSPHAMIDE, GOLD AND PENICILLAMINE — DISEASE-MODIFYING DRUGS IN RHEUMATOID ARTHRITIS — TAILORED DOSAGE AND ULTIMATE SUCCESS. **Rheumatology and Rehabilitation**, v. 15, p. 217–220, 1976.

GUSTAFSON, P. V.; AGAR, H. D.; CRAMER, D. I. An electron microscope study of *Toxoplasma*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 3, n. 6, p. 1008–22, nov. 1954.

- HEDMAN, K. et al. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 123–129, 1993.
- HOLLIMAN, R. E. et al. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. **Epidemiol. Infect.**, v. 112, p. 399–408, 1994.
- HOSSEININEJAD, Z. et al. Toxoplasmosis seroprevalence in rheumatoid arthritis patients: A systematic review and meta-analysis. 2018.
- HOWE, D. K.; DAVID SIBLEY, L. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1561–66, 1995.
- HSIEH, C. et al. Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T Cells Through IL-1<sub>2</sub> Produced by Listeria-Induced Macrophages. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 547–49, 1993.
- HUSKINSON, J. et al. Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 9, p. 2031–2038, 1989.
- HUTCHISON, W. M. et al. Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5689, p. 142–44, 1970.
- INFANTE-DUARTE, C. et al. Microbial Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 11, p. 6107–15, 2000.
- ISA, F. et al. Implementation of molecular surveillance after a cluster of fatal toxoplasmosis at 2 neighboring transplant centers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 4, p. 565–68, 2016.
- JACOBSON, D. L. et al. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 84, n. 3, p. 223–243, 1997.
- JENKS, K. A. et al. Leflunomide-associated infections in rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 34, n. 11, p. 2201–2203, 2007.
- JOHNSON, L. L.; SAYLES, P. C. Interleukin-12, dendritic cells, and the initiation of host-protective mechanisms against *Toxoplasma gondii*. **The Journal of experimental medicine**, v. 186, n. 11, p. 1799–802, 1 dez. 1997.
- JOHNSON, L. L.; SAYLES, P. C. Deficient Humoral Responses Underlie Susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-Deficient Mice. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 185–91, jan. 2002.
- KAHI, S. et al. A switch towards Th2 during serological rebound in children with congenital toxoplasmosis. **Clinical and experimental immunology**, v. 117, n. 3, p. 524–28, set. 1999.
- KAMISAWA, T. et al. A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 38, n. 10, p. 982–984, 2003.
- KANG, H.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 164, n. 5, p. 2629–34, 1 mar. 2000.
- KAWAZOE, U.; NEVES, D. *Toxoplasma gondii*. In: **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 149–156.
- KEANE, J. et al. Tuberculosis associated with Infliximab, a tumor necrosis factor  $\alpha$ -neutralizing agent. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 15, p. 1098–1104, 2001.
- KEHRL, B. Y. J. H. et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **The Journal of experimental medicine**, v. 163, n. 5, p. 1037–50, 1986.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 677–704, 27 abr. 2008.

KHABAZ, M. N.; ELKHATEEB, L.; AL-ALAMI, J. Reactivation of latent *Toxoplasma gondii* in immunocompromised cancer patients. **Comparative Clinical Pathology**, v. 20, n. 2, p. 183–86, 2011.

KHAN, W. I. et al. Modulation of Intestinal Muscle Contraction by Interleukin-9 ( IL-9 ) or IL-9 Neutralization : Correlation with Worm Expulsion in Murine Nematode Infections. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2430–38, 2003.

KLOSE, C. S. N. et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. **Cell**, v. 157, n. 2, p. 340–356, 2014.

KOETZ, K. et al. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 9203–9208, 2000.

KOSKINIEMI, M. Toxoplasmosis Needs Evaluation. **American Journal of Diseases of Children**, v. 143, n. 6, p. 724–28, 1989.

KREMER, J. M.; LEE, J. K. The safety and efficacy of the use of methotrexate in long-term therapy for rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 29, n. 7, p. 822–831, 1986.

LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 2, p. 233–40, 2005.

LASSOUED, S. et al. Toxoplasmic Chorioretinitis and Antitumor Necrosis Factor Treatment in Rheumatoid Arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 4, p. 262–263, 2007.

LAWRENCE BURG, J. et al. Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1787–92, 1989.

LEAL, F. E. et al. *Toxoplasma gondii* Pneumonia in Immunocompetent Subjects: Case Report and Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 6, p. e62–e66, 15 mar. 2007.

