

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Perfil de Quimiocinas e Citocinas Séricas em Recém-nascidos com Diferentes
Manifestações da Toxoplasmose Congênita Ocular.**

Thádia Evelyn de Araújo

**Uberlândia
Fevereiro - 2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Perfil de Quimiocinas e Citocinas Séricas em Recém-nascidos com Diferentes
Manifestações da Toxoplasmose Congênita Ocular.**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa
de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas, como requisito parcial a obtenção do título
de mestre

Aluna: Thádía Evelyn de Araújo

Orientador: Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Eloísa Amália Vieira Ferro

**Uberlândia
Fevereiro - 2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A663p
2016

Araújo, Thádia Evelyn de, 1991

Perfil de quimiocinas e citocinas séricas em recém-nascidos com diferentes manifestações da toxoplasmose congênita ocular / Thádia Evelyn de Araújo. - 2016.
67 f. : il.

Orientador: Olindo Assis Martins Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Toxoplasmose congênita - Teses. 3. Olhos - Doenças - Teses. 4. Marcadores biológicos. - Teses. I. Martins Filho, Olindo Assis. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

“Aguarde as surpresas do tempo, agindo sem precipitação.

Se cada noite é nova sombra, cada dia é nova luz. ”

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

A toda minha família pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Arli Lopes de Araújo e Marluce da Silva Araújo, pela excelente educação que me deram; por todo amor, apoio, amizade e puxões de orelha, quando necessário;

Ao meu orientador Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho, por ter aceitado o desafio de me orientar a distância, pelos diversos ensinamentos e pela enorme paciência;

A minha co-orientadora Eloísa Amália Vieira Ferro, por ter me aceitado como uma de suas em seu laboratório, por ser um exemplo de mulher na Ciência e por ter me apresentado uma linha de pesquisa tão apaixonante;

Aos meus irmãos de sangue e de coração Thárique e Lorraine, pelo exemplo de dedicação e responsabilidade que sempre me deram;

Aos meus amigos de tantos anos Karen, Cândida, Dayme, Talita, Nathália, e ao meu namorado Fernando pelo companheirismo e apoio.

Às minhas colegas do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução com quem tanto aprendi: Camilla, Priscilla, Rafaela, Ana Carolina, Paula, Fernanda, Iliana, Andressa, Pâmela, Mayara, Ariane, Lara, Prof^a. Dr^a. Bellisa, Prof^a. Dr^a. Angélica, e aos colegas Matheus e Prof. Dr. Deivid. Obrigada pelos dois anos de convivência!

À Dra. Samantha Ribeiro Bela por ter me hospedado em sua casa junto a sua família linda em Belo Horizonte.

A Dra. Jordana pelo auxílio ao longo de todo trabalho.

Aos colaboradores desse projeto, sem os quais não seria possível a sua realização.

Aos responsáveis pelos pacientes participantes da pesquisa que tornaram possível a nossa contribuição à Ciência.

A todos os meus colegas de mestrado, pela agradável convivência e troca de conhecimentos.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1.INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 Toxoplasmose: biologia do agente etiológico e transmissão | 11 |
| 1.2 Epidemiologia | 13 |
| 1.3 Infecção congênita | 15 |
| 1.4 Toxoplasmose ocular | 17 |
| 1.5 Resposta Imune | 18 |
| 1.6 Biomarcadores de resposta imunológica | 20 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 22 |
| 3. OBJETIVO | 23 |
| 3.1 Objetivo Geral | 23 |
| 3.2 Objetivos específicos | 23 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 4.1. População de estudo | 24 |
| 4.2 Citometria de fluxo - “Cytometric bead Array (CBA)” | 26 |
| 4.2 Análise de dados | 27 |
| 4.3 Análise de assinatura de biomarcadores | 27 |
| 4.4 Rede de biomarcadores séricos | 27 |
| 5. RESULTADOS | 29 |
| 5.1 Lactentes com Toxoplasmose congênita apresentam uma proeminente produção de quimiocinas mediada por MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8 | 29 |
| 5.2 Enquanto IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 são biomarcadores gerais associados a lesão ocular, MIG/CXCL9 aparece como um marcador seletivo para lesão retinocoroidal ativa. | 29 |
| 5.3 O grupo TOXO é caracterizado por um padrão misto de citocinas de perfil pró-inflamatório/regulatório mediado por IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 | 31 |
| 5.4 Enquanto TNF é apresentado como um biomarcador para o grupo SL e IFN- γ e IL-5 no grupo RA, IL-10 aparece como um mediador relevante nos grupos RAC/RC | 31 |
| 5.5 As assinaturas de biomarcadores séricos corroboram que o grupo TOXO é caracterizado por uma profícua produção de quimiocinas/citocinas com um amplo conjunto de mediadores pró-inflamatórios/reguladores | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 5.6 IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 são indicadores de amplo espectro de doença ocular, enquanto que TNF é um biomarcador para SL, IFN- γ e MIG/CXCL9 apontam para ARL e IL-10 é destacada como um verdadeiro biomarcador sérico de ACRL/CRL | 36 |
| 5.7 A ampla interação entre quimiocinas/citocinas mediada por negativas correlações na rede TOXO contrasta com uma pequena ponte de IL-10 observada na rede NI..... | 38 |
| 5.8 A rede RA apresenta uma clara diminuição de conexões vizinhas, enquanto que SL e RC apresentaram uma rede equilibrada, da mesma forma que observamos em NI | 39 |
| 6.DISSCUSSÃO | 41 |
| 7.CONCLUSÕES..... | 49 |
| 8.FIGURAS..... | 46 |
| REFERÊNCIAS | 56 |

RESUMO

O presente estudo caracterizou as primeiras mudanças nas assinaturas e redes de quimiocinas e citocinas séricas de lactentes portadores de toxoplasmose congênita (TOXO), em comparação aos controles não infectados (NI). Grupo TOXO foi subdivididos de acordo com o status de lesão retinocoroidal como sem lesão (SL), lesão ativa (RA), lesão cicatricial e ativa (RAC) e lesão cicatricial (RC). Os resultados mostraram que TOXO exibiu um perfil proeminente de quimiocinas mediada por IL-8/CXCL8, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5. Além disso, enquanto IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 são biomarcadores gerais associados com lesão ocular, MIG/CXCL9 aparece com um biomarcador seletivo para lesão retinocoroidal ativa. Além disso, TOXO é caracterizado por um padrão de citocinas misto com ação pró-inflamatória /reguladora mediada por IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10. Enquanto o TNF aparece como um biomarcador putativo para SL e IFN- γ e IL-5, como característica imunológica para RA, IL-10 surge como um mediador relevante em RAC/RC. Assinaturas de biomarcadores séricos corroboram que TOXO é acompanhado por uma produção profícua de quimiocinas/citocinas com um amplo conjunto de mediadores pró-inflamatórios/ reguladores. IL-8 / CXCL8 e IP-10 / CXCL10 são indicadores de amplo espectro de doença ocular, enquanto TNF é um biomarcador para SL, IFN- γ e MIG/CXCL9 apontam para RA e IL-10 é destacada como um excelente biomarcador sérico de ACRL/CRL. A análise da rede de biomarcadores demonstrou um número amplo de cruzamentos entre quimiocinas/ citocinas mediados por correlações negativas observadas em TOXO contrastado com a pequena ponte de IL-10 observada na rede de biomarcadores de SL. Adicionalmente, na rede de RA observa-se um encurtamento claro de conexões vizinhas, enquanto SL e RC apresentou uma rede equilibrada, da mesma forma que observamos em NI. No entanto, este novo equilíbrio de rede, semelhante ao observado em NI é suportado por uma assinatura de quimiocinas/citocinas distinta em SL e RC. Com isso, concluímos que lactentes infectados com *T. gondii* produzem uma ampla gama de biomarcadores que caracterizam os diferentes tipos de lesão da toxoplasmose, o que pode auxiliar no prognóstico e diagnóstico da doença.

Palavras-chave: Toxoplasmose Congênita, Retinocoroidite, Lactentes, Biomarcadores.

ABSTRACT

This study describes the first changes signatures and networks of chemokines and cytokines serum of patients with congenital toxoplasmosis infants (TOXO), compared to non infected controls (NI). TOXO group was divided according to retinochoroidal injury status: without injury (SL), active injury (RA), scar and active injury (RAC) and scar injury (RC). The author found out that TOXO displays an outstanding profile of chemokine mediated by IL-8/CXCL8, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5. WHILE il-8/cxcl8 AND ip-10/cxcl10 are general biomarkers associated with ocular injury MIG/CXCL9 appears with an active selection biomarker for retinchoroidal injury. Furthermore, TOXO is characterized by a mixed pattern of cytokines with proinflammatory/regulatory action mediated by IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10. While TNF appears as a putative biomarker for SL and IFN- γ e IL-5 as immunological characteristic of RA, IL-10 appears as an important mediator in RAC/RC. Signatures of serum biomarkers confirm that TOXO is accompanied by a significant storm of chemokines/cytokines with a wide range of proinflammatory/regulatory mediators. IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 are indicators of broad ocular disease spectrum, while TNF is a biomarker for SL, IFN- γ and MIG/CXCL9 point for RA and IL-10 is highlighted as an excellent serum biomarker of ACRL/CRL. In the RA network a clear shortening neighboring connections are observed, while SL and CR showed a balanced network, as it was observed in NI. This network balancing, however, similar to the one observed in NI is supported by a signature of chemokines/cytokines in separate SL and CR. Thus, we concluded that infants infected with *T. gondii* produce a wide range of biomarkers that characterize the different types of toxoplasmosis lesion, which may assist in prognosis and diagnosis of the disease.

Keywords: Congenital toxoplasmosis, Retichoroiditis, Infants, Biomarkers.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

BD - *Becton Dickinson*

Blimp-1 - *B lymphocyte-induced maturation protein-1*

CBA – *Cytometric Bead Array*

COEP- UFMG - Conselho de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

CXCR3 – Receptor 3 de quimiocina C-X-C

ELFA- *Enzyme Linked Fluorescent Assay*

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

GRA1- *Recombinant granule antigen proteins* um.

IC – Intervalo de confiança

Ig- Imunoglobulina

IFN- γ – Interferon alfa

IL- Interleucina

IL-8/CXCL8 – Interleucina 8/quimiocina ligante 8 (motivo C-X-C)

IP-10/CXCL10 - proteína induzida por interferon gama 10/ quimiocina ligante 10 (motivo C-X-C)

MCP-1/CCL2 - proteína quimiotática de monócitos 1/quimiocina ligante 2 (motivo C-C)

MIG/CXCL9 – monocina induzida por interferon gama/quimiocina ligante 9 (motivo C-X-C)

Myd88 - Fator de diferenciação mielóide 88

NI – grupo não infectado

NK – *Natural killers*

NO – óxido nítrico

O₂ – gás oxigênio

Pg/ml – picogramas por mililitro.

RA – Retinocoroidal aguda

RAC – Retinocoroidal aguda e cicatrizada

RANTES/CCL5 – regulador da atividade normal de célula T expressa e secretada/quimiocina ligante 5 (motivo C-C).

RC – Retinocoroidal cicatrizada

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição;

SL – Sem lesão

Th – Célula T auxiliar

TLR – *Toll like receptor*, Receptores do tipo Toll

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa.

TOXO – grupo com toxoplasmose.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Toxoplasmose: biologia do agente etiológico e transmissão

A toxoplasmose é uma parasitose de distribuição global, causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, que pertencente ao Filo Apicomplexa, à Classe Sporozoea, à Sub-classe Coccidia, à Ordem Eucoccidiida, à Família Sarcocystidae e à Sub-família Toxoplasmatinae, e única espécie de seu gênero *Toxoplasma*. Este parasito foi descrito em 1908 por Splendore no Brasil e por Nicolle & Manceaux na Tunísia, simultaneamente. Pode afetar qualquer célula nucleada em animais homeotérmicos, porém tem preferência por células do sistema nervoso central, incluindo os grupos celulares responsáveis pela visão (DUBEY E BEATTIE, 1988).

As três formas de *T. gondii* (taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas) são infecciosas. Taquizoíto é a principal forma encontrada na fase aguda da toxoplasmose, devido a sua capacidade proliferativa. Necessita de ambiente intracelular para sobrevivência e replicação, e após ingestão oral é rapidamente destruído pelo suco gástrico. Os bradizoítos são a forma de resistência na forma de cistos teciduais, caracterizando a fase crônica, e possibilitam a reativação da doença após longos períodos. Já os esporozoítos são formados dentro de oocistos, que são eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos. Nos hospedeiros intermediários, são liberados após passagem pelo suco gástrico, podendo então invadir células e levar a toxoplasmose (FRENKEL et al., 1970; BLACK e BOOTHROYD, 2000; HINRICHSSEN; VALENTE, 2005; BLADER et al., 2015; WATTS et al., 2015).

Seres humanos podem se tornar infectados pelas seguintes vias: ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos com a forma bradizoíta, principalmente carnes de suínos, ovinos e caprinos (KIJLSTRA; JONGERT 2009); ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos excretados nas fezes de felídeos infectados, principalmente gatos domésticos (BAHIA-OLIVEIRA, et al., 2003); transmissão congênita, por meio da transferência de taquizoítas da mãe para o feto através da placenta (transmissão vertical), principalmente na fase aguda da infecção (BALE, 2002); transplante de órgãos de um doador infectado para um receptor soronegativo, principalmente transplantes de coração, pulmão, fígado e rim (ROGERS et al., 2008); transfusão sanguínea de doadores infectados para receptores soronegativos, acidentes laboratoriais ou entre profissionais de saúde com objetos perfuro-cortantes contaminados com taquizoítas viáveis presentes em secreções, ou acidentes laboratoriais envolvendo animais infectados (BOWIE et al., 1997). A infecção pelo parasito pode ser assintomática ou apresentar

alguns sinais e sintomas que variam de acordo com o perfil genético e estado imunológico do hospedeiro, do genótipo do parasito e ainda forma de infecção (MONTTOYA e LIESENFELD, 2004).

O ciclo de vida desse protozoário é heteróxico facultativo e possui como hospedeiros definitivos os felídeos, nos quais corre a fase sexuada do ciclo, e hospedeiros intermediários vertebrados homeotérmicos, nos quais ocorre a fase assexuada. Tanto na fase sexuada quanto assexuada, os hospedeiros podem entrar em contato com as formas evolutivas do parasito por meio de cistos (contendo bradizoítos), oocistos (contendo esporozoítos) ou taquizoítos. Essas formas possuem a capacidade de invadir enterócitos do hospedeiro após ingestão oral. Na fase sexuada, no interior dessas células, o parasito se multiplica por merogonia, originando merozoítos (HEHL et al., 2015). O rompimento da célula parasitada libera essas formas, que penetram novas células epiteliais e se diferenciam em gametócitos e gamontes, e depois de processo de maturação, em microgametas e macrogametas. Esses gametas se fecundam formando o zigoto, que dá origem ao oocisto. Ocorre, então, o rompimento da célula e o oocisto é liberado para o meio externo junto às fezes do animal. O oocisto sofre maturação em condições adequadas de temperatura, umidade e iluminação sombreada, o que justifica a alta porcentagem de soropositivos em países tropicais. Cada oocisto maduro contém dois esporocistos, e em cada esporocisto há quatro esporozoítos, e podem se manter infectantes por volta de um ano, em condições ambientais favoráveis (FRENKEL et al. 1970; BLACK e BOOTHROYD, 2000).

Já na fase assexuada, que também pode ocorrer nos felídeos, após ingestão de alguma das formas de *T. gondii*, o parasito liberado no trato digestivo sofre intensa replicação intracelular no epitélio intestinal, sob a forma de taquizoíto, e invade vários tipos celulares, formando um vacúolo parasitóforo, onde sofre divisões sucessivas por endodiogenia, formando novos taquizoítos. Após novo rompimento celular, invadirão novas células. A disseminação do parasito pode ocorrer por meio de sangue ou linfa, o que facilita a invasão de *T. gondii* em diversos órgãos e tecidos, incluindo olhos, placenta e cérebro (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Em modelos animais observa-se grande influência do genótipo do parasito na gravidade da doença (PEIXOTO-RANGEL et al. 2009; BEZERRA et al. 2012). Com base na utilização da técnica de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), *T. gondii* foi classificado em linhagens genéticas distintas: cepas do tipo I, II e III, provenientes de isolados da Europa e Estados Unidos (HOWE; SIBLEY, 1995) e cepas atípicas provenientes principalmente de isolados da América Latina (WUJICKA et al. 2013b). Os casos mais graves

de toxoplasmose são associados às cepas clonais do tipo I e atípicas, bem como os casos de toxoplasmose congênita e ocular no Brasil. Já as cepas do tipo II são associadas a casos assintomáticos (RESENDE et al. 2008; WUJCICKA et al. 2013b).

Mais de um terço da população mundial apresenta soropositividade para o parasito (RIBEIRO et al. 2008; ROBERT-GANGNEUX et al. 2012; TENTER, 2000), porém a maioria dos casos é assintomática e autolimitada para imunocompetentes. Nesses casos, os sintomas são inespecíficos, como febre, fadiga e linfadenopatia, sendo na maioria das vezes, confundidos com manifestações de outras doenças. Esses sintomas ocorrem em decorrência da destruição tecidual causada pelo processo de invasão do protozoário (BLADER et al., 2015). Já em pacientes imunocomprometidos, as manifestações clínicas da toxoplasmose são mais graves, podendo ocorrer comprometimento neurológico e oftalmológico, além de pneumonia e miocardite (PARLOG et al., 2015).

Os inúmeros casos assintomáticos ocorrem, provavelmente devido à capacidade do parasito em desenvolver estratégias para evadir a resposta imune do hospedeiro. Essa evasão ocorre, dentre outros meios, por meio da secreção de proteínas que são liberadas durante a invasão do protozoário, produzidas em organelas do complexo apical, as roptrias, micronemas e grânulos densos. As micronemas fazem o reconhecimento e adesão inicial do parasito aos receptores da superfície da célula hospedeira; as roptrias participam da internalização do parasito dentro do vacúolo parasitóforo e os grânulos densos são responsáveis pela remodelação do vacúolo parasitóforo como um compartimento metabolicamente ativo para o crescimento do protozoário (DUBEY, 1998; STUTZ et al., 2012).

Outra forma de evasão ocorre com a interconversão entre as formas taquizoíta e bradizoíta, formando cistos. Assim, o protozoário consegue modular a produção de resposta inflamatória excessiva, por meio da modulação da produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias e indução da síntese de anti-inflamatórios (STUTZ et al. 2012 ; HUNTER et al. 2012).

1.2 Epidemiologia

Em áreas endêmicas a toxoplasmose pode apresentar soroprevalência extremamente alta, com ampla disseminação do parasito (TENTER, 2000 ; CABRAL et al., 2014 ; MEDEIROS et al., 2014, CÂMARA et al., 2015). Mesmo considerando que a maioria dos casos permanece assintomática, a infecção por *T. gondii* pode ser prejudicial, especialmente quando ocorre infecção durante a gravidez, o que pode resultar na transmissão vertical de *T. gondii*,

sendo o desenvolvimento da toxoplasmose congênita e a forma mais significativa da doença (EMELIA et al., 2014; PERNAS et al., 2014; REZENDE-OLIVEIRA et al., 2012).