LERNER, A.; JEREMIAS, P.; MATTHIAS, T. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. **International Journal of Celiac Disease, Vol. 3, 2015, Pages 151-155**, v. 3, n. 4, p. 151–155, 16 nov. 2015.

LIMA, R. et al. Perfil do uso de agentes biológicos no tratamento da artrite reumatoide: experiência do Hospital Universitário Walter Cantídio. **Revista de Medicina da UFC**, v. 55, n. 2, p. 15–22, 2015.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1829–31, 9 dez. 2011.

LIU, L. et al. RROP2186-533: A novel Peptide antigen for detection of IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 1, p. 7–12, 1 jan. 2012.

LÜDER, C. G. K.; BOHNE, W.; SOLDATI, D. Toxoplasmosis: A persisting challenge. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 10, p. 460–463, 2001.

LUDVÍK, J. Morphology of *Toxoplasma gondii* in Electron Microscope. **Vestník Československe Zoologicke Spolecnosti**, v. 22, n. 2, p. 130–36, 1958.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 198–201, 2002.

MC AULEY, J. et al. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: The Chicago collaborative treatment trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 38–72, 1994.

MCGOVERN, J. L. et al. Th17 cells are restrained by Treg cells via the inhibition of

interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis responding to anti-tumor necrosis factor antibody therapy. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 10, p. 3129–3138, 1 out. 2012.

MEDZHITOV, R. et al. MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. **Molecular Cell**, v. 2, n. 2, p. 253–58, 1 ago. 1998.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394–97, 1997.

MEIRA, C. DA S. et al. Evolution of cytokine profile during the treatment of cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. **Journal of Immunological Methods**, v. 426, p. 14–8, 2015.

MEIRA, C. S. et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 492, 2014.

MELO, M. B. et al. UNC93B1 Mediates Host Resistance to Infection with *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. 1–15, 26 ago. 2010.

MINEO, J. R. et al. Pesquisa de Anticorpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* por meio de técnica imunoenzimática reversa. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 6–11, 1986.

MONTOYA, J. G. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. s1, p. S73–S82, 15 fev. 2002.

MORDUE, D. G. et al. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 8, p. 4574–84, 15 out. 2001.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 136, n. 7, p. 2348–57, 1 abr. 1986.

MOTA, L. et al. Safe use of biological therapies for the treatment of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 3, p. 281–309, 2015a.

MOTA, L. M. H. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 135–174, 2012.

MOTA, L. M. H. et al. Safe use of biological therapies for the treatment of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 3, p. 281–309, 2015b.

MOTA, L. M. H. et al. 2017 recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. **Advances in Rheumatology**, v. 58, n. 1, p. 1–17, 2018.

MUN, H.-S. et al. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **International Immunology**, v. 15, n. 9, p. 1081–87, 2003.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 269–85, 2011.

NARDONE, R. et al. Cerebral toxoplasmosis following adalimumab treatment in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 53, n. 2, p. 284, 2014.

NICOLAIDES, N. C. et al. Interleukin 9: a candidate gene for asthma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 24, p. 13175–80, 25 nov. 1997.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondii: toxoplasma. **Seances Academy Scientific**, v. 148, p. 369–72, 1909.

NIE, H. et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- $\alpha$  in rheumatoid arthritis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 3, p. 322–328, 2013.