No Brasil a taxa de prevalência da toxoplasmose varia ao longo do território geográfico, e sofre influência de diversos fatores relacionados a padrões culturais da população, como hábitos alimentares, faixa etária e procedência urbana ou rural (AMENDOEIRA et al, 2003). Na região nordeste, estudos indicam alta taxa de positividade, com 77% de gestantes positivas em Caxias, Maranhão, sendo 0,5% IgM reagentes (CÂMARA et al., 2015) e em Natal, Rio Grande do Norte, a taxa foi de 68,5% de IgG reagentes e 0,3% IgM reagentes (INAGAKI et al., 2014). No norte do país, num estudo realizado com moradores de comunidades ribeirinhas no Amazonas foi visto que 56,7% da população era soropositiva para *T. gondii* (VITALIANO et al., 2015). No Sudeste, em Assis, São Paulo, a soroprevalência de 22,3% foi observada num estudo realizado com estudantes universitários de 17 a 25 anos (RODRIGUES et al., 2015). Em outro estudo brasileiro realizado em Campos dos Goytacazes, no estado do Rio de Janeiro, a taxa de prevalência chegou a 84% no grupo considerado com condições socioeconômicas mais baixas. Além disso, nesse estudo o hábito de beber água sem filtrar foi relacionado a altas taxas de positividade para *T. gondii* (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Já no estado de Minas Gerais, onde nosso estudo foi realizado, a prevalência encontrada em recém-nascidos foi de 1/770, sendo que dessa população estudada 79,8% apresentaram lesão retinocoroideana decorrente da toxoplasmose congênita (VASCONCELOS-SANTOS, 2009).

Essa variação também ocorre comparando diversas partes do globo. Na Ásia, um estudo realizado na China Oriental mostra que 15,2% das gestantes estudadas foram positivas pra IgG e 2,9% pra IgM, enquanto não gestantes tiveram 17,3% e 3,8% de positividade pra IgG e IgM, respectivamente, onde os fatores de risco envolvidos incluíam residência na área rural e contato com o solo. Contato com gatos e cachorros também foi considerado como fator de risco (CONG et al., 2015). Na Etiópia 18,5% de gestantes foram positivas para IgG anti-*T.gondii*, e nenhuma foi diagnosticada na fase aguda (AWOKE, NIBRET E MUNSHEA, 2015).

Poucos surtos de toxoplasmose são registrados na literatura. De 2001 a 2002, em Santa Isabel do Ivaí, no Paraná, foi registrado um surto de toxoplasmose, afetando 426 pessoas devido à contaminação com oocistos no reservatório de água da cidade. Foram registrados 14 casos de toxoplasmose ocular e 7 casos em gestantes, sendo que uma apresentou aborto espontâneo e 6 crianças nasceram infectadas, uma com anomalia congênita grave, que resultou em óbito (ALMEIDA et al., 2011). Outro surto envolvendo reservatório de água ocorreu em Greater Vitória, no Canadá, em 1995, tendo como resultado 110 casos agudos de toxoplasmose,

incluindo 42 gestantes e 11 recém-nascidos (BELL et al., 1995). Isso demonstra que o tratamento de água e saneamento básico adequados são necessários para a prevenção de casos de toxoplasmose, além de outras diversas parasitoses.

1.3 Infecção congênita

A transmissão por via placentária, da mãe para o filho, é a forma de transmissão que mais merece a atenção das autoridades de saúde, pois pode acarretar consequências graves para o feto ou recém-nascido (MOMBRO et al. 2003). Durante a gravidez, a placenta desempenha um papel importante contra *T. gondii* na transmissão materno-fetal. O parasito coloniza preferencialmente trofoblastos extravilosos em comparação com sinciciotrofoblastos (WUJCICKA, et al. 2013b). A imunomodulação observada na gravidez cria mecanismos que favorecem o escape de *T. gondii* e o próprio parasito contribui para esta condição modulando a síntese de quimiocinas por células mononucleares de sangue periférico (REZENDE-OLIVEIRA et al, 2012). O tratamento de mulheres grávidas com espiramicina reduz a possibilidade de transmissão da infecção para o feto e a ausência de um tratamento adequado está associada com o aparecimento da forma neural-óptico de infecção congênita (AVELINO et al, 2014). Alguns estudos utilizando vilos placentários e o roedor *Calomys callosus* sugerem que a azitromicina também pode ser utilizada em grávidas, uma vez que a droga pode atuar diminuindo a carga parasitária e prevenindo a transmissão de *T. gondii* através da placenta (COSTA et al., 2009; CASTRO-FELICI et al., 2014).

Em geral, no primeiro trimestre de gestação, a taxa de transmissão congênita é de aproximadamente 9%, aumentando para 27% e 59% no segundo e no terceiro trimestre de gestação, respectivamente. A frequência de transmissão e a gravidade das consequências da infecção para o feto ou recém-nascido são inversamente proporcionais, de modo que as consequências mais graves são observadas em estágios gestacionais precoces (HOHLFELD et al. 1994; DUNN et al. 1999; WALLON et al. 1999). A prevalência da toxoplasmose congênita varia entre 0,3/1000 neonatos em Ribeirão Preto, SP (CARVALHEIRO et al. 2005), 0,9/1000 em Porto Alegre, RS (VARELLA et al. 2009), 5/1000 em Uberlândia, MG (SEGUNDO et al. 2004) e 1/770 no estado de Minas Gerais (VASCONCELOS-SANTOS et al. 2009; MACHADO et al. 2010).

Estudos realizados em áreas endêmicas do Brasil indicam maior prevalência da toxoplasmose congênita em comparação com o resto do mundo (SEGUNDO et al, 2004; CÂMARA et al., 2015). Em até 80% dos casos, os recém-nascidos apresentam retinocoroidite

no momento do nascimento, sendo que 50% desses casos manifestam as formas graves de lesão retinocoroidal. Estes achados oculares alarmantes entre crianças com toxoplasmose congênita no Brasil revelam aumento da gravidade da doença ocular, em comparação com outros achados oculares clínicos relatados em todo o mundo (VASCONCELOS-SANTOS et al. 2009).

Dimorfismos genéticos nos parasitas e circulação de cepas atípicas poderiam justificar a gravidade e prevalência de lesões oculares aumentarem em áreas endêmicas (CARNEIRO et al. 2013). Por outro lado, o resultado da infecção pelo *T. gondii* baseia-se na interação entre a resposta inflamatória induzida pelo complexo do parasita, assim como os mecanismos imunomoduladores desencadeados como resposta, principalmente em gestantes (REZENDE-OLIVEIRA et al. 2012). A imunopatogenia do parasita é bem conhecida durante a infecção em adultos, no entanto, os dados para toxoplasmose congênita ocular em crianças e recém-nascidos ainda são escassos.

As manifestações clínicas da infecção congênita variam de acordo com a fase da gestação em que ocorre a transmissão do parasito para o feto. Deste modo, as consequências mais comuns são: aborto espontâneo e morte fetal no interior do útero, ou nascimento de crianças com hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas, coriorretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardamento mental e motor, trombocitopenia e/ou anemia. Nenhum dos sinais descritos anteriormente é patognomônico para toxoplasmose congênita, uma vez que podem se manifestar em decorrência de infecções congênitas causadas por outros patógenos (SWISHER, BOYER e MCLEOD, 1994; MONTOYA e LIESENFELD, 2004; KRAVETZ e FEDERMAN, 2005). Estudos com recém-nascidos no estado de Minas Gerais demonstraram que 80% dos nascidos com toxoplasmose apresentavam algum sinal clínico importante no momento do nascimento (63% lesão ocular e 17% comprometimento neurológico)(ANDRADE et al. 2008, VASCONCELOS-SANTOS et al. 2009, MACHADO et al. 2010).

Um estudo realizado em Minas Gerais concluiu que os casos de toxoplasmose congênita no estado são relacionados à exposição materna a alguns fatores de risco, como baixa condição socioeconômica, baixa escolaridade e idade das mães e ingestão de água não tratada e não fervida. Além disso, nesses casos a infecção materna ocorreu principalmente por ingestão de oocistos (CARELLOS et al., 2014). Resultados semelhantes foram vistos no Paraná, onde também foram considerados como fatores de risco: residência em zona rural, a mãe ter mais de um filho, ingestão de carne mal cozida e contato constante com o solo. Nos dois estudos a presença do gato doméstico não foi considerado como fator de risco (LOPES-MORI et al. 2013).

1.4 Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose ocular é considerada a forma de uveíte posterior mais frequente (LAHMAR et al. 2009; MAENZ et al. 2014; TONG et al. 2015) e é uma das manifestações mais comuns na doença congênita, observada em um terço dos casos (GARZA-LEON, et al. 2008). Durante a inflamação, o indivíduo afetado se queixa de perda ou turvação da visão e visualização de partículas flutuantes (ROBERTS, et al. 2001). Após o processo inflamatório inicial, o tecido afetado cicatriza, resultando em uma lesão que, quando apresenta morfologia clássica, assemelha-se a uma roda de carroça (COMMODARO et al. 2009).

Os principais sinais são lesões focais brancas visíveis, com uma intensa reação inflamatória associada (MONTROYA et al. 1996; BURNETT et al. 1998; HOLLAND, 1999; HEGAB et al. 2003). Dentre as apresentações clínicas da retinocoroidite ativa, que ocorre devido à resposta inflamatória provocada por *T. gondii*, encontram-se: retinite destrutiva associada à vitrite; áreas puntiformes de retinite com edema e reação vítrea associadas; lesões puntiformes profundas, com exsudato subretinal com reação vítrea mínima e com fluido subretinal turvo ou com sangue. Essas lesões levam a cicatrizes de pigmentação variável. Porém, algumas lesões com parasitos permanecem ao redor das cicatrizes, o que possibilita a reativação da doença, após tempo indeterminado (HEDGE et al., 2015).

As consequências para a visão do indivíduo afetado dependem da localização onde as lesões se desenvolvem e da extensão do tecido afetado. Desta maneira, pode acarretar perda de visão parcial ou total, quando afetam a região macular ou até não ter consequência permanente, quando afetam as demais regiões do globo ocular (HOLLAND, 2004). A perda da acuidade visual pode ser resultado também do envolvimento do nervo óptico e torna-se permanente quando ocorre formação de cicatriz macular ou atrofia ótica (LONDON et al., 2011).

Embora a lise celular mediada pelo parasito seja provavelmente a principal causa de destruição tecidual, estados de imunodeficiência, hipersensibilidade e respostas inflamatórias podem ser a base da doença grave em imunocompetentes. Como exemplo disso, a toxoplasmose ocular ativa pode ser associada à diminuição dos níveis séricos de CCL2 em pacientes adultos (REY et al. 2014). Já em estudos utilizando modelos experimentais, as lesões na retina foram associadas a altos níveis de IL-6, depois de reativação da infecção (ROCHET et al., 2014). Assim o perfil de citocinas pode servir como um marcador de atividade e fornecer ferramentas para novos alvos de tratamento.

1.5 Resposta Imune

Tanto a resposta imune inata quanto a resposta adaptativa possuem funções no controle da disseminação *T. gondii* no hospedeiro adulto, envolvendo uma série de interações celulares coordenadas entre o parasito e enterócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, NK, entre outros elementos da resposta imune (MILLER et al. 2009; HALONEN et al. 2013). Em síntese, a interrupção da proliferação de taquizoítos decorre principalmente da ativação de macrófagos e células NK, da produção de IL-12, IFN- γ , IL-2, TNF pelos linfócitos T e da ação do óxido nítrico (NO) e oxigênio (O₂), que possuem ação antimicrobiana. Sendo assim, esses elementos interferem na resposta inata e adaptativa (MILLER et al., 2009; TAIT e HUNTER, 2009; LYKENS et al., 2010).

O sistema imune inato evoluiu para reconhecer um conjunto de moléculas presente em protozoários, bem como produtos de danos teciduais causados pela invasão de *T. gondii* (YAROVINSKY, 2014). Nisso ocorre a participação do receptor semelhante a Toll (TLR), principalmente TLR11 e TLR12, induzidos por Myd88, induzindo a produção de IL-12 por células dendríticas. Essa citocina estimula células Natural Killers (NK) e linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ a produzirem outra citocina, o IFN- γ , que regula mecanismos efetores para o controle do parasito (HUNTER et al. 2012).

Como o parasito é intracelular obrigatório, a resposta protetora é fundamentalmente mediada por células. Linfócitos T CD4⁺ participam principalmente na produção de IFN- γ , que induzem a ativação de macrófagos a produzir moléculas de ação antimicrobiana (STURGE et al., 2014). Em tecidos fetais, a sobrevivência e a multiplicação do parasito é facilitada pela ativação deficiente de macrófagos e menor produção de citocinas pró-inflamatórias pelos linfócitos T, incluindo uma menor produção de IFN- γ e TNF, em comparação com tecidos adultos (BELLANTI et al., 1999).

Polimorfismos de genes associados à expressão de IFN- γ vem sendo associados à susceptibilidade dos hospedeiros a toxoplasmose, principalmente retinocoroidite (ALBUQUERQUE et al., 2009; PEIXE et al., 2014). Isso se deve ao fato que IFN- γ , juntamente a TNF- α , promovem eventos precoces e tardios associados à citotoxicidade contra as células infectadas com *T. gondii*, exercidas pelas células efetoras T CD8⁺ (SHAH et al., 2015).

Após o contato com o antígeno, ocorre uma produção inicial de citocinas que estimulam a diferenciação de células TCD4⁺ em perfil pró ou anti-inflamatório, que produzirão perfis diferentes de citocinas. A IL-12, por exemplo, estimula a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em linfócitos TCD4⁺ de perfil pró-inflamatório, que juntamente a macrófagos e células NK,

produzem IFN- γ . Essa citocina inibe a diferenciação de L TCD4⁺ em perfil anti-inflamatório, mantendo assim, um perfil de resposta pro-inflamatório, com imunidade predominantemente celular. Por outro lado, as citocinas IL-4 e IL-10 estimulam a diferenciação para perfil Th2, com resposta predominantemente humoral (GAJEWSKI et al. 1988; MOSMANN et al., 1991; TRINCHIERI et al., 1993).

Com o desenvolvimento da resposta imune, ocorre a eliminação de taquizoítos e o aparecimento de bradizoítos com formação de cistos teciduais, dando início à fase crônica. Nessa fase, os níveis de citocinas pró-inflamatórias caem e o controle da infecção ocorre devido à ação de L TCD4⁺ e L TCD8⁺ específicos, que controlam os cistos teciduais por meio de produção de IFN- γ e atividade citotóxica mediada por perforina, respectivamente (SUZUKI et al., 2000; MILLER et al., 2009).

A limitação dos danos causados pelo parasita também é dependente da capacidade do hospedeiro em restringir a resposta inflamatória exacerbada pela produção de moléculas modulatórias tais como IL-4 e IL-10 (CALABRESE et al., 2008; CORDEIRO et al., 2008). Pesquisas *in vivo* mostram que a produção de IL-10 modula a síntese de IL-12 e IFN- γ , evitando uma resposta imune excessiva, com consequente dano tecidual (DENKERS et al. 1996).

A resposta imune humoral também participa diretamente na neutralização e destruição de parasitos extracelulares, auxiliando no controle da disseminação da infecção (HEGAB et al. 2003). Os anticorpos IgA e IgM são as primeiras imunoglobulinas produzidas na infecção por *T. gondii*. Os anticorpos IgM são responsáveis pela ativação do sistema complemento, e tem como característica o fato de serem ótimos aglutinadores, o que permite a sua utilização no diagnóstico. O encontro de IgM anti-*T. gondii* em amostras de recém-nascidos sugere quadro de toxoplasmose congênita, uma vez que essa classe de anticorpos não atravessa a barreira placentária (LAWTON, 1992). Enquanto a IgA produzida pela mucosa digestiva - sítio natural da infecção por *T. gondii* - é importante para a protecção contra a infecção, os anticorpos IgG específicos para o antígeno estão envolvidos com a protecção e patogênese da doença (ZORGI et al, 2011).

Os anticorpos IgG são produzidos sistematicamente na toxoplasmose e são a principal classe de imunoglobulinas da resposta humoral na infecção, sendo que são detectadas em diferentes fases da doença. A avidez da ligação de IgG ao antígeno permite conhecer se a infecção é recente ou não, auxiliando no diagnóstico, principalmente em recém-nascidos e lactentes. Contudo, sua detecção pode ocorrer pela transferência passiva de anticorpos maternos, sem que tenha ocorrido a transmissão vertical de *T. gondii*. Portanto, nesses casos é

necessário averiguar se ocorre negatização dos títulos desse anticorpo até um ano de idade do bebê. Se isso não ocorrer, o diagnóstico de toxoplasmose é confirmado (BOYER, 2005).

Resultados de trabalho do nosso grupo mostraram que a produção de IgA e IgG1 está relacionada intimamente com a produção de citocinas. Enquanto o anticorpo IgA foi intimamente relacionado à produção de TNF, o anticorpo IgG1 foi intimamente relacionado à produção de IL-10 derivada de células B, e negativamente correlacionado à produção de IFN- γ , derivado de monócitos, neutrófilos e L TCD8⁺ (DE JESUS et al., 2015). Esses resultados indicam a importância das citocinas na toxoplasmose, também no nível de resposta humoral.

1.6 Biomarcadores de resposta imunológica

Citocinas e quimiocinas são moléculas utilizadas como biomarcadores para diversas doenças, de caráter infeccioso ou não, incluindo manifestações alérgicas, câncer, doenças autoimunes, parasitoses, dentre outras. Vários ensaios tem sido desenvolvidos no intuito de identificar essas moléculas, para a partir disso, conhecer um determinado estado de uma doença ou resposta a um fármaco. Dentre os estudos que abordam essa temática, incluem:

A imunopatologia da infecção por *T. gondii* é caracterizada pela síntese de diferentes citocinas (COSTA-SILVA et al., 2012). Quimiocinas e citocinas são moléculas extremamente importantes na resposta do hospedeiro contra a infecção por *T. gondii*. Estes potenciais biomarcadores extracelulares podem ser produzidos por uma infinidade de células e são responsáveis por desencadear eventos imunológicos essenciais como: adesão e quimiotaxia de leucócitos, maturação e ativação celular e ainda regulação da duração e intensidade das respostas específicas contra patógenos e doenças não infecciosas (KIKUMURA, et al. 2012). As células do sistema imune inato são essenciais para iniciar a resposta tanto por meio da produção de IL-12, bem como a apresentação de antígenos derivados do parasita às células T (PEPPER et al., 2008).

A avaliação do perfil de citocinas, como o IFN- γ , pode auxiliar no diagnóstico e prognóstico de toxoplasmose congênita em recém-nascidos, principalmente por ser um teste simples, de fácil realização e possibilita que a decisão do tratamento seja feita de forma mais imediata (CHAPEY et al., 2010). Resumidamente, dentre as citocinas e quimiocinas importantes na toxoplasmose podemos citar: IL-2, na ativação de células *natural killer* (NK) e proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺, para que ambas produzam IFN- γ (REIS E SOUZA, et al., 1997, PIFER e YAROVINSKY, 2011); IL-12, no desenvolvimento de uma resposta imune pró-inflamatória efetora contra o parasito (LIEBERMAN, et al. 2004); IFN- γ , fundamental para

o controle da infecção aguda e crônica por *T. gondii* (ALIBERTI, 2005). $TNF\alpha$, que juntamente a outros biomarcadores iniciam a produção das moléculas microbidas (BRUNET, 2001); IL-10, IL-4 e IL-5, desempenham um papel crítico na regulação da resposta inflamatória à infecção por *T. gondii* (GAZZINELLI et al. 1996) ; $TGF\beta$, envolvida no controle da patologia intestinal após a infecção oral pelo parasito (MENNECHET et al. 2002); IL17A, associada com imunopatologia apresentada pelo hospedeiro durante a infecção pelo parasito (VILLARINO et al. 2006); IP-10, MIG, MCP-1, RANTES e IL8, na adesão e quimioatração celular para o sítio inflamatório da infecção e ainda facilitar a fagocitose celular (KIKUMURA et al. 2012); IL-21 com papel fundamental na produção de IgG específico, porém com papel limitado na regulação da imunopatologia da toxoplasmose (STUMHOFER, SILVER e HUNTER, 2013).

Neste contexto, o papel das quimiocinas é recrutar células imunitárias por quimiotaxia e trabalho na relação hospedeiro-parasita (BRENIER-PINCHART et al., 2001). Na toxoplasmose, IL-8 / CXCL8 desempenha um papel importante no processo inflamatório da retinocoroidite toxoplásmica ativa (GONÇALVES et al., 2007) e foi visto que IP-10/CXCL10 é responsável pela manutenção da resposta de células T e o controle de *T. gondii* ocular durante a infecção crônica em ratos (NOROSE et al, 2011). Em camundongos BALB/c resistentes, as quimiocinas IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5 e MIG/CXCL9 são predominantemente induzidas no cérebro durante a infecção crônica, e a sua expressão é dependente de $IFN-\gamma$ (WEN et al., 2010).

Vários trabalhos abordaram o papel de mediadores de resposta imunológica local no controle da infecção ocular por *T. gondii* em diversos modelos experimentais (DO CARMO et al. 2014; ROCHET et. al, 2015) e em humanos em humor vítreo (DE-LA-TORRE et. al, 2013; SAUER et. al, 2015). Porém pouco se sabe sobre citocinas circulantes em pacientes humanos com toxoplasmose ocular (REY et al. 2014) e mais precisamente, não há estudos que abordam esse assunto em recém-nascidos congenitamente infectados categorizados pelo status clínico da lesão.

2. JUSTIFICATIVA

Citocinas e quimiocinas são biomarcadores imunológicos de grande importância na maioria das patologias, sejam elas infecciosas ou não. Na toxoplasmose, determinar estes marcadores é essencial, uma vez que na presença destas moléculas o sistema imune do hospedeiro reage ao parasito de maneira a limitar a infecção e ainda se protege de uma eventual reação exacerbada com consequente dano tecidual.

Apesar da prevalência da toxoplasmose congênita ainda permanecer alta, são inúmeras as dificuldades dos estudos relacionados a este modo de transmissão. Com isso, encontramos na literatura análises convencionais dos aspectos imunológicos ou avaliações em modelos experimentais que dificultam a transposição dos achados para humanos.

Deste modo, evidenciamos a relevância deste estudo, que visa identificar os biomarcadores envolvidos com a toxoplasmose em recém-nascidos com toxoplasmose congênita e suas associações com aspectos clínicos da infecção por *T. gondii*.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil de quimiocinas e citocinas séricas em recém-nascidos com diferentes manifestações da toxoplasmose congênita ocular.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil de quimiocinas (IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8) e citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF, IFN- γ e IL-17A) plasmáticas em crianças com Toxoplasmose Congênita;
- Determinar o padrão de quimiocinas (IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8) e citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF, IFN- γ e IL-17A) plasmáticas em crianças apresentando diferentes manifestações clínicas de lesão ocular da toxoplasmose congênita;
- Estabelecer o perfil de assinatura de quimiocinas (IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8) e citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF, IFN- γ e IL-17A) plasmáticas em crianças apresentando diferentes manifestações clínicas de lesão ocular da toxoplasmose congênita;
- Identificar possíveis biomarcadores relacionados às diferentes manifestações clínicas de lesão ocular;
- Empregar ferramentas de aprendizagem de máquina para caracterizar as conexões em redes de biomarcadores plasmáticos em crianças apresentando diferentes manifestações clínicas de lesão ocular da toxoplasmose congênita.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de estudo

Este é um estudo transversal realizado pelo Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita UFMG, aprovado pelo comitê de ética da UFMG (COEP), protocolo 298/06. Um fluxograma que ilustra a triagem neonatal para toxoplasmose congênita, incluindo o rastreio e testes serológicos de confirmação, bem como a análise de fundo de olho empregada para agrupar a população de estudo é fornecida na Figura 1.

Amostras de sangue seco coletado em papel filtro, por meio de punção do calcanhar, foram obtidos de 220 recém-nascidos imediatamente depois do nascimento, no período de 01 de novembro de 2006 a 31 de maio de 2007. Com essas amostras foram realizadas pesquisa de IgM anti-*T.gondii* utilizando teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Q-Preven® TOXO, Biomerieux, France). Recém-nascidos que tiveram resultados negativos nesse teste foram excluídos da pesquisa. Nos bebês que apresentaram resultado positivo, foi realizada uma segunda coleta de sangue, obtida por meio de punção venosa no período de 30-45 dias após o nascimento, para pesquisa de anticorpos IgG e IgM (ELFAVIDAS® TOXO, Biomerieux, France) e IgA (IgA TOXO ELISA Bio-Rad, France) anti-*T. gondii*, para realização de diagnóstico confirmatório da toxoplasmose congênita.

Lactentes que tiveram o resultado negativo para IgM anti-*T.gondii* foram excluídos. Já os que tiveram resultados positivos para IgG, IgM ou IgA anti-*T.gondii* passaram por uma nova coleta de sangue realizada por punção venosa, um ano depois, para realização de teste de IgG anti-*T.gondii* (ELFAVIDAS® TOXO, Biomerieux, France), conclusivo para o diagnóstico. Bebês com resultados finais negativos foram classificados como grupo controle não infectado (NI, n=22). Bebês com resultado final positivo foram categorizados como infectados com toxoplasmose congênita (grupo TOXO, n=121).

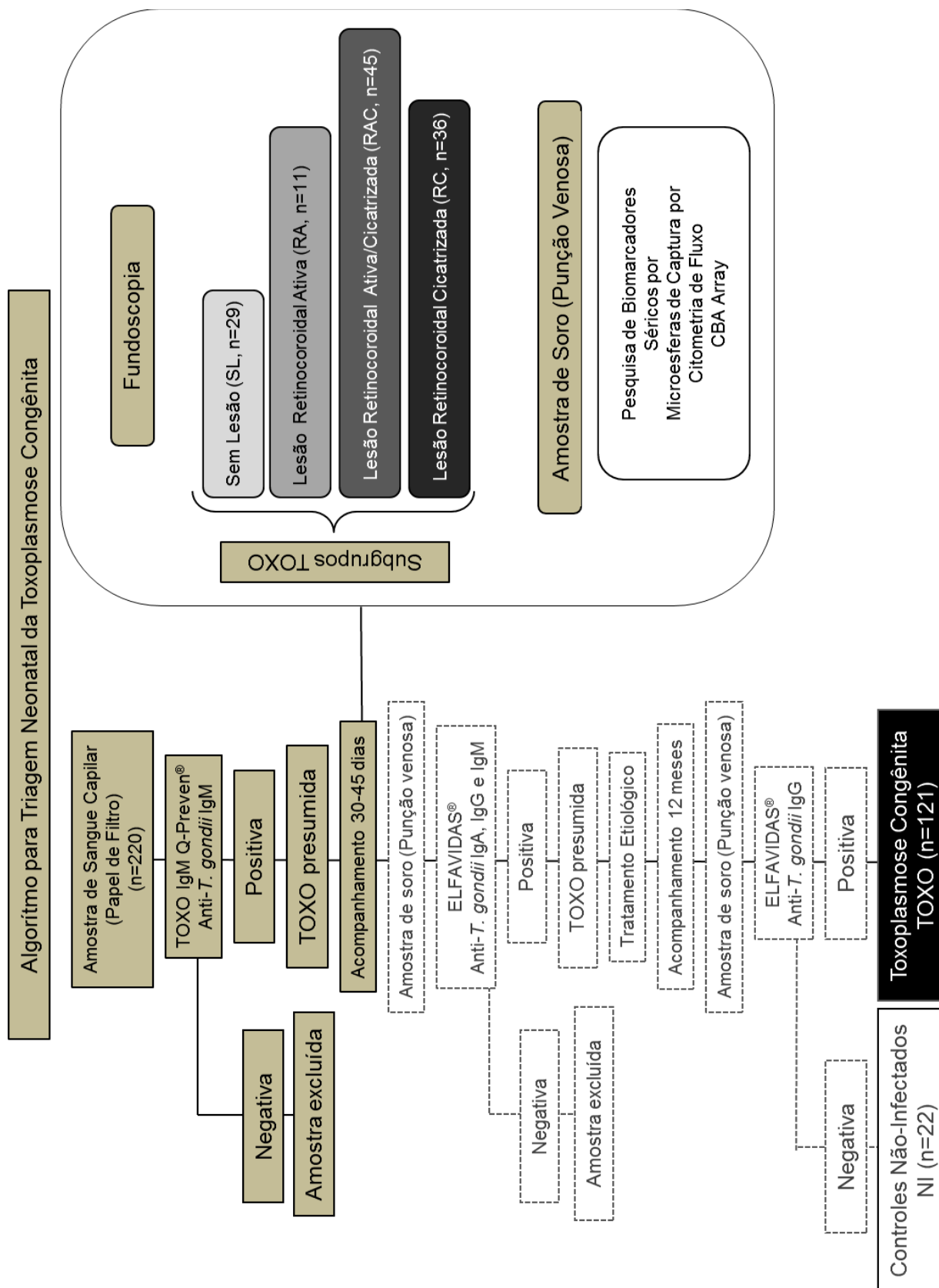


Figura 1: Fluxograma de triagem neonatal para toxoplasmose congênita (TOXO). Amostras de sangue total seco (punção no calcanhar) foram coletadas de 220 bebês imediatamente após o nascimento. Anticorpos IgM anti-*T. gondii* foram utilizados para selecionar o grupo "TOXO presumida". Amostras de soro foram obtidas do grupo "TOXO presumida" em 30-45 dias após o nascimento, para confirmação do diagnóstico por meio de pesquisa de

anticorpos IgG / IgM / IgA anti-*T.gondii*. Lactentes com resultados positivos do grupo "TOXO presumida" foram acompanhados por um ano para executar teste sorológico conclusivo por meio de pesquisa de IgG anti-*T.gondii*. Lactentes com resultados negativos finais foram classificados como grupo controle não infectado (NI, n = 22,). Lactentes com resultados positivos finais foram categorizados como grupo infectado com toxoplasmose congênita (TOXO, n = 121,). Com base no status de análise de fundo de olho, as crianças TOXO foram sub agrupadas em 4 categorias referidas como: (i) crianças sem lesões retinocoroideanas (NL, n = 29,); (ii) crianças apresentando lesões retinocoroideanas ativas (ARL, n = 11,); (iii) crianças com lesões retinocoroideanas ativas / cicatriciais (ACRL, n = 45), e (iv) as crianças com lesões cicatriciais retinocoroideanas (CRL, n = 36,). As amostras de soro coletadas em 30-45 dias após o nascimento foram armazenadas a -80 ° C e utilizadas para análises quimiocinas e citocinas séricas por meio de ensaio de citometria de fluxo de alta sensibilidade.

Todas as crianças incluídas nesse estudo receberam assistência médica de especialistas com experiência em doenças infecciosas e foram submetidos à avaliações oftalmológicas. Todos os pacientes classificados como NI não apresentaram nenhuma alteração oftalmológica. Baseada na análise fundoscópica, o grupo TOXO foi subdividido em quatro categorias: bebês sem lesão retinocoroidal (SL=29); bebês com lesão retinocoroidal ativa (RA=11); bebês com lesões retinocoroidais ativa e cicatrizada (RAC=45) e bebês com lesão cicatrizada (RC=36).

As amostras de soro coletadas no período de 30-45 dias depois do nascimento foram estocadas a -80°C e utilizadas para análises de biomarcadores séricos (IL-8/CXCL-8, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF, IFN- γ e IL-17A), utilizando de citometria de fluxo.

4.2 Citometria de fluxo - "Cytometric bead Array (CBA)"

Os níveis das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF, IFN- γ e IL-17A em amostra de soro de lactentes com toxoplasmose congênita foram mensuradas usando o teste de alta sensibilidade Cytometric Bead Array (Flex enhanced sensitivity CBA Kits - BD® Biosciences, San Jose, CA, USA). As etapas do protocolo foram seguidas de acordo com as instruções do fabricante.

As quimiocinas MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, IL-8/CXCL8, MIG/ CXCL9 e IP-10/ CXCL10 também foram avaliadas no soro de lactentes com toxoplasmose congênita utilizando o kit Cytometric Bead Array (CHEMOKINE CBA Kit - BD® Biosciences, San Jose, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A aquisição de dados da citometria de fluxo foi realizada usando o citômetro de fluxo BD FACSVers (Becton Dickinson, La Jolla, CA, USA) e o software BD FACSuite™ (Becton Dickinson, La Jolla, CA, USA) e para a análise o FCAP Array™ Software Version 3.0 (Becton Dickinson, La Jolla, CA, USA). Os resultados foram expressos em fg/mL, tal como avaliado pela curva padrão, utilizando regressão logística. De acordo com o Kit, O limite de detecção para cada quimiocina é 0.2 (IL-8/CXCL8), 1.0 (RANTES/CCL5), 2.5 (MIG/CXCL9), 2.7 (MCP-1/CCL2) e 2.8 (IP-10/CXCL10) pg/ml. Já no

imunoensaio de alta sensibilidade utilizado para mensurar as citocinas o intervalo de detecção é de 274 a 200,000 fg / ml.

4.2 Análise de dados

Os níveis de quimiocinas e citocinas mensurados no plasma obtidos de pacientes com toxoplasmose foram comparados por testes não paramétricos baseados na análise de variância (ANOVA), teste Kruskal–Wallis seguido de teste Dunn's para comparações múltiplas. Para análise de dados foi utilizado o programa The Graphpad Prism software version 6.0 (San Diego, CA, USA).

Para avaliar as várias associações entre os biomarcadores avaliados nos lactentes com toxoplasmose congênita, uma matriz de correlações entre os níveis de citocinas e quimiocinas secretadas no plasma dos recém-nascidos foi calculada para cada grupo clínico.

4.3 Análise de assinatura de biomarcadores

Nesta análise de dados, inicialmente, todo o universo de dados de cada citocina e de quimiocinas foi usado para calcular a mediana global, usada como o ponto de corte para classificar crianças como *baixos* ou *altos* produtores de um determinado biomarcador. Uma vez que foram estabelecidos os pontos de corte para cada biomarcador, foram selecionadas crianças com contagens elevadas de biomarcadores e montados os dados usando diagramas para calcular a frequência daqueles para cada grupo clínico. Dados relevantes (> 50%) foram então destacadas em negrito / sublinhado formato. O programa GraphPad Prism 6.00 (San Diego, EUA) foi utilizado para artes gráficas.

4.4 Rede de biomarcadores séricos

Para avaliar a associação entre as citocinas e quimiocinas, o coeficiente de correlação de Spearman e significância foram calculados. A correlação entre os biomarcadores é calculada com o intuito de verificar se existe um inter-relacionamento entre essas duas variáveis quantitativas. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$. O índice de correlação (r) foi utilizado para categorizar a força de correlação como negativa ($r < 0$), moderada ($0,36 > r > 0,67$) e mais forte $> 0,68$ (Taylor, 1990). A correlação negativa indica que o crescimento de uma das variáveis implica, em geral, no decréscimo da outra. A correlação positiva indica, em geral, o crescimento ou decréscimo concomitante das duas variáveis consideradas. O software Graphpad Prism 6.0 (San Diego, EUA) foi utilizado a análise de dados e o Cytoscape

(versão 2.8) utilizado para as artes da rede.

5. RESULTADOS

5.1 Lactentes com Toxoplasmose congênita apresentam uma proeminente produção de quimiocinas mediada por MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8

Os níveis de quimiocinas séricas em lactentes com toxoplasmose congênita são apresentadas na Figura 2A. A análise de dados demonstrou que níveis aumentados de IL-8/CXCL8, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5 foram observados no grupo TOXO em comparação ao grupo NI. Não foi observada diferença significativa entre os grupos, em relação a produção de MCP-1/CCL2. Esses dados indicam uma produção relevante de quimiocinas no período de 30-45 dias após o nascimento de bebês com toxoplasmose congênita.

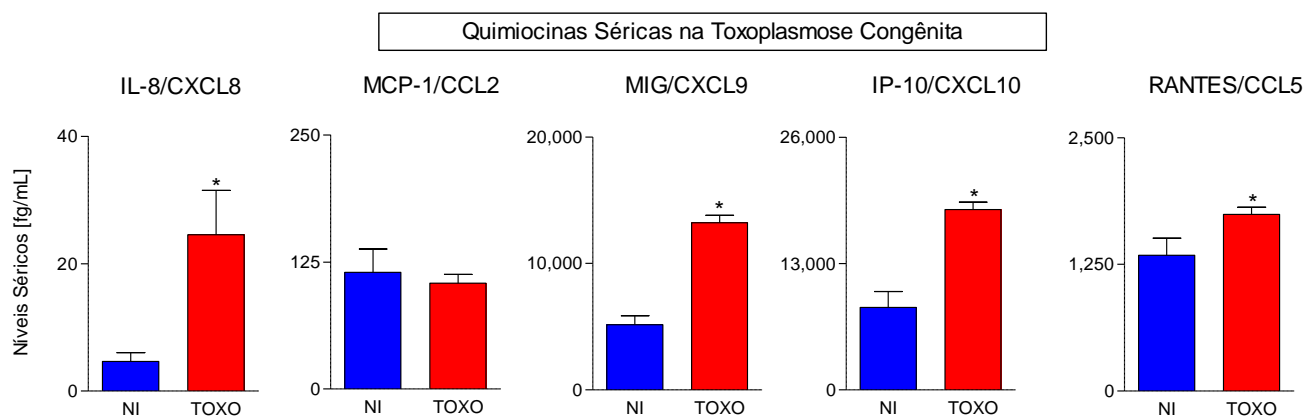


Figura 2: Perfil de quimiocinas séricas de crianças com toxoplasmose congênita. Níveis de quimiocina (IL-8 / CXCL8, MCP-1 / CCL2, MIG / CXCL9, IP-10 / CXCL10 e RANTES / CCL5) foram mensuradas em amostras de soro coletadas a 30-45 dias após o nascimento, através de pesquisa de biomarcadores séricos por microesferas de captura por Citometria de Fluxo (CBA Array), como descrito em materiais e métodos. As medições dos níveis séricos de quimiocina foram efetuadas em recém-nascidos com toxoplasmose congênita (TOXO, n = 121), em comparação com grupo de controle não infectado (NI, n = 22,). Os resultados são apresentados em gráficos de barras com a média de concentração de soro (fg / ml) \pm erro padrão. O intervalo confidencial 95% (IC 95%) para cada biomarcador foi calculado para o grupo de NI e utilizados como valores de referência para a análise comparativa dos subgrupos. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) são destacadas por um asterisco (*) para comparações com o grupo NI.