- NISSAPATORN, V. et al. Toxoplasmosis in HIV/AIDS Patients: A Current Situation. **Original Article Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 57, p. 160–65, 2004.
- NUNURA, J. et al. Disseminated toxoplasmosis in an immunocompetent patient from Peruvian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 107–110, abr. 2010.
- OLDENHOVE, G. et al. Decrease of Foxp3 + Treg Cell Number and Acquisition of Effector Cell Phenotype during Lethal Infection. **Immunity**, v. 31, p. 772–786, 2009.
- OSTENSEN, M. Treatment with immunosuppressive and disease modifying drugs during pregnancy and lactation. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 28, n. 3–4, p. 148–152, 1992.
- PALUCKA, A. K. et al. Cross-regulation of TNF and IFN- $\alpha$  in autoimmune diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 9, p. 3372–3377, 2005.
- 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. 1385–94, out. 2009.
- PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133–41, 2005.
- PARK, Y.-H.; HAN, J.-H.; NAM, H.-W. Clinical Features of Ocular Toxoplasmosis in Korean Patients. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 49, n. 2, p. 167–71, 2011.
- PASSOS, L. N.; ARAÚJO FILHO, O. F. DE; ANDRADE JUNIOR, H. F. DE. Toxoplasma Encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 3, p. 141–45, 2000.
- PERGOLA, G.; CASCONI, A.; RUSSO, M. Acute pericarditis and myocarditis by *Toxoplasma gondii* in an immunocompetent young man: A case report. **Infezioni in Medicina**, v. 18, n. 1, p. 48–52, 2010.
- POWRIE, B. F. et al. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 6, p. 2669–74, 1996.
- PULIVARTHI, S. et al. Cerebral Toxoplasmosis in a Patient on Methotrexate and Infliximab for Rheumatoid Arthritis. **Internal Medicine**, v. 54, n. 11, p. 1433–36, 2015.
- RAMOS-CASALS, M. et al. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies: Analysis of 233 cases. **Medicine**, v. 86, n. 4, p. 242–251, 2007.
- RAMOS-CASALS, M. et al. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 5, p. 847–861, 2008.
- REMYINGTON, J. S. et al. Toxoplasmosis. In: ELS SAUN, U. S. A. (Ed.). . **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. [s.l: s.n.]. p. 947–1041.
- RIBEIRO, A. C.; MUTIS, M. S.; FERNANDES, O. Association of the presence of residual anti-*Toxoplasma gondii* IgM in pregnant women and their respective family groups in Miracema, Northwest Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 6, p. 591–594, 2008.
- RIBEIRO, D. P. et al. CpG-ODN 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.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–96, abr. 2012.
- ROSE, N. R.; BONA, C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's

postulates revisited). **Immunology Today**, v. 14, n. 9, p. 426–430, 1993.

SAAG, K. G. et al. Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: An analysis of serious adverse events. **The American Journal of Medicine**, v. 96, n. 2, p. 115–123, 1994.

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (toxoplasma). **Science**, v. 108, n. 2815, p. 660–663, 1948.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 3, p. 1151–64, 1 ago. 1995.

SALIU, O. Y. et al. Tumor-Necrosis-Factor Blockers: Differential Effects on Mycobacterial Immunity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 4, p. 486–492, 15 ago. 2006.

SALLIOT, C.; VAN DER HEIJDE, D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: A systematic literature research. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 7, p. 1100–1104, 2009.

SASAI, M.; YAMAMOTO, M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **Experimental & Molecular Medicine 2019 51:12**, v. 51, n. 12, p. 1–10, 11 dez. 2019.

SAÚDE, M. DA. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA MANEJO DA INFECÇÃO PELO HIV EM ADULTOS**. [s.l.: s.n.].

SAÚDE, M. DA. **Caderneta da Gestante 3ª edição Brasília-DF 2016**. [s.l.: s.n.].

SAUZULLO, I. et al. Changes in T cell effector functions over an 8-year period with TNF antagonists in patients with chronic inflammatory rheumatic diseases. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 1 dez. 2018.

SAYLES, P. C.; GIBSON, G. W.; JOHNSON, L. L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1026–1033, 2000.

SCANGA, C. A. et al. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 12, p. 5997–6001, 15 jun. 2002.

SCOTT, P. et al. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 139, n. 1, p. 221–7, 1 jul. 1987.

SEONG, S. S. et al. Incidence of tuberculosis in Korean patients with Rheumatoid Arthritis (RA): Effects of RA itself and of tumor necrosis factor blockers. **Journal of Rheumatology**, v. 34, n. 4, p. 706–711, abr. 2007.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 2, p. 116–126, 2002.

SHEFFIELD, H. G.; MELTON, M. L. *Toxoplasma gondii*: The Oocyst, Sporozoite and Infection of Cultured Cells. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 892–93, 1970.

SHEFFIELD, H. G.; MELTON, M. L. The Fine Structure and Reproduction of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 54, n. 2, p. 209–26, 1968.

SILVA, D. A. et al. TNF- $\alpha$  blockade impairs in vitro tuberculous granuloma formation and down modulate Th1, Th17 and Treg cytokines. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–13, 2018.

SINGH, J. A. et al. 2012 Update of the 2008 American College of Rheumatology (ACR) Recommendations for the use of Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs and

Biologics in the treatment of Rheumatoid Arthritis (RA). **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 64, n. 5, p. 625–639, 2012a.

SINGH, J. A. et al. 2012 update of the 2008 American college of rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis Care and Research**, v. 64, n. 5, p. 625–639, 2012b.