5.2 Enquanto IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 são biomarcadores gerais associados à lesão ocular, MIG/CXCL9 aparece como um marcador seletivo para lesão retinocoroidal ativa.

Com o intuito de caracterizar a presença e o estado da lesão retinocoroidal associado ao padrão de quimiocinas, foi quantificado os níveis séricos de IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5 nos subgrupos TOXO. Os resultados estão apresentados na Figura 2B. O intervalo de confiança (IC) de 95% dos níveis de quimiocinas

observado no grupo NI (retângulos cinzas) foi usado como intervalo de referência. A análise dos dados demonstrou o aumento dos níveis de MIG/CXCL9 e RANTES/CCL5 em bebês com toxoplasmose congênita independentemente da presença de lesão ocular comparado ao intervalo de referência de NI. Aumento nos níveis de IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 foi observado em bebês com lesão retinocoroidal, enquanto que somente no grupo SL foram observados valores dentro do intervalo de referência de NI. Níveis séricos de MIG/CXCL9 foram significativamente maiores no grupo de bebês RA comparado a SL, RAC e RC. (Figura 3).

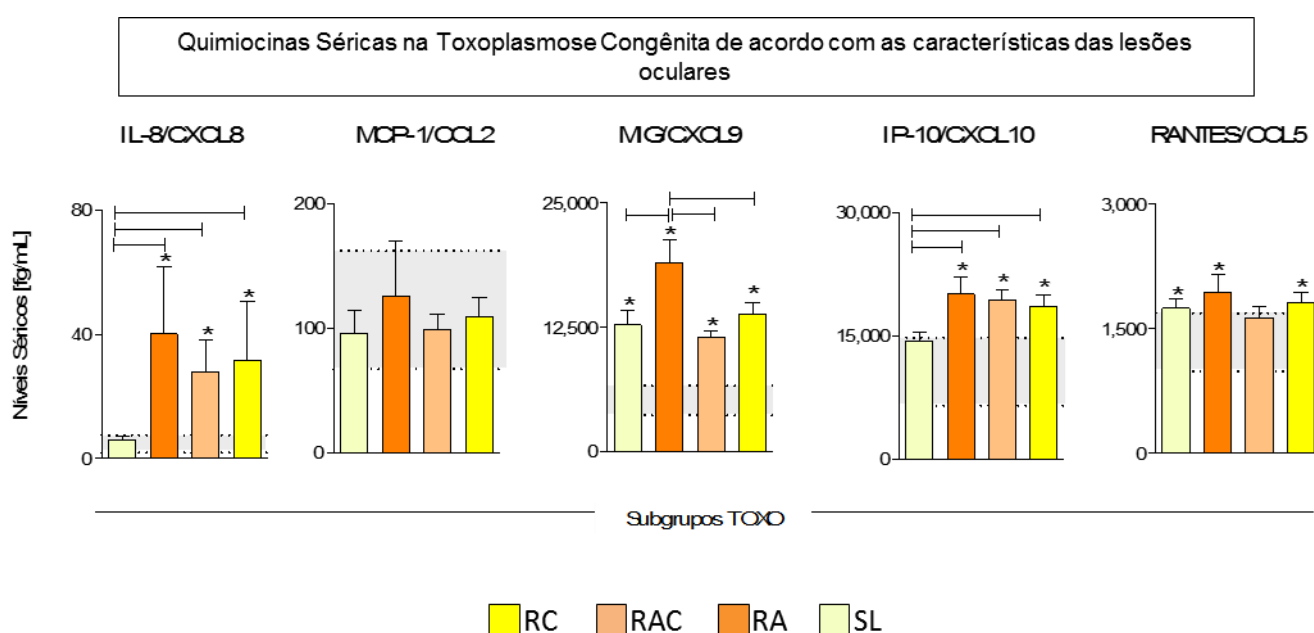


Figura 3: Perfil de quimiocinas séricas de crianças com toxoplasmose congênita de acordo com as lesões retinocoroideanas. Níveis de quimiocinas (IL-8 / CXCL8, MCP-1 / CCL2, MIG / CXCL9, IP-10 / CXCL10 e RANTES / CCL5) foram mensuradas em amostras de soro coletadas a 30-45 dias após o nascimento, através de pesquisa de biomarcadores séricos por microesferas de captura por Citometria de Fluxo (CBA Array), como descrito em materiais e métodos. Essas quimiocinas foram quantificadas em subgrupos TOXO categorizados de acordo com o estado da lesão retinocoroideanas como: crianças sem lesões retinocoroideanas (SL, n = 29,); crianças apresentando lesões retinocoroideanas ativas (RA, n = 11,); crianças com lesões retinocoroideanas ativas/cicatriciais (RAC, n = 45), e crianças com lesões cicatriciais retinocoroideanas (RC, n = 36,). Os resultados são apresentados em gráficos de barras com a média de concentração de soro (fg / ml) ± erro padrão. O intervalo confidencial 95% (IC 95%) para cada biomarcador foi calculado para o grupo de NI e utilizados como valores de referência para a análise comparativa dos subgrupos (TOXO retângulos cinzas). As diferenças estatísticas (p < 0,05) são destacadas por um asterisco (*) para comparações com o grupo NI. Além disso, as diferenças significativas entre os subgrupos TOXO para p < 0,05 são identificados por linhas de conexão.

5.3 O grupo TOXO é caracterizado por um padrão misto de citocinas de perfil pró-inflamatório/regulatório mediado por IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10

Os níveis de citocinas mensurados em amostras de soro de lactentes com toxoplasmose congênita são mostrados na Figura 4. Níveis aumentados de IL-6 e IFN- γ contrabalanceado pelo aumento da concentração de IL-4, IL-5 e IL-10 foram observados no grupo TOXO comparado ao NI. Em relação às citocinas IL-1 β , TNF, IL-12 e IL-17, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de produção entre os grupos TOXO e NI.

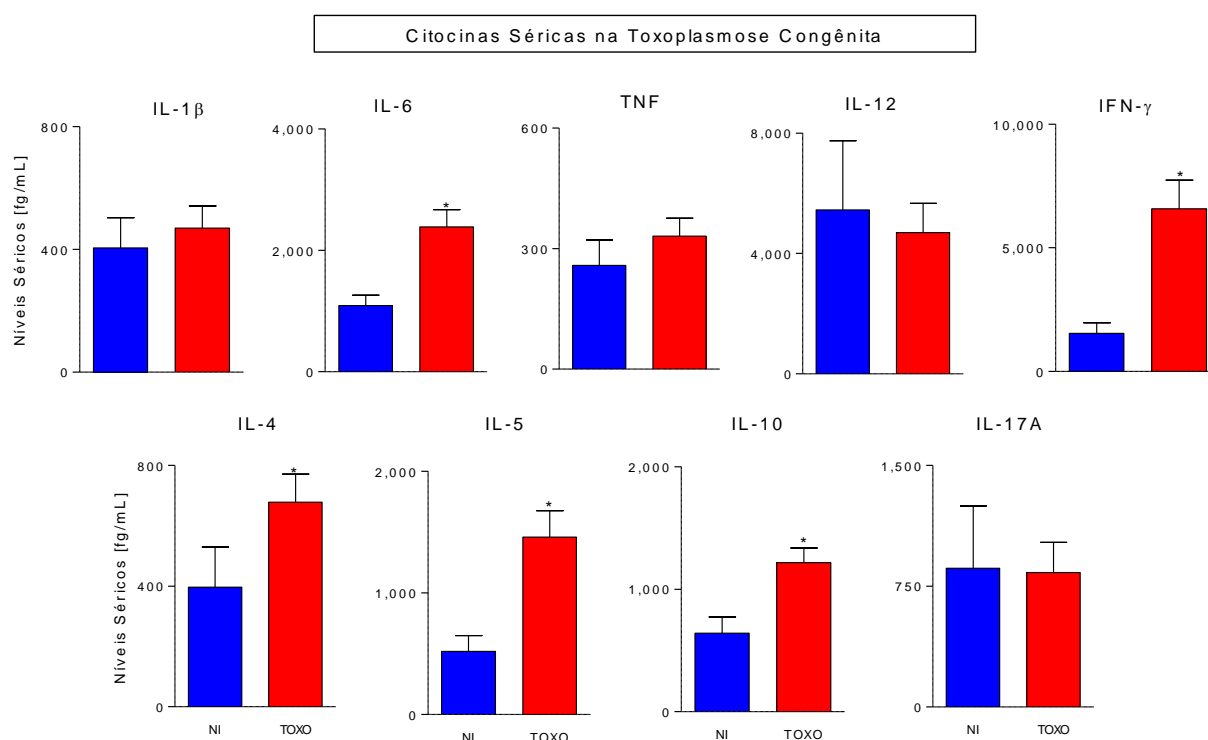


Figura 4: Perfil de citocinas séricas de crianças com toxoplasmose congênita. Os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17A) foram mensurados em amostras de soro colhidas a 30-45 dias após o nascimento usando um ensaio utilizando microesferas de captura por Citometria de Fluxo (CBA Array), conforme descrito no material e Métodos. (A) As medições dos níveis de citocinas no soro foram realizadas em lactentes com toxoplasmose congênita (TOXO, n = 121), e em comparação com grupo de controle não infectado (NI, n = 22). Os resultados são apresentados em gráficos de barras com a média de concentração de soro (fg / ml) \pm erro padrão. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) são destacadas por um asterisco (*) para comparações com o grupo NI.

5.4. Enquanto TNF é apresentado como um biomarcador para o grupo SL e IFN- γ e IL-5 no grupo RA, IL-10 aparece como um mediador relevante nos grupos RAC/RC

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias observados nas amostras de soro dos diferentes subgrupos TOXO, categorizados de acordo com o status da lesão

retinocoroidiana são apresentados na Figura 5. O IC de 95% dos níveis de citocinas observados no grupo NI (retângulos cinzas) são usados como intervalo de referência. Esses resultados revelam níveis aumentados de IL-6, IFN- γ e IL-5 observados nos subgrupos de TOXO, comparado com intervalo de referência de NI.

No entanto, foi visto o aumento dos níveis IFN- γ e, surpreendentemente, IL-5 no grupo RA (Figura 5). Os níveis séricos de TNF foram maiores significativamente em lactentes SL em comparação com os grupos RA, RAC e RC, sugerindo o seu potencial como um biomarcador precoce associado com a ausência de lesão ocular em toxoplasmose congênita. Curiosamente, níveis elevados de IL-10 foram observados nos grupos RAC e RC, demonstrando a relevância deste biomarcador como um mediador de eventos cicatriciais de lesão retinocoroidal. Não houve diferença nos níveis das citocinas IL-1 β , IL-12 e IL-17A observadas em amostras de soro a partir de subgrupos TOXO, em comparação com o NI (Figura 5). No entanto, a ausência de lesão retinocoroidal foi particularmente associada com níveis de IL-17A confinados na fração inferior do intervalo de referência NI (Figura 5).

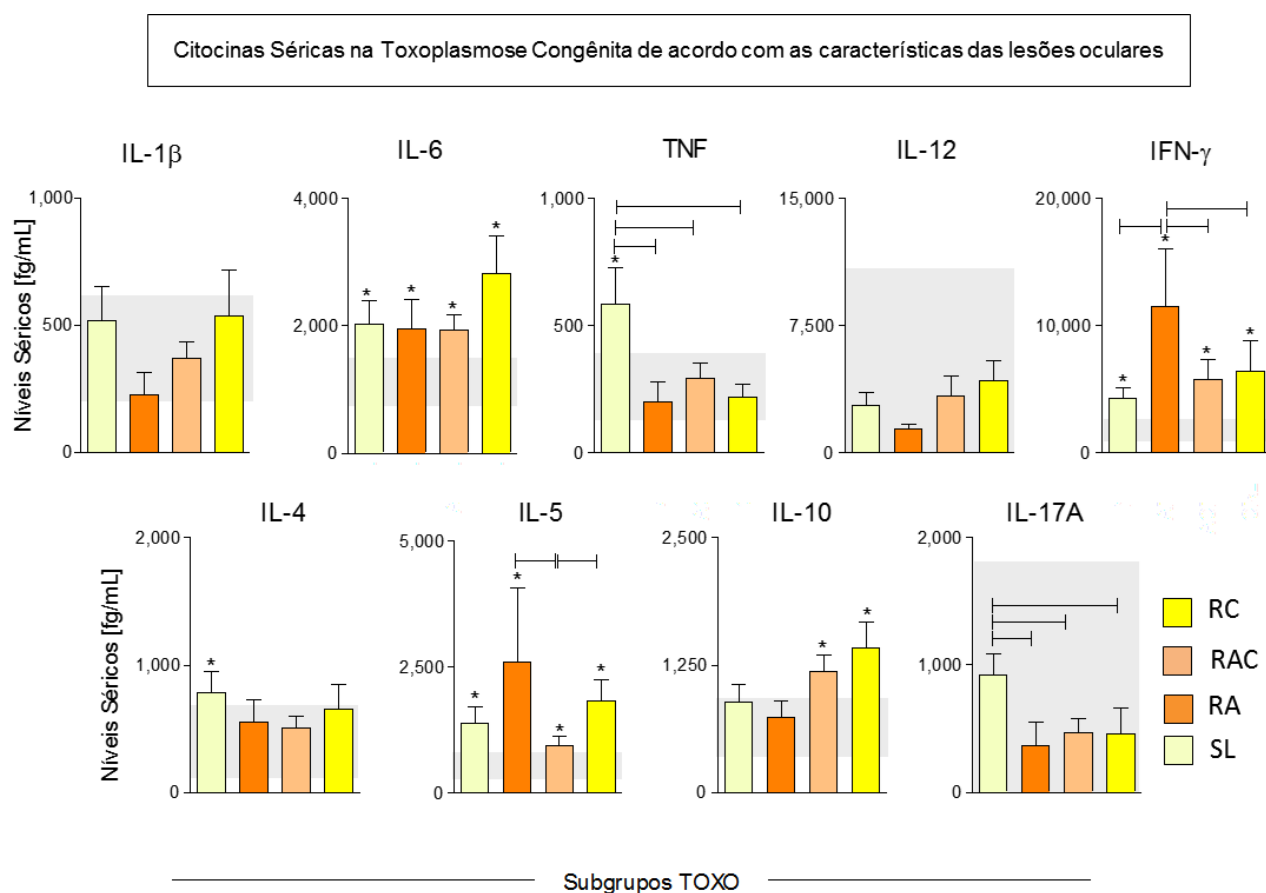


Figura 5: Os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17A) foram mensurados em amostras de soro colhidas a 30-45 dias após o nascimento usando um ensaio utilizando microesferas de captura

por Citometria de Fluxo (CBA Array), conforme descrito em Material e Métodos. Os níveis dessas citocinas foram quantificados em subgrupos TOXO categorizados de acordo com o estado da lesão retinocoroideana, como: crianças sem lesões retinocoroideanas (SL, n = 29,); crianças apresentando lesões retinocoroideanas ativas (RA, n = 11,); crianças com lesões retinocoroideanas ativas/cicatriciais (RAC, n = 45), e crianças com lesões cicatriciais retinocoroideanas (RC, n = 36,). O intervalo de confiança 95% (IC 95%) para cada biomarcador foi calculado para o grupo NI e utilizados como valores de referência para a análise comparativa dos subgrupos TOXO (retângulos cinzas.). As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) são destacadas por um asterisco (*) para comparações com o grupo NI e as diferenças significativas entre os subgrupos TOXO para $p < 0,05$ são identificados por linhas de conexão.

5.5. As assinaturas de biomarcadores séricos corroboram que o grupo TOXO é caracterizado por uma profícua produção de quimiocinas/citocinas com um amplo conjunto de mediadores proinflamatórios/reguladores.

A assinatura de biomarcadores foi elaborada para compilar a frequência de pacientes com altos níveis de biomarcadores séricos (Figuras 6 e 7), pretendendo eleger esses dados como possíveis atributos para caracterizar os eventos imunológicos relacionados à toxoplasmose congênita.

Diagramas para Cálculo das Frequências de Recém-Nascidos com Altos Níveis de Biomarcadores

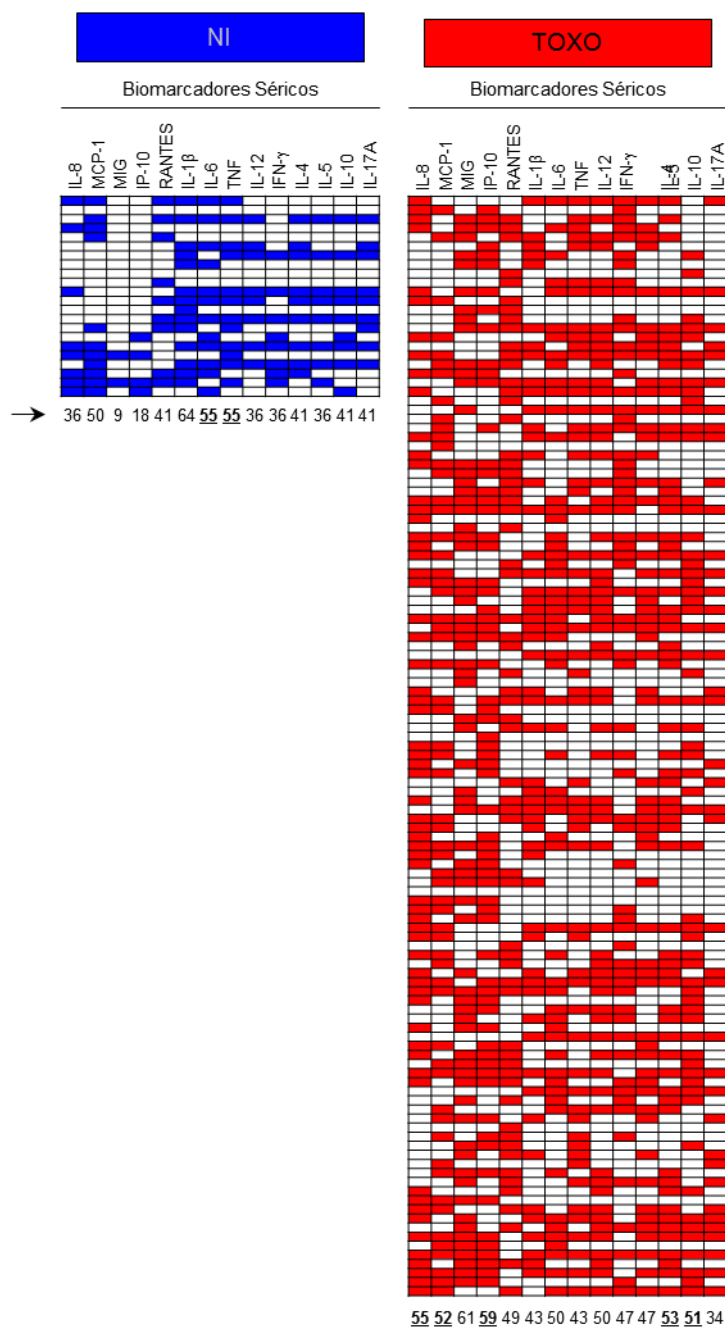


Figura 6: Diagrama para cálculos das frequências de recém-nascidos com altos níveis de biomarcadores nos grupos NI e TOXO. Todo o universo de dados de cada citocina (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17A) e de quimiocinas (IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5) foi usado para calcular a mediana global, usada como o ponto de corte para classificar crianças como *baixos* ou *altos* produtores de um determinado biomarcador. Uma vez que foram estabelecidos os pontos de corte para cada biomarcador, foram selecionadas crianças com contagens elevadas de biomarcadores e montados os dados usando diagramas para calcular a frequência daqueles para cada grupo clínico. Dados relevantes (> 50%) estão destacadas em negrito. Os retângulos coloridos representam os altos produtores, sendo azul para pacientes do grupo NI e vermelho para o grupo TOXO. (As curvas ascendentes de frequência para altos produtores de todos os grupos TOXO são exibidas nas figuras 8 e 9).

Diagramas para Cálculo das Frequências de Recém-Nascidos com Altos Níveis de Biomarcadores
Subgrupos de TOXO

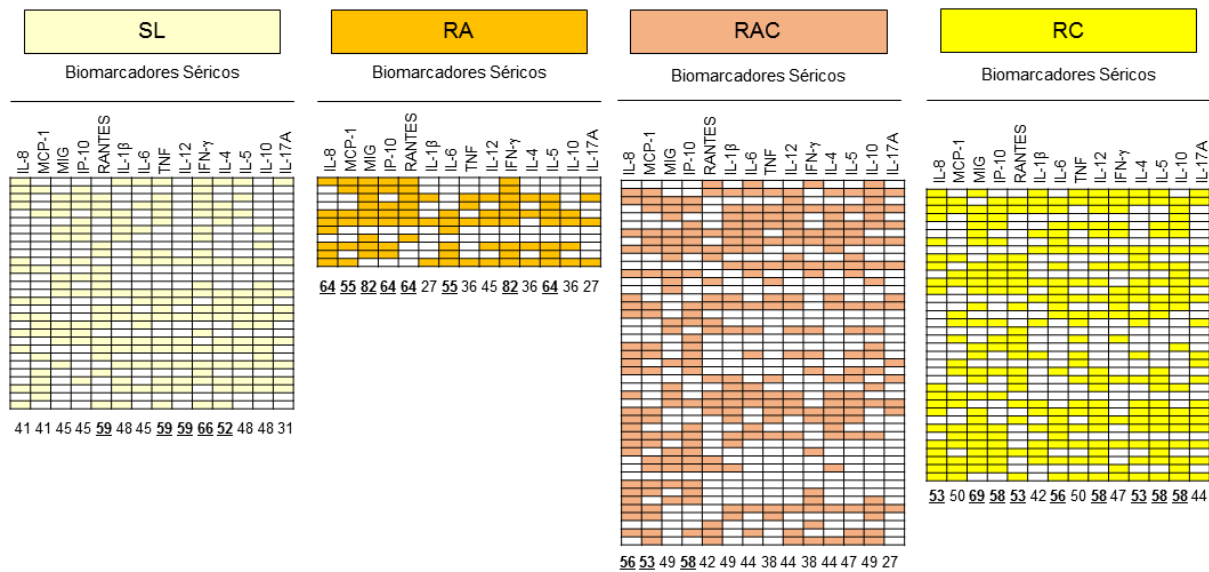


Figura 7: Diagrama para cálculos das frequências de recém-nascidos com altos níveis de biomarcadores nos subgrupos TOXO. Todo o universo de dados de cada citocina e de quimiocinas foi usado para calcular a mediana global, usada como o ponto de corte para classificar crianças como *baixos* ou *altos* produtores de um determinado biomarcador. Uma vez que foram estabelecidos os pontos de corte para cada biomarcador, foram selecionadas crianças com contagens elevadas de biomarcadores e montados os dados usando diagramas para calcular a frequência daqueles para cada subgrupo clínico. Dados relevantes (> 50%) estão destacadas em negrito. Os retângulos coloridos representam os altos produtores, sendo amarelo claro: pacientes SL; laranja: pacientes RA; salmão: pacientes RAC e amarelo-ouro: pacientes RC.

Utilizando análise categórica descritiva foi possível selecionar os biomarcadores mais relevantes observados em mais de 50% dos indivíduos de cada grupo (Figure 8 – retângulos cinzas). As assinaturas de quimiocinas/citocinas de TOXO e NI são apresentadas na Figura 8. As análises de dados demonstraram que NI exibe um pequeno conjunto de biomarcadores com frequência maior que 50%, incluindo MCP-1/CCL2, IL-6, TNF e IL-1 β (Figura 8). Por outro lado, o grupo TOXO mostrou uma assinatura de biomarcadores robusta, composta por frequências relevantes de IL-10, INF- γ , RANTES/CCL5, IL-12, IL-5, IL-8, IP-10/CXCL10 e MIG/CXCL9.

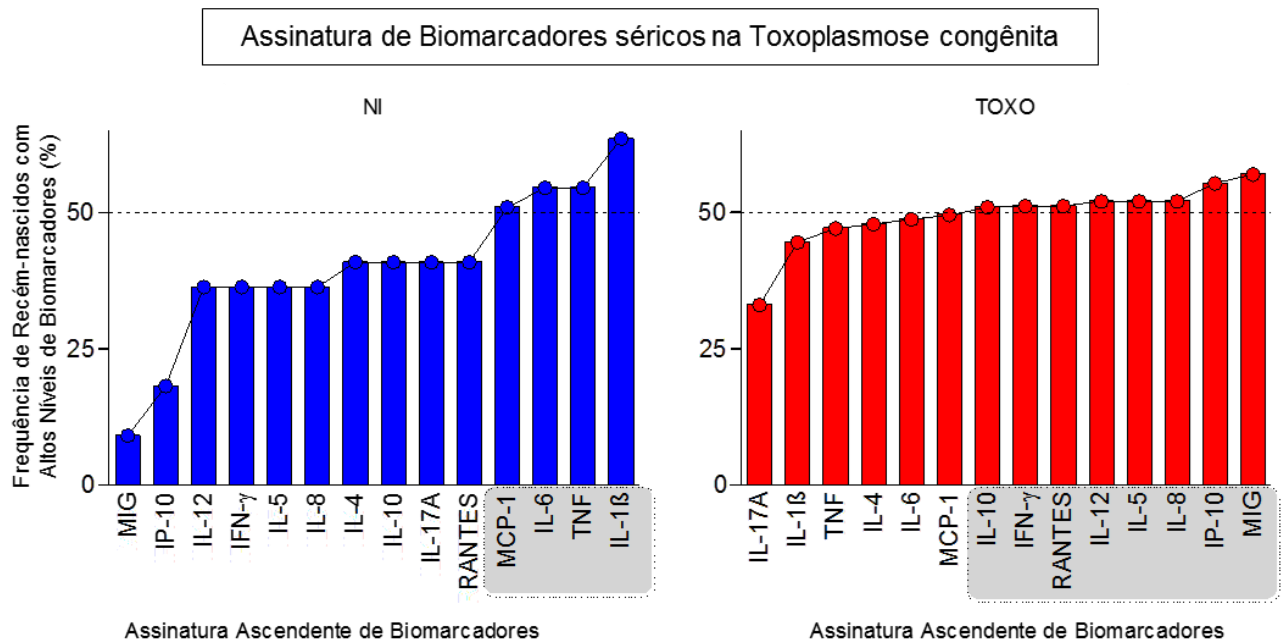


Figura 8: Análises de biomarcadores séricos na toxoplasmose congênita. Análises quantitativas de biomarcadores realizadas por citometria de fluxo de alta sensibilidade foram realizadas para medir os níveis séricos de quimiocinas (IL-8 / CXCL8, MCP-1 / CCL2, MIG / CXCL9, IP-10 / CXCL10, e RANTES / CCL5) e citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17A). Os valores da mediana global de cada biomarcador foi calculado levando em conta todo o universo dos dados, e foram utilizadas como ponto de corte para classificar as crianças como "baixo" ou "alto" produtores de biomarcadores. A frequência dos "altos" foi usado para montar as curvas ascendentes referidos como "assinaturas de biomarcadores séricos" para cada grupo clínico. As assinaturas de biomarcadores ascendentes do TOXO e NI são apresentados em gráficos de barras e linhas. As frequências relevantes de "altos produtores" ($\geq 50\%$) são destacados por retângulos cinzas na parte inferior da cada gráfico.

5.6 IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 são indicadores de amplo espectro de doença ocular, enquanto TNF é um biomarcador para SL, IFN- γ e MIG/CXCL9 apontam para ARL e IL-10 é destacada como um verdadeiro biomarcador sérico de ACRL/CRL

As assinaturas de quimiocinas/citocinas construídas para os subgrupos TOXO de acordo com o tipo de lesão retinocoroidal são apresentadas na Figura 9. Após a seleção dos mediadores mais relevantes que foram observados em mais de 50% dos indivíduos em cada grupo clínico (Figura 9 - retângulos cinzas), os resultados mostraram que a IL-8/CXCL8 é um atributo universal observado nas assinaturas de biomarcadores de lactentes com lesões oculares causadas por *T. gondii*, independentemente do nível de morbidade (Figura 9 - círculos). Enquanto o subgrupo SL apresenta um número restrito de biomarcadores com frequência de altos produtores acima de 50% (IL-4, TNF, IL-12, RANTES/CCL5 e IFN- γ), RA apresenta uma assinatura mais proeminente com maiores frequências de alto produtores, incluindo IL-6, MCP-1/CCL2, IL-5, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5 e um pico composto por IFN- γ e MIG/CXCL9 (Figura 9 – semicírculo). Outro resultado de destaque foi a notável presença

seletiva de IL-10 entre os atributos inseridos na assinatura de biomarcadores dos grupos RAC e RC (Figura 9 - retângulos).

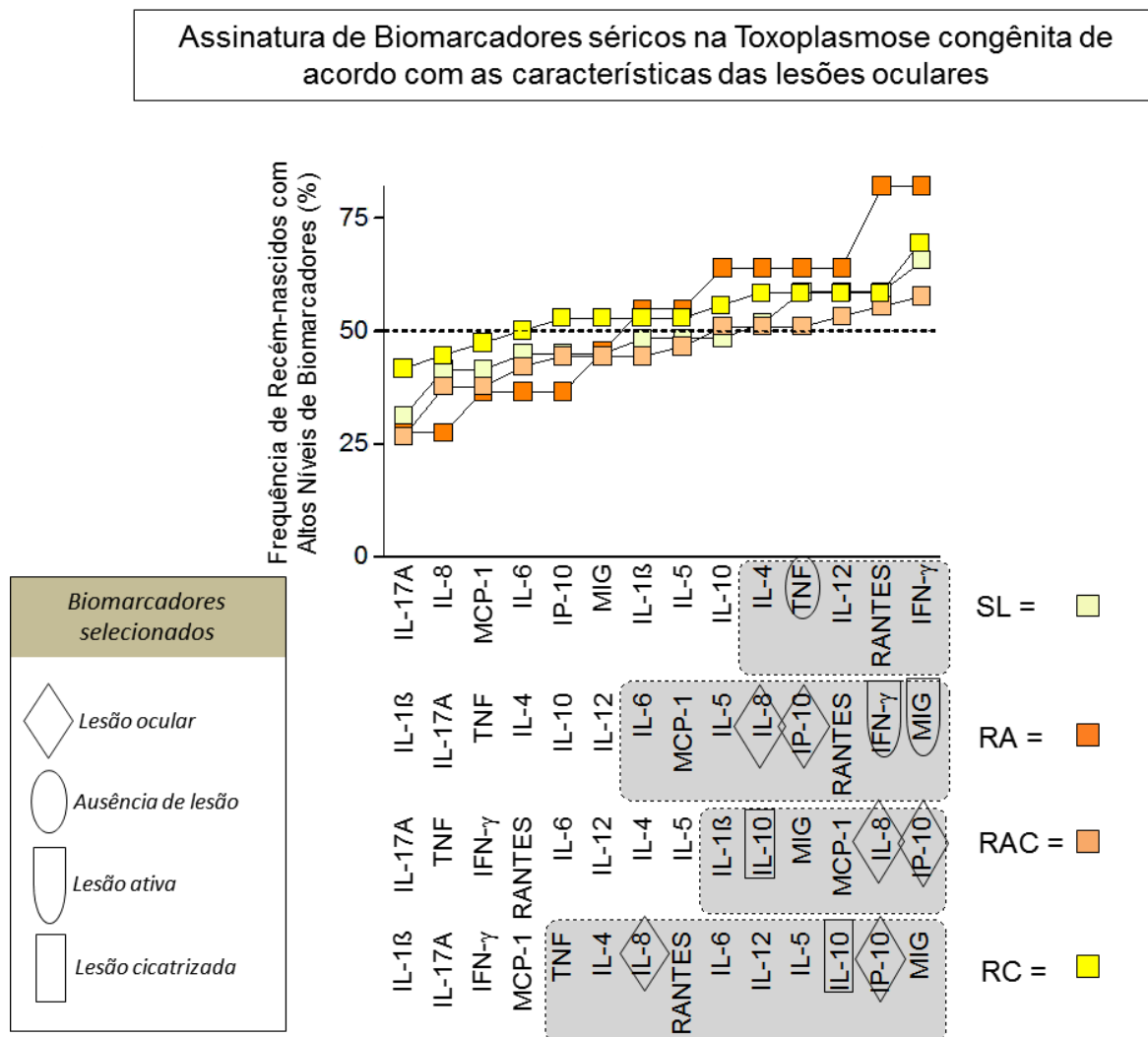


Figura 9: Análises de biomarcadores séricos na toxoplasmose congênita de acordo com as lesões retinocoroideanas. Análises quantitativas de biomarcadores realizadas por citometria de fluxo de alta sensibilidade foram realizadas para medir os níveis séricos de quimiocinas (IL-8 / CXCL8, MCP-1 / CCL2, MIG / CXCL9, IP-10 / CXCL10, e RANTES / CCL5) e citocinas (IL-1β, IL-6, TNF, IL-12, IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17A). Os valores da mediana global de cada biomarcador foi calculado levando em conta todo o universo dos dados, e foram utilizadas como ponto de corte para classificar as crianças como "baixo" ou "alto" produtores de biomarcadores. A frequência dos "altos" foi usado para montar as curvas ascendentes referidos como "assinaturas de biomarcadores séricos" para cada grupo clínico. Assinaturas de biomarcadores ascendentes dos subgrupos TOXO, categorizados de acordo com o estado da lesão retinocoroideana (NL,; ARL,; ACRL e CRL,) são apresentados por curvas de sobreposição. Frequências relevantes de "altos produtores" (≥50%) são destacadas por retângulos cinzas na parte inferior do gráfico. Biomarcadores selecionados com provável associação com morbidade da toxoplasmose congênita são realçados por símbolos geométricos fornecidos na figura (= biomarcador de amplo espectro associado com a presença de lesão ocular; = seletiva biomarcador relacionado à ausência de lesão; = biomarcadores relacionados com a lesão ativa ; = biomarcador de lesão cicatricial).

5.7 A ampla interação entre quimiocinas/citocinas mediada por negativas correlações na rede TOXO contrasta com uma pequena ponte de IL-10 observada na rede NI.

Por último, a análise de redes de quimiocinas/citocinas foi projetada para entender a relação e cruzamentos entre biomarcadores séricos, como indicado pelo índice de correlação. Esta abordagem representa um novo conceito de biologia de sistemas para integrar os aspectos multifuncionais da resposta imune. Na nossa análise de redes de biomarcadores, vimos clara diferença entre os grupos NI x TOXO e entre os subgrupos TOXO, tanto em relação ao número de conexões quanto em relação ao tipo dessas conexões. Primeiramente, a rede TOXO apresenta mais conexões entre citocinas e quimiocinas quando comparada à rede NI, sendo a maioria dessas conexões negativa, com exceção das interações que envolvem IL-8/CXCL-8. O número de conexões de citocinas entre os biomarcadores no grupo NI é muito homogêneo.

A rede de biomarcadores séricos, caracterizada por eventos precoces da toxoplasmose congênita no período de 30-45 dias após o nascimento, é apresentada na Figura 8. As análises de dados demonstraram que o grupo TOXO mostrou evidente expansão nas conexões vizinhas no microambiente de quimiocinas, comparado à rede NI. Neste contexto, o aumento dos nódulos das quimiocinas são evidentes com IL-8/CXCL8<MIG/CCL2<IP-10/CXCL10.

Além disso, pode ser notada interação maior entre os microambientes de citocinas e quimiocinas, mediada por um grande número de arestas negativas. Apesar de ocorrer a manutenção de uma rede complexa de citocinas, um evidente enfraquecimento das forças das bordas pode ser notado em TOXO, com menores índices de correlação (Figura 10).

Redes de Biomarcadores Séricos na Toxoplasmose Congênita

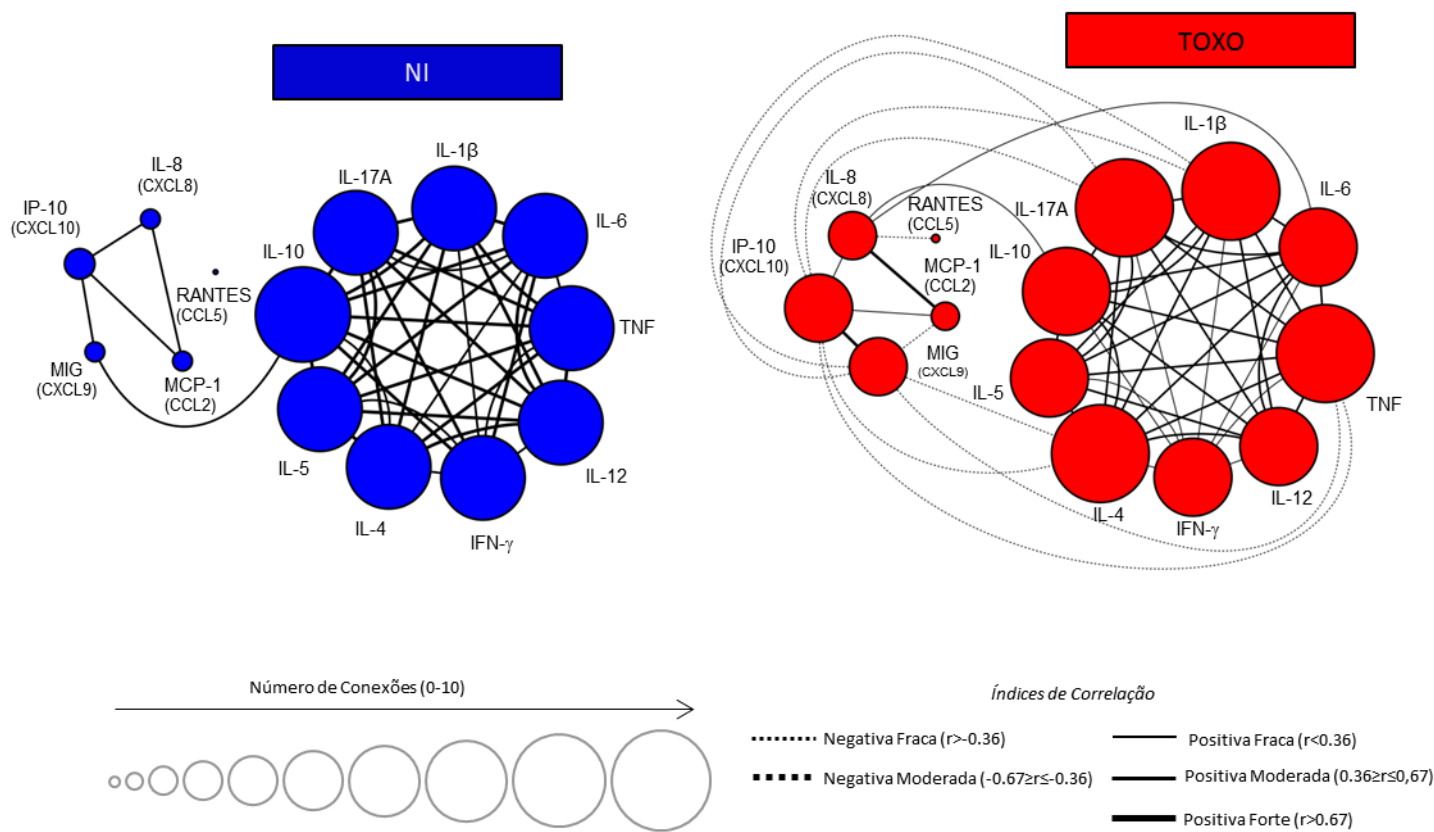


Figura 10: Rede de biomarcadores séricos em crianças com toxoplasmose congênita. Análises de correlação foram realizadas para calcular a relação entre os níveis de quimiocinas e citocinas no soro durante os eventos iniciais da toxoplasmose congênita. Matrizes de correlação foram construídos com índices significativos e layouts circulares montados para identificar a associação entre os níveis de biomarcadores séricos. Redes de biomarcadores para TOXO e NI são exibidos pela distribuição de aglomerados de nódulos para quimiocinas (micronet à esquerda) e citocinas (macronet à direita). Tamanhos dos nós refletem o número de ligações vizinhas, de 0 a 10, de acordo com a escala fornecida na figura. Correlações significativas ($p \leq 0,05$) foram representados através das conexões dos nós, sendo positivo [fraco ($r < 0,36$); moderada ($0.36 \leq r \leq 0.68$); forte ($r > 0,68$)] ou negativos [fraco ($r > -0,36$); ou moderados ($-0.68 \leq r \leq -0,36$)], tal como proposto por Taylor (1990).