SMITH, D. A.; GERMOLEC, D. R. Introduction to Immunology and Autoimmunity. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 5, p. 661–65, 1999.

SOETE, M. et al. *Toxoplasma gondii*: Kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 259–264, 1993.

SOUSA, C. R. E et al. In Vivo Microbial Stimulation Induces Rapid CD40 Ligand-independent Production of Interleukin 12 by Dendritic Cells and their Redistribution to T Cell Areas. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 11, p. 1819–29, 1997.

SPLENDORE, A. Um nuovo protozoa parassita de' conigli, incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma, Nota preliminare pel. **Rev Soc Scien Sao Paulo**, v. 3, p. 109–12, 1908.

STRAY-PEDERSEN, B. Toxoplasmosis in pregnancy. **Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 7, n. 1, p. 107–37, 1993.

SUZUKI, Y. et al. Interferon- $\gamma$ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, n. 4851, p. 516–518, 1988.

THIEME, C. et al. The intraocular cytokinome is linked to clinical characteristics in human toxoplasmosis. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 56, n. 7, p. 1893, 2015.

TITTON, D. C. et al. Registro Brasileiro de Biológicos: preliminares do BiobadaBrasil. **Rev Bras Reumatol**, v. 51, n. 2, p. 145–160, 2011.

TOLENTINO, D. S.; DE OLIVEIRA, C. M.; DE ASSIS, E. M. Population-based Study of 24 Autoimmune Diseases Carried Out in a Brazilian Microregion. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, p. 243–251, 2019.

TRACEY, D. et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 244–279, 2008.

VARELLA, I. S. ET AL. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 1, p. 69–74, 2003.

VELDHOEN, M. et al. Transforming growth factor- $\beta$  'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9 – producing subset. **Nature Immunology**, v. 9, n. 12, p. 1341–46, 2008.

VIDAL, J. E. et al. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: Clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. **AIDS Patient Care and STDs**, v. 19, n. 10, p. 626–34, 2005.

WALLIS, R. S. et al. Granulomatous Infectious Diseases Associated with Tumor Necrosis Factor Antagonists. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1261–1265, 2004.

WIELAARD, F. et al. Diagnosis of Acute Toxoplasmosis by an Enzyme Immunoassay for Specific Immunoglobulin M Antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 981–87, 1983.

WILKING, H. et al. Prevalence, incidence estimations and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. **Scientific Reports**, v. 6, n. 22551, p. 1–9, 3 abr. 2016.

WITEBSKY, E. et al. Chronic thyroiditis and autoimmunization. **Journal of the American Medical Association**, v. 164, n. 13, p. 1439–1447, 1957.

XIAO, J. et al. PD-1 immune checkpoint blockade promotes brain leukocyte infiltration and diminishes cyst burden in a mouse model of *Toxoplasma* infection. **Journal of**

**Neuroimmunology**, v. 319, p. 55–62, 2018.

YANG, J. et al. Risk assessment of etanercept in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–10, 2018.

YANG, M. et al. TNF- $\alpha$  inhibitor therapy can improve the immune imbalance of CD4+ T cells and negative regulatory cells but not CD8+ T cells in ankylosing spondylitis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 22, n. 1, p. 149, 19 jun. 2020.

YOKOSUKA, T. et al. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 6, p. 1201–1217, 4 jun. 2012.

ZHAN, F. X. et al. Importance of Th22 cell disequilibrium in immune thrombocytopenic purpura. **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 8767–8772, 2018.

ZHAO, L. et al. IL-22+CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 16, n. 5, p. 518–526, 2013.

---

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

Paciente Nº: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Grupo: ( ) DS ( ) IB

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

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

**Sexo:** ( ) Feminino ( ) Masculino

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

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

**Escolaridade:** ( ) Fund. Incomp. ( ) Fund. Comp. ( ) Ens. Méd. Incomp. ( ) Ens. Méd.

Comp. ( ) Sup. Incomp. ( ) Sup. Comp.

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

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

**Tabagismo:** ( ) não ( ) sim. Quantidade diária? \_\_\_\_\_ Tempo de uso: \_\_\_\_\_

**Alcoolismo** ( ) não ( ) sim. Quantidade diária? \_\_\_\_\_ Tempo de uso: \_\_\_\_\_

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

---

**Conhece a Toxoplasmose:** ( ) não ( ) Já ouviu falar ( ) sim

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

**Possui gatos?** ( ) não ( ) sim

**Costuma deixa-los “passear” na rua?** ( ) não ( ) sim

**Onde esses animais depositam seus dejetos?** ( ) caixa de areia ( ) quintal ou jardim da casa

**Possui hábitos de jardinagem?** ( ) não ( ) sim. **Se sim, usa luvas?** ( ) não ( ) sim

**Tem o hábito de lavar frutas, verduras e legumes antes do consumo?**

( ) não ( ) às vezes esquece ( ) lava em água corrente ( ) lava com água e sabão

( ) deixa algum tempo no vinagre ( ) deixa algum tempo no hipoclorito

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

**Tem o hábito de ingerir leite cru?** ( ) não ( ) sim

**Tem o hábito de ferver ou filtrar a água antes da ingestão?** ( ) não ( ) fervida ( ) filtrada

**Informações do Prontuário**

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

Data do diagnóstico \_\_\_\_\_ Início do tratamento \_\_\_\_\_

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

Medicação para controle de sintomas? ( ) não ( ) sim. Qual? \_\_\_\_\_

Uso de drogas modificadoras do curso da doença? ( ) não ( ) sim. Qual? \_\_\_\_\_

Início do tratamento com atual medicação: \_\_\_\_\_

Posologia: \_\_\_\_\_

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

Posologia do IB \_\_\_\_\_

Data do último IB \_\_\_\_\_ Próxima data IB \_\_\_\_\_

Início do tratamento com atual imunobiológico \_\_\_\_\_

Tempo de tratamento com atual imunobiológico \_\_\_\_\_

Início do tratamento com 1º imunobiológico \_\_\_\_\_

Tempo de tratamento com 1º imunobiológico \_\_\_\_\_

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

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

Já fez alguma cirurgia? ( ) sim ( ) não. Qual(is)? \_\_\_\_\_

Possui doenças crônicas? ( ) Diabetes \_\_\_\_\_ ( ) Hipertensão Arterial ( )

Hipertireoidismo ( ) Hipotireoidismo ( ) Doença de Chagas ( ) Outras \_\_\_\_\_

Histórico de doenças na família? Quais? \_\_\_\_\_

Observações gerais: \_\_\_\_\_

Laboratório Central: Toxo: \_\_\_\_\_ Chagas: \_\_\_\_\_ Tuberculose: \_\_\_\_\_

Sorologia para *T. gondii*: IgM \_\_\_\_\_ IgG \_\_\_\_\_

---

**ANEXO A - Termos de consentimento livres e esclarecidos para pacientes em uso de imunomoduladores biológicos e para indivíduos que constituíram o grupo controle.**



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](mailto: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 convidado (a) a participar do estudo “Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados”, por ser paciente do Ambulatório de Reumatologia. O objetivo desse trabalho é analisar a resposta do seu sistema imunológico, frente à toxoplasmose, e a influência do seu tratamento (com ou sem imunomoduladores biológicos) na intensidade dessa resposta e no funcionamento do seu organismo. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. Não será feito nenhum procedimento que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida, apenas iremos coletar seu sangue e alguns dados.

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

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



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](mailto: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 convidado (a) a participar do estudo “Avaliação da resposta imune celular e humoral específica ao *Toxoplasma gondii* em pacientes imunomodulados”.

Algumas pessoas desenvolvem doenças autoimunes em que o sistema imune “reconhece e ataca” tecidos próprios como se fossem patógenos causadores de doenças. Para evitar que isso aconteça, é necessário que esses indivíduos façam uso de medicamentos imunossupressores, que servem para controlar essa ação exagerada do sistema imune e impedir que haja danos ao organismo. Porém, por abaixar a imunidade esses medicamentos podem predispor alguns desses pacientes a doenças oportunistas, de modo que é preciso sempre monitorá-los. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é analisar a resposta do sistema imune frente à toxoplasmose e a influência do tratamento (com ou sem imunomoduladores biológicos) na intensidade dessa resposta e no funcionamento do organismo. Para que possamos avaliar se essas pessoas respondem adequadamente, precisamos estudar também como está a defesa de quem não possui doença autoimune e não toma medicamentos imunossupressores, por isso você foi convidado(a) a participar desse estudo.

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 para tomar os devidos cuidados com relação à necessidade de adequação a um tratamento para esse grupo de pacientes. 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](mailto: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  
 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 B – Parecer do consubstanciado do CEP****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

**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

Telefone: (34)3700-6776

CEP: 38.025-100

Município: UBERABA

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