5.8 A rede RA apresenta clara diminuição de conexões vizinhas, enquanto SL e RC apresentaram rede equilibrada, da mesma forma que observamos em NI

As redes de quimiocinas/citocinas elaboradas para os subgrupos TOXO de acordo com o status da lesão retinocoroidal são apresentadas na Figura 10. Uma análise geral das redes permitiu identificar que em RA houve redução notável no número de conexões vizinhas, permanecendo com algumas bordas fortes, representando elevados índices de correlação. (Figura 10).

Interessantemente, um pequeno número de conexões vizinhas pode ser observado para IFN em todos os subgrupos TOXO, é notável que, apesar da conexão entre IFN- γ /IL-12

aparecer em todos os grupos, a ligação de IFN- γ ocorre com diferentes biomarcadores em cada subgrupo vizinhança são mediados por arestas distintas, com outros biomarcadores. Com efeito, no subgrupo SL, IFN- γ mostra ligação adicional com a citocina IL-17A e TNF, enquanto em RAC, a interação com IL-5 aparece como a única aresta adicional. Além disso, em RC houve expansão no número de conexões vizinhas de IFN- γ , com ligações adicionais com IL-10, IL-5 e IL-6 (Figura 10).

Redes de Biomarcadores Séricos na Toxoplasmose Congênita de Acordo com as Características das Lesões Oculares

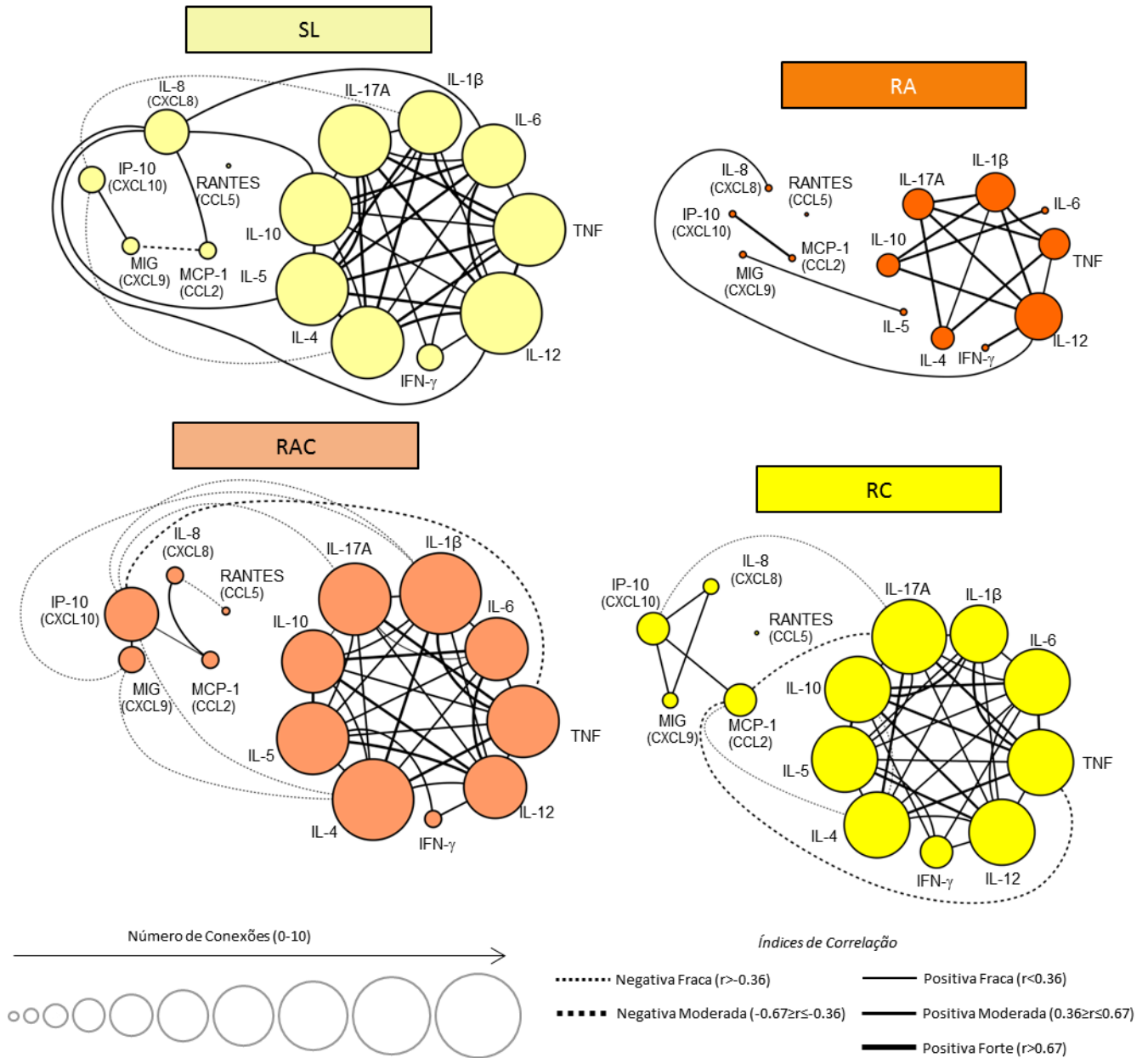


Figura 11: Redes de biomarcadores para subgrupos TOXO, categorizados de acordo com o estado da lesão retinocoroideana (SL, RA, RAC e RC) foram construídas para identificar potenciais biomarcadores, as suas ligações vizinhas e conexões relacionadas com nível de lesão retinocoroideanas. Tamanhos dos nós refletem o número de ligações vizinhas, de 0 a 10, de acordo com a escala fornecida na figura. Correlações significativas ($p \leq 0,05$) foram representados através das conexões dos nós, sendo positivo [fraco ($r < 0,36$); moderada ($0,36 \leq r \leq 0,68$); forte ($r > 0,68$)] ou negativos [fraco ($r > -0,36$); ou moderados ($-0,68 \leq r \leq -0,36$)], tal como proposto por Taylor (1990).

6. DISCUSSÃO

A infecção humana por *T. gondii* é geralmente assintomática em adultos imunocompetentes, enquanto leva à significativa morbidade em crianças infectadas congenitamente (GUGLIETTA et al. 2007). A imunidade celular desempenha o papel principal na resistência do hospedeiro e citocinas de perfil pró-inflamatório são necessárias para proteção e controle dessa infecção (DENKERS et al. 1998; STURGE et al. 2014). Enquanto isso, pouco se sabe a respeito da produção de quimiocinas e citocinas em lactentes com toxoplasmose congênita. Em relação à resposta imune celular observada nessa mesma faixa etária, nosso grupo viu o aumento do número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, além de monócitos circulantes em sangue periférico de crianças soropositivas, comparadas a soronegativas (MACHADO et al., 2014). Considerando a resposta imune humoral, a doença é caracterizada pela alta produção de anticorpos IgG1 e IgG3, sendo que indivíduos com danos oculares têm títulos de anticorpos mais elevados do que indivíduos sem doença ocular (DE JESUS et al., 2015).

Neste trabalho analisamos por citometria de fluxo, níveis séricos de cinco quimiocinas (IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5) e nove citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17A) em pacientes lactentes, com o objetivo de entender melhor a resposta imune na toxoplasmose congênita e identificar potenciais biomarcadores das diferentes manifestações da toxoplasmose ocular. Para isso utilizamos a análise de dados convencional, a assinatura de biomarcadores e as redes de biomarcadores.

Por meio dessas três análises, observamos que o perfil de resposta de quimiocinas e citocinas é misto, com ação pró-inflamatória e reguladora, e em cada subgrupo TOXO observamos potenciais biomarcadores específicos para toxoplasmose ocular. Esse perfil de resposta misto observado provavelmente ocorre devido à tentativa do organismo infectado em regular a resposta exacerbada provocada pela presença de *T. gondii*, e a partir disso, evitar dano tecidual. Entretanto, nos pacientes dos subgrupos RA e RAC essa tentativa de regulação não foi suficiente, causando lesão. Outros fatores devem ser considerados como decisivos para a ocorrência de diferentes tipos de manifestações clínicas, como as diferenças entre as cepas de *T. gondii* e susceptibilidade do hospedeiro (ALBURQUERQUE et al., 2009; BRANDÃO et al., 2009; BEHNKE et al., 2015).

Por meio da análise do perfil de quimiocinas observamos que IL-8/CXCL8, RANTES/CCL5, IP-10/ CXCL10, MIG/ CXCL9 diferiram significativamente entre os grupos controle e infectado, o que nos indica produção substancial dessas moléculas no período de 30-

45 dias após o nascimento. As quimiocinas são moléculas responsáveis pela regulação de todo processo dinâmico no tráfego celular (BRENIER-PINCHART et al. 2001), sendo assim, o aumento da concentração destas moléculas sugere a participação das células que expressam os respectivos receptores dessas quimiocinas em suas membranas.

Analisando os subgrupos, vimos um aumento de IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 em todos os grupos que apresentaram lesão. Em relação a MIG/CXCL9, os níveis dessa quimiocina foram significativamente maiores no grupo de bebês RA comparado a SL, RAC e RC, destacando-se como um biomarcador seletivo de lesão retinocoroidal ativa na toxoplasmose. Alguns estudos mostram o papel dessas quimiocinas na toxoplasmose. Níveis elevados de IL-8/CXCL8 foram vistos em soro de pacientes com toxoplasmose e foram correlacionados ao tamanho das lesões, sendo reduzidos após tratamento adequado (GONÇALVES et al., 2007). Essa citocina é produzida por monócitos, linfócitos T e neutrófilos e está relacionada à quimioatração deste último tipo celular para o sítio de infecção, além da sua adesão ao endotélio (ZEILHOFER E SCHORR, 2000; TAKAMI, TERRY E PETRUZZELLI, 2002; ZOUKI et al., 2001). Considerando os produtores de IL-8/CXCL9, nossos dados estão de acordo com Machado et al. (2014) que observaram um aumento do número de monócitos em recém-nascidos com toxoplasmose congênita, comparado ao controle não infectado.

Já a expressão de MIG/CXCL9 e IP-10/CXCL10 é mediada pela produção de IFN- γ , com posterior ligação ao receptor CXCR3 de perfil pró-inflamatório, expresso predominantemente por linfócitos T e células NK (GROOM et al. 2011). Em camundongos infectados cronicamente, a expressão de MIG/CXCL9 e IP-10/CXCL10 avaliados na retina desses animais foi significativamente maior durante a infecção crônica. Em animais tratados com anticorpos anti-CXCL10, houve diminuição na contagem de células T CD4⁺, indicando que a manutenção da resposta de células T e consequente controle da replicação de *T. gondii* no olho desses animais durante a infecção crônica é dependente de IP-10/CXCL10 (NOROSE et al., 2011). Já nos nossos pacientes, os dados sugerem que essas quimiocinas levam à lesão, provocada por resposta imunológica de perfil pró-inflamatório.

Em relação a RANTES/CCL5, que teve a concentração significativamente maior no grupo TOXO, num outro estudo envolvendo modelo experimental de toxoplasmose cerebral foi visto que a produção dessa quimiocina em camundongos deficientes em Myd88 infectados por *T. gondii* foi bem maior. Isso leva a concluir que a resposta dessa quimiocina depende de sinalização via Myd88 e que ela está envolvida na resistência de camundongos à infecção por *T. gondii* (TORRES et al., 2013). Outro estudo mostra a relação de IFN- γ e RANTES/CCL5,

onde foi visto que camundongos geneticamente resistentes a *T. gondii* produzem mais RANTES/CCL5, comparados a animais deficientes em IFN- γ , mostrando, portanto, que a produção dessa quimiocina em cérebros de animais durante a infecção crônica também depende de IFN- γ .

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de MCP-1/CCL2. Diferentemente, em outro estudo, os níveis de MCP-1/CCL2 foram menores em pacientes com toxoplasmose ocular ativa em Barcelona, Espanha (REY et al. 2014). Porém, num estudo brasileiro, também não foram observadas diferenças nos níveis dessa quimiocina em pacientes com retinocoroidite toxoplásmica ativa, comparadas com o grupo controle, coincidindo com os nossos resultados (GONÇALVES et al. 2007). Essa diferença pode ser atribuída à variação de cepas de *T. gondii* que infectaram os pacientes nas diferentes localizações geográficas.

Na análise de citocinas, a alta produção de IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-5 e IL-10 no grupo TOXO sugere que nesses pacientes o perfil de resposta é misto, com ação pró-inflamatória/reguladora, em lactentes com toxoplasmose congênita, no período de 30 a 45 dias depois do nascimento.

A respeito da resposta de perfil pró-inflamatório, a produção de IFN- γ foi maior em pacientes com lesão ativa, comparado ao grupo controle e outras manifestações clínicas. IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória essencial para a sobrevivência do hospedeiro durante a infecção por *T. gondii* e é necessário para estimular a produção de potentes antimicrobianos produzidos por macrófagos (SCHARTON-KERSTEN et al., 1997; STURGE et al., 2014). Essa citocina é produzida por diversos tipos de células, incluindo células T, e desempenha um papel crítico na prevenção da reativação da infecção de *T. gondii* no cérebro (KANG et al. 2001). Correlacionado a isso, um outro estudo realizado por nosso grupo observou alta expressão de células NK CD3-CD16⁺-CD56⁺ em bebês com lesão ativa ocular causada por *T. gondii*, além de células T CD8⁺ em bebês infectados (MACHADO et al., 2014). Além disso, foi vista alta produção dessa citocina em 86% de células fagocíticas mononucleares provindas de crianças infectadas por *T. gondii*, quando reestimuladas com o antígeno GRA1 do parasito (GUGLIETTA et al., 2007). Em contraste com nossos resultados, pacientes assintomáticos tiveram alta produção de IFN- γ quando comparados com pacientes com lesão ocular (MEIRA et al., 2014), sugerindo que IFN- γ pode ter um papel ambíguo na toxoplasmose, levando à proteção do hospedeiro ou causando lesão.

Outra citocina pró-inflamatória, IL-6, teve seus níveis altos em pacientes do grupo TOXO comparados ao grupo controle. IL-6 é produzido por monócitos, células endoteliais e

fibroblastos e se liga ao receptor de interleucina-6, que inicia sinalização intracelular (ROSE-JOHN, 2015). Alguns estudos mostram a relação entre a produção de IL-6 e lesões causadas por toxoplasmose. Camundongos deficientes em IL-6 foram mais susceptíveis à infecção por *T. gondii* e esses animais apresentaram ineficiente neutrofilia durante a infecção (JEBBARI et al., 1998). Outro estudo realizado em camundongos, viu que essa citocina teve ação prejudicial em animais que apresentavam lesão ocular causada por *T. gondii* (ROCHET et al., 2015).

Enquanto algumas citocinas pró-inflamatórias apresentaram níveis mais altos em pacientes com lesão ocular, observamos que a concentração de TNF foi significativamente diferente em pacientes sem lesão, possivelmente, exercendo um papel protetor. Da mesma forma, a toxoplasmose cerebral foi correlacionada a um aumento da carga parasitária e menor expressão de TNF- α no cérebro, além de IL-12 (TORRES et al., 2013), e IFN- γ e bloqueadores de TNF- α estão associados com a reativação de granulomas latentes em pacientes com toxoplasmose ocular (PAULA-RODRIGUES et al., 2013). Em animais cronicamente infectados com *T. gondii* tratados com doses de anticorpo neutralizante contra TNF- α , observaram-se a emergência de taquizoítos livres e um aumento do número de cistos.

Em relação à regulação da resposta, foi observado também que a produção de IL-10 foi significativamente maior em pacientes com lesão cicatrizada. IL-10 é uma citocina produzida por células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e populações de linfócitos T (células T reguladoras e Th2) (BLISS et al. 2000; MOORE et al., 2001), relacionada com a supressão da resposta patológica nos casos de transplante, alergia e resposta imune (LEVINGS et al., 2002) e limitação de potencial resposta prejudicial de perfil Th1 causada por inflamação ocular decorrente de toxoplasmose (SUZUKI et al., 2000). Deficiência no fator de transcrição regulador Blimp-1 relacionado à produção dessa citocina, levou ao aumento da mortalidade de camundongos infectados com *T. gondii*, devido à excessiva inflamação (NEUMANN et al., 2014). Em camundongos infectados com cepas RH, macrófagos peritoneais produzem IL-10 rapidamente, provavelmente, para controlar o processo inflamatório causado por neutrófilos e as células dendríticas que produzem IL-12 (BLISS, et al. 2000). Além disso, em humanos, foi visto que o polimorfismo do gene IL-10 foi associado à reticoroidite toxoplásmica, devido à baixa produção dessa citocina (CORDEIRO et al., 2008).

Além de IL-10, IL-4 e IL-5 são citocinas importantes para a regulação da resposta imune ou susceptibilidade à infecção. Estudos controversos indicam que a produção de IL-4 pode ser benéfica ou prejudicial em camundongos infectados com *T. gondii*. Enquanto camundongos IL-4 -/- são mais resistentes à toxoplasmose adquirida quando comparados ao seu tipo selvagem

(NICKDEL et al., 2004) a mesma linhagem é mais susceptível em condições de infecção semelhantes, porém com efeitos prejudiciais de longo prazo, possivelmente por causa da habilidade dessa citocina em modular produtos pró-inflamatórios com efeito anti-parasitário (ROBERTS et al., 1996).

Por outro lado, IL-5, que em nosso trabalho foi associado a lesão ativa, é uma citocina derivada de células T que prolonga a sobrevivência de eosinófilos, estimula a desgranulação desses eosinófilos e produção de espécies reativas de oxigênio, exerce efeito quimiotático nessas células e promove a proliferação e diferenciação de células B ativadas (KOIKE et al. 1994; FACCIOLI et al., 1997; KARLEN et al., 1998). Em estudo relacionando a toxoplasmose, foram vistos níveis altos de IL-5 em mulheres infectadas na fase aguda da infecção comparadas ao grupo controle (MATOWICKA-KARNA, et al. 2009) o que indica que esta citocina é importante para o estado de inflamação. Durante a infecção crônica em camundongos deficientes em IL-5, foi visto o aumento do número de cistos e taquizoítos e acelerada mortalidade dos animais (ZHANG et al.1999). Com isso podemos ver que essas citocinas possuem diferentes papéis durante a infecção por *T. gondii*, e suas ações dependem também do tipo de infecção, do modelo experimental utilizado na pesquisa, da cepa do parasito e da susceptibilidade do hospedeiro para determinar se a regulação da resposta será benéfica ou prejudicial.

Outro dado interessante a ser analisado, refere-se aos níveis de concentração da citocina IL-17A nos subgrupos TOXO. Foi visto que, apesar de não apresentar diferença significativa em relação NI, os níveis dessa molécula foram maiores no grupo SL comparados aos grupos que apresentaram algum tipo de lesão. IL-17A é normalmente associada a respostas pró-inflamatórias e doenças autoimunes. Em um estudo realizado na França utilizando amostras intraoculares de pacientes com uveíte, foi visto que os níveis dessa citocina foram maiores particularmente no grupo com lesões associadas à toxoplasmose (SAUER et. al, 2015). Essa divergência com nossos dados pode ser relacionada ao tipo de amostra utilizada nos dois estudos: amostras sistêmicas e amostras intraoculares, considerando que o olho é um órgão imunoprivilegiado. Além disso, diferenças nas cepas do parasito circulantes no Brasil e na França também podem ser relacionadas a esses resultados.

Como resultado da análise convencional realizada, as citocinas TNF, IFN- γ e IL-5 juntos à IL-10 foram eleitas como potenciais biomarcadores de morbidade relacionados à toxoplasmose congênita precoce, sendo associadas com ausência de lesão (TNF), lesão ativa (IFN e IL-5) e presença de cicatrização (IL-10).

Posteriormente a análise convencional, nós desenvolvemos a assinatura de biomarcadores, a fim de complementar os dados do perfil imunológico de lactentes com toxoplasmose congênita. Nessa análise, mensuramos o número de pacientes considerados *baixos* e *altos* produtores de cada biomarcador alvo, sendo possível concluir, por meio disso, quais são as quimiocinas e citocinas mais frequentes em cada grupo de manifestação clínica. Observamos então, que o grupo TOXO é composto por eventos inflamatórios e moduladores ocorrendo simultaneamente, com a produção de IL-10, INF- γ , RANTES/CCL5, IL-12, IL-5, IL-8, IP-10/CXCL10 e MIG/CXCL9, destacando o perfil de resposta misto apresentado por lactentes no período de 30 a 45 dias após o nascimento, como visto na análise convencional. Em contraste com esse resultado, observamos que o grupo NI é composto somente por MCP-1/CCL2, IL-6, TNF e IL-1 β , sugerindo que nossos pacientes apresentaram maior variedade de quimiocinas e citocinas quando infectados por *T. gondii*. Esses resultados corroboram a hipótese geral de que a toxoplasmose congênita é caracterizada por uma produção mista de quimiocinas/citocinas no período de 30-45 dias após o nascimento.

Combinando os resultados da análise convencional com a assinatura de biomarcadores destacamos certas citocinas e quimiocinas que potencialmente podem ser marcadores de fase clínica da toxoplasmose. Estes incluem IL-8/CXCL8 (biomarcador de lesão), TNF (biomarcador de ausência de lesão), IL-10 (lesão cicatricial) e MIG/CXCL9 (lesão ativa). É importante salientar que a análise de assinatura de biomarcadores não substitui a análise convencional, e sim complementa, apresentando novos dados que são úteis para definição de biomarcadores que podem auxiliar no diagnóstico, prognóstico e monitoração de tratamento em pacientes com toxoplasmose. Além disso, considerando que casos de reativação de toxoplasmose ocular podem ocorrer, especialmente quando se trata de crianças, a importância de se estudar biomarcadores de manifestação clínica cresce e diferentes formas de análise são necessárias para obtenção de dados consistentes.

Analisando as redes dos subgrupos TOXO, é possível observar, na rede SL, múltiplas conexões entre citocinas e quimiocinas, incluindo duas negativas. Nessa rede, a quimiocina IL-8/CXCL-8 interage com grande número de interações. Curiosamente, IFN- γ exibe menos interações com outros biomarcadores durante esse estado da doença. A rede RA apresenta um perfil interativo pobre de biomarcadores, que pode ser resultado de uma produção desorganizado de citocinas e quimiocinas. Além disso, menos número de conectividade entre os biomarcadores durante a fase ativa pode representar enfraquecimento do sistema imune, em que as respostas efetoras ainda são imaturas. Em RAC e RC as conexões entre os biomarcadores

são reestabelecidas, sendo IP-10/CXCL10 e IFN- γ biomarcadores fundamentais durante a fase crônica. A rede RC apresenta algumas similaridades com os pacientes não infectados (rede NI), sugerindo que a resposta imune nesse grupo está tendendo a voltar ao estado homeostático. Entretanto, quando comparamos as assinaturas de biomarcadores desses dois grupos, elas são diferentes no perfil de altos produtores de citocinas/quimiocinas, embora apresentem semelhança em relação as conexões, sugerindo que o grupo RC ainda carrega características inflamatórias relacionadas à convalescência.

Outras conexões observadas nas redes que podem ser consideradas relevantes envolvem a citocina IL-12. Em nenhum momento na análise convencional houve diferença significativa nas concentrações dessa citocina nos grupos analisados. Porém, nas redes é possível ver conexões entre IL-12 e IFN- γ em todos os grupos, notando-se a importância da correlação entre esses dois biomarcadores na toxoplasmose.

Os nossos dados sugerem que as respostas pró-inflamatórias desencadeadas pelo parasito durante as fases precoces e tardias da doença podem ser observadas juntamente à modulação da resposta imune sistêmica e não apenas localmente (TORRES-MORALES et al., 2014). A avaliação de biomarcadores sistêmicos é plausível e pode contribuir para a compreensão dos fatores imunológicos resultantes de eventos significativos que ocorrem durante a toxoplasmose ocular aguda e crônica. Esta abordagem permite avaliação menos invasiva de pacientes, especialmente quando a população do estudo inclui crianças.

Além disso, nossos dados sugerem que a produção de quimiocinas e citocinas sistêmicos no período de 30-45 dias é essencial na resposta imunológica a *T. gondii*, sendo que cada manifestação clínica da toxoplasmose ocular apresenta um perfil de produção de quimiocinas/citocinas diferente. Isso possibilita a criação de métodos de avaliação de potenciais biomarcadores, para sua utilização na monitoração de pacientes recém-nascidos/lactentes com toxoplasmose congênita.

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, a análise de biomarcadores em crianças com toxoplasmose congênita, demonstrou que há amplas interações entre quimiocinas/citocinas, que podem mudar durante as diferentes fases da lesão retinocoroidal induzidas pela infecção por *T. gondii*. Isso cria possibilidades na monitoração dos pacientes tratados, podendo indicar que os pacientes têm risco de recorrência da infecção. Mais estudos são necessários para entender melhor a resposta imune de crianças e bebês com toxoplasmose congênita.

Além disso, alguns tópicos merecem destaque:

- Pacientes lactentes com toxoplasmose congênita apresentaram perfil de resposta imunológica diferente do grupo controle e diferente entre os grupos de manifestação clínica, subdivididos de acordo com a lesão ocular.
- Lactentes com Toxoplasmose congênita apresentam perfil de quimiocinas mediada por MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8;
- Enquanto IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 são biomarcadores gerais associados à lesão ocular, MIG/CXCL9 aparece como marcador seletivo para lesão retinocoroidal ativa;
- O grupo TOXO é caracterizado por padrão de citocinas misto proinflamatório/regulatório mediado por IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10;
- Enquanto TNF é apresentado como biomarcador para o grupo SL, e IFN- γ e IL-5 no grupo RA, IL-10 aparece como mediador relevante nos grupos RAC/RC;
- As assinaturas de biomarcadores séricos corroboram que o grupo TOXO é caracterizado por uma relevante tempestade de quimiocinas/citocinas com amplo conjunto de mediadores proinflamatórios/reguladores;
- De acordo com a assinatura de biomarcadores, IL-8/CXCL8 e IP-10/CXCL10 são indicadores de amplo espectro de doença ocular, enquanto TNF é biomarcador para SL, IFN- γ e MIG/CXCL9 apontam para ARL e IL-10 é destacada como verdadeiro biomarcador sérico de ACRL/CRL;
- No estudo das redes de biomarcadores, a ampla interação entre quimiocinas/citocinas mediada por negativas correlações na rede TOXO contrasta com uma pequena ponte de IL-10 observada na rede NI;
- A rede RA apresenta clara diminuição de conexões vizinhas, enquanto SL e RC apresentaram uma rede equilibrada, da mesma forma que observamos em NI.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. C. ; COUTO-ALEIXO, A. L. Q.; BENCHIMOL, E. I. et al. The IFN- γ +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, n.3, p.451-455, 2009.
- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nat Rev Immunol**. v.5, n.2, p.162-70, 2005.
- ALMEIDA, M. J.; OLIVEIRA, L. H.; FREIRE, R.L. et al. Aspectos sociopolíticos da epidemia de toxoplasmose em Santa Isabel do Ivaí (PR). **Cien Saude Colet**. v.16, n.1, p.1363-73, 2011.
- AMENDOEIRA, M.R.R.; SOBRAL, C.Q.; TEVA, A. et al. Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndios isolados, Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Tropical**, v. 36, n.6, p.671-676, 2003.
- ANDRADE, G. M. Q.; RESENDE, L. M. ; GOULART, E. M. A. et al. Deficiência auditiva na toxoplasmose congênita detectada pela triagem neonatal. **Rev Bras Otorrinolaringol** v.74, n.1, p.21-28, 2008.
- AWOKE, K.; NIBRET, E.; MUNSHEA, A. Sero-prevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women attending antenatal care at Felege Hiwot Referral Hospital, northwest Ethiopia. **Asian Pac J Trop Med**.v.8, n.7, p.549-54, 2015.
- AVELINO, M.M.; AMARAL, W.N.; RODRIGUES, I.M. et al. Congenital toxoplasmosis and prenatal care state programs. **BMC Infect Dis**. v.14, n.33, p.1-13, 2014.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.9, n.1, p. 55-62. 2003.
- BEHNKE, M. S.; KHAN, A.; LAURON, E.J. et al. Rhoptry proteins ROP5 and ROP18 are major murine virulence factors in genetically divergent south american strains of *Toxoplasma gondii*, **PLoS Genet**. v.11, n.8, p.1-22, 2015.
- BELL, A.; GILL, R.; ISAAC-RENTON, J.; KING, A. et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water--British Columbia. The British Columbia Toxoplasmosis Team. **Can Commun Dis Rep**. v.21, n.18, p.161-3, 1995.

BELLANTI, J.A.; PUNG, Y.H.; ZELIGS, B.J. Immunology, 1999. In: AVERY, G.B; FLETCHER, M.A.; MACDONALD, M.G. **Neonatology**: pathophysiology and management of the newborn. 4. ed. Philadelphia, JB. Lippincott Co. p.1000-1028, 1999.

BEZERRA, R.A.; CARVALHO, F.S.; GUIMARÃES, L.A. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. **Vet Parasitol.** v.189, n.2-4, p.153-61, 2012.

BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 64, n.3, p.607-23, 2000.

BLADER, I.J.; COLEMAN, B.I.; CHEN, C.T. et al. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annu Rev Microbiol.** v.69, p.463-85. 2015.

BLISS, S. K.; BUTCHER, B. A. and DENKERS, E. Y. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. **J Immunol.** v. 165, n.8, p. 4515-4521, 2000.

BALE, J.F. JR. Congenital infections. **Neurol Clin.** v.20, n.4, p.1039-60, 2002.

BRANDÃO, G. P.; MELO, M. N.; GAZZINELLI, R. T. et al. A. Experimental reinfection of BALB/c mice with different recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: involvement of IFN- γ and IL-10, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, n.2, p.241-245, 2009.

BRUNET, L.R. Nitric oxide in parasitic infections. **Int Immunopharmacol.** v.1, n.8, p.1457-67, 2001.

BOWIE, W. R.; KING, A. S.; WERKER, D. H. et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipaldrinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. **Lancet**, v. 350, n. 9072, p. 173-177, 1997.

BOYER, K.M.; HOLFELS, E.; ROIZEN, N. et al. Toxoplasmosis Study Group. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: Implications for prenatal management and screening. **Am J Obstet Gynecol.** v.192, n.2, p.564-71, 2005.

BRENIER-PINCHART, M.P.; PELLOUX, H.; DEROUICH-GUERGOUR, D. et al. Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. **Trends. Parasitol.** v.17, n.6, p.292-6, 2001.

BURNETT, A. J.; SHORTT, S. G.; ISAAC-RENTON, J. et al. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. **Ophthalmology**, v. 105, n.6, p. 1032-1037, 1998.

CABRAL, A.D.; D'AURIA, S.R.N.; CAMARGO, M.C.G.O.; ROSA, A.R et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in bats from São Paulo city, Brazil, **Vet. Parasitol.** v.206, n.3, p.293–296, 2014.

CALABRESE, K.S.; TEDESCO, R.C.; ZAVERUCHA DO VALLE, T. et al. Serum and aqueous humour cytokine response and histopathological alterations during ocular *Toxoplasma gondii* infection in C57BL/6 mice. **Micron**. v.39, n.8, p.1335-41, 2008.

CÂMARA, J.T.; DA SILVA, M.G.; DE CASTRO, A. M.; Prevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas em dois centros de referência em uma cidade do Nordeste, **Brasil Rev Bras Ginecol Obstet.** v.37, n.2, p.64-70, 2015.

CARELLOS, E.V.; ANDRADE, G.M.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; UFMG CONGENITAL TOXOPLASMOSIS BRAZILIAN GROUP, et al. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. **PLoS One**. v.9, n.2, p.1-9, 2014.

CARNEIRO, A.C.; ANDRADE, G.M.; COSTA, J.G. et al. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern brazil. **J Clin Microbiol.** v.51, n.3, p. 901-7, 2013.

CARVALHEIRO, C. G.; MUSSI-PINHATA, M. M.; YAMAMOTO, A. Y. et al. M.Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic confirmation in asymptomatic newborn infants. **Epidemiol Infect**, v.133, n.3, p. 485-491, 2005.

CASTRO-FILICE, L.S.; BARBOSA, B.F.; ANGELONI, M.B. et al. Martins-Filho, O.A.; Santos, M.C.; Mineo, J.R.; Ferro, E.A. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. **J Transl Med.** v.12, n.132, p.1-12, 2014.

CHAPEY, E.; WALLON, M.; DEBIZE, G. et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. **J Clin Microbiol.** v. 48, n.1, p. 41-5, 2010.

COELHO, R. A.; KOBAYASHI, M.; CARVALHO JR., L. B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.45, n.4, p. 229-231, 2003.

COMMODARO, A. G., BELFORT, R. N; RIZZO, L. V. et al. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, n.2, p. 345-350, 2009.

CONG, W.; DONG, X.Y.; MENG, Q.F. et al. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: a seroprevalence and case-control study in Eastern China. **Biomed Res Int**. v. 2015, p.1-6, 2015.

CORDEIRO, C.A.; MOREIRA, P.R.; ANDRADE, M.S. et al. Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. v.49, n.5, p.1979-82, 2008.

COSTA, I.N.; ANGELONI, M.B.; SANTANA, L.A. et al. Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta**. v.30, n.10, p.884-90, 2009.

COSTA-SILVA, T.A.; BORGES, M.M.; GALHARDO, C.S. et al. Immunization with excreted/secreted proteins in AS/n mice activating cellular and humoral response against *Toxoplasma gondii* infection. **Acta Trop**. v.124, n.3, p.203-9, 2012.

DE JESUS, L.N.; TONINI, A.C.Z.; BARROS, G.B. et al. IgA and IgG1 reactivities assessed by flow cytometry mirror clinical aspects of infants with ocular congenital toxoplasmosis, **J. Immunol. Methods**. v.2015, n.1, p.1-8, 2015.

DE-LA-TORRE A.; SAUER, A.; PFAFF, A.W. et al. Severe south american ocular toxoplasmosis is associated with decreased IFN- γ /IL-17a and increased IL-6/IL-13 intraocular levels. **PLoS Negl Trop Dis**. v.7, n.11, p.1-11, 2013.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T.; Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection, **Clin. Microbiol. Rev**. v.11, n.4, p.569–588,1998.

DO CARMO, G. M.; SILVA, A.S.; KLAUCK, V. et al. Immunological response and markers of cell damage in seropositive horses for *Toxoplasma gondii*. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**. v. 38, n. 1, p: 9-13, 2014.

DUBEY, J.P. Reevaluation of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterin Parasitol**. v.74, n.1, p. 75-77, 1998.

DUBER, J.B.; BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Toxoplasmosis in birds. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988, p.151-153.

DUNN, D.; WALLON, M.; PEYRON, F.; PETERSEN, E. et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **Lancet**, v. 353, n. 9167, p. 1829-1833, 1999.

EMELIA, O.; RAHANA, A.R.; MOHAMAD-FIRDAUS, A. et al. IgG avidity assay: A tool for excluding acute toxoplasmosis in prolonged IgM titer sera from pregnant women. **Trop Biomed**, v.31, n.4, p. 633–640, 2014.

FACCIOLI, L. H.; VARGAFTIG, B.B.; MEDEIROS, A. I. et al. Cytokines in the Modulation of Eosinophilia, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.92, n.2, p.109-114, 1997.

FERNANDES, G. C.; AZEVEDO, R. S.; AMAKU, M. et al. Seroepidemiology of Toxoplasma infection in a metropolitan region of Brazil. **Epidemiol Infect**, v.137, n.12, p. 1809-1815, 2009.

FERREIRA, M. U.; HIRAMOTO, R. M.; AURELIANO, D. P. et al. A community-based survey of human toxoplasmosis in rural Amazonia: seroprevalence, seroconversion rate, and associated risk factors. **Am J Trop Med Hyg**, v.81, n.1, p.171-176, 2009.

FRANCO, P.S.; GOMES, A.O.; BARBOSA, B.F. et al. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**. v.32, n.11, p.838-44, 2011.

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.893-896, 1970.

GADDI, P. J. AND YAP, G. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunol. Cell Biol**. v. 85, n. 2, p. 155–159, 2007.

GAJEWSKI, T.F.; FITCH, F.W. Antiproliferative effect of IFN- γ in immuno regulation. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J. Immunol**. v.140, n.12, p.4245-4231, 1988.

GARZA-LEON, M.; MUCCIOLI, C.; ARELLANES-GARCIA, L. Toxoplasmosis in pediatric patients. **Int Ophthalmol Clin**. v.48, n.3, p.75-85, 2008.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S. et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . **J Immunol**, v. 157, n.2, p. 798-805, 1996.

GILBERT, R.E.; FREEMAN, K.; LAGO, E.G. et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, 2008.

GONÇALVES, R.M; RODRIGUES, D.H.; CAMARGOS DA COSTA, A.M. et al. Increased serum levels of CXCL8 chemokine in acute toxoplasmic retinochoroiditis. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 85, n.8, p. 871–876, 2007.

GROOM, J. R.; LUSTER, A. D.; CXCR3 in T cell function, **Exp. Cell. Res.** v.317, n. 5 ,p. 620–631, 2011.

GUGLIETTA, S.; BEGHETTO, E.; SPADONI, A. et al. Age-dependent impairment of functional helper T cell responses to immunodominant epitopes of *Toxoplasma gondii* antigens in congenitally infected individuals. **Microbes and Infection**. v.9, n.2, p. 127-133, 2007.

HALONEN, S.K.; WEISS, L.M. Toxoplasmosis. **Handb Clin Neurol**. v.114, n.1, p.125–145, 2013.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clin Exp Med**, v. 3, n.2, p. 84-105, 2003.

HEGDE, S.; RELHAN, N.; PATHENGAY, A.; BAWDEKAR, A. et al. Coexisting choroidal neovascularization and active retinochoroiditis-an uncommon presentation of ocular toxoplasmosis. **J Ophthalmic Inflamm Infect**. v.5, n.22, 2015.

HEHL, A.B.; BASSO, W.U.; LIPPUNER, C. et al. Asexual expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes. **BMC Genomics**. v.16, n.66, p.1-16, 2015.

HINRICHSEN, S.L.; VALENTE, A. et al. 2005. **Toxoplasmose**. In: Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 421-427.

HOHLFELD, P.; DAFFOS, F.; COSTA, J. M. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chainreaction test on amniotic fluid. **N Engl J Med**, v. 331, n.1, p. 695-699, 1994.

HOLLAND, G. N. Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. **Am J Ophthalmol**, v. 128, n.4, p. 502-505, 1999.

HOLLAND, G. N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. **Am J Ophthalmol**, v. 137, n.1, p. 1-17, 2004.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J Infect Dis**, v. 172, n.6, p.1561-1566, 1995.

HUNTER, C.A.; SIBLEY, L.D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nat Rev Microbiol**. v.10, n.11, p.766-78, 2012.

INAGAKI, A.D.; CARDOSO, N.P.; LOPES, R.J et al. Análise espacial da prevalência de toxoplasmose em gestantes de Aracaju, Sergipe, Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**. v.36, n.12, p.535-40, 2014.

JEBBARI, H.; ROBERTS, C.W.; FERGUSON, D.J. et al. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol**. v. 20, n.5, p. 231-9, 1998.

KANG, H.; SUZUKI, Y.; Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. **Infect. Immun**. v. 69, n.5, p.2920–2927, 2001.

KARLEN, S.; DE BOER, M.L.; LIPSCOMBE, R.J. et al. Biological and molecular characteristics of interleukin-5 and its receptor, **Int. Rev. Immunol**. v.16, n.3, p.227-47, 1998.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Toxoplasma-safe meat: close to reality? **Trends Parasitol**, v.25, n.1, p.18-22, 2009.

KIKUMURA, A.; ISHIKAWA,T.; NOROSE, K. Kinetic analysis of cytokines, chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules in murine ocular toxoplasmosis. **Br J Ophthalmol**, v. 96, n.9, p. 1259-1267, 2012.

KRAVETZ, J. D.; FEDRMAN, D. G. Prevention of toxoplasmosis in pregnancy: knowledge of risk factors.**Infect Dis Obstet Gynecol**, v.13, n.3, p.161-165, 2005.

KOIKE, M.; TAKATSU, K.; IL-5 and its receptor: which role do they play in the immune response? **Int. Arch. Allergy. Immunol**. v.104, n.1, p.1-9,1994.

LAWTON, A.R. B-cell development. In: POLIN, R.A.; FOX, W.W. Ed. **Fetal and Neonatal Physiology**. Phil, WB. Saun Comp. 2 ed. 1432-1438, 1992.

LAHMAR, I.; ABOU-BACAR, A.; ABDELRAHMAN, T. Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis. **J Infect Dis**. v. 199, n.8, p.1239-49, 2009.

LEVINGS, M.K.; BACCHETTA, R.; SCHULZ, U. et al. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells, **Int. Arch. Allergy Immunol**, v.129, n.4, p.263–276, 2002.

LIEBERMAN, L.A.; VILLEGAS, E.N.; HUNTER, C.A. Interleukin-15-deficient mice develop protective immunity to *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun**. v.72, n.11, p. 6729-32, 2004.

LONDON, N. J. S.; HOVAKIMYAN, A.; CUBILLAN, L. D. P. et al. Prevalence, clinical characteristics, and causes of vision loss in patients with ocular toxoplasmosis, **Eur J Ophthalmol**, vol. 21, n.6, p. 811–819, 2011.

LOPES-MORI, F.M.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; BITTENCOURT, L.H. et al. Gestational toxoplasmosis in Paraná State, Brazil: prevalence of IgG antibodies and associated risk factors. **Braz J Infect Dis**. v.17, n.4, p.405-9, 2013.

LYKENS, J.E.; TERRELL, C.E.; ZOLLER, E.E.; DIVANOVIC, S. et al. Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. **J Immunol**, v. 184, n.2, 877-885, 2010.

MACHADO, A. S., ANDRADE, G. M.; JANUARIO, J. N. et al. IgG and IgM western blot assay for diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz** , v.105, n.6, p. 757-761, 2010.

MACHADO A. S.; CARNEIRO, A. C. A. V.; BÉLA, S. R.; et al. Biomarker analysis revealed distinct profiles of innate and adaptive immunity in infants with ocular lesions of congenital toxoplasmosis. **Mediators Inflamm**. v. 2014, n.1, p. 1-13, 2014.

MAENZ, M.; SCHLÜTER, D.; LIESENFELD, O.; Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Prog Retin Eye Res**, v. 39, n.1, p. 77-106, 2014.

MATOWICKA-KARNA, J.; DYMICKA-PIEKARSKA, V.; KEMONA, H.; Does *Toxoplasma gondii* infection affect the levels of IgE and cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha)? **Clin Dev Immunol**. v.2009, n.1, p.1-4, 2009.

MEDEIROS, A.D.; ANDRADE, M. M.; VÍTOR, R.W. et al. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in meat and dairy goat herds in Rio Grande do Norte, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol**, v.23, n.4, 481-487, 2014.

MEIRA, C. S.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; VIDAL, J. E. et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- γ , TNF- α , and IL-10 levels, **Front Microbiol**, v.5, n.1, p. 1-7, 2014.

MENNECHET, F.J.; KASPER, L.H.; RACHINEL, N. et al. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. **J Immunol**. v.168, n.6, p.2988-96, 2002.

MILLER, C.M.; BOULTER, N.R.; IKIN, R.J. et al. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v.39, n.1, 23-39, 2009.

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

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. **Clin Infect Dis**, v.23, n.2, p. 277-282, 1996.

MOMBRÒ, M.; PERATHONER, C.; LEONE, A. Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection, **Eur J Pediatr**. v.162, n.10, p.703-6, 2003.

MOORE, K.W.; MALEFYT, R. W.; COFFMAN, R.L. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n.1, p. 683–765, 2001.

MOSMANN, T.R. Cytokines: is there biological meaning? **Curr. Opin. Immunol**. v.3, n.3, p.311-314, 1991.

NEUMANN, C.; HEINRICH, F.; NEUMANN, K. et al. Role of Blimp-1 in programming Th effector cells into IL-10 producers, **J Exp Med**. v. 211, n. 9, p. 1807-1819, 2014.

NICKDEL, M.B.; LYONS, R.E.; ROBERTS, F. et al. Intestinal pathology during acute toxoplasmosis is IL-4 dependent and unrelated to parasite burden, **Parasite Immunol**. v.26, n.2, p. 75-82, 2004.

NOROSE, K.; KIKUMURA, A.; LUSTER, A.D. et al. CXCL10 is required to maintain T-cell populations and to control parasite replication during chronic ocular toxoplasmosis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.52, n.1, p.389-398, 2011.

PARLOG, A.; SCHLÜTER, D.; DUNAY, I.R. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. **Parasite Immunol.** v.37, n.3, p.159-70, 2015.

PAULA-RODRIGUES, K. F.; ARANTES, T. E. F.; MUCCIOLI, C. et al. Incidence of toxoplasma retinochoroiditis in patients with ankylosing spondylitis after using TNF- α blockers, **Parasitol. Int.** v.62, n. 3, p.272–275, 2013.

PEIXE, R.G.; BOECHAT, M.S.; RANGEL, A.L. et al. Single nucleotide polymorphisms in the interferon gamma gene are associated with distinct types of retinochoroidal scar lesions presumably caused by *Toxoplasma gondii* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.109, n.1, p.99-107, 2014.

PEIXOTO-RANGEL, A. L.; MILLER, E. N.; CASTELLUCCI, L. et al. Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for tolllike receptor 9 (TLR9). **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 104, n.8, p. 1187-1190, 2009.

PEPPER, M.; DZIERSZINSKI, F.; WILSON, E. et al. Plasmacytoid dendritic cells are activated by *Toxoplasma gondii* to present antigen and produce cytokines. **J Immunol.** v. 180, n. 9, p. 6229-6236, 2008.

PERNAS, L.; RAMIREZ, R.; HOLMES, T.H. et al. Immune Profiling of pregnant toxoplasma-infected US and Colombia patients reveals surprising impacts of infection on peripheral blood cytokines. **J Infect Dis.** v. 210, n.6, p.923-931, 2014.

PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. **Trends Parasitol,** v.27, n.9, p. 388-393, 2011.

REIS E SOUSA, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T. 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. **J Exp Med.** v.186, n.11, p.1819-29, 1997.

REMINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P. et al. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.** 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. p. 947-1091.

RESENDE, M.G., FUX, B., CAETANO, B.C. et al. The role of MHC haplotypes H2d/H2b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. **An Acad Bras Cienc,** v.80, n.1,85-99, 2008.

REY, A.; MOLINS, B.; LLORENÇ, V. et al. Cytokine profiling reveals decreased serum levels of CCL2 in active ocular toxoplasmosis. **Br J Ophthalmol**, v.97, n.7, p. 1338–1342, 2014.

REZENDE-OLIVEIRA, K.; SILVA, N.M. et al. Cytokines and chemokines production by mononuclear cells from parturient women after stimulation with live *Toxoplasma gondii*. **Placenta**, v.33,n.9 , p.682-687, 2012.

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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n.6, p. 591-594, 2008.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev**. v.25, n.2, p.264-96, 2012.

ROBERTS, C.W.; FERGUSON, D.J.; JEBBARI, H. et al. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection, **Infect. Immun**. v.64, n.3, p.897-904, 1996.

ROBERTS, C. W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.3, p. 476-488, 2001.

ROBERTS, F.; ROBERTS, C. W.; FERGUSON, D. J. P. et al. Inhibition of nitric oxide production exacerbates chronic ocular toxoplasmosis. **Parasite Immunol**, v. 22, n.1, p. 1-5, 2000.

ROCHET, E.; BRUNET, J.; SABOU, M. et al. Interleukin-6-Driven inflammatory response induces retinal pathology in a model of ocular toxoplasmosis reactivation. **Infect Immun**. v. 83, n. 5, p- 2108-2117, 2015.

RODRIGUES, J.P.; FREI, F.; NAVARRO, I.T. et al. Seroepidemiological analysis of toxoplasmosis in college students. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. v.21, n.1, p.1-6, 2015.

ROGERS, N. M.; PEH, C. A.;FAULL, R. et al. Transmission of toxoplasmosis in two renal allograft recipients receiving an organ from the same donor. **Transpl Infect Dis**, v. 10, n.1, p. 71-74, 2008.

ROSE-JOHN, S. The soluble interleukin-6 receptor and related proteins. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab**. v.29, n.5, p. 787-797, 2015.

SAUER, A.; VILLARD, O.; CREUZOT-GARCHER, C. et al. Intraocular levels of interleukin 17A (IL-17A) and IL-10 as respective determinant markers of toxoplasmosis and viral uveitis. **Clin Vaccine Immunol.** v. 22, n.1, p.72-8, 2015.

SEGUNDO, G.R.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERREIRA, M.S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**v, 99, n.1, p.13-17, 2004.

SHAH, S.; GROTENBREG, G.M.; RIVERA, A.; YAP, G.S. An extrafollicular pathway for the generation of effector CD8⁽⁺⁾ T cells driven by the proinflammatory cytokine, IL-12. **Elife.** v.2015, n.4, p. 1-21, 2015.

SCHARTON-KERSTEN, T. M.; YAP, G.; MAGRAM, J. et al. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*, **J. Exp. Med.** v.185, n.7, p.1261–1273, 1997.

STUMHOFER, J.S.; SILVER, J.S.; HUNTER, C.A. IL-21 is required for optimal antibody production and T cell responses during chronic *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS One.** v.8, n.5, 2013.

STURGE, C. R.; YAROVINSKY, F.; Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection, **Infect. Immun.**v.82, n.8,p.3090–3097, 2014.

STUTZ, A.; KESSLER, H.; KASCHEL, M.E. et al. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. **Immunobiology.** v. 217, n.1, p.28-36, 2012.

SULLIVAN JR, W. J. AND JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency, **FEMS Microbiol Rev**, v.36, n.3, p. 717–733, 2012.

SUZUKI,Y.; SHER, A.; YAP, G. et al. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol.** v. 164, n. 10, p. 5375- 5382, 2000.

SWISHER, C. N.; BOYER, K.; MCLEOD, R. Congenital toxoplasmosis. The Toxoplasmosis Study Group. **Semin Pediatr Neurol**, v.1, n.1, p. 4-25.1994.

TAIT, E.D.; HUNTER, C.A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n.2, p. 201-210, 2009.

TAKAMI, M.; TERRY, V.; PETRUZZELLI, L. Signaling pathways involved in IL-8-dependent activation of adhesion through Mac-1. **J Immunol**. v.168, n.9, p. 4559-66, 2002.

TAYLOR, R.E. Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. **J Diagn Med Sonogr**. v.6, n.1, p.35-39, 1990.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M . *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**, v.30, n.2, p.1217-1258. 2000.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. **Immunol. Today**. v.14, n.7, p.335-338, 1993.

TONG, X. AND LU, F. IL-33/ST2 involves the immunopathology of ocular toxoplasmosis in murine model. **Parasitol. Res**. v.114, n.5, p.1897-1905, 2015.

TORRES, M.; GUITON, R.; LACROIX-LAMANDÉ, S. et al. MyD88 is crucial for the development of a protective CNS immune response to *Toxoplasma gondii* infection, **J. Neuroinflammation**. v.10, n.19, p. 1-12, 2013.

TORRES-MORALES, E.; TABORDA, L.; CARDONA, N. et al. Th1 and Th2 immune response to P30 and ROP18 peptides in human toxoplasmosis, **Med Microbiol Immunol**. v.203, n.5, p.315-322, 2014.

VARELLA, I. S.; CANTI, I. C.; SANTOS, B. R. et al. Prevalence of acute toxoplasmosis infection among pregnant women and the mother-to-child transmission rate in a public hospital in South Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n.2, p. 383-388, 2009.

VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; AZEVEDO, D. O. M.; CAMPOS, W. R. et al. Group. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology**, v. 116, n.11, p. 2199-2205 e 2191, 2009.

VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; QUEIROZ ANDRADE, G.M.; Geographic Difference in Outcomes of Congenital Toxoplasmosis. **Pediatr Infect Dis J**. v.30,n.9, p.816-817, 2011.

VAZ, R. S.; THOMAZ-SOCCOL, V. ; SUMIKAWA, E.; GUIMARAES, A. T. Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women from Southern Brazil. **Parasitol Res**, v.106, n.3, p. 661-665, 2010.

VILLARINO, A.V.; STUMHOFER, J.S.; SARIS, C.J. et al. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. **J Immunol**. v.176, n.1, p.237-47, 2006.

VITALIANO, S.N.; DE MENDONÇA, G.M.; DE SANDRES, F.A. et al. Epidemiological aspects of *Toxoplasma gondii* infection in riverside communities in the Southern Brazilian Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n.3, p.301-306, 2015.

WALLON, M.; LIOU, C.; GARNER, P.; PEYRON, F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. **BMJ**, v. 318, n.7197, p. 1511-1514, 1999.

WATTS, E.; ZHAO, Y.; DHARA, A.; ELLER, B. et al. Novel approaches reveal that *Toxoplasma gondii* bradyzoites within tissue cysts are dynamic and replicating entities in vivo, **MBio**, v.6, n.5, p.1-25, 2015.

WEN, X.; KUDO,T.; PAYNE, L. et al. Predominant interferon- γ -mediated expression of CXCL9, CXCL10, and CCL5 proteins in the brain during chronic infection with *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice resistant to development of toxoplasmic encephalitis. **J Interferon Cytokine Res**. v. 30, n.9, p.653-660, 2010.

WUJCICKA, W.; WILCZYŃSKI, J.; NOWAKOWSKA, D. SNPs in toll-like receptor (TLR) genes as new genetic alterations associated with congenital toxoplasmosis? **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.32, n.4, p.503-511, 2013a.

WUJCICKA, W.; WILCZYNSKI, J.; NOWAKOWSKA,D. Do the placental barrier, parasite genotype and Toll-like receptor polymorphisms contribute to the course of primary infection with various *Toxoplasma gondii* genotypes in pregnant women? **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.33, n.5, p.703–709, 2013b.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nat Rev Immunol**. v.14, n.2, p.109-21, 2014.

ZHANG, Y.; DENKERS, E.Y.; Protective role for interleukin-5 during chronic *Toxoplasma gondii* infection, **Infect Immun**. v.67, n.9, p.4383-92, 1999.

ZEILHOFER, H.U.; SCHORR, W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. **Curr Opin Hematol**, v.7, n.3, p.178-82, 2000.

ZOUKI, C.; JÓZSEF, L.; OUELLET, S.; PAQUETTE, Y.; FILEP, J.G. Peroxynitrite mediates cytokine-induced IL-8 gene expression and production by human leukocytes. **J Leukoc Biol.** v.69, n.5, p.815-24, 2001.

ZORGI, N.E.; COSTA, A.; GALISTEO, A.J. JR. et al. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. **Immunol Lett.** v.138, n.2, p.187-96, 2011.

ANEXO

Parecer nº. ETIC 0298/06

Interessada: Profa. Gláucia Manzan Queiroz de Andrade
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 27 de setembro de 2006, o projeto de pesquisa intitulado **"Triagem neonatal para toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG