

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Perfil de resposta imunológica em lactentes: uso no diagnóstico, prognóstico e
monitoração pós-terapêutica da
toxoplasmose congênita.**

Thádia Evelyn de Araújo

Uberlândia
Novembro, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Perfil de reposta imunológica em lactentes: uso no diagnóstico, prognóstico e
monitoração pós-terapêutica da
toxoplasmose congênita.**

Tese de doutorado submetida ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas, como requisito
parcial a obtenção do título de doutor.

Aluna: Thádia Evelyn de Araújo

Orientador: Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho

Coorientadora: Prof^a. Dra. Eloisa Amalia Vieira Ferro

**Uberlândia
Novembro, 2021**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A663 2021	<p data-bbox="414 1211 1085 1377">Araújo, Thádia Evelyn de, 1991- Perfil de reposta imunológica em lactentes: uso no diagnóstico, prognóstico e monitoração pós-terapêutica da toxoplasmose congênita [recurso eletrônico] / Thádia Evelyn de Araújo. - 2021.</p> <p data-bbox="414 1411 1117 1668">Orientador: Olindo Assis Martins Filho. Coorientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro . Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.642 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p data-bbox="414 1702 1085 1870">1. Imunologia. I. Martins Filho, Olindo Assis ,1966- (Orient.). II. , Eloisa Amália Vieira Ferro,1964- (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p data-bbox="1133 1926 1315 1962">CDU: 612.017</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado nº 142				
Data:	vinte e cinco de novembro de dois mil e vinte um	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	
Matrícula do Discente:	11723IPA004				
Nome do Discente:	Thádia Evelyn de Araújo				
Título do Trabalho:	"Perfil de reposta imunológica em lactentes: uso no diagnóstico, prognóstico e monitoração pós-terapêutica da <i>toxoplasmose congênita</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Análise integrativa de parâmetros imunológicos na identificação de biomarcadores complementares para o diagnóstico precoce e monitoração pós-terapêutica da toxoplasmose congênita.				

Reuniu-se, por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, dia 25/11/2021, assim composta pelos titulares: Profa. Dra. Silvana Maria Elói Santos, UFMG, Profa. Dra. Glaucia Diniz Alessio, UFSJ, Profa. Dra. Mariana Bodini Angeloni, UFJ, Profa. Dra. Márcia Aires Freitas, FAMED-UFU, Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho - (Presidente) orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Prof. Olindo Assis Martins Filho apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimeada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Olindo Assis Martins Filho, Usuário Externo**, em 25/11/2021, às 13:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvana Maria Eloi Santos, Usuário Externo**, em 25/11/2021, às 13:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Bodini Angeloni, Usuário Externo**, em 25/11/2021, às 13:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glauca Diniz Alessio, Usuário Externo**, em 25/11/2021, às 13:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Aires Rodrigues de Freitas, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/11/2021, às 13:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3167908** e o código CRC **376F7E83**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Marluce da Silva Araújo e Arli Lopes de Araújo, meus amados pais.

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 sacrifícios que fizeram no decorrer da vida;
- 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;
- Ao meu noivo Fernando, por ser o meu maior suporte, dando apoio e carinho todos os dias, e por acreditar em mim em momentos que nem eu mesma acredito;
- 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, pelo companheirismo e apoio;
- À Prof^ª. Dr^ª. Angélica, que foi uma grande colaboradora neste trabalho, que é um grande exemplo de pesquisadora e por quem tenho um imenso carinho;
- À Prof^ª. Dr^ª. Karine, que foi a primeira a me incentivar a seguir a carreira científica e que se tornou uma grande amiga;
- Aos meus colegas do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução com quem tanto aprendi: Priscila, Rafaela, Iliana, Alessandra, Guilherme, Samuel, Mayara, Carol, Luana, Maria Thereza, Prof^ª. Dr^ª. Bellisa e a Prof^ª. Dr^ª. Juliana. Vou carregar sempre todos vocês no coração. Obrigada pela ajuda no dia-a-dia e pelos ensinamentos de cada um;
- A toda equipe de colaboradores do Grupo de Pesquisa em Biomarcadores do Instituto René Rachou: Jordana, Carol Campi, Carol Aguiar, Lis, Luara, Anderson, Andrea, Dra Gláucia, Prof. Dr. Ricardo e Samantha. Obrigada pelos ensinamentos neste período;
- Aos demais 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.
- Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia (PPIPA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e suporte financeiro.

Obrigada a todos!

Então, vanho...?

Passou-se a infância...
Adolescência turbulenta.
Escada interminável?
Como é fácil o valor do um após outro,
Dos degraus e degraus transpostos.
Ápice longínquo, desejado,
Com esforço alcançado.
Pombinha branca da paz alça voo,
Vê-se nas alturas o vulto,
Sob o claro azul do céu.
Voa minha pombinha branca!
Deixou-me esperançoso,
Seu futuro também é azul.
Sobre o telhado, ergue-se com anseio,
Num bater de asas frenético,
Como se fosse mensageira da paz.
Tens em mente o endereço planejado e traçado.
Acharás teu destino nos pisos repisados,
Dos infindáveis murmúrios cobichados.
Exaltados e sobressaltados, comentários curiosos,
Matarás a ignorância ainda impregnada...
Outra fase perpetua incógnita e sigilosa
Molhando-se em árduas e futuras pesquisas
Afogarás em buscas sábias e constantes.
Frenética como as asas d'outrora,
Doutora...? Buscas o saber?
E nos passos da vida seguida,
Preenches o vácuo de sua promessa.
Numa brincadeira matreira, balbucia:
—Ei...! Já sei falar... “vamos”?
—Então, vamos!

Autor: Arli Lopes de Araújo

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	18
1.2. Toxoplasmose congênita	19
1.5. Diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita.....	32
1.6. Diagnóstico da toxoplasmose congênita em recém-nascidos e lactentes.....	34
1.7. Biomarcadores imunológicos	35
CAPÍTULO I	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. JUSTIFICATIVA.....	52
3. OBJETIVOS	53
3.1. Objetivo geral	53
3.2. Objetivos específicos	53
4. METODOLOGIA	54
4.1. População de estudo	54
4.2. Quantificação de quimiocinas e citocinas séricas	55
4.3. Imunofenotipagem de leucócitos circulantes	55
4.4. Cultura de sangue total de curto prazo <i>in vitro</i> e análise de citocinas intracitoplasmáticas	56
4.5. Análise estatística	57
5. RESULTADOS	58
5.1. Triagem de quimiocinas e citocinas séricas como biomarcadores complementares para diagnóstico precoce e prognóstico de toxoplasmose congênita.....	58
5.2. Triagem de subpopulações de leucócitos circulantes como biomarcadores complementares para diagnóstico precoce e prognóstico de toxoplasmose congênita.....	60
5.3. Triagem de citocinas intracelulares específicas de <i>T. gondii</i> como biomarcadores complementares para o diagnóstico precoce e prognóstico da toxoplasmose congênita.	63
5.4. Desempenho detalhado de biomarcadores selecionados para o diagnóstico complementar precoce de toxoplasmose congênita.....	66
5.5. Desempenho de biomarcadores combinados para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.....	68

5.6.	Desempenho de células T CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ mais IFN- γ ⁺ CD8 ⁺ como diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita.....	72
5.7.	Desempenho de células T CD4 ⁺ IL5 ⁺ e células NK IFN- γ ⁺ para o prognóstico precoce de toxoplasmose congênita.....	73
6.	DISCUSSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	79
	CAPÍTULO 2.....	82
1.	INTRODUÇÃO.....	83
2.	JUSTIFICATIVA.....	85
3.	OBJETIVOS.....	86
3.1.	Objetivo geral.....	86
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
4.1.	População de estudo e amostragem.....	87
5.	RESULTADOS.....	93
5.1.	Perfil fenotípico de leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento.....	93
5.3.	Características fenotípicas de leucócitos circulantes em lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, de acordo com a evolução do estado basal da lesão retinocoroidal.....	96
5.4.	Assinaturas fenotípicas de leucócitos do sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento.....	98
5.5.	Perfil funcional dos leucócitos do sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, de acordo com o estado da lesão retinocoroidal.....	100
	0.....	
6.	DISCUSSÃO.....	103
7.	CONCLUSÃO.....	106
	REFERÊNCIAS.....	107
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ACL = lactentes com lesões retinocoroidais ativas / cicatriciais mistas no início do estudo
ACL → CL = lactentes com lesões retinocoroidais ativas / cicatriciais mistas no início do estudo (ACL) com alteração para lesões retinocoroidais cicatriciais um ano após o nascimento (CL);

ACRL = *Active and Cicatricial Retinochoroidal Lesion* – Lesão retinocoroideana ativa e cicatrizada simultaneamente

AL= lactentes com lesões retinocoroidais ativas no início do estudo

AL → CL = lactentes com lesões retinocoroidais ativas no início do estudo (AL) com alteração para lesões retinocoroidais cicatriciais um ano após o nascimento (CL);

AUC=área sobre a curva

CBA = *Cytometric Bead Array*

CC= Cultura controle

CCL = *Chemokine ligand* – Ligante de Quimiocina

CCR = *Chemokine receptor* - Receptor de Quimiocina

CL= lactentes com lesões retinocoroidais cicatriciais no início do estudo

CL≈CL = lactentes com lesões retinocoroidais (CL) cicatriciais no início do estudo e um ano após o nascimento

CTL = lactentes sem infecção (controle)

CXCL = ligante de quimiocina CXC

DCs = *Dendritic cells* – Células dendríticas

DNA= *Deoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucleico

EDTA = *Ethylenediamine tetraacetic acid* - ácido etilendiamino tetra-acético

ELFA = *Enzyme Linked Fluorescent Assay*

ELISA =*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Ensaio Imunoenzimático

FITC = *Fluorescein isothiocyanate* - Isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF = *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* – Fator estimulante de macrófagos e granulócitos

HLA = *Human leukocyte antigen* – antígeno leucocitário humano

IC = Intervalo de Confiança

IEL = *Intraepithelial lymphocytes* – Linfócitos intraepiteliais

IFN = *Interferon*

IgA = Imunoglobulina da classe A

IgG = Imunoglobulina da classe G

IgM = Imunoglobulina da classe M

IL =Interleucina

iNOS = óxido nítrico sintase induzível

IP-10 = *interferon-inducible protein 10*, proteína 10 induzida por interferon gama

ISAGA= *Immunosorbent Agglutination Assay*, ensaio de aglutinação por imunoadsorção

LA= líquido amniótico

L (-) = lactentes sem lesões retinocoroidais um ano após o nascimento;
L (+) = lactentes com lesões retinocoroidais cicatríciais atuais um ano após o nascimento;
LCR= líquido cefalorraquidiano
LPS = Lipopolissacarídeo
MCP = *Monocyte Chemotactic Protein* - proteína quimiotática de monócitos
MFI= Intensidade Média de Fluorescência
MHC = *Major Histocompatibility Complex* – Complexo principal de histocompatibilidade
MIP = *Macrophage Inflammatory Proteins* - Proteína inflamatória de macrófagos
MyD = *Myeloid differentiation primary response gene* - Fator de diferenciação mielóide
NETs = *Neutrophil Extracellular Traps*
NI = *Non Infected* – Grupo não infectado (controle)
NK = *Natural Killer* – Células Natural Killer
NKT = *Natural Killer T Cells* – Células T Natural Killer
NO = *Nitrous Oxide* - Oxido nítrico
NL = *No Retinochoroidal Lesion* – Sem lesões retinocoroideanas
NUPAD = Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da UFMG
PAMPs = *Pathogen-Associated Molecular Patterns* - Padrões moleculares associados a patógenos
PBS= *Phosphate buffered saline* - solução salina tamponada com fosfato
PCR = *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da Polimerase
PE = *Phycoerythrin* - Ficoeritrina
PETN = Programa Estadual de Triagem Neonatal
PMN = Polimorfonucleares
PRRs = *Pattern recognition receptors* - Receptores de reconhecimento padrão
RE = Retículo Endoplasmático
RN = Recém-nascido
ROC= *Receiver Operating Characteristic* - Característica de Operação do Receptor
ROI = *Reactive Oxygen Intermediate* - Reativos intermediários de oxigênio
ROP = ropria
ROS = *Reactive Oxygen species* - espécies reativas de oxigênio
RPMI = *Roswell Park Memorial Institute*
Se= sensibilidade
Sp= *specificity* , especificidade
STAg = *soluble toxoplasma tachyzoite antigen* - antígeno solúvel de *T. gondii*
STAT = *Signal Transducer And Activator Of Transcription* - Transdutor de sinal e ativador de transcrição
T. gondii = *Toxoplasma gondii*
TC = Toxoplasmose congênita
TCR= *T-cell receptor* – receptor de células T
TGF = *Transforming Growth Factor* – Fator de transformação do crescimento
TG-ROC= *Two-Graph Receiver Operating Characteristic* - Característica de Operação do Receptor de dois gráficos
TGF= *Transforming Growth Factor* - fator de transformação de crescimento

Th = T *helper*

TLR = *Toll-like Receptors* – Receptores semelhantes a Toll

TNFR = *Tumor Necrosis Factor Receptor* – Receptor do fator de necrose tumoral

TNF = *Tumor Necrosis Factor* - Fator de necrose tumoral

TOXO = lactentes infectados com *T. gondii*

TOXO_{1-anoAT} = Lactentes com toxoplasmose congênita um ano após início do tratamento

Treg = células T regulatórias

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

WBC = (do inglês *White blood cells*) – células brancas do sangue (leucócitos)

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Distribuição global da soroprevalência das imunoglobulinas M de <i>Toxoplasma gondii</i> em gestantes (BIGNA et al., 2020).....	21
Figura 2- Distribuição global da soroprevalência das imunoglobulinas G de <i>Toxoplasma gondii</i> em gestantes (BIGNA et al., 2020).....	22

CAPITULO 1

Figura 1- Desempenho dos biomarcadores imunológicos para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.....	66
Figura 2- Desempenho da análise de biomarcador passo a passo simples e combinado para o diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita.....	68
Figura 3- Desempenho de análise única de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e análise combinada de células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ e CXCL9 para o diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita.....	70
Figura 4- Desempenho das células T produtoras de IFN- γ (Σ IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ e CD8 ⁺) para o diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita.....	71
Figura 5- Desempenho de citocinas intracelulares produzidas por células T para o prognóstico precoce da toxoplasmose congênita ocular.....	73

CAPÍTULO 2

Figura 1- Gráficos de citometria de fluxo representativos empregados para estratégia de <i>gating</i> para análise fenotípica e funcional de leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita.	
Figura 2- Perfil fenotípico de leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento.....	93
Figura 3- Perfil fenotípico de lactentes com toxoplasmose congênita de acordo com a lesão retinocoroidal atual um ano após o início do tratamento.....	94
Figura 4- Perfil fenotípico dos leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, de acordo com a evolução do estado basal da lesão retinocoroidal.....	96

Figura 5- Assinaturas fenotípicas de leucócitos do sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento.....	98
Figura 6- Perfil funcional dos leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, classificados de acordo com a lesão retinocoroidal atual.....	100
Figura 7- Perfil funcional dos leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, classificados de acordo com a evolução da lesão retinocoroidal.....	101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Triagem de quimiocinas e citocinas séricas como biomarcadores complementares para diagnóstico precoce e prognóstico da toxoplasmose congênita.....	58
Tabela 2. Triagem de subpopulações de leucócitos circulantes <i>ex vivo</i> como biomarcadores complementares para diagnóstico precoce e prognóstico de toxoplasmose congênita.....	60
Tabela 3. Triagem de citocinas intracelulares específicas de <i>T. gondii</i> como biomarcadores complementares para diagnóstico e prognóstico de toxoplasmose congênita.....	63
Tabela 4. Triagem de subpopulações de leucócitos circulantes <i>ex vivo</i> e citocinas intracelulares específicas de <i>T. gondii</i> como biomarcadores complementares para o prognóstico de toxoplasmose congênita um ano após o nascimento.....	64

RESUMO

O diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita (TC) representa um desafio importante em saúde pública. A busca de indicadores laboratoriais complementares para um diagnóstico precoce e mais sensível da infecção congênita tem sido considerada relevante para contribuir na tomada de decisão clínica e início imediato do tratamento, que reduz complicações posteriores. Aliado a isso, vários estudos tem abordado diferentes tipos de resposta imunológica, para melhor compreensão de como o organismo infectado responde a presença de *T. gondii*. Com isso, o presente trabalho teve dois objetivos: (i) realizar uma análise integrativa de parâmetros imunológicos na identificação de biomarcadores complementares para o diagnóstico precoce da TC em lactentes; e (ii) avaliar o impacto do tratamento etiológico precoce no perfil de biomarcadores celulares e moleculares na TC. Usando pequenos volumes de amostras de sangue total, o desempenho de mediadores solúveis no soro, fenótipos *ex vivo* de leucócitos circulantes e perfis de citocinas intracelulares após estímulos *in vitro* de curto prazo foram avaliados como plataformas de biomarcadores passo a passo simples ou combinadas. Os resultados mostraram que os níveis séricos de CXCL9 e as frequências de células T CD4⁺ CD25⁺ circulantes e células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ específicas de *T. gondii*, mensuradas no período de 30-45 dias após o nascimento apresentaram alta acurácia para distinguir lactentes infectados com *T. gondii* de controles saudáveis de mesma idade. Digno de nota foi o desempenho aprimorado (acurácia = 96%) obtido usando uma análise combinada passo a passo de células T CD4⁺ CD25⁺ e CXCL9. Além disso, a alta acurácia global (AUC = 0,9) com sensibilidade elevada (Se = 98%) também foi alcançada usando a frequência total de células T específicas de *T. gondii* produtoras de IFN- γ *in vitro* (Σ IFN- γ ⁺ CD4⁺ e CD8⁺) como biomarcador de TC. Além disso, a análise *in vitro* de células T CD4⁺ IL5⁺ específicas de *T. gondii* e células NK IFN- γ ⁺ exibiram uma alta acurácia para o prognóstico precoce de lesão ocular em lactentes com TC. Juntos, esses achados apoiam a relevância do emprego dos elementos da resposta imune celular como biomarcadores com potencial para endossar o diagnóstico precoce e o prognóstico da TC, contribuindo assim para um manejo clínico preciso e intervenção terapêutica eficaz. Em relação ao segundo objetivo, abordou-se a alteração da resposta imune de crianças com toxoplasmose congênita (TC) quanto à evolução da infecção e intervenção terapêutica. Lactentes com TC apresentaram alta contagem de monócitos, células T CD3⁻ CD16⁻ CD56^{High}, CD3⁺ CD56⁺ e CD4⁺ um ano após o início do tratamento (TOXO_{1-yearAT}). Números menores de células T CD3⁻ CD16⁻ CD56⁺ e TCR γ δ ⁺ foram especificamente

observados em lactentes com lesões retinocoroidais (L (+)). Quando os lactentes foram classificados de acordo com o estado basal da lesão, a expansão das células T CD3⁻CD16⁻CD56^{High} e CD4⁺ foi observada em L (+) que incluíam pacientes com lesões ativas, ativas/cicatrizadas ou cicatrizadas. Lactentes que tiveram lesões ativas ou ativas/cicatrizadas apresentaram níveis maiores de monócitos, células T CD3⁻CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD56⁺, CD8⁺DR⁺ e TCR $\gamma\delta$ ⁺ e aqueles com lesões ativas/cicatrizadas ou cicatrizadas na classificação basal apresentaram aumento nos monócitos CD14⁺CD64⁺. Além disso, todos em L(+) aumentaram as células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ e IL-10⁺ enquanto L (-) aumentaram células NK produtoras de TNF, IFN- γ e IL-4, após estimulação com antígeno específico. Alterações persistentes em leucócitos em TOXO1-yearAT sugerem sequelas de longo prazo no sistema imunológico de lactentes com TC. Embora o tratamento tenha um impacto benéfico na mudança da lesão retinocoroidal para um estado cicatricial, a implementação de um programa de rastreamento pré-natal ativo para prevenir a transmissão da TC é necessária para minimizar o impacto a longo prazo dessa infecção no sistema imunológico. Em resumo, nossos dados obtidos mostram que o perfil de resposta imune que ocorre em lactentes com TC pode ser útil para a busca de novos biomarcadores diagnósticos e prognósticos e para o monitoramento pós-terapêutico dos pacientes tratados.

Palavras-chave: biomarcadores, resposta imune, lactentes, toxoplasmose congênita

ABSTRACT

The early diagnosis of congenital toxoplasmosis (CT) represents an important public health challenge. The search for complementary laboratory indicators for an early and more sensitive diagnosis of congenital infection has been considered relevant to contribute to clinical decision-making and immediate initiation of treatment, which reduces further complications. In addition, several studies have addressed different types of immune response, for a better understanding of how the infected organism responds to the presence of *T. gondii*. Thus, the present work had two objectives: (i) to perform an integrative analysis of immunological parameters in the identification of complementary biomarkers for the early diagnosis of CT in infants; and (ii) assess the impact of early etiological treatment on the profile of cellular and molecular biomarkers in CT. Using small volumes of whole blood samples, the performance of serum soluble mediators, *ex vivo* phenotypes of circulating leukocytes and intracellular cytokine profiles upon short-term *in vitro* stimuli were evaluated as single or combined stepwise biomarker platforms. Results showed that *ex vivo* serum levels of CXCL9, and the frequencies of circulating CD4⁺CD25⁺ T-cells and *T. gondii*-specific IFN- γ ⁺CD4⁺ T-cells measured 30-45 days after birth presented high accuracy to distinguish *T. gondii*-infected infants from healthy age-matched controls (Global Accuracy/AUC = 0.9; 0.9 and 0.8, respectively). Of note was the enhanced performance (Accuracy = 96%) achieved by using a combined stepwise analysis of CD4⁺CD25⁺ T-cells and CXCL9. In addition, high global accuracy (AUC = 0.9) with elevated sensitivity (Se = 98%) was also reached by using the total frequency of *in vitro* IFN- γ -producing *T. gondii*-specific T-cells (Σ IFN- γ ⁺ CD4⁺ & CD8⁺) as a biomarker of congenital toxoplasmosis. Furthermore, the analysis of *in vitro* *T. gondii*-specific IL5⁺CD4⁺ T-cells and IFN- γ ⁺ NK-cells displayed a high accuracy for early prognosis of ocular lesion in infant with CT (Global Accuracy/AUC = 0.8 and 0.9, respectively). Together, these findings support the relevance of employing the elements of the cell-mediated immune response as biomarkers with potential to endorse early diagnosis and prognosis of congenital ocular toxoplasmosis to contribute for a precise clinical management and effective therapeutic intervention. Regarding the second objective, changes in immune response of children with congenital toxoplasmosis (CT) regarding infection evolution and therapeutic intervention was addressed. Infants with CT presented increased counts of monocytes, CD3⁻CD16⁻CD56^{High}, CD3⁺CD56⁺ and CD4⁺ T-cells 1-year after treatment onset (TOXO_{1-yearAT}). Smaller numbers of CD3⁻CD16⁻CD56⁺ and TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-cells were specifically observed in infants with retinochoroidal lesions (L(+)). When infants were classified based on

the baseline status, expansion of CD3⁻CD16⁻CD56^{High} and CD4⁺ T-cells were observed in L(+) who had active, active/cicatricial or cicatricial lesions. Infants who had active or active/cicatricial lesions display augmented numbers of monocytes, CD3⁻CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD56⁺, CD8⁺DR⁺ and TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-cells and those with active/cicatricial or cicatricial at baseline displayed increase in CD14⁺CD64⁺ monocytes. Moreover, all L(+) had increased IFN- γ ⁺ and IL-10⁺ CD4⁺ T-cells, while L(-) had increased ratios of TNF⁺, IFN- γ ⁺ and IL-4⁺ NK-cells upon antigen-specific stimulation. Persistent alterations in leukocytes in TOXO1-yearAT suggest long-term sequels in the immune system of infants with CT. Although treatment had a beneficial impact in shifting the retinochoroidal lesion to a cicatricial state, the implementation of an active prenatal screening program to prevent CT transmission is necessary to minimize the long-term impact of this infection in the immune system. In summary, our data suggest that the immune response profile that occurs in newborns and infants with CT may be useful for the search for new diagnostic and prognostic biomarkers, and for post-therapeutic monitoring of treated patients.

Keywords: biomarkers, immune response, infants, congenital toxoplasmosis.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, Classe Coccidea, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eimeriida, Subordem Eimeriorina, Família Sarcocystidae (Sarcocystis), Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero Toxoplasma (McAULEY; JONES; SINGH, 2015). Foi descrito em 1908 por Splendore no Brasil e por Nicolle & Manceaux na Tunísia, simultaneamente. Tem como característica a capacidade de infectar células nucleadas de animais homeotérmicos, incluindo células do sistema nervoso e placenta (DUBEY; BEATTIE, 1988), graças a um conjunto de organelas secretoras presentes no complexo apical de organismos pertencentes ao grupo Apicomplexa (MORRISSETE; SIBLEY, 2002).

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxênico, envolvendo um hospedeiro definitivo felídeo e hospedeiros intermediários, incluindo aves e mamíferos. Membros da família Felidae são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos para os estágios sexuais de *T. gondii* e, portanto, são os principais reservatórios de infecção. Os três estágios deste parasita inclui: taquizoítos, que proliferam rapidamente e destroem células infectadas durante a infecção aguda; bradizoítos, que possuem proliferação lenta em tecidos formando cistos; e esporozoítos em oocistos, que são excretados em fezes do gato. Os oocistos podem sobreviver no ambiente por vários meses a mais de um ano e são resistentes a desinfetantes, congelamento e secagem, mas são destruídos por aquecimento a 70 ° C durante 10 minutos (REMINGTON et al., 2011, McAULEY, 2014).

Nas células epiteliais do intestino dos felídeos ocorre a reprodução sexuada do protozoário. Estes animais se infectam após a ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos, uma das formas de desenvolvimento do parasito, citada anteriormente (REMINGTON et al., 2011). Nos hospedeiros intermediários ocorre somente a fase assexuada da reprodução. Nesses casos, a contaminação ocorre por meio de: ingestão de oocistos maduros presentes no solo; ingestão de água e alimentos não higienizados; ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos em carnes cruas ou mal cozidas; ingestão de taquizoítas presentes em líquidos orgânicos, infecções congênitas, acidentes laboratoriais e transplante de órgãos e tecidos (DEROUIN; PELLOUX, 2008; GOTTELAND et al., 2014; CARADONNA et al., 2017).

Em humanos, a infecção causada por esse protozoário geralmente é assintomática em adultos imunocompetentes, mas oferece riscos consideráveis com elevada morbidade para pacientes imunocomprometidos, sendo o sistema nervoso central o local das manifestações mais graves nesses indivíduos (PORTER; SANDE, 1992; ROBERT-GANGNEUX et al., 2015). A doença oferece também riscos consideráveis com complicações graves para o feto ou recém-nascido quando a primo-infecção ocorre durante a gestação (MOMBRÓ et al., 2003). Em imunocompetentes, os sintomas são inespecíficos, como febre, fadiga e linfadenopatia, sendo na maioria das vezes, confundidos com manifestações de outras doenças e não tendo necessidade de tratamento específico. Esses sintomas ocorrem devido à destruição tecidual causada pelo crescimento do protozoário (BLADER et al., 2015). Em pacientes imunocomprometidos, as manifestações clínicas da toxoplasmose são mais graves, podendo ocorrer comprometimento neurológico e oftalmológico, além de pneumonia e miocardite (PARLOG; SCHLÜTER; DUNAY, 2015).

1.2. Toxoplasmose congênita

A infecção em gestantes pode resultar na transmissão vertical da toxoplasmose, sendo a TC a forma mais significativa da doença (REZENDE-OLIVEIRA et al., 2012, EMELIA et al., 2014, PERNAS et al., 2014). Embora a transmissão vertical derivada de infecção primária é considerada a via mais comum, estudos mostram que a transmissão transplacentária também pode ocorrer após a recorrência de infecção com reativação de cistos latentes no organismo e reinfecção materna com cepas geneticamente distintas (FRANCO et al., 2011, BESSA et al., 2019, CHIEBAO et al., 2019).

As manifestações clínicas da infecção congênita variam de acordo com a fase da gestação em que ocorre a transmissão do parasito para o feto, sendo que a possibilidade de transmissão materno-fetal de *T. gondii* aumenta no decorrer da gravidez, ou seja, a idade gestacional e a taxa de transmissão são diretamente proporcionais. Apesar das maiores taxas de transmissão de infecção para o feto ocorrerem no terceiro trimestre, a transmissão mais tardia na gravidez geralmente resulta em infecção subclínica ou manifestações mais leves de toxoplasmose congênita no nascimento. Sendo assim, a idade gestacional e a gravidade das sequelas da infecção são inversamente proporcionais (DESMONTS; COUVREUR, 1974, HOHLFELD et al., 1994, STILLWAGGON et al., 2011). Porém, é importante ressaltar que

as lesões oculares decorrentes da toxoplasmose não são totalmente dependentes da época da infecção (GILBERT et al., 2008).

Deste modo, as consequências mais comuns são: retinocoroidite, aborto espontâneo e morte fetal no interior do útero, ou nascimento de crianças com hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardamento mental e motor, trombocitopenia e/ou anemia. Nenhum dos sintomas descritos anteriormente é exclusivo para toxoplasmose congênita, uma vez que podem se manifestar em decorrência de infecções congênitas causadas por outros patógenos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

Além disso, indivíduos infectados congenitamente podem apresentar sintomas na puberdade e fase adulta, sendo a retinocoroidite e danos no sistema nervoso central as manifestações mais comuns nesses casos (BEVERLEY, 1973, WILSON et al., 1980). Outros estudos indicam a possibilidade de relação entre toxoplasmose e manifestação de diversos distúrbios mentais, como transtorno bipolar, esquizofrenia, autismo e depressão, na puberdade e vida adulta, porém ainda não há um consenso na literatura a respeito dessa possível correlação (DEL GRANDE et al., 2017, SPANN et al., 2017). A ausência do tratamento durante a gestação está relacionado com a presença de sintomas nas crianças nascidas com TC, demonstrando a importância de um pré-natal com exames periódicos e de uma intervenção terapêutica precoce (STRANG et al., 2020).

Estima-se que a prevalência para a toxoplasmose atinja até 30% em adultos, com variações decorrentes da localização geográfica (MONTROYA; LIESENFELD, 2004), 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). Uma estudo recente de revisão, que abordou a prevalência da toxoplasmose gestacional em vários países, mostrou que a soroprevalência global de IgM anti-*T. gondii* foi de 1,9% , com heterogeneidade substancial entre as regiões (Figura 1). Já a soroprevalência global de IgG (Figura 2) foi de 32,9%, também apresentando heterogeneidade substancial, sendo o Brasil o terceiro país com maior taxa de soroprevalência de IgG (53.8%). Além disso, o estudo concluiu que a toxoplasmose apresenta distribuição mundial e sua frequência é maior em países de baixa renda em comparação com países de maior renda (BIGNA et al., 2020). As diferenças nas taxas de soroprevalência ao redor do globo provavelmente estão relacionadas com as variações nos níveis de serviços públicos de saúde e saneamento básico, situação econômica, diferentes condições culturais e sociais, além de diferenças climáticas (ROSTAMI

et al., 2020). Nessas localizações, a conscientização da população pode facilitar o reconhecimento de fatores de risco e pode permitir a aplicação de políticas adequadas de saúde pública, visando, em particular, mulheres soronegativas em idade fértil em áreas de alta prevalência (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009).

Além da América do Sul apresentar altas taxas de soroprevalência em comparação com outras regiões (BIGNA et al., 2020, ROSTAMI et al., 2020), a infecção congênita, retinocoroidite, e encefalite toxoplasmática também são mais frequentes na América do Sul do que em outras regiões do mundo (BESSA, ALMEIDA-VITOR, MARTINS-DUARTE, 2021). Para explicar esse fato, diversos estudos relacionam o aumento da frequência das manifestações clínicas da toxoplasmose com uma grande diversidade genética de *T. gondii* nessas regiões. Especificamente em Minas Gerais, um estudo utilizando isolados obtidos em amostras de recém-nascidos com TC mostrou um alto índice de polimorfismo genético. No total, 27 cepas foram isoladas e a análise genética de 24 destas revelou 14 genótipos diferentes, incluindo 7 previamente identificados de animais e 7 novos tipos. (CARNEIRO et al., 2013). Outro estudo brasileiro observou a alta diversidade genética de *T. gondii* entre isolados de animais domésticos, animais selvagens e amostras de líquido-amniótico no Centro-Oeste do Brasil, identificando nove genótipos previamente descritos e dois novos em animais domésticos e selvagens (WITTER et al., 2020). Acredita-se que os fatores que contribuem para esta grande variabilidade genética de cepas de *T. gondii* incluem: a grande biodiversidade da fauna brasileira, incluindo hospedeiros definitivos, amplitude geográfica e diferentes rotas de infecção (FERREIRA et al., 2006).

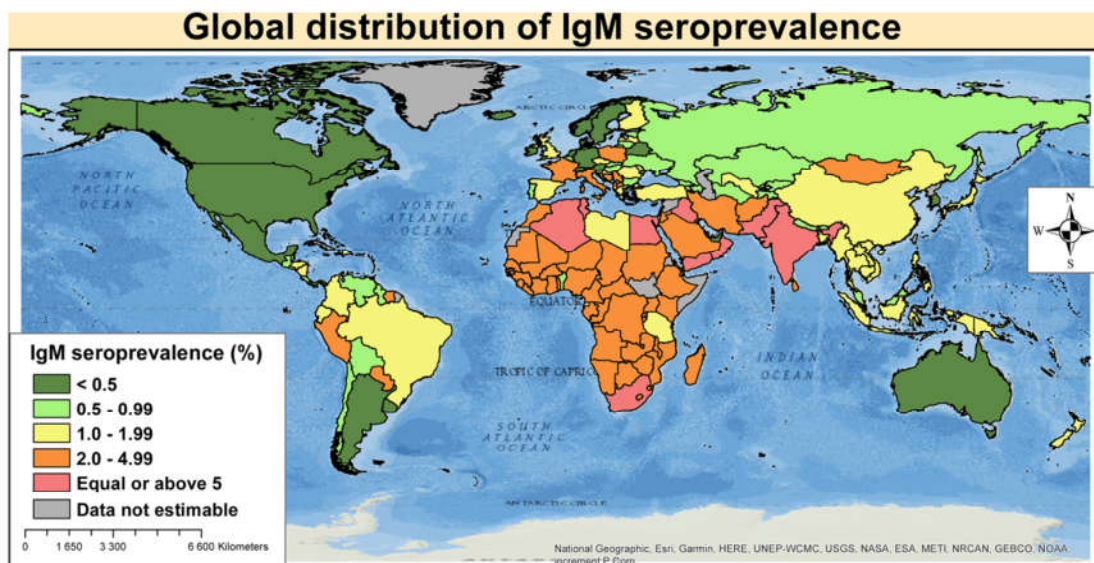


Figura 1. Distribuição global da soroprevalência das imunoglobulinas M de *Toxoplasma gondii* em gestantes (BIGNA et al., 2020).

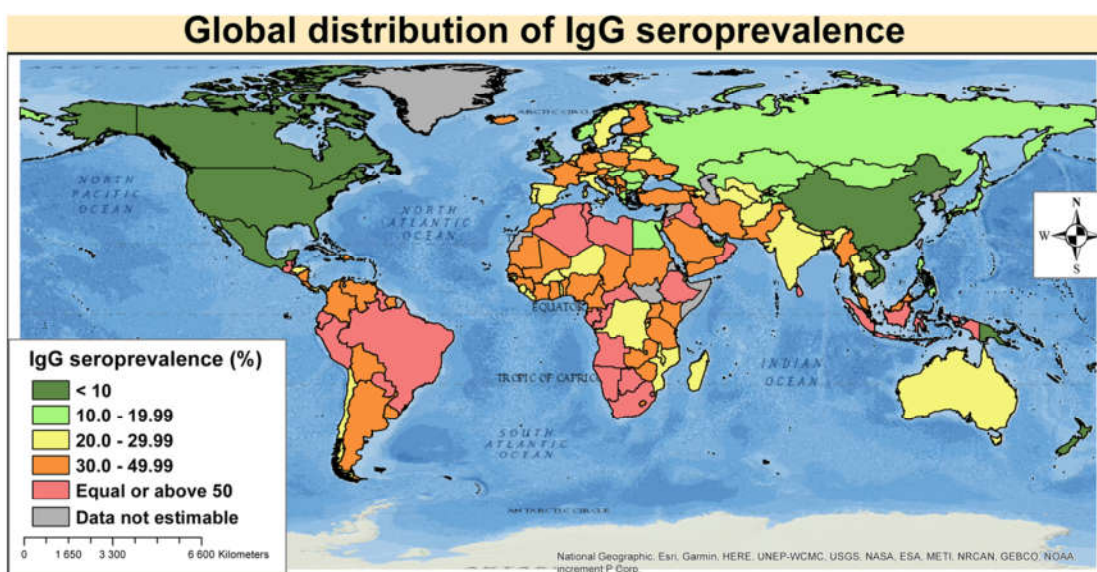


Figura 2. Distribuição global da soroprevalência das imunoglobulinas G de *Toxoplasma gondii* em gestantes (BIGNA et al., 2020).

1.3. Resposta imune ao *Toxoplasma gondii*.

O controle da disseminação de *T. gondii* no hospedeiro adulto envolve uma série de interações celulares coordenadas entre o parasito, células e outros elementos da resposta imune (MILLER et al. 2009, HALONEN et al., 2013). Normalmente, *T. gondii* atinge locais classicamente definidos como “imunologicamente privilegiados”, como o cérebro, os olhos ou a placenta. Essa condição é definida pela limitação da inflamação local e ativação de

células imunes, evitando danos irreversíveis aos tecidos (GREIGERT, BITTICH-FAHMI, PFAFF, 2020). Nesses locais, o equilíbrio entre a ativação da resposta imune para conduzir a formação dos estágios de cisto tecidual crônico e a inibição da resposta imune para garantir sua sobrevivência determina o sucesso de *T. gondii* no organismo. Para ser transmitido, o protozoário em questão precisa formar cistos teciduais infecciosos por via oral em hospedeiros intermediários. Portanto, é do interesse do parasita garantir que seu hospedeiro sobreviva à infecção, que é alcançada pela indução de uma resposta imune capaz de controlar a multiplicação do parasita. No entanto, para garantir que nem todos os parasitas sejam eliminados por essa resposta imune, *T. gondii* utiliza estratégias efectoras para garantir a sua sobrevivência (ARRANZ-SOLÍS; MUKHOPADHYAY; SAEIJ, 2021).

1.3.1. Resposta imune inata

Inicialmente *T. gondii*, quando ingerido pelo hospedeiro na forma de cisto ou oocisto, tem sua parede rompida no estômago, e os bradizoítos ou esporozoítos cruzam a barreira epitelial intestinal ao infectar enterócitos presentes na mucosa, mecanismo necessário para desencadear uma infecção sistêmica (EGAN et al., 2012). Este protozoário apicomplexa realiza a invasão celular de forma ativa, evitando extensas rupturas do endotélio durante o processo (DUNAY; SIBLEY, 2010). Os enterócitos infectados secretam quimiocinas como o ligante de quimiocina CXC 2 (CXCL2), que inicialmente recruta neutrófilos para o local da infecção. Outras quimiocinas produzidas localmente após a infecção por *T. gondii* incluem os ligantes de quimiocinas CCL2, CCL4, CCL5, CCL7 (proteína quimiotática de monócitos 3 - MCP-3), CCL8 (MCP-2), que possuem ação quimioatraente para monócitos, células dendríticas (DCs) e macrófagos, direcionando essas células para o intestino (MCGOVERN; WILSON, 2013, DUNAY; DIEFENBACH, 2018). Embutida no epitélio intestinal está também uma população de linfócitos T intraepiteliais (IEL) cuja origem e função são relativamente mal compreendidas. Estas células podem expressar o receptor de células T (TCR) $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ e foram relacionadas com a homeostase tecidual, podendo contribuir também para o surgimento de patologia causada por resposta pró-inflamatória durante a toxoplasmose (COHEN; DENKERS, 2015). Em modelo animal, a patologia foi associada à capacidade dessas células de produzir IFN- γ e foi dependente da expressão do receptor de quimiocinas 2 (CCR2) (EGAN et al., 2009).

Durante a infecção aguda, as células apresentadoras de antígenos como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (citados anteriormente) são extremamente importantes para iniciar uma resposta imune do tipo T *helper* 1 (Th1), necessária para a eliminação de *T. gondii*. Para que a ativação dessas células ocorra, 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 dos receptores semelhante à Toll (TLRs – do inglês *Toll like receptors*), principalmente TLR11 (não funcional em humanos) e TLR12, induzidos pela molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (Myd88 – do inglês *Myeloid differentiation protein 88*), desencadeando 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). Na ausência de TLR11, os receptores endossomais TLR7 e TLR9 agem de forma combinada também levando a ativação de Myd88. Além disso, os receptores de superfície celular TLR2 e TLR4 também parecem estar envolvidos no reconhecimento de *T. gondii* (YAROVINSKY, 2014).

Após o reconhecimento pelos receptores, os neutrófilos desempenham papel importante nos estágios iniciais da infecção, atuando na proteção por meio da fagocitose, liberação de moléculas microbicidas, como intermediários reativos de oxigênio e enzimas degradativas, e secreção de moléculas efetoras (como IL-12, IL-1 β , TNF, CXCL1 e CXCL2, CCL5, CCL20 e CCL2), ativando outros subconjuntos de células imunes (DENKERS et al., 2004, DUNAY; DIEFENBACH, 2018). Além disso, podem promover armadilhas extracelulares, chamadas NETs (do inglês *Neutrophil extracellular trap*), que capturam, neutralizam e matam *T.gondii*, promovem o recrutamento de células CD4⁺ e a produção de citocinas de perfil Th1 e Th17 durante a fase aguda da doença (MIRANDA et al., 2021). Em camundongos, a depleção de neutrófilos no início da infecção resulta no aumento da susceptibilidade e exacerbação da toxoplasmose, com diminuição da produção de IFN- γ , IL-12, TNF- α , indicando uma reversão da resposta Th1 para uma resposta predominantemente Th2. Quando a depleção é feita em estágios mais avançados da infecção nenhum efeito é observado, indicando um papel importante destes na resposta inicial ao *T. gondii* (BLISS et al., 2001).

As células dendríticas são as principais fontes de produção de IL-12 em resposta a infecção por *T. gondii* e são vitais para a resistência contra a infecção *in vivo* (SCOTT,

HUNTER, 2002). Foi demonstrado que o receptor CCR5 está envolvido na mobilização de células dendríticas e na produção de IL-12 após a infecção por *T. gondii*. Neutrófilos infectados produzem os ligantes de CCR5 (CCL3, CCL4 e CCL5), levando à migração de células dendríticas para o sítio de infecção e à posterior produção de IL-12, demonstrando assim um papel importante dessas células na iniciação das respostas de perfil Th1 (ALIBERTI; JANKOVIC; SHER, 2004). Corroborando com esses dados, foi visto que, em camundongos, a depleção das células dendríticas suprime a produção de IL-12 e aumenta a susceptibilidade de camundongos à infecção aguda. Ao mesmo tempo, a transferência de células dendríticas de camundongos selvagens para camundongos que sofreram depleção de células dendríticas antes da infecção restaura a produção de IL-12 e IFN- γ , e consequentemente aumenta a resistência à infecção (LIU et al., 2006).

Outro componente da resposta inata que atua no início da infecção por *T. gondii* são os macrófagos, que são um grupo de células extremamente heterogêneo com muitas subpopulações que se comportam de maneira distintas, inclusive durante a infecção por *T. gondii* (CABRAL et al., 2018). Em geral, essas células atuam na fagocitose, apresentação de antígenos para os linfócitos, produção de substâncias antimicrobianas e de citocinas pró-inflamatórias importantes, como IFN- γ , TNF e IL-12. O IFN- γ induz a produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos próprios macrófagos, sendo essas substâncias extremamente importantes para uma eliminação eficiente de *T. gondii* (STURGE et al., 2014).

Após o reconhecimento do antígeno, os macrófagos podem sofrer uma polarização que determina suas respostas efectoras. Citocinas de perfil Th1 desencadeiam a ativação clássica dessas células, conhecida como polarização M1. Macrófagos M1 são produtores de fatores pró-inflamatórios e expressam em suas superfícies os marcadores CD40 e CD64. Já as citocinas de perfil Th2 desencadeiam a ativação alternativa dos macrófagos, que são polarizados para um perfil denominado M2. Esse perfil de macrófago está mais associado a uma resposta imune reguladora, participando da regeneração de tecidos, angiogênese e tolerância imunológica. Apresentam em suas superfícies os marcadores CD163 e CD206. As duas populações de macrófagos descritas possuem papel importante na resposta a *T. gondii*, estando relacionados a patogenicidade (macrófagos M1) e a ausência de sintomas (macrófagos M2) (PATIL et al., 2014, JIN et al., 2017).

Contudo, *T. gondii* evoluiu estratégias para poder evadir da resposta de macrófagos ativadas classicamente. Uma das estratégias desenvolvidas inclui a supressão da produção de

óxido nítrico (NO, do inglês *Nitrous Oxide*), limitando a disponibilidade de arginina intracelular. Parasitas da cepa Tipo I iniciam a privação de arginina pela secreção de roptria 16 (ROP16), uma quinase que ativa STAT6 e resulta na expressão da arginase-1 do hospedeiro, que degrada a arginina da célula hospedeira disponível, limitando assim a disponibilidade de NO. Apesar dessa limitação de NO ser benéfico para o protozoário, *T. gondii* também é afetado pela falta de arginina, que provoca diminuição de sua proliferação. Essa resposta leva a uma redução no crescimento do parasita com o objetivo de manter a sua sobrevivência a longo prazo dentro do hospedeiro (BUTCHER et al., 2011, PITTMAN; KNOLL, 2015).

A infecção por *T. gondii* também desencadeia a produção de células NK citotóxicas, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção. Na fase aguda, células NK migram para o sítio de infecção pela ação do receptor de quimiocinas CCR5 e produzem IFN- γ em resposta a IL-12, contribuindo para o desencadeamento da resposta pró-inflamatória (KHAN et al., 2006, GIGLEY et al., 2016). Essas células parecem estar envolvidas também na produção de IL-17, estimuladas por IL-6, IL-23 e TGF- β , apontando um papel dessas células na promoção e manutenção da resposta de perfil Th17. Em contraste, esses eventos foram inibidos por IL-2, IL-15 e IL-27 (PASSOS et al., 2010).

Em suma, a interrupção da proliferação de taquizoítos decorre principalmente da ativação de macrófagos e células NK, da produção de IL-12, IFN- γ , IL-2 e 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). 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 de que IFN γ , junto a TNF- α , promove eventos precoces e tardios associados à citotoxicidade contra as células infectadas com *T. gondii*, exercidas pelas células efectoras de linfócitos T CD8⁺ (SHAH et al., 2015).

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 conseqüente dano tecidual (DENKERS et al. 1998).

1.3.2. Resposta imune adaptativa

As citocinas produzidas após reconhecimento de *T. gondii* pela resposta imune inata determinam o curso da resposta imune adaptativa. A IL-12 produzida durante respostas imunes inatas em DCs, e os macrófagos estimulam a proliferação de células NK, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ citotóxicas, resultando em produção massiva de IFN- γ . 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 iniciação das respostas das células T requer que as células T CD4⁺ ou CD8⁺ *naïve* encontrem células apresentadoras de antígenos contendo seu antígeno associado às moléculas MHCII ou MHCI, respectivamente, em conjunto com os sinais coestimulatórios (a ligação das moléculas CD28 e ICOS, expressas na superfície das células T) e de citocinas (IL-12) necessários para a ativação das células T. As células que apresentam antígeno para as células T CD4⁺ incluem células B, macrófagos e DCs (CURTSINGER et al., 1999, DUPONT, CHRISTIAN, HUNTER, 2012).

As células T CD4 normalmente desempenham um papel menor no controle da infecção por *T. gondii* em hospedeiros imunossuficientes, onde as infecções são geralmente bem contidas e amplamente assintomáticas (TUSSIWAND et al., 2020). Porém, essas células desempenham um papel auxiliar essencial para manter a imunidade a longo prazo e fornecem várias funções regulatórias críticas na mediação da resistência à toxoplasmose. Durante os estágios iniciais da infecção, eles contribuem para as respostas ideais das células B e T CD8⁺, e a capacidade dessas células de controlar a infecção crônica pode ser atribuída à sua produção de citocinas como IFN- γ , ou sua expressão de CD40L (também referido como CD154), que pode ativar mecanismos efetores em macrófagos e outras células inatas que expressam CD40 em sua superfície (ANDRADE et al., 2005, DUPONT, CHRISTIAN, HUNTER, 2012).

O papel de células T CD4⁺ regulatórias (Treg) ainda precisa ser explorado com mais detalhes, porém vários estudos sugerem que Treg está envolvido com a proteção do *T. gondii*. Uma diminuição no número de células Treg Foxp3⁺ locais e na circulação sistêmica foi associada à mortalidade em camundongos após infecção oral letal por *T. gondii* (OLDENHOVE et al., 2009, SILVA-GUTIERREZ et al., 2018). Outro estudo usando modelo animal aponta um papel duplo das células Treg durante a infecção por *T. gondii*: nos animais com baixo número de células Treg durante a infecção aguda, foi visto uma alta taxa de mortalidade decorrente de uma resposta imune exacerbada, porém após a transferência de células Treg, a imunopatologia foi atenuada e a carga de cistos cerebrais aumentou. Portanto, na toxoplasmose é necessário que ocorra um equilíbrio delicado entre resposta imune inflamatória e sua modulação pelas células Treg (OLGUÍN et al., 2015).

Enquanto células T CD4⁺ desempenham um papel importante na etapa inicial da infecção por *T. gondii*, os linfócitos T CD8⁺ desempenham o papel principal no controle da toxoplasmose e são críticas para a proteção de longo prazo e para manter a infecção em um estado crônico. O mecanismo de proteção mediada por células T CD8⁺ durante os estágios finais da infecção aguda pode ser atribuído à sua capacidade de produzir IFN- γ . No entanto, durante a toxoplasmose crônica, a capacidade citotóxica dependente de perforina da população de células T CD8⁺ está envolvida em restringir a proliferação do protozoário (KHAN; MORETTO, 2019). Camundongos infectados cronicamente e tratados com o anticorpo anti-CD8 apresentaram reativação da infecção latente, indicando a importância dessas células para o controle da toxoplasmose (BHADRA; COBB; KHAN, 2011).

Embora as células T CD8⁺ desempenhem um papel efetor importante no controle da infecção crônica, sua manutenção depende da ajuda crítica fornecida por T CD4⁺ (KHAN; MORETTO, 2019). As células T CD4⁺ ajudam a resposta das células T CD8⁺ principalmente facilitando a apresentação do antígeno e a regulação positiva de moléculas co-estimulatórias nas células dendríticas para níveis ideais que induzem uma resposta robusta das células T CD8⁺ (BENNETT et al., 1997, SCHOENBERGER et al., 1998). As células T CD4 também são essenciais para a expansão robusta da população de células T CD8⁺ de memória (WILLIAMS et al., 2006a) e são uma fonte crítica de IL-2, importante para o desenvolvimento das células T CD8⁺ (WILLIAMS et al., 2006b).

As células NK durante a infecção crônica por *T. gondii* modificam seu papel na imunidade ao parasita e passam de protetoras a componentes prejudiciais da resposta imune. Em camundongos foi visto que essas células provocam a exaustão de linfócitos T CD8⁺, ao

desencadear apoptose, diminuindo o número dessas células protetoras no baço e consequentemente no cérebro, levando a uma possível reativação da infecção (IVANOVA et al., 2020). A exaustão das células T CD8⁺ durante a infecção crônica por *T. gondii* é marcada pela redução do número de células T CD8⁺, diminuição das frequências e números de células T CD8⁺ produtoras de IFN γ no baço e cérebro, aumento da apoptose de T CD8⁺ e alta expressão de PD1 na superfície dessa população celular (WHERRY; KURACHI, 2015).

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 proteção contra a infecção, os anticorpos IgG específicos para o antígeno estão envolvidos com a proteção 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 avidéz 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.

1.4. Resposta imune ao *Toxoplasma gondii* na placenta

A toxoplasmose congênita é causada pela transmissão vertical de *T. gondii* durante a gestação. Para que isso ocorra, o protozoário em questão precisa atravessar a barreira placentária e chegar até o feto. Da mesma forma que ocorre na toxoplasmose adquirida pós-natal, quando *T. gondii* infecta uma gestante também são necessárias interações celulares coordenadas entre todos os elementos da resposta imune, para que ocorra o controle de sua disseminação, e isso deve ocorrer principalmente no microambiente placentário.

Em humanos, a placenta é a principal interface entre os compartimentos materno e fetal e é a barreira primária que restringe a disseminação hematogênica de diferentes microrganismos. Aliado a isso, as gestantes representam uma população imunologicamente única: a presença do feto e a formação da placenta alteram a imunidade e fisiologia materna com o objetivo de manter a gravidez. A resposta imune na placenta fornece proteção contra infecção e contribui para a remodelamento do tecido materno, que é fundamental para o desenvolvimento do feto. Compreender os aspectos celulares e moleculares desta interação é relevante para a tomada de decisões clínicas associadas ao tratamento e prevenção de infecções que ocorrem durante a gestação (RACICOT et al., 2014, ANDER et al., 2018, PIAO et al., 2018, BORGES et al., 2019).

O risco da transmissão vertical de *T. gondii* aumenta de acordo com a idade gestacional. Esse aumento no risco ocorre devido a dois fatores principais: alterações na estrutura da placenta ao longo da gestação e a modulação da resposta imunológica, necessária para a manutenção da gestação. No decorrer da gravidez, a barreira placentária diminuiu progressivamente até o final do período gestacional, permitindo que os patógenos invadam de forma mais fácil os trofoblastos (BLASZKOWSKA; GÓRALSKA, 2014; HOO; NAKIMULI; VENTO-TORMO, 2020). Além disso, de acordo com o prosseguimento da gestação, a camada de trofoblasto viloso se torna descontínua e diminui sua capacidade proliferativa, fazendo com que a camada de sinciotrofoblasto se torne mais fina e descontínua, levando à uma diminuição da barreira placentária (CARLIER et al., 2012; ROBBINS et al., 2012).

A modulação da resposta imunológica, o segundo fator que interfere na relação entre a taxa de transmissão e o período gestacional, é decorrente da necessidade do organismo materno em promover tolerância em relação aos tecidos fetais, que expressam antígenos paternos. Nos primeiros estágios da gravidez, há um ambiente pró-inflamatório que decorre da implantação e placentação. Posteriormente, há uma mudança para um estado anti-

inflamatório que permite o crescimento fetal e, finalmente, uma mudança de volta para um estágio pró-inflamatório que promove o parto. Com isso, durante esse período alguns aspectos da imunidade da mãe são modificados, com o aumento da circulação de monócitos, granulócitos e linfócitos T, e diminuição da expressão do complexo de histocompatibilidade classe II pelos monócitos circulantes da mãe (NAPSO et al., 2018; ARRANZ-SOLÍS, MUKHOPADHYAY; SAEIJ, 2021).

Além da interferência da resposta imunológica na transmissão do parasito, a infecção por *T. gondii* promove um desequilíbrio nessa curva de resposta imunológica, desencadeando diferentes consequências clínicas. A alteração do equilíbrio Th1 / Th17 versus Th2 / Treg na placenta pode desempenhar um papel central na ocorrência do aborto, principalmente no início da gestação, não necessariamente tendo relação com a transmissão vertical. O toxoplasma causa uma diminuição nos níveis de Tregs e do fator de transformação de crescimento (TGF) - β na interface materno-fetal, impedindo assim o controle de uma resposta imune exacerbada (ARRANZ-SOLÍS; MUKHOPADHYAY; SAEIJ, 2021). Em contrapartida, se prevalecer um perfil dominado por células Th2 e Treg, esse perfil menos agressivo pode facilitar o escape de *T. gondii* da resposta imune, levando ao aumento da patologia materna ou ao aumento da probabilidade de transmissão congênita (BORGES et al., 2019).

Estudos *in vitro* usando linhagens celulares mostram que células trofoblásticas modulam a atividade de células imunológicas, na infecção por *T. gondii*. Castro et al (2013) viram, por exemplo, que células trofoblásticas são capazes de regular a atividade funcional das monócitos (células THP-1), alterando o padrão de secreção de citocinas, bem como sua suscetibilidade à infecção por *T. gondii* na interface materno-fetal. Já Guirelli et al. (2015), observaram que macrófagos infectados desencadearam o aumento de apoptose em linhagem de trofoblasto extraviloso.

Porém, alguns estudos utilizando amostras de soro sugerem que o perfil da resposta imunológica da gestante é um fator importante envolvido na taxa de transmissão vertical, sugerindo que o perfil de resposta Th1 pode estar associado a uma maior transmissão (GOMÉZ-CHAVEZ et al., 2019, GOMÉZ-CHAVEZ et al., 2020). O aumento da produção de IFN- γ foi associada a gestantes infectadas com *T. gondii* que transmitiram congenitamente o protozoário, sendo encontrada também uma diminuição da produção de TGF- β nesse mesmo grupo de gestantes. Isso, de acordo com os autores deste trabalho, demonstra um papel paradoxal da resposta pro-inflamatória de perfil Th1, que limita a infecção nos tecidos

maternos, porém parece estar associada a uma maior transmissão (GOMÉZ-CHAVEZ et al., 2019, GOMÉZ-CHAVEZ et al., 2020).

Nesse contexto, o desenvolvimento do sistema imunológico humano que começa nos estágios embrionários iniciais pode sofrer interferências. O perfil de resposta imunológica de uma criança pode ser influenciado por alterações intrauterinas, como por exemplo a exposição a alérgenos, infecções microbianas ou doenças maternas imunomediadas, que podem ocasionar impacto na imunidade no nascimento e na maturação imunológica durante a primeira infância das crianças. A falha em responder com uma resposta apropriada para a idade leva a mortalidade e a morbidade. O aumento do conhecimento sobre a maturação do sistema imunológico pode levar a novas ferramentas diagnósticas e intervenções terapêuticas (YGBERG; NILSSON, 2011, BASHA, SURENDRAN, PICHICHERO et al., 2014).

1.5. Diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita

O diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita ainda representa um desafio importante em saúde pública. O soro, o plasma, o líquido cefalorraquidiano (LCR), o fluido ocular, o LA e a placenta podem ser utilizados para pesquisa de anticorpos específicos e/ou DNA do parasita (STERKERS et al., 2012, McAULEY, 2014, ROBERTGANGNEUX et al., 2017), sendo úteis no diagnóstico e/ou no monitoramento dos pacientes.

O diagnóstico clínico da doença é pouco empregado, pois a maioria dos casos é assintomática e nos casos onde existem sintomas, estes são inespecíficos. Nesse contexto faz-se necessário a utilização de testes sorológicos, que indicam o estágio da doença. Os métodos indiretos baseados na pesquisa de anticorpos específicos para *T. gondii* são os mais utilizados (MITSUKA-BREGANÓ et al., 2010).

Apesar de a maioria dos casos de toxoplasmose não apresentar sintomas clínicos, é extremamente importante realizar um diagnóstico precoce da doença para início imediato do tratamento, que reduz complicações posteriores, incluindo a retinocoroidite. Devido a isso, a triagem sorológica das gestantes, ao detectar a infecção em fase aguda, facilita o diagnóstico e tratamento e previne a transmissão da doença para o feto (PINON et al., 1996; REMINGTON et al., 2011).

No diagnóstico pré-natal, a infecção primária é confirmada depois da avaliação da presença de anticorpos IgM e/ou IgG no soro das pacientes gestantes. No entanto, devido às variações na produção de anticorpos após a infecção, um diagnóstico definitivo só é possível após avaliações adicionais, como a confirmação de um aumento significativo no título de anticorpos ou soroconversão concomitante a teste de avidéz de IgG. A capacidade de um teste para confirmar os dias de soroconversão antes de outros testes poderia permitir o manejo precoce de infecções congênicas (ARMENGOL et al., 2017, BASCHIROTTI; KRIEGER; FOTI, 2017).

Os critérios de seleção de um teste sorológico devem incluir os valores de sensibilidade e especificidade de IgM e IgG, que são determinantes para o diagnóstico de infecção recente por *T. gondii*. Deve-se levar em conta também as restrições técnicas e financeiras do laboratório onde será executado o experimento. Em um estudo realizado na França, foram avaliados diferentes imunoenaios comerciais para pesquisa de IgG e IgM anti-*T.gondii* em gestantes. Para detecção desses anticorpos, os testes comerciais mais sensíveis e específicos foram AxSYM, VIDAS, Architect e Elecsys. O teste Platelia teve uma sensibilidade elevada para IgM, porém para detecção precoce de IgG em situações de rotina os valores de sensibilidade e especificidade foram baixos. O mesmo estudo recomenda ainda a utilização de métodos para confirmação dos resultados encontrados em testes comerciais, como por exemplo, teste de avidéz e Western blot para IgG e ensaio de aglutinação por imunoabsorção (ISAGA-IgM) para IgM (VILLARD et al., 2016).

Durante a gestação, a presença do parasita no LA (observada por meio da amplificação do DNA, microscopia ou isolamento do organismo) e em tecidos fetais (por meio da amplificação de DNA, coloração de antígenos, microscopia ou isolamento do organismo) resulta em resultado positivo para toxoplasmose congênita. Uma das metodologias laboratoriais mais aceitas para o diagnóstico durante a gestação é o uso de *Polymerase chain reaction* – reação de cadeia de polimerase (PCR) no líquido amniótico (POMARES; MONTOYA, 2016). O uso de técnicas de biologia molecular para a detecção do DNA de *T. gondii* em amostras de LA contribuiu significativamente para a sensibilidade do diagnóstico no pré-natal no feto. Embora a sensibilidade da PCR em LA possa chegar a 91%, a sensibilidade da PCR em amostras de placentas confere uma sensibilidade de apenas 52% (BESSIÈRES et al., 2009).

1.6. Diagnóstico da toxoplasmose congênita em recém-nascidos e lactentes

O método mais comum utilizado para o diagnóstico de TC em recém-nascidos e lactentes é a detecção sorológica de vários isotipos de anticorpos específicos para *T. gondii*, sendo pesquisa de IgG, IgM e IgA os mais empregados. Juntos, esses três isotipos de anticorpos podem fornecer informações sobre soroconversão e se a infecção é aguda, crônica ou reativada (LI et al., 2016; VILLARD et al., 2016).

A utilização de testes laboratoriais para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, empregando métodos clássicos, possuem pouca relevância no diagnóstico precoce em recém-nascidos e lactentes devido à transferência passiva de IgG materna específica e seu desaparecimento gradual em crianças saudáveis (PINON et al., 1996). Dessa forma, a pesquisa de IgG torna-se relevante após uma fase relativamente tardia da infecção. Por outro lado, a detecção IgM e IgA específicas em amostras de soro são métodos sorológicos importantes para o diagnóstico da TC. A utilização combinada destes testes permite o diagnóstico da toxoplasmose congênita no primeiro ou nos três primeiros meses de vida com sensibilidade de 90 e 94%, respectivamente, alcançando valores mais elevados (99%) apenas aos 8 meses de idade (PINON et al., 1996).

A sensibilidade dos testes para a detecção de IgM e IgA específicas no sangue do cordão também possui uma baixa sensibilidade, por volta de 64% e 53%, respectivamente (BESSIÈRES et al., 2009). Estudos anteriores tem demonstrado que a análise dos padrões de reatividade em Western Blot para IgG e IgM específicas permitem a detecção de 94% dos casos de toxoplasmose congênita nos primeiros 3 meses de vida, sugerindo que o uso do Western blot parece ser uma ferramenta complementar útil para o diagnóstico pós-natal precoce de toxoplasmose congênita (ROBERT-GANGNEUX et al., 1999; RILLING et al., 2003). Entretanto, o elevado custo dessa metodologia tem restringido o seu uso em larga escala.

É necessário acompanhar os recém-nascidos e lactentes em risco de toxoplasmose congênita com técnicas específicas, até que os títulos de IgG específicos para *Toxoplasma gondii* sejam completamente negativos. Isso exclui o diagnóstico da toxoplasmose congênita quando a sorologia se torna negativa e também permite o diagnóstico e o tratamento da doença quando a infecção é detectada de forma tardia (POMARES e MONTOYA, 2016; DARD et al., 2017).

Nesse contexto, tem sido proposto, que a utilização ampliada de diversas abordagens diagnósticas ainda se faz necessária para um diagnóstico precoce com elevada sensibilidade. Diversos métodos analíticos têm sido propostos para essa finalidade. Dentre eles, a detecção de *T. gondii* em amostras de líquido amniótico associada à triagem neonatal com a detecção de parasitos na placenta, associada à pesquisa de IgM e IgA específicas em recém-nascidos tem sido propostas (BESSIÈRES et al., 2009). Embora os métodos moleculares em amostras de líquido amniótico contribuam para maior sensibilidade no diagnóstico da toxoplasmose congênita, permitindo um diagnóstico precoce da maioria dos casos, a ausência de um kit comercial amplamente disponível e confiável, exige que os profissionais de saúde encaminhem seus pacientes para uma unidade de pesquisa capaz de executar o teste ou, então, tratar a infecção suspeita de forma empírica sem o diagnóstico (OLIVEIRA-AZEVEDO et al., 2016).

1.7. Biomarcadores imunológicos

A busca de indicadores laboratoriais complementares para um diagnóstico precoce e mais sensível da infecção congênita tem sido considerada relevante para contribuir na tomada de decisão clínica. Para isso, vários estudos tem abordado diferentes tipos de resposta imunológica, para melhor compreensão de como o organismo infectado responde a presença de *T. gondii*. Diversos estudos têm demonstrado que a infecção por *T. gondii* promove uma resposta imune celular de longa duração, altamente dependente da atividade efetora de linfócitos T produtores de IFN- γ (GAZZINELI et al., 1991, CHAPEY et al., 2010). Um estudo realizado por Chapey et al., 2010 avaliou o desempenho de um ensaio de produção de IFN- γ em amostras de sangue total incubadas na presença de antígenos de *T. gondii* para o diagnóstico de toxoplasmose congênita. A sensibilidade e especificidade do método foram de 94% e 98%, respectivamente. Em outro estudo em modelos murinos para diagnóstico precoce de toxoplasmose, foi possível detectar a infecção dos animais em apenas 3 dias após a inoculação do parasito, utilizando ensaio de produção de IFN- γ (YIN et al., 2015).

Análises do perfil imunológico celular de leucócitos circulantes no contexto *ex vivo* foi realizado por Machado et al., 2014, em recém-nascidos com toxoplasmose congênita.

Nesse estudo, foram identificados biomarcadores de imunidade celular associados com características imunopatológicas da toxoplasmose congênita. Dentre as principais observações, foi identificada uma expansão de monócitos CD14⁺CD16⁺HLA-DR^{High} e células NK-CD56^{dim} em pacientes com lesões ativas. Frequência elevada de células T TCRγδ⁺ e células T CD8⁺ foram atributos diretamente associados com o grau de morbidade. Um outro estudo, desenvolvido por Carneiro et al., 2016, forneceu novas informações sobre os eventos imunológicos celulares associados com retinocoroidite no cenário de toxoplasmose congênita em recém-nascidos, demonstrando uma série de biomarcadores com aplicabilidade potencial como indicadores laboratoriais complementares no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita. Nesse estudo, foi observado que a resposta pró-inflamatória das células T CD4⁺ e CD8⁺, caracterizada por elevada produção de IFN-γ e IL-17 é predominante em pacientes com lesão retinocoroidal ativa, enquanto a presença simultânea de simultânea de IFN-γ e fator de necrose tumoral (TNF-α) é característica de casos sem lesão e com lesão cicatricial. Entretanto, um perfil elevado de IL-10 é observado em crianças com lesões cicatriciais.

Em conjunto, esses resultados suportam a existência de microambiente imunológico progressivo nas fases iniciais, apical e cicatricial do processo de formação da lesão retinocoroidal em recém-nascidos com toxoplasmose congênita, sugerindo a perspectiva de identificação de biomarcadores complementares com aplicação na avaliação prognóstica de monitoração e manejo clínicos dos pacientes.

Outro estudo realizado pelo nosso grupo com amostras de pacientes lactentes avaliou a produção de quimiocinas e citocinas séricas em pacientes não infectados e pacientes com toxoplasmose, sendo avaliados também de acordo com a presença e ausência de lesão ocular. A partir disso, foi observado que pacientes com lesão apresentaram uma produção maior de IL-8 e IP-10. Pacientes com lesão ativa apresentaram uma maior produção de IFN-γ, quando comparado aos outros grupos, e surpreendentemente, foi vista uma produção maior de TNF em pacientes sem lesão, sugerindo que esta citocina teve uma ação protetiva na resposta a *T. gondii* (ARAÚJO et al., 2017). Estudos de imunidade humoral, baseado na pesquisa de subclasses de IgG tem também demonstrado a existência de um padrão diferencial de reatividade, sugerindo que a análise de subclasses de IgG específicas são biomarcadores sorológicos relevantes com aplicabilidade diagnóstico e avaliação prognóstica da toxoplasmose congênita (DE-JESUS et al., 2016).

Métodos de avaliação de marcadores imunológicos celulares, empregando amostras de sangue total, têm se tornado uma ferramenta aplicável em laboratório clínico, oferecendo

vantagens quando comparados aos métodos convencionais de culturas de células mononucleares isoladas de amostras de sangue periférico. Em geral, o volume de amostra necessário para a realização de testes é bem reduzido (cerca de 1mL), com a possibilidade de separação do plasma para a realização da pesquisa de anticorpos IgM e IgA específicos (considerados “padrão de ouro” ou “método referência”) e a detecção da produção de IFN- γ na mesma amostra biológica. Essa vantagem representa um ponto importante no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, uma vez que a coleta de amostras em recém-nascidos geralmente apresenta restrições éticas e operacionais de coletas de grandes volumes de sangue (CHAPEY et al., 2010).

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. C. 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. doi: 10.1590/s0074-02762009000300009.

ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; SHER, A. Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection. **Immunological reviews**, v. 201, p. 26–34, 2004. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00179.x

AMENDOEIRA, M.R.R.; et al. Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndios isolados, Mato Grosso. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.6, p.671-676, 2003. doi: 10.1590/s0037-86822003000600005.

ANDER, S. E. et al. Human placental syncytiotrophoblasts restrict *Toxoplasma gondii* attachment and replication and respond to infection by producing immunomodulatory chemokines. *mBio*, v. 9, n. 1, p. e01678-17, 2018. doi: 10.1128/mBio.01678-17

ANDRADE, R. M. et al. CD40 signaling in macrophages induces activity against an intracellular pathogen independently of gamma interferon and reactive nitrogen intermediates. **Infection and immunity**, v.73, n.5, p.3115–3123, 2005. doi:10.1128/IAI.73.5.3115-3123.2005

ARMENGOL, C. et al. Time before anti-*Toxoplasma* IgG seroconversion detection by 7 commercial assays in French pregnant women. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n.2, p.103-107, 2017. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.020.

ARRANZ-SOLÍS, D.; MUKHOPADHYAY, D.; SAEIJ, J.J.P. *Toxoplasma* Effectors that Affect Pregnancy Outcome. **Trends Parasitol**,v.37, n.4, p.283-295, 2021. doi:10.1016/j.pt.2020.10.013

BASCHIROTTI, P. T.; KRIEGER, M. A.; FOTI, L. Preliminary multiplex microarray IgG immunoassay for the diagnosis of toxoplasmosis and rubella. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.112, n.6, p. 428-436, 2017. doi: 10.1590/0074-02760160509.

BASHA, S.; SURENDRAN, N.; PICHICHERO, M. Immune responses in neonates. **Expert review of clinical immunology**, v.10, n.9, 1171–1184, 2014. doi:10.1586/1744666X.2014.942288

BENNETT, S. R. et al. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. **The Journal of experimental medicine**, v.186, n.1, p.65–70, 1997. <https://doi.org/10.1084/jem.186.1.65>

BESSA, G. L. et al. Tissue dissemination and humoral response after experimental reinfection with atypical *Toxoplasma gondii* strains obtained from congenital human toxoplasmosis in Brazil. **Experimental parasitology**, v.207, 107781, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107781>

BESSA, G.L.; ALMEIDA-VITOR, R. W.; MARTINS-DUARTE, E.S. *Toxoplasma gondii* in South America: a differentiated pattern of spread, population structure and clinical manifestations. **Parasitology research**, v.120, n.9, p.3065–3076, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07282-w>

- BESSIÈRES, M.H. et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n.2, p. 389-392, 2009. doi: 10.1590/s0074-02762009000200038.
- BEVERLEY, J. K. A. A new look at infectious diseases. Toxoplasmosis. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5864, p. 475-478. 1973.
- BHADRA, R.; COBB, D. A.; KHAN, I. A. CD40 signaling to the rescue: A CD8 exhaustion perspective in chronic infectious diseases. **Critical reviews in immunology**, v.33, n.4, p.361–378, 2013. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.2013007444>
- BIGNA, J. J. et al. Global, regional, and country seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women: a systematic review, modelling and meta-analysis. **Scientific reports**, v.10, n.1, p.12102, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69078-9>
- BLADER, I.J. et al. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annu Rev Microbiol.** v.69, p.463-85. 2015. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104100.
- BŁASZKOWSKA, J.; GÓRALSKA, K. Parasites and fungi as a threat for prenatal and postnatal human development. **Annals of parasitology**, v.60, n.4, 225–234, 2014.
- BLISS, S. K. et al. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. **Infection and immunity**, v. 69, n.8, p. 4898–4905, 2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4898-4905.2001>
- BORGES, M. et al. How does toxoplasmosis affect the maternal-foetal immune interface and pregnancy? **Parasite Immunology**, v.41, e12606, 2019. doi: 10.1111/pim.12606.
- 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. **American journal of obstetrics and gynecology**, v.192, n.2, p.564-71, 2005 . doi: 10.1016/j.ajog.2004.07.031
- BUTCHER, B. A. et al. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. **PLoS pathogens**, v.7, n.9, e1002236, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002236>
- CABRAL, G. et al. Inhibition of nitric oxide production in activated macrophages caused by *Toxoplasma gondii* infection occurs by distinct mechanisms in different mouse macrophage cell lines. **Frontiers in microbiology**, v.9, p.1936, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01936>
- CALABRESE, K. S. 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.1335–1341, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.02.003>

- CARADONNA, T. et al. Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. **Food Microbiology**, v.67, n.1., p.67-75, 2017. doi: 10.1016/j.fm.2017.06.006
- CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections:A review. **Acta Trop.**, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012. doi:10.1016/j.actatropica.2011.10.018
- 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. **Journal of Clinical Microbiology**. v.51, n.3, p. 901-7, 2013. doi: 10.1128/JCM.02502-12
- CARNEIRO, A.C. et al. Cytokine Signatures Associated With Early Onset, Active Lesions and Late Cicatricial Events of Retinochoroidal Commitment in Infants With Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v.213, n.12, p.1962-70, 2016 . doi: 10.1093/infdis/jiw041
- CASTRO, A. S. et al. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v, 34, n. 3, p. 240-247, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.12.006>
- CHAPEY, E. et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n.1, p. 41-5, 2010. doi: 10.1128/JCM.01903-09.
- CHIEBAO, D. P. et al. Congenital transmission of *Toxoplasma gondii* after experimental reinfection with brazilian typical strains in chronically infected sheep. **Frontiers in veterinary science**, v.6, n.93, 2019. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00093>
- COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. **Parasite immunology**, v.37, n.3, 108–117, 2015. <https://doi.org/10.1111/pim.12164>
- CORDEIRO, C.A.; MOREIRA, P.R.; ANDRADE, M.S. et al. Interleukin-10 gene polymorphism (-1082G/A) is associated with toxoplasmic retinochoroiditis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.49, n.5, p.1979-82, 2008. doi: 10.1167/iovs.07-1393
- CURTSINGER, J. M. et al. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. **Journal of immunology**, v.162, n.6, p.3256–3262, 1999.
- DE ARAÚJO, T. E. et al. Early serum biomarker networks in infants with distinct retinochoroidal lesion status of congenital toxoplasmosis. **Cytokine**, v.95, p. 102–112, 2017. doi.org/10.1016/j.cyto.2017.02.018
- DE JESUS, L.N. et al. IgA and IgG1 reactivities assessed by flow cytometry mirror clinical aspects of infants with ocular congenital toxoplasmosis. **Journal of Immunology Methods**. v.1, n.428, p.1-8, 2016. doi: 10.1016/j.jim.2015.11.004

DEL GRANDE, C. et al. Bipolar disorder with psychotic features and ocular toxoplasmosis: a possible pathogenetic role of the parasite? **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v.205, n.3, p. 192-195, 2017 . doi: 10.1097/NMD.0000000000000496.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T.; Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. **Clinical Microbiology Review**, v.11, n.4, p.569–588,1998. doi: 10.1128/CMR.11.4.569.

DENKERS, E. Y. et al. Neutrophils, dendritic cells and Toxoplasma. **International journal for parasitology**, v.34, n.3, p. 411–421, 2004. doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.11.001

DEROUIN, F.; PELLOUX, H.; ESCMID Study Group on Clinical Parasitology. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. **Clinical microbiology and infection**, v.14, n.12, 1089–1101, 2008. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02091.x

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 50, n.2, p. 146–159, 1974.

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

DUNAY, I. R.; DIEFENBACH, A. Group 1 innate lymphoid cells in *Toxoplasma gondii* infection. **Parasite immunology**, v.40, n.2, 10.1111/pim.12516, 2018. doi.org/10.1111/pim.12516

DUNAY, I. R.; SIBLEY, L. D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current opinion in immunology**, v.22, n.4, p.461–466, 2010. doi.org/10.1016/j.coi.2010.04.008

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in immunopathology**, v.34, n.6, p.793–813, 2012. doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3

EGAN, C. E. et al. CCR2-dependent intraepithelial lymphocytes mediate inflammatory gut pathology during *Toxoplasma gondii* infection. **Mucosal immunology**, v.2, n.6, 527–535, 2009. https://doi.org/10.1038/mi.2009.105

EGAN, C. E. et al. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunology and cell biology**, v.90, n.7, 668–675, 2012. doi.org/10.1038/icb.2011.93

EMELIA, O. et al. IgG avidity assay: a tool for excluding acute toxoplasmosis in prolonged IgM titer sera from pregnant women. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n.4, p. 633–640, 2014.

FERREIRA, A M. et al. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, genetics and evolution**, v.6, n.1, p.22–31, 2006. doi.org/10.1016/j.meegid.2004.12.004

- FRANCO, P. S. et al. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. **Placenta**, v.32, n.2, 116–120, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.11.012>
- GAZZINELLI, R.T. et al. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 1, p. 286-92, 1991
- GIGLEY J. P. The Diverse Role of NK Cells in Immunity to *Toxoplasma gondii* Infection. **PLoS pathogens**, v.12, n.2, e1005396, 2016. doi.org/10.1371/journal.ppat.1005396
- GILBERT, R.E. et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, 2008.
- GÓMEZ-CHÁVEZ, F., et al. Maternal immune response during pregnancy and vertical transmission in human toxoplasmosis. **Frontiers in Immunology**, v 21, n.10, p.285, 2019. [doi:10.3389/fimmu.2019.00285](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00285).
- GÓMEZ-CHÁVEZ, F. et al. A Proinflammatory Immune Response Might Determine *Toxoplasma gondii* Vertical Transmission and Severity of Clinical Features in Congenitally Infected Newborns. **Frontiers in immunology**, v.11, n.390, p.1-11, 2020. doi.org/10.3389/fimmu.2020.00390
- GOTTELAND, C. et al. Spatial distribution of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil in a rural area: Influence of cats and land use. **Veterinary Parasitology**, v.205, n.3-4, p.629-37, 2014. [doi: 10.1016/j.vetpar.2014.08.003](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.003)
- GREIGERT, V.; BITTICH-FAHMI, F.; PFAFF, A. W. Pathophysiology of ocular toxoplasmosis: Facts and open questions. **PLoS neglected tropical diseases**, v.14, n.12, e0008905, 2020. doi.org/10.1371/journal.pntd.0008905
- GUIRELLI, P. M. et al. Trophoblast-macrophage crosstalk on human extravillous under *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta**, v.36, n.10, p.1106–1114, 2015. doi.org/10.1016/j.placenta.2015.08.009
- HALONEN, S.K.; WEISS, L.M. Toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**, v.114, n.1, p.125–145, 2013. [doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X)
- HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 3, n.2, p. 84-105, 2003. [doi: 10.1007/s10238-003-0011-2](https://doi.org/10.1007/s10238-003-0011-2).
- HOHLFELD, P. et al. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chainreaction test on amniotic fluid. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 11, p. 695-699. 1994.
- HOO, R.; NAKIMULI, A.; VENTO-TORMOL, R. Innate Immune Mechanisms to Protect Against Infection at the Human Decidual-Placental Interface. **Front Immunol.**, v. 11, n. 2070, 2020. [doi: 10.3389/fimmu.2020.02070](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02070)

- 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. doi: 10.1038/nrmicro2858.
- IVANOVA, D. L. et al. NK Cells Negatively Regulate CD8 T Cells to Promote Immune Exhaustion and Chronic *Toxoplasma gondii* Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v.10, n.313, p.1-19, 2020. doi.org/10.3389/fcimb.2020.00313
- JIN, R. M. et al. Promote Myositis and Muscle Damage in *Toxoplasma gondii* Infection. **Journal of immunology**, v.198, n.1, 352–362, 2017. doi.org/10.4049/jimmunol.1600914
- KHAN, I. A. et al. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS pathogens**, v.2, n.6, e49, 2006. doi.org/10.1371/journal.ppat.0020049
- KHAN, I. A., HWANG, S., MORETTO, M. *Toxoplasma gondii*: CD8 T Cells Cry for CD4 Help. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v.9, n.136, p.1-8, 2019. doi.org/10.3389/fcimb.2019.00136
- KRAVETZ, J. D.; FEDRMAN, D. G. Prevention of toxoplasmosis in pregnancy: knowledge of risk factors. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v.13, n.3, p.161-165, 2005. doi: 10.1080/10647440500068305.
- 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
- LIU, C. H., et al. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Journal of immunology**, v.177, n.1, p.31–35, 2006. doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.31
- LYKENS, J.E. 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. **Journal of Immunology**, v. 184, n.2, 877-885, 2010. doi: 10.4049/jimmunol.0902346
- MACHADO, A. S. et al. Biomarker analysis revealed distinct profiles of innate and adaptive immunity in infants with ocular lesions of congenital toxoplasmosis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, n.1, p. 1-13, 2014. doi: 10.1155/2014/910621
- McAULEY, J. B. Congenital Toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. 1, p. S30–S35, 2014. doi: 10.1093/jpids/piu077.
- McAULEY, J. B.; JONES, J.; SINGH, K. *Toxoplasma*, In: JORGENSEN J., et al. (ed). **Manual of Clinical Microbiology**. 12^aed. Washington: ASM Press, 2015. p 2373-2386.

- MCGOVERN, K. E., WILSON, E. H. Role of Chemokines and Trafficking of Immune Cells in Parasitic Infections. **Current immunology reviews**, v.9, n.3, 157–168, 2013. doi.org/10.2174/1573395509666131217000000
- 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. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.08.002.
- MIRANDA, F. et al. Toxoplasma gondii-Induced Neutrophil Extracellular Traps Amplify the Innate and Adaptive Response. **mBio**, e0130721, 2021. doi.org/10.1128/mBio.01307-21
- MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F.M.R.; NAVARRO, I.T., orgs. **Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas**. Londrina: EDUEL, 2010. 62 p.
- MOMBRÒ, M. et al. Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection, **European Journal of Pediatrics**. v.162, n.10, p.703-6, 2003. doi: 10.1007/s00431-003-1248-1
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16412-X
- MORRISSETTE, N.S.; SIBLEY, L.D. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.6, n.1, p. 21–38, 2002. doi: 10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002
- NAPSO, T. et al. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1091, 2018. Doi: 10.3389/fphys.2018.01091.
- OLDENHOVE, G. et al. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. **Immunity**, v.31, n.5, 772–786, 2009. doi.org/10.1016/j.immuni.2009.10.001
- OLGUÍN, J. E. et al. Adoptive transfer of CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells to C57BL/6J mice during acute infection with *Toxoplasma gondii* down modulates the exacerbated Th1 immune response. **Microbes and infection**, v.17, n.8, p.586–595, 2015. doi.org/10.1016/j.micinf.2015.04.002
- OLIVEIRA-AZEVEDO, C.T. et al. Performance of Polymerase Chain Reaction Analysis of the Amniotic Fluid of Pregnant Women for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: A Systematic Review and MetaAnalysis. **Plos one**, v.11, n.4, p.1-26, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0149938.
- PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* s and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v.39, n.12, p.1385–1394, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0149938.

- PARLOG, A.; SCHLÜTER, D.; DUNAY, I.R. Toxoplasma gondii-induced neuronal alterations. **Parasite Immunology**, v.37, n.3, p.159-170, 2015. doi: 10.1111/pim.12157
- PASSOS, S. T. et al. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. **Journal of immunology**, v.184, n.4, p.1776–1783, 2010. doi.org/10.4049/jimmunol.0901843
- PEIXE, R.G. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.109, n.1,p.99-107, 2014. doi: 10.1590/0074-0276140539
- PERNAS, L. et al. Immune Profiling of pregnant toxoplasma-infected US and Colombia patients reveals surprising impacts of infection on peripheral blood cytokines. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n.6, p.923-931, 2014. doi: 10.1093/infdis/jiu189
- PIAO, L.X. et al. Cellular immunopathogenesis in primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Parasite Immunology**, v.4, n.9, e12570, 2018. doi: 10.1111/pim.12570.
- PINON, J.M. et al. Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti*Toxoplasma gondii* Immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.3, p.579-83, 1996.
- PITTMAN, K. J., KNOLL, L. J. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n.4, p.387–401, 2015. doi.org/10.1128/MMBR.00027-15
- POMARES, C; MONTOYA, J.G. Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, n.10, p.2448-54, 2016. doi: 10.1128/JCM.00487-16.
- PORTE, S.B.; SANDE, M.A. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v.327, n.23, p.1643-1648, 1992.
- RACICOT, K. et al. Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. **American journal of reproductive immunology**, v.72, n.2, p.107–116, 2014. doi.org/10.1111/aji.12289
- REMINGTON, J.S. et al. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S. et al. editores. **Infection diseases of the fetus and newborn infant**. 7^a.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2011. p.918-1041.
- REZENDE-OLIVEIRA, K. 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. doi: 10.1016/j.placenta.2012.05.013

ROBBINS, J. R. et al. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and immunity**, v. 80, n. 1, p. 418-428, 2012. doi: 10.1128/IAI.05899-11

ROBERT-GANGNEUX, F. et al. Molecular Biology Study Group of the French National Reference Center for Toxoplasmosis. Evaluation of *Toxoplasma* ELITE MGB Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n.5, p.1369-1376, 2017. doi: 10.1128/JCM.02379-1

ROBERT-GANGNEUX, F. et al. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-Year Multicenter Retrospective Study. **Journal of Clinical Microbiology**. v.53, n.5, p.1677-1684, 2015. doi: 10.1128/JCM.03282-14.

ROSTAMI, A. et al. Global prevalence of latent toxoplasmosis in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. **Clinical microbiology and infection**, v.26, n.6, 673–683, 2020. doi.org/10.1016/j.cmi.2020.01.008

SCHOENBERGER, S. P. et al. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. **Nature**, v. 393, n.6684, p.480–483, 1998. doi.org/10.1038/31002

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. doi: 10.7554/eLife.09017.

SILVA-GUTIERREZ, N. et al. T-cell profiles elicited by *Toxoplasma gondii* in acutely/chronically infected humans. **Parasite immunology**, v.40, n.6, e12532, 2018. doi.org/10.1111/pim.12532

SPANN, M.N. et al. Prenatal toxoplasmosis antibody and childhood autism. **Autism Research**, v.10, n.5, p.769-777, 2017. doi: 10.1002/aur.1722

STERKERS, Y.; et al. Novel Interpretation of Molecular Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis According to Gestational Age at the Time of Maternal Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.12, p.3944-3950, 2012. doi: 10.1128/JCM.00918-12.

STILLWAGGON, E. et al. Maternal serologic screening to prevent congenital toxoplasmosis: a decision-analytic economic model. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.9, p.1-17, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0001333.

STRANG, A. et al. The congenital toxoplasmosis burden in Brazil: Systematic review and meta-analysis. **Acta tropica**, v.211, 105608, 2020. doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105608

STURGE, C. R.; YAROVINSKY, F.; Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v.82, n.8, p.3090–3097, 2014. doi: 10.1128/IAI.01722-14

SUZUKI, Y. 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*. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 5375-5382, 2000. doi: 10.4049/jimmunol.164.10.5375.

TAIT, E.D.; HUNTER, C.A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n.2, p. 201-210, 2009. doi: 10.1590/s0074-0276200900020001.

TUSSIWAND, R. et al. An Important Role for CD4+ T Cells in Adaptive Immunity to *Toxoplasma gondii* in Mice Lacking the Transcription Factor Batf3. **mSphere**, v.5, n.4, e00634-20, 2020. doi.org/10.1128/mSphere.00634-20

VILLARD, O. et al. Help in the choice of automated or semiautomated immunoassays for serological diagnosis of toxoplasmosis: evaluation of nine immunoassays by the french national reference center for toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, n.12, p.3034-3042, 2016. doi: 10.1128/JCM.01193-16

WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature reviews Immunology**, v.15, n.8, p.486–499, 2015. doi.org/10.1038/nri3862

WILLIAMS, M. A. et al. Developing and maintaining protective CD8⁺ memory T cells. **Immunological reviews**, v.211, p.146–153, 2006a. doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00389.x

WILLIAMS, M. A. et al. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. **Nature**, v.441, n.7095, p. 890–893, 2006b. doi.org/10.1038/nature04790

WILSON, C. B. et al. Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. **Pediatrics**, v.66, n.5, p.767–774, 1980

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Review Immunology**, v.14, n.2, p.109-21, 2014. doi: 10.1038/nri3598.

YGBERG, S.; NILSSON, A. The developing immune system - from foetus to toddler. **Acta paediatrica**, v.101, n.2, p.120–127, 2012. doi.org/10.1111/j.1651-2227.2011.02494.x

YIN, Q. et al. Interferon Gamma Release Assay: An Effective Tool to Detect Early *Toxoplasma gondii* Infection in Mice. **PLoS One**, v.10, n.9, p.1-9, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0137808

ZORGI, N.E. 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*. **Immunology Letters**, v.138, n.2, p.187-96, 2011. doi: 10.1016/j.imlet.2011.04.007

CAPÍTULO I

**Biomarcadores putativos para diagnóstico precoce e prognóstico de toxoplasmose ocular
congénita**

1. INTRODUÇÃO

A infecção por *Toxoplasma gondii* apresenta distribuição mundial, afetando por volta de 25 a 30% da população humana (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012, TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013). A soroprevalência pode variar de menos de 10% a maior de 90%, dependendo dos hábitos de nutrição e higiene da população de diferentes regiões geográficas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004, PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009). A infecção por *T. gondii* pode resultar da ingestão ou manipulação de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais ou alimentos contaminados com oocistos infectantes. Além disso, a toxoplasmose congênita pode ocorrer como consequência da infecção primária em gestantes, podendo resultar em morte fetal e aborto ou causar sintomas graves que incluem dano neurológico, déficit neurocognitivo ou coriorretinite (MOMBRÓ et al., 2003).

Apesar da gravidade das lesões que a toxoplasmose congênita pode desencadear, estas nem sempre são detectáveis durante o pré-natal. Assim, o dano fetal causado pela toxoplasmose é detectável pela triagem ultrassonográfica apenas quando anomalias neurológicas graves estão presentes. No entanto, a coriorretinite toxoplasmática não é acessível por ultrassonografia. As manifestações clínicas da toxoplasmose congênita podem estar ausentes em recém-nascidos, mas podem ser observadas sequelas a longo prazo, incluindo retinocoroidite e anormalidades neurológicas. Além disso, nenhum sinal descrito em recém-nascido com doença congênita é patognomônico para toxoplasmose (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

O diagnóstico da toxoplasmose congênita é geralmente estabelecido com base no uso de vários métodos laboratoriais, incluindo o isolamento do *T. gondii* do sangue ou fluidos corporais, detecção de DNA do parasita e testes sorológicos para detecção de imunoglobulinas específicas do parasito. Embora a detecção de IgM e IgA específica para *T. gondii*, que não atravessa a placenta, sejam considerados bons marcadores de infecção congênita, esses biomarcadores apresentam baixa sensibilidade e não conseguem detectar mais do que 75% dos lactentes infectados (MONTROYA; LIESENFELD, 2004, CHAPEY et al., 2010). Como o anticorpo IgG específico para *T. gondii* atravessa a placenta e a eliminação

de IgG recebido da mãe no bebê pode levar de 6 a 12 meses (LEBECH et al., 1996, MONTOYA; LIESENFELD, 2004), IgG não é um marcador laboratorial viável para toxoplasmose congênita. Nesse sentido, torna-se relevante propor abordagens diagnósticas complementares que contribuam para um manejo clínico preciso e efetivo estabelecimento de intervenção terapêutica imediatamente após o nascimento.

É bem conhecido que, além de desencadear uma resposta robusta de anticorpos, a infecção congênita por *T. gondii* resulta em resposta imune mediada por células de longa duração, que envolve uma ampla gama de subpopulações de células e moléculas solúveis (DENKERS et al., 1999, FATOOHI et al., 2003, CIARDELLI et al., 2008, MATOWICKA-KARNA et al., 2009; CHAPEY et al., 2010, MACHADO et al., 2014, CHAPEY et al., 2015, CARNEIRO et al., 2016, DE ARAÚJO et al., 2017). Surpreendentemente, os estudos que investigaram o potencial papel da imunidade celular no diagnóstico da toxoplasmose congênita ou métodos com potencial prognóstico para predizer o estado da lesão retinocoroidal ainda são escassos. Foi proposto que a triagem de IgM ao nascimento, seguida pela análise de avidéz de IgG por citometria de fluxo 30-45 dias após o nascimento, apresenta alto desempenho para o diagnóstico sorológico precoce de toxoplasmose congênita (DE CASTRO et al., 2017). Além disso, o uso de sorologia de citometria de fluxo tem sido reconhecido como um método potencial para o prognóstico precoce de lesões oculares em lactentes infectados com *T. gondii* (DE JESUS et al., 2016).

Foi relatado que a alta expressão de CD25 é detectável em quase todos os pacientes infectados com *T. gondii*, incluindo recém-nascidos (FATOOHI et al., 2003). Além disso, a análise de outros marcadores de ativação de células T, como as células T produtoras de HLA-DR e IFN- γ , tem se mostrado uma abordagem útil para o diagnóstico precoce e preciso da toxoplasmose congênita (CIARDELLI et al., 2008). Com o objetivo de aprimorar o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose, métodos complementares com amostras de sangue total têm sido propostos. Nessa linha, foi descrito um teste simples baseado no ensaio de liberação de IFN- γ no sangue total para avaliar a imunidade mediada por células T na toxoplasmose com alta sensibilidade e especificidade (CHAPEY et al., 2010, CHAPEY et al., 2015, MAHMOUDI et al., 2017).

No presente estudo, avaliamos uma ampla gama de mediadores imunológicos a serem empregados como biomarcadores para o diagnóstico precoce e prognóstico do desenvolvimento de lesões oculares em lactentes com toxoplasmose congênita. Usando pequenos volumes de amostras de sangue total, o desempenho de mediadores solúveis no

soro, fenótipos *ex vivo* de leucócitos circulantes e perfis de citocinas intracelulares após estímulos *in vitro* de curto prazo foram avaliados como plataformas de biomarcadores passo a passo simples ou combinadas. Conforme relatado aqui, descobrimos que os níveis de CXCL9 e as frequências de células T CD4⁺CD25⁺ circulantes e células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ específicas de *T. gondii* medidas 30-45 dias após o nascimento apresentaram alta acurácia para distinguir lactentes infectados com *T. gondii*. Além disso, as análises escalonadas combinadas de células T CD4⁺CD25⁺ e CXCL9 ou a frequência total de células T específicas de *T. gondii* produtoras de IFN- γ ⁺ *in vitro* melhoram ainda mais a acurácia do diagnóstico de toxoplasmose congênita. Finalmente, a análise contemporânea de células T CD4⁺ IL-5⁺ específicas de *T. gondii* e células NK IFN- γ ⁺ servem como uma ferramenta de prognóstico precoce do envolvimento ocular em lactentes com toxoplasmose congênita.

2. JUSTIFICATIVA

As manifestações da toxoplasmose congênita podem surgir ao nascimento, durante a infância, ou até vários anos mais tarde. Sendo assim, é de grande importância que lactentes nascidos de mães soropositivas para toxoplasmose sejam monitorados, no mínimo, por um ano, com avaliação clínica (incluindo avaliação oftalmológica e neurológica) e testes sorológicos periódicos, para diagnosticar e tratar a infecção o mais cedo possível. Para conseguir alcançar um diagnóstico precoce e sensível, é importante utilizar testes sensíveis como a citometria de fluxo e ferramentas de análises de dados, que facilitam a apuração de resultados e avaliação de desempenho de biomarcadores, utilizando pequenos volumes de amostras. Esses biomarcadores auxiliam na tomada de decisão clínica e ajudam a melhorar o prognóstico do pacientes. Deste modo, evidenciamos a relevância deste trabalho, que visou avaliar o desempenho de biomarcadores complementares em lactentes com toxoplasmose congênita, no período de 30 a 45 dias após o nascimento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar uma análise integrativa de parâmetros imunológicos na identificação de biomarcadores complementares para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita em lactentes.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar o desempenho isolado e combinado de biomarcadores celulares e moleculares como ferramenta complementar no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita;
- Analisar a aplicabilidade de biomarcadores imunológicos celulares e moleculares na avaliação prognóstica precoce da lesão retinocoroidal na toxoplasmose congênita;

4. METODOLOGIA

4.1. População de estudo

Este estudo fez parte de uma investigação prospectiva sobre a triagem neonatal para toxoplasmose congênita realizada por um grupo de pesquisa multidisciplinar (Grupo Brasileiro de toxoplasmose congênita da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG).

Amostras de sangue total seco ao ar (punção do calcanhar) foram coletadas imediatamente após o nascimento de 146.307 recém-nascidos e utilizadas para a triagem inicial de IgM anti-*T. gondii* por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Q-Preven TOXO, Symbiosis, Leme, Brasil). Indivíduos com resultados positivo ou indeterminado para IgM anti-*T. gondii* foram selecionados posteriormente em uma amostragem de conveniência não probabilística para coleta de sangue periférico adicional. Amostras de sangue total foram obtidas em 30-45 dias e um ano após o nascimento para identificar biomarcadores putativos para fins de diagnóstico / prognóstico precoce ou prognóstico tardio, respectivamente. Foram selecionados 215 lactentes, incluindo: 177 lactentes com diagnóstico confirmado de toxoplasmose congênita (TOXO) e 38 lactentes incluídos como grupo controle (CTL), com resultados negativos para IgG anti-*T. gondii* usando teste *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA - ELFAVIDAS® TOXO, Biomerieux, França), realizado em amostras de sangue adicionais coletadas 12 meses após o nascimento.

A análise fundoscópica foi realizada por um médico especialista no período de 30-45 dias após o nascimento para avaliar o comprometimento oftalmológico conforme descrito anteriormente (VASCONCELOS-SANTOS et al., 2009). Com base nos achados oftalmológicos, o grupo TOXO foi primeiro categorizado em dois subgrupos, referidos como: pacientes sem lesão retinocoroidal (NL) e pacientes com lesão retinocoroidal (L). A classificação posterior dos pacientes com TOXO foi realizada com base na presença de lesões retinocoroidais cicatriciais (CL), ativas (AL) ou ativas / cicatriciais (ACL). As crianças CTL não apresentavam qualquer comprometimento oftalmológico.

Os protocolos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética local (Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo 298/06). O consentimento informado por escrito foi dado por todas as mães dos lactentes incluídos neste estudo.

4.2. Quantificação de quimiocinas e citocinas séricas

Um total de 134 amostras coletadas no período de 30-45 dias após o nascimento foram testadas para quantificação de quimiocinas e citocinas séricas (108 TOXO e 26 CTL) por *Cytometric Bead Array* de acordo com as instruções do fabricante (CBA, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As quimiocinas (CXCL8, CCL2, CCL5, CXCL9 e CXCL10) foram medidas pelo sistema CBA convencional e os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-17A) determinado usando o ensaio CBA Flex de sensibilidade aprimorada. A aquisição da amostra foi realizada utilizando o citômetro de fluxo BD FACSVerser (Becton Dickinson, La Jolla, CA, EUA) e a análise dos dados realizada utilizando o software FCAP ArrayTM V3.0 (Becton Dickinson, La Jolla, CA, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL (quimiocinas) ou fg/mL (citocinas), avaliados pela curva padrão usando o parâmetro de regressão logística. Os limites de detecção foram CXCL8 = 2,5 pg/mL, CCL2 = 0,2 pg/mL, CCL5 = 1,0 pg/mL, CXCL9 = 2,7 pg/mL, CXCL10 = 2,8 pg/mL, IL-1 β = 274,35 fg/mL, IL-6 = 409,62 fg/mL, TNF = 144,62 fg/mL, IL-12 = 191,48 fg/mL, IFN- γ = 172,09 fg/mL, IL-4 = 238,34 fg/mL, IL-5 = 407,19 fg/mL, IL-10 = 152,70 fg/mL e IL-17A = 239,95 fg/mL. Todas as amostras de pacientes foram testadas no mesmo lote usando a mesma curva padrão para evitar a variabilidade entre os testes.

4.3. Imunofenotipagem de leucócitos circulantes

O sangue periférico de crianças com toxoplasmose congênita (TOXO) e crianças não infectadas (CTL) foi coletado em tubos de heparina / EDTA. Um total de 90 amostras (68 TOXO e 22 CTL), coletadas 30-45 dias após o nascimento e 81 amostras de TOXO coletadas um ano após o nascimento, foram usadas para análise imunofenotípica de leucócitos circulantes. As amostras foram processadas e os leucócitos foram utilizados para protocolos *ex vivo*, conforme previamente descrito (MACHADO et al., 2014). Os anticorpos monoclonais foram usados para marcar as moléculas da superfície celular: anti-CD14 (TüK4), anti-CD16 (3G8), anti-CD32 (FLI8.26) e anti-CD64 (10.1) para monócitos, anti-CD16 (3G8) e anti-CD56 (B159) para células NK e subconjuntos de células NKT; anti-TCR $\alpha\beta$ (WT31) e anti-TCR $\gamma\delta$ (11F2), anti-CD3 (UCHT1), anti-CD4 (RPA-T4), anti-CD8 (B9.11) para subconjuntos de células T e anti-HLA-DR (TÜ36) como marcador de ativação para células T

juntamente com anti-CD5 (L17F12), anti-CD19 (4G7) e anti-CD23 (M-L233) para subpopulações de células B. Os anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou Tricolor (TC) foram adquiridos de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA) e BD Bioscience (San Diego, CA, EUA). A aquisição de dados foi realizada usando FACSCalibur e os resultados expressos como % de células fechadas ou intensidade média de fluorescência (MFI) da expressão do marcador de superfície celular. FlowJo (versão 9.4.1; TreeStar, Ashland, Oregon) foi usado para análise de dados.

4.4. Cultura de sangue total de curto prazo *in vitro* e análise de citocinas intracitoplasmáticas

Amostras de sangue total heparinizado (3 mL) de 61 lactentes (51 TOXO e 10 CTL) coletadas 30-45 dias após o nascimento e 50 amostras de TOXO coletadas um ano após o nascimento foram usadas para cultura *in vitro* de curto prazo, conforme descrito anteriormente (CARNEIRO et al., 2016). Amostras de sangue foram dispensadas em tubos de polipropileno e cultivadas com meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (cultura controle, CC) ou antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg), produzido conforme descrito anteriormente (GAZZINELLI et al., 1991), a uma concentração de 5 µg / mL (cultura estimulada por *T. gondii*). As amostras foram incubadas por 12 horas em uma incubadora de 5% de CO₂ a 37° C. Brefeldin A (Sigma, St Louis, Missouri) foi adicionada a cada tubo de cultura a uma concentração final de 10 µg / mL durante 4 horas adicionais. Antes da imunomarcação, as células estimuladas por CC e STAg foram tratadas com EDTA e mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos antes da análise de citocina intracelular. Após a estimulação, as células foram coradas com os seguintes anticorpos de superfície: anti-CD14-TC, anti-CD16-TC, anti-CD4-TC, anti-CD8-TC ou anti-CD19-TC, à temperatura ambiente por 30 minutos. Os glóbulos vermelhos foram então lisados e os leucócitos foram fixados com solução de lise / fixação durante 10 minutos à temperatura ambiente. As lavagens foram realizadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) suplementada com 0,5% de albumina de soro bovino e permeabilização com PBS-saponina (PBS, 0,5% de albumina de soro bovino, 0,5% de saponina). As células permeabilizadas fixas foram coradas com anti-IL-8 (AS14), anti-IL-1β (AS10), anti-IL-6 (AS12), anti-TNF (Mab11), anti-IL-12 (C11.5), anti-IFN-γ (4S.B3), anti-IL-4 (8D4-8), anti-IL-5 (TRFK5), anti-IL-10 (JES3-19F1) ou anti-IL-17A (SCPL1362)

anticorpos monoclonais conjugados com PE, por 30 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas e fixadas com solução de fixação FACS (10 g / L de paraformaldeído, 10,2 g / L de cacodilato de sódio e 6,63 g/L de cloreto de sódio; pH 7,2). As amostras foram armazenadas na ausência de luz, e a aquisição realizada em 24 horas utilizando FACSCalibur (BD Biosciences). Pelo menos 20.000 eventos totais foram adquiridos. O software FlowJo foi usado para análise de dados. As estratégias de análise foram feitas da seguinte forma: os linfócitos foram selecionados primeiro com base em seu tamanho e propriedades de espalhamento de laser de granulosidade. Posteriormente, a frequência de células produtoras de citocinas em subconjuntos ou monócitos de linfócitos bloqueados foi calculada para culturas de CC e STAg. Uma análise posterior foi realizada para estimar a produção de citocinas específicas de *T. gondii* como o índice de cultura estimulada por STAg dividido pelo CC (doravante, o índice STAg / CC).

4.5. Análise estatística

A ferramenta estatística usada para determinar o ponto de corte, bem como os índices de desempenho de sensibilidade e especificidade e os respectivos intervalos de confiança em 95% dos testes foi a curva *Receiver Operating Characteristic* (curva ROC) e a *Two-Graph Receiver Operating Characteristic* (TG -ROC). A definição dos pontos de corte para cada biomarcador foi determinada pela análise da curva ROC, considerando os maiores valores possíveis de sensibilidade e especificidade. A acurácia global foi estimada considerando a área sob a curva ROC (AUC) categorizada como baixa (AUC <0,7), moderada (0,7 <AUC <0,8) ou alta (AUC > 0,8). Análise combinada de biomarcadores, incluindo quimiocinas e citocinas séricas; o perfil imunofenotípico dos leucócitos circulantes e os padrões de citocinas intracitoplasmáticas também foram realizados, por meio de um algoritmo sequencial proposto para aqueles atributos com maior acurácia na triagem. GraphPad Prism 5.0 foi usado para construir as curvas ROC e TG-ROC.

5. RESULTADOS

5.1. Triagem de quimiocinas e citocinas séricas como biomarcadores complementares para diagnóstico precoce e prognóstico de toxoplasmose congênita

O desempenho das quimiocinas e citocinas séricas como biomarcadores complementares para o diagnóstico precoce da infecção congênita por *T. gondii* foi avaliado primeiro avaliando a sensibilidade (Se) e a especificidade (Sp) para segregar lactentes infectados por *T. gondii* (TOXO) de controles saudáveis (CTL) Além disso, a capacidade desses biomarcadores séricos de fornecer uma avaliação do prognóstico precoce também foi avaliada comparando TOXO com lesão retinocoroidal (L) vs TOXO sem lesões (NL), bem como TOXO com lesão ativa (AL) vs TOXO com lesão cicatricial (CL) Os índices de desempenho (AUC, Se e Sp) são apresentados na Tabela 1, da maior para a menor acurácia global (AUC). Os pontos de corte específicos usados para cada biomarcador foram calculados pela curva ROC e são fornecidos na Tabela 1. A análise dos dados demonstrou que CXCL9 e CXCL10 exibem alta acurácia (AUC > 0,8) para distinguir TOXO de indivíduos CTL. Baixa acurácia (AUC < 0,7) foi encontrada para quimiocinas e citocinas séricas para avaliação do prognóstico precoce, comparando NL vs L ou AL vs CL (Tabela 1).

Tabela 1. Triagem de quimiocinas e citocinas séricas como biomarcadores complementares para diagnóstico precoce e prognóstico da toxoplasmose congênita

DIAGNÓSTICO				PROGNÓSTICO							
Biomarcadores* (pg/mL)	CTL x TOXO			Biomarcadores # (pg/mL)	TOXO (NL x L)			Biomarcadores § (pg/mL)	TOXO (AL x CL)		
	AUC	Se (%)	Sp (%)		AUC	Se (%)	Sp (%)		AUC	Se (%)	Sp (%)
CXCL9	0.9	84	81	IL-5	0.6	92	28	IL-12p70	0.6	91	30
CXCL10	0.8	82	69	TNF	0.6	78	50	IL-6	0.6	87	30
CCL5	0.6	83	42	CXCL8	0.6	68	50	CCL2	0.6	84	37
CXCL8	0.6	68	50	IL-6	0.6	62	61	CCL5	0.6	78	37
IFN- γ	0.6	58	65	CCL2	0.6	61	72	IL-17A	0.6	72	46
IL-12p70	0.6	56	61	IFN- γ	0.6	55	72	IL-4	0.6	63	52
IL-1 β	0.6	52	65	CCL5	0.6	40	78	IL-1 β	0.5	96	15
TNF	0.6	31	83	IL-17A	0.5	83	33	IL-10	0.5	94	21
IL-10	0.5	91	22	IL-1 β	0.5	81	39	CXCL8	0.5	93	17
CCL2	0.5	91	23	IL-4	0.5	71	50	IL-5	0.5	93	27
IL-17A	0.5	91	22	CXCL9	0.5	68	50	IFN- γ	0.5	59	52
IL-4	0.5	85	30	IL-12p70	0.5	51	61	TNF	0.5	48	70
IL-5	0.5	51	70	IL-10	0.5	46	72	CXCL9	0.5	40	74
IL-6	0.5	42	74	CXCL10	0.5	13	100	CXCL10	0.5	31	86

CTL = controles não infectados (n = 26); TOXO = Lactentes com toxoplasmose congênita (n = 108); NL = sem lesão retinocoroidal (n = 18); L = lesão retinocoroidal (n = 90); AL = lesão retinocoroidal ativa (n = 35); CL = lesão retinocoroidal cicatricial (n = 55); AUC = Área sob a curva ROC; Se = Sensibilidade; Sp = especificidade. * Cut-off: CXCL9 = 6.754; CXCL10 = 12.050; CCL5 = 937; CXCL8 = 3,3; IFN- γ = 1.565; IL-12p70 = 72; IL-1 β = 197; TNF = 64; IL-10 = 98; CCL2 = 230; IL-17A = 795; IL-4 = 704; IL-5 = 451 e IL-6 = 1.861. # Cut-off: IL-5 = níveis detectáveis; TNF = 346; CXCL8 = 3,3; IL-6 = 986; CCL2 = 59; IFN- γ = 2.031; CCL5 = 1.295; IL-17A = 335; IL-1 β = 83; IL-4 = 342; CXCL9 = 10.135; IL-12p70 = 275; IL-10 = 887 e CXCL10 = 8.523. §Cut-off: IL-12p70 = 4.617; IL-6 = 3.460; CCL2 = 141; CCL5 = 2.215; IL-17A = níveis detectáveis; IL-4 = 249; IL-1 β = 1.065; IL-10 = 138; CXCL8 = 1,2; IL-5 = 2.914; IFN- γ = 1.414; TNF = 91; CXCL9 = 15.256 e CXCL10 = 24.694.

5.2. Triagem de subpopulações de leucócitos circulantes como biomarcadores complementares para diagnóstico precoce e prognóstico de toxoplasmose congênita.

As contagens absolutas de leucócitos realizadas por hematológico automatizado e a frequência de monócitos circulantes, neutrófilos, eosinófilos, células T e subconjuntos de células B gerados a partir de análises de citometria de fluxo *ex vivo*, avaliadas 30-45 dias após o nascimento, foram utilizadas para avaliar a sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) para segregar lactentes infectados com *T. gondii* (TOXO) de controles saudáveis (CTL). Além disso, a capacidade desses biomarcadores de distinguir “NL de L”, bem como “AL de CL” também foi avaliada. Os índices resultantes (AUC, Se e Sp) são fornecidos na Tabela 2. A análise de dados mostrou que as frequências de células T CD4⁺ CD25⁺, células T $\gamma\delta$, células T CD8⁺, células T CD4⁺ HLA-DR⁺, Células T CD8⁺ HLA-DR⁺, células T CD4⁺ discriminam TOXO de indivíduos CTL com alta acurácia (AUC > 0,8). Precisão moderadas (AUC = 0,7) ou baixas (AUC < 0,7) foram encontradas para comparações entre “NL vs L” ou “AL vs CL” (Tabela 2).

Tabela 2. Triagem de subpopulações de leucócitos circulantes *ex vivo* como biomarcadores complementares para diagnóstico precoce e prognóstico de toxoplasmose congênita

DIAGNÓSTICO				PROGNÓSTICO							
Biomarcadores* (% or MFI, Cont.)	CTL x TOXO			Biomarcadores# (% or MFI, Cont.)	TOXO (NL x L)			Biomarcadores§ (% or MFI, Cont.)	TOXO (AL x CL)		
	AUC	Se (%)	Sp (%)		AUC	Se (%)	Sp (%)		AUC	Se (%)	Sp (%)
CD4⁺CD25⁺	0.9	82	91	CD3 ⁻ CD16 ⁺ & CD3 ⁻ CD56 ⁺	0.7	63	73	CD3 ⁻ CD16 ⁺ & CD3 ⁻ CD56 ⁺	0.7	82	62
TCRγδ⁺	0.8	82	76	CD3 ⁺ CD56 ⁺	0.7	59	80	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.7	55	92
CD8⁺	0.8	78	68	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.7	54	93	WBC(Cont.)	0.7	55	85
CD4⁺DR⁺	0.8	71	77	WBC(Cont.)	0.7	50	93	CD3 ⁻ CD16 ⁺	0.6	92	29
CD8⁺DR⁺	0.8	66	77	CD3 ⁻	0.6	96	24	CD14 ⁺ CD64 ⁺ (MFI)	0.6	89	36
CD4⁺	0.8	54	100	CD14 ⁺ CD64 ⁺ (MFI)	0.6	74	53	CD14 ⁺ CD32 ⁺ (MFI)	0.6	86	43
CD14 ⁺ CD32 ⁺ (MFI)	0.7	82	55	CD19 ⁺ CD5 ⁺	0.6	72	59	TCRγδ ⁺	0.6	86	43
WBC(Cont.)	0.7	79	55	CD3 ⁺ CD16 ⁺	0.6	72	67	LYM	0.6	85	46
CD14 ⁺ CD64 ⁺ (MFI)	0.7	77	59	CD19 ⁺	0.6	70	59	CD4 ⁺ CD8 ⁺	0.6	81	14
TCRαβ ⁺	0.7	75	71	TCRαβ ⁺	0.6	69	65	NEU	0.6	79	54
CD3 ⁻ CD56 ⁺	0.7	66	82	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.6	64	67	CD3 ⁺ CD56 ⁺	0.6	69	64
CD14 ⁺ CD16 ⁺ /CD14 ⁺	0.7	57	82	CD19 ⁺ CD23 ⁺	0.6	60	71	CD4 ⁺	0.6	67	57
CD3 ⁻ CD16 ⁺	0.7	54	77	LYM	0.6	54	73	CD19 ⁺	0.6	67	57
NEU	0.6	97	30	CD14 ⁺ CD16 ⁺ DR ⁺ /CD14 ⁺ CD16 ⁺	0.6	54	71	CD3 ⁻	0.6	61	71
CD14 ⁺ CD16 ⁺ DR ⁺ /CD14 ⁺ CD16 ⁺	0.6	93	36	CD8 ⁺ DR	0.6	44	77	TCRαβ ⁺	0.6	46	71
LYM	0.6	89	32	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.6	40	87	CD14 ⁺ CD16 ⁺ /CD14 ⁺	0.6	36	86
CD3 ⁺ CD56 ⁺	0.6	85	41	CD4 ⁺	0.6	36	94	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.5	100	15
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.6	84	41	CD3 ⁻ CD56 ⁺	0.6	33	100	CD8 ⁺	0.5	78	43
CD3 ⁺	0.6	63	59	NEU	0.6	24	100	CD19 ⁺ CD23 ⁺	0.5	78	36
MON	0.6	62	73	CD14 ⁺ CD16 ⁺ /CD14 ⁺	0.5	96	18	CD14 ⁺ CD16 ⁺ DR ⁺ /CD14 ⁺ CD16 ⁺	0.5	69	43
EOS	0.6	54	64	TCRγδ ⁺	0.5	82	29	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.5	63	62
CD3 ⁻ CD16 ⁺ & CD3 ⁻ CD56 ⁺	0.6	52	77	CD8 ⁺	0.5	80	41	CD4 ⁺ DR ⁺	0.5	53	71
CD19 ⁺ CD5 ⁻	0.6	41	91	CD19 ⁺ CD5 ⁻	0.5	80	41	CD19 ⁺ CD5 ⁻	0.5	53	64
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.6	39	91	CD4 ⁺ CD8 ⁺	0.5	68	41	CD4 ⁺ CD25 ⁺	0.5	53	71
CD19 ⁺ CD23 ⁺	0.6	35	96	CD4 ⁺ CD25 ⁺	0.5	60	53	EOS	0.5	39	82
CD19 ⁺ CD5 ⁺	0.5	47	68	CD14 ⁺ CD32 ⁺ (MFI)	0.5	44	71	CD19 ⁺ CD5 ⁺	0.5	33	86
CD4 ⁺ CD8 ⁺	0.5	27	91	MON	0.5	44	71	CD8 ⁺ DR	0.5	28	86
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.5	26	91	CD4 ⁺ DR ⁺	0.5	40	77	MON	0.5	24	100
CD19 ⁺	0.5	16	100	EOS	0.5	29	93	CD3 ⁻ CD56 ⁺	0.5	14	100

CTL = controles não infectados (n = 22); TOXO = Lactentes com toxoplasmose congênita (n = 68); NL = sem lesão retinocoroidal (n = 18); L = lesão retinocoroidal (n = 50); AL = lesão retinocoroidal ativa (n = 14); CL = lesão retinocoroidal cicatricial (n = 36); AUC = Área sob a curva ROC; Se = Sensibilidade; Sp = especificidade. WBC = glóbulos brancos; LYM = linfócitos; MON = Monócitos; NEU = Neutrófilos; EOS = Eosinófilos. * Cut-off: CD4⁺CD25⁺=4.8; TCRγδ⁺=4.1; CD8⁺=23.2; CD4⁺DR⁺=5.4; CD8⁺DR⁺=14.1; CD4⁺=33.8; CD14⁺CD32⁺(MFI)=518.3; WBC(Contagem)=9,350; CD14⁺CD64⁺(MFI)= 557.5; TCRαβ⁺=59.5; CD3⁻CD56⁺=1.1; CD14⁺CD16⁺/CD14⁺= 12.1; CD3⁺CD16⁺=0.9; NEU=28; CD14⁺CD16⁺DR⁺/CD14⁺CD16⁺=63.7; LYM=58.2; CD3⁻CD56⁺=0.4; CD3⁻CD16⁺CD56⁺=4.8; CD3⁺=66.8; MON=10; EOS=3.7; CD3⁻CD16⁺ & CD3⁻CD56⁺=18.5; CD19⁺CD5⁻=6.0; CD3⁻CD16⁺CD56⁺=8.8; CD19⁺CD23⁺=10.5; CD19⁺CD5⁺=12.7; CD4⁺CD8⁺=0.8; CD3⁻CD16⁺CD56⁺=2.3; CD19⁺=11.9. #Cut-off: CD3⁻CD16⁺ &

CD3⁻CD56⁺=20.4; CD3⁺CD56⁺=0.5; CD3⁻CD16⁺CD56⁺=9.7; WBC(Contagem)=12,360; CD3⁺=75.8; CD14⁺CD64⁺(MFI)=566.4; CD19⁺CD5⁺=14.2 CD3⁺CD16⁺=0.3; CD19⁺=2.6; TCRαβ⁺=54.4; CD3⁻CD16⁺CD56⁻=5.9; CD19⁺CD23⁺=12.9; LYM=70.2; CD14⁺CD16⁺DR⁺/CD14⁺CD16⁺=80.8; CD8⁺DR⁺=32.6; CD3⁻CD16⁻CD56⁺=1.7; CD4⁺=28.8; CD3⁻CD56⁺⁺=0.9; NEU=10; CD14⁺CD16⁺/CD14⁺=26.5; (continuação) TCRγδ⁺=11.9; CD8⁺=24.2; CD19⁺CD5⁻=4.5; CD4⁺CD8⁺=0.3; CD4⁺CD25⁺=3.9; CD14⁺CD32⁺(MFI)=481.8; MON=10.3; CD4⁺DR⁺=10.2; EOS=2.8. §Cut-off: CD3⁻CD16⁺ & CD3⁻CD56⁺=24.9; CD3⁻CD16⁺CD56⁺=7.3; WBC(Contagem)=12,160; CD3⁺CD16⁺=0.4; CD14⁺CD64⁺(MFI)=630.7; CD14⁺CD32⁺(MFI)=356.6; TCRγδ⁺=4.4; LYM=63.1; CD4⁺CD8⁺=0.8; NEU=17; CD3⁺CD56⁺=0.9; CD4⁺=29.8; CD19⁺=17.6; CD3⁺=62.6; TCRαβ⁺=53.5; CD14⁺CD16⁺/CD14⁺=10; CD3⁻CD16⁻CD56⁺=4.9; CD8⁺=30.8; CD19⁺CD23⁺=17.2; CD14⁺CD16⁺DR⁺/CD14⁺CD16⁺=86.9; CD3⁻CD16⁺CD56⁻=7.2; CD4⁺DR⁺=7.9; CD19⁺CD5⁻=6.7; CD4⁺CD25⁺=3.6; EOS=2.9; CD19⁺CD5⁺=14.2; CD8⁺DR⁺=10.9; MON=13.4; CD3⁻CD56⁺⁺=0.3.

5.3. Triagem de citocinas intracelulares específicas de *T. gondii* como biomarcadores complementares para o diagnóstico precoce e prognóstico da toxoplasmose congênita.

Citocinas intracelulares foram analisadas em monócitos, neutrófilos, células NK, células B e células T por citometria de fluxo após estimulação de curto prazo com antígeno de *T. gondii* de amostras de sangue total *in vitro*, realizada 30-45 dias após o nascimento. A acurácia global (AUC), sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) desses biomarcadores para segregar "TOXO de CTL", bem como "NL de L" e "AL de CL" são fornecidos na Tabela 3. Os resultados indicam que o índice STAg / CC para células T CD4⁺ IFN- γ ⁺, monócitos IL-12⁺ e neutrófilos IL-5⁺ exibiram alta acurácia (AUC > 0,8) para discriminar TOXO de indivíduos CTL. Para fins de prognóstico precoce, o índice STAg / CC para células T CD4⁺ IL-5⁺ e células T CD4⁺ IL-17A⁺ mostraram alto desempenho (AUC > 0,8) para discriminar NL de L. Além disso, o índice STAg / CC para As células NK IFN- γ ⁺ exibiram alta acurácia (AUC > 0,8) para discriminar AL de CL (Tabela 3).

Com o objetivo de rastrear biomarcadores complementares para o prognóstico tardio da toxoplasmose congênita, as características *ex vivo* dos leucócitos circulantes e o perfil *in vitro* de citocinas intracelulares foram analisados em amostras de sangue total coletadas 1 ano após o nascimento do TOXO para procurar atributos putativos com aplicabilidade como prognóstico tardio biomarcadores para distinguir "NL de L". Os resultados são apresentados na Tabela 4. Todos os biomarcadores avaliados apresentam índices de acurácia moderados (AUC = 0,7) ou baixos (AUC < 0,7) para discriminar NL de L (Tabela 4).

Tabela 3. Triagem de citocinas intracelulares específicas de *T. gondii* como biomarcadores complementares para diagnóstico e prognóstico de toxoplasmose congênita.

DIAGNÓSTICO				PROGNÓSTICO							
Biomarcadores* (%)	CTL x TOXO			Biomarcadores# (%)	TOXO (NL x L)			Biomarcadores§ (%)	TOXO (AL x CL)		
	AUC	Se (%)	Sp (%)		AUC	Se (%)	Sp (%)		AUC	Se (%)	Sp (%)
CD4⁺ IFN-γ⁺	0.8	79	80	CD4⁺ IL-5⁺	0.8	65	90	NK IFN-γ⁺	0.9	93	83
MON IL-12⁺	0.8	78	70	CD4⁺ IL-17A⁺	0.8	62	100	CD4 ⁺ IL-4 ⁺	0.7	86	50
NEU IL-5⁺	0.8	65	88	CD19 ⁺ IL-4 ⁺	0.7	100	29	MON IL-1 β ⁺	0.7	68	80
MON IL-1 β ⁺	0.7	93	56	CD4 ⁺ IL-8 ⁺	0.7	81	50	CD8 ⁺ IL-8 ⁺	0.7	68	71
NEU IL-17A ⁺	0.7	78	56	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	0.7	74	60	CD4 ⁺ IL-8 ⁺	0.7	67	69
NEU IL-10 ⁺	0.7	76	67	NEU IL-4 ⁺	0.7	63	78	CD19 ⁺ TNF ⁺	0.7	63	69
NEU TNF ⁺	0.7	63	88	MON TNF ⁺	0.7	63	78	NK IL-4 ⁺	0.7	60	73
MON TNF ⁺	0.7	55	90	CD8 ⁺ IL-5 ⁺	0.7	48	88	CD4 ⁺ TNF ⁺	0.7	52	79
CD8 ⁺ IFN- γ ⁺	0.7	45	100	NEU IL-5 ⁺	0.7	41	100	NEU IL-4 ⁺	0.7	47	85
NK IFN- γ ⁺	0.7	44	100	CD4 ⁺ IL-10 ⁺	0.6	98	30	CD8 ⁺ IL-10 ⁺	0.6	96	29
CD19 ⁺ IL-10 ⁺	0.6	90	44	CD8 ⁺ TNF ⁺	0.6	80	44	CD8 ⁺ IL-4 ⁺	0.6	96	35
CD19 ⁺ IL-4 ⁺	0.6	80	40	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺	0.6	79	44	NEU IL-6 ⁺	0.6	75	46
MON IL-4 ⁺	0.6	78	50	CD4 ⁺ TNF ⁺	0.6	71	50	MON IL-10 ⁺	0.6	75	47
MON IL-10 ⁺	0.6	73	60	MON IL-6 ⁺	0.6	68	56	CD8 ⁺ TNF ⁺	0.6	73	59
CD8 ⁺ IL-5 ⁺	0.6	71	56	CD19 ⁺ IL-10 ⁺	0.6	63	71	NEU TNF ⁺	0.6	71	67
CD4 ⁺ IL-4 ⁺	0.6	70	60	NK TNF ⁺	0.6	48	83	NEU IL-10 ⁺	0.6	70	63
NEU IL-4 ⁺	0.6	67	63	MON IL-1 β ⁺	0.6	47	89	CD4 ⁺ IL-10 ⁺	0.6	63	63
NEU IL-8 ⁺	0.6	66	78	NEU IL-17A ⁺	0.6	42	86	TNF/NK	0.6	60	67
MON IL-6 ⁺	0.6	65	60	CD8 ⁺ IL-17A ⁺	0.6	35	88	CD19 ⁺ IL-10 ⁺	0.6	58	69
NEU IL-1 β ⁺	0.6	61	71	NEU IL-1 β ⁺	0.6	31	100	MON IL-4 ⁺	0.6	52	73
CD8 ⁺ IL-4 ⁺	0.6	59	67	NK IFN- γ ⁺	0.6	23	100	MON TNF ⁺	0.6	48	79
CD8 ⁺ TNF ⁺	0.6	58	67	CD8 ⁺ IL-8 ⁺	0.6	21	100	NEU IL-17A ⁺	0.6	47	86
NK TNF ⁺	0.6	58	100	NEU TNF ⁺	0.5	100	11	MON IL-6 ⁺	0.6	45	79
CD4 ⁺ IL-17A ⁺	0.6	50	78	CD8 ⁺ IL-4 ⁺	0.5	95	22	CD4 ⁺ IFN- γ ⁺	0.5	100	19
CD4 ⁺ IL-8 ⁺	0.6	40	80	MON IL-10 ⁺	0.5	80	44	CD4 ⁺ IL-5 ⁺	0.5	96	18
CD4 ⁺ TNF ⁺	0.6	33	90	CD4 ⁺ IL-4 ⁺	0.5	73	44	CD8 ⁺ IL-5 ⁺	0.5	91	29
CD8 ⁺ IL-17A ⁺	0.6	33	100	MON IL-12 ⁺	0.5	56	67	CD8 ⁺ IL-17A ⁺	0.5	91	25
CD19 ⁺ TNF ⁺	0.6	26	100	NEU IL-10 ⁺	0.5	47	89	MON IL-12 ⁺	0.5	81	33
CD4 ⁺ IL-5 ⁺	0.5	64	50	MON IL-4 ⁺	0.5	36	89	NEU IL-1 β ⁺	0.5	69	46
NEU IL-6 ⁺	0.5	45	75	NEU IL-6 ⁺	0.5	27	100	CD8 ⁺ IFN- γ ⁺	0.5	62	65
CD8 ⁺ IL-8 ⁺	0.5	35	100	CD8 ⁺ IL-10 ⁺	0.5	27	89	CD4 ⁺ IL-17A ⁺	0.5	55	64
NK IL-4 ⁺	0.5	34	100	CD19 ⁺ TNF ⁺	0.5	24	100	NEU IL-8 ⁺	0.5	44	80
CD4 ⁺ IL-10 ⁺	0.5	18	100	NEU IL-8 ⁺	0.5	24	100	NEU IL-5 ⁺	0.5	30	88
CD8 ⁺ IL-10 ⁺	0.5	16	100	NK IL-4 ⁺	0.5	23	100	CD19 ⁺ IL-4 ⁺	0.5	24	92

CTL = controles não infectados (n = 10); TOXO = Lactentes com toxoplasmose congênita (n = 51); NL = sem lesão retinocoroidal (n = 10); L = lesão retinocoroidal (n = 41); AL = lesão retinocoroidal ativa (n = 16); CL = lesão retinocoroidal cicatricial (n = 25); AUC = Área sob a curva ROC; Se = Sensibilidade; Sp = especificidade. Células NK: CD16⁺ FSCLowSSC_{Low}; MON = Monócitos: células CD14⁺; NEU = neutrófilos SSC^{High}CD16⁺ ou CD14⁺. *Cut-off: CD4⁺ IFN- γ ⁺=1.3; MON IL-12⁺=1.2; NEU IL-5⁺=0.9; MON IL-1 β ⁺=0.5; NEU IL-17A⁺= 0.9; NEU IL-10⁺=0.9; NEU TNF⁺=0.9; MON TNF⁺=4.0; CD8⁺IFN- γ ⁺=1.3; NK IFN- γ ⁺=1.7; CD19⁺IL-10⁺=0.7; CD19⁺IL-4⁺=0.8; MON IL-4⁺=1.0; MON IL-10⁺=1.3; CD8⁺IL-5⁺=0.9; CD4⁺IL-4⁺=1.1; NEU IL-4⁺=0.9; NEU IL-8⁺=3.4; MON IL-6⁺=1.3; NEU IL-1 β ⁺=3.8; CD8⁺ IL-4⁺=1.0; CD8⁺ TNF⁺=1.1; NK TNF⁺=1.2; CD4⁺IL-17A⁺=1.2; CD4⁺IL-8⁺=1.2; CD4⁺TNF⁺=1.9; CD8⁺IL-17A⁺=0.9; CD19⁺TNF⁺=1.7; CD4⁺ IL-5⁺=0.9; NEU IL-6⁺=1.1; CD8⁺ IL-8⁺=1.6; NKIL-4⁺=0.8; CD4⁺IL-10⁺=1.7; CD8⁺IL-10⁺=1.5. #Cut-off: CD4⁺IL-5⁺=1.1; CD4⁺IL-17A⁺=1.2; CD19⁺IL-4⁺=0.5; CD4⁺ IL-8⁺=1.4; CD4⁺IFN- γ ⁺=2.8; NEU IL-4⁺=1.2; MON TNF⁺=6.0; CD8⁺ IL-5⁺=1.0; NEU IL-5⁺=2.3; CD4⁺ IL-10⁺=2.2; CD8⁺ TNF⁺=1.5; CD8⁺ IFN- γ ⁺=1.9; CD4⁺TNF⁺=1.8; MON IL-6⁺=3.1; CD19⁺IL-10⁺=1.1; NK TNF⁺=1.1; MON IL-1 β ⁺=1.2; NEU IL-17A⁺=2.6; CD8⁺ IL-17A⁺=1.2; NEU IL-1 β ⁺=1.7; NK IFN- γ ⁺=0.9; CD8⁺IL-8⁺=0.8; NEU TNF⁺= 5.1; CD8⁺IL-4⁺=0.5; MON IL-10⁺=1.2; CD4⁺IL-4⁺=1.1; MON IL-12⁺=2.2; NEU IL-10⁺=1.0; MON IL-4⁺=1.6; NEU IL-6⁺=2.4; CD8⁺ IL-10⁺=1.2; CD19⁺ TNF⁺=1.8; NEU IL-8⁺=1.5; NK IL-4⁺=0.5; §Cut-off: NK IFN- γ ⁺=1.3; CD4⁺ IL-4⁺=0.9; MON IL-1 β ⁺=1.2; CD8⁺ IL-8⁺=1.2; CD4⁺ IL-8⁺=1.1; CD19⁺ TNF⁺=1.1; NK IL-4⁺=1.1; CD4⁺ TNF⁺=1.3; NEU IL-4⁺=0.6; CD8⁺ IL-10⁺=0.7; CD8⁺ IL-4⁺=1.4; NEU IL-6⁺=1.6; MON IL-10⁺=1.4; CD8⁺ TNF⁺=1.2; NEU TNF⁺=1.3; NEU IL-10⁺=1.4; CD4⁺ IL-10⁺=1.0; NK TNF⁺=1.1; CD19⁺ IL-10⁺=1.0; MON IL-4⁺=1.2; MON TNF⁺=6.0; NEU IL-17A⁺=1.2; MON IL-6⁺=1.1; CD4⁺ IFN- γ ⁺=0.8; CD4⁺ IL-5⁺=0.5; CD8⁺ IL-5⁺=1.7; CD8⁺IL-17A⁺=1.8; MON IL-12⁺=1.3; NEU IL-1 β ⁺=1.9; CD8⁺IFN- γ ⁺=1.2; CD4⁺IL-17A⁺=1.3; NEU IL-8⁺= 2.1; NEU IL-5⁺=4.2; CD19⁺ IL-4⁺=1.8.

Tabela 4: Triagem de subpopulações de leucócitos circulantes *ex vivo* e citocinas intracelulares específicas de *T. gondii* como biomarcadores complementares para o prognóstico de toxoplasmose congênita um ano após o nascimento *

Subpopulações de leucócitos [#] (%, MFI ou Contagem)	STATUS CLÍNICO (um ano após nascimento)						
	TOXO (NL x L)			Citocinas específicas de <i>T. gondii</i> [§] (%)	TOXO (NL x L)		
	AUC	Se (%)	Sp (%)		AUC	Se (%)	Sp (%)
CD14 ⁺ CD16 ⁺ DR ⁺ /CD14 ⁺ CD16 ⁺	0.7	52	82	NK IL-4 ⁺	0.7	95	50
CD19 ⁺ CD5 ⁻	0.6	89	39	MON IL-6 ⁺	0.7	93	50
LYM	0.6	87	39	NK TNF ⁺	0.7	88	56
CD3 ⁺	0.6	84	44	MON IL-4 ⁺	0.7	82	75
CD8 ⁺ DR ⁺	0.6	80	47	MON IL-1β ⁺	0.7	78	75
CD4 ⁺ CD8 ⁺	0.6	73	56	CD4 ⁺ IFN-γ ⁺	0.7	77	67
NEU	0.6	68	56	NK IFN-γ ⁺	0.7	76	67
CD14 ⁺ CD64 ⁺ (MFI)	0.6	68	53	CD4 ⁺ IL-10 ⁺	0.7	68	83
CD19 ⁺	0.6	65	61	NEU IL-17A ⁺	0.7	53	68
CD3 ⁻ CD16 ⁻ CD56 ⁺	0.6	64	61	MON IL-10 ⁺	0.6	97	33
MON	0.6	61	59	CD8 ⁺ IL-17A ⁺	0.6	90	33
CD3 ⁺ CD56 ⁺	0.6	60	67	CD4 ⁺ IL-17A ⁺	0.6	86	50
TCRαβ ⁺	0.6	57	65	CD8 ⁺ IL-5 ⁺	0.6	72	63
CD19 ⁺ CD23 ⁺	0.6	55	67	CD4 ⁺ TNF ⁺	0.6	65	67
CD14 ⁺ CD16 ⁺ /CD14 ⁺	0.6	49	71	NEU TNF ⁺	0.6	57	67
CD4 ⁺ DR ⁺	0.6	45	78	CD4 ⁺ IL-8 ⁺	0.6	45	83
CD3 ⁻ CD16 ⁺ & CD3 ⁻ CD56 ⁺	0.6	35	89	NEU IL-8 ⁺	0.6	39	89
EOS	0.6	20	100	CD8 ⁺ TNF ⁺	0.6	38	89
TCRγδ ⁺	0.5	85	41	CD4 ⁺ IL-5 ⁺	0.6	36	83
CD4 ⁺ CD25 ⁺	0.5	70	44	CD8 ⁺ IFN-γ ⁺	0.6	34	100
CD3 ⁻ CD56 ⁺⁺	0.5	69	53	CD19 ⁺ TNF ⁺	0.6	29	100
WBC (Cont.)	0.5	68	44	NEU IL-10 ⁺	0.6	28	100
CD19 ⁺ CD5 ⁺	0.5	48	72	CD8 ⁺ IL-10 ⁺	0.6	26	100
CD8 ⁺	0.5	45	72	NEU IL-1β ⁺	0.6	22	100
CD4 ⁺	0.5	41	83	NEU IL-6 ⁺	0.5	93	33
CD3 ⁺ CD16 ⁺	0.5	40	78	NEU IL-4 ⁺	0.5	77	44
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0.5	40	78	CD8 ⁺ IL-8 ⁺	0.5	74	38
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁻	0.5	35	89	CD19 ⁺ IL-10 ⁺	0.5	69	50
CD14 ⁺ CD32 ⁺ (MFI)	0.5	24	94	MON TNF ⁺	0.5	66	60
-	-	-	-	CD4 ⁺ IL-4 ⁺	0.5	53	67
-	-	-	-	NEU IL-5 ⁺	0.5	51	67
-	-	-	-	MON IL-12 ⁺	0.5	41	80
-	-	-	-	CD8 ⁺ IL-4 ⁺	0.5	33	86
-	-	-	-	CD19 ⁺ IL-4 ⁺	0.5	27	100

Os achados oftalmológicos empregados para definir o estado clínico (NL e L), bem como as características imunológicas foram medidos um ano após o nascimento. TOXO = Lactentes com toxoplasmose congênita (n # = 81; n§ = 50); NL = sem lesão retinocoroidal (n # = 18; n§ = 9); L = lesão retinocoroidal (n # = 63; n§ = 41); AUC = Área sob a curva ROC; Se = Sensibilidade; Sp = especificidade. #Cut-off: CD14⁺CD16⁺DR⁺/CD14⁺CD16⁺=91.7; CD19⁺CD5⁺=15.0; LYM=71.3; CD3⁺=60.8; CD8⁺DR⁺=2.0; CD4⁺CD8⁺=1.1; NEU=24.0; CD14⁺CD64⁺(MFI)=181; CD19⁺=21.8; CD3⁻CD16⁻CD56⁺=1.3; MON=5.9; CD3⁺CD56⁺=1.3; TCRαβ⁺=59.1; CD19⁺CD23⁺=11.0; CD14⁺CD16⁺/CD14⁺=7.1; CD4⁺DR⁺=3.2; CD3⁻CD16⁺ & CD3⁻CD56⁺=8.9; EOS=8.0; TCRγδ⁺=8.3; CD4⁺CD25⁺=6.1; CD3⁻CD56⁺⁺=1.6; WBC(Contagem)=; CD19⁺CD5⁺=9.3; CD8⁺=31.9; CD4⁺=40.4; CD3⁺CD16⁺=1.9; CD3⁻CD16⁺CD56⁺=5.7; CD3⁻CD16⁺CD56⁻=1.6; CD14⁺CD32⁺(MFI)=229. §Cut-off: NK IL-4⁺=2.3; MON IL-6⁺=2.6; NK TNF⁺=1.7; MON IL-4⁺=1.8; MON IL-1β⁺=3.5; CD4⁺ IFN-γ⁺=1.2; NK IFN-γ⁺=1.7; CD4⁺IL-10⁺=0.9; NEU IL-17A⁺=0.9; MON IL-10⁺=2.6; CD8⁺IL-17A⁺=2.5; CD4⁺IL-17A⁺=1.7; CD8⁺ IL-5⁺=1.4; CD4⁺TNF⁺=1.1; NEU TNF⁺=1.7; CD4⁺IL-8⁺=1.0; NEU IL-8⁺=1.3; CD8⁺TNF⁺=1.5; CD4⁺IL-5⁺=0.8; CD8⁺ IFN-γ⁺=0.7; CD19⁺TNF⁺=1.5; NEU IL-10⁺=1.5; CD8⁺IL-10⁺=1.5; NEU IL-1β⁺=1.0; NEU IL-6⁺=3.0; NEU IL-4⁺=1.7; CD8⁺ IL-8⁺=1.4; CD19⁺IL-10⁺=1.3; MON TNF⁺=2.5; CD4⁺ IL-4⁺=0.9; NEU IL-5⁺=1.4; MON IL-12⁺=1.7; CD8⁺ IL-4⁺=1.2; CD19⁺ IL-4⁺=1.4.

5.4. Desempenho detalhado de biomarcadores selecionados para o diagnóstico complementar precoce de toxoplasmose congênita.

Informações detalhadas de desempenho, incluindo curvas ROC de dois gráficos (TG-ROC), índices de curvas ROC e distribuição de gráfico de dispersão para os biomarcadores selecionados durante a análise de triagem (CXCL9, células T CD4⁺ CD25⁺ e células T CD4⁺ IFN- γ ⁺) são apresentado na Figura 1. As curvas TG-ROC foram empregadas para definir os pontos de corte para cada biomarcador, capazes de segregar TOXO do CTL com a maior acurácia (Figura 1, painéis à esquerda). A análise de dados indicou que níveis de CXCL9 acima de 6.754 pg/ml, frequência de células T CD4⁺ CD25⁺ acima de 4,8% e índice STAg/CC para células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ acima de 1,3% são os pontos de corte mais confiáveis para discriminar TOXO de CTL (Figura 1, painéis do meio). Os parâmetros da curva ROC ressaltaram o alto desempenho para esses biomarcadores, (AUC = 0,9; 0,9 e 0,8, respectivamente) (Figura 1, painéis do meio). As distribuições de gráfico de dispersão de valores individuais ilustram ainda a capacidade das CXCL9, células T CD4⁺ CD25⁺ e células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ para distinguir TOXO de CTL (Figura 1, painéis direitos).

FIGURA 1

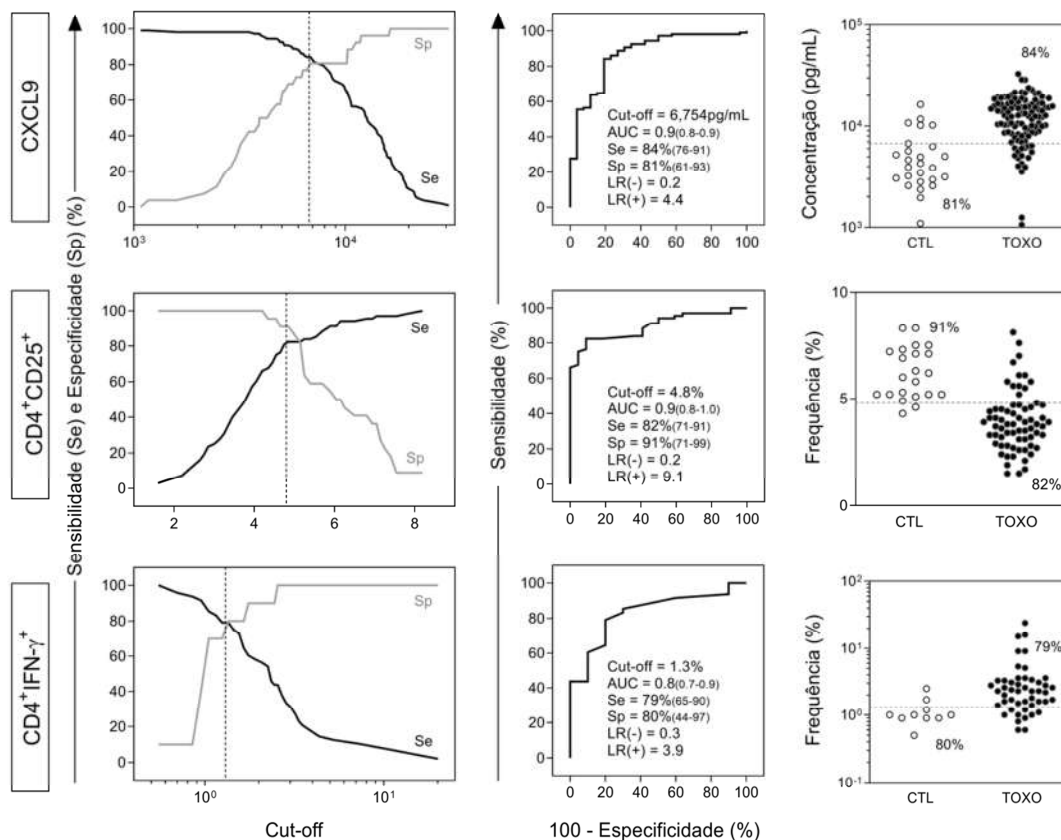


Figura 1 - Desempenho dos biomarcadores imunológicos para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita. Os níveis séricos de CXCL9 (pg / mL) e as porcentagens de células T CD4⁺ CD25⁺ e células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ circulantes foram medidos conforme descrito em Material e métodos. As curvas TG-ROC foram traçadas com base na sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) no eixo y versus ponto de corte no eixo x. As linhas pontilhadas indicam o corte com maior acurácia. As curvas ROC foram traçadas considerando a sensibilidade (Se) e o complemento da especificidade (100-Sp%) ao longo de uma faixa de pontos de corte. A área sob a curva (AUC) indica a acurácia global de cada biomarcador no diagnóstico de toxoplasmose congênita pela segregação de TOXO de CTL. Os índices de desempenho (Cut-off; Área sob a curva - AUC; Sensibilidade (Se); Especificidade (Sp); Razão de Verossimilhança - LR (-) / LR (+) para os três biomarcadores selecionados são fornecidos na figura. Gráficos de dispersão ilustram os níveis de CXCL9 (pg / mL), bem como a frequência de células T CD4⁺ CD25⁺ e células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ em lactentes com toxoplasmose congênita (TOXO, círculos pretos, n = 90) e controles saudáveis (CTL, círculos brancos, n = 24). A linha pontilhada representa o corte previamente selecionado pela análise da curva TG-ROC e ROC. As frequências das amostras TOXO (Se) e CTL (Sp) segregadas pelo ponto de corte são exibidos em cada gráfico de dispersão.

5.5. Desempenho de biomarcadores combinados para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.

Na tentativa de melhorar o desempenho dos biomarcadores imunológicos como ferramentas complementares para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, os dois principais biomarcadores de cada conjunto de parâmetros foram combinados em um algoritmo sequencial gradual (Figura 2). Para este propósito, novas bordas de corte foram definidas para cada atributo da raiz (CXCL9, células T CD4⁺ CD25⁺ e células T CD4⁺ IFN- γ ⁺) para melhorar a sensibilidade para fins de triagem. Um segundo biomarcador (CXCL10, células T γ δ e IL-12⁺ MON, respectivamente) foi então empregado como um atributo restritivo para fornecer especificidade complementar. A acurácia obtida para o uso de biomarcadores únicos ou combinados foi então comparada por análise discriminante. A análise de dados foi realizada com grupos de lactentes com medição pareada de CXCL9: CXCL10 (TOXO = 108 e CTL = 26), células T CD4⁺ CD25⁺: células T γ δ (TOXO = 67 e CTL = 21) e células T CD4⁺IFN- γ ⁺: MON IL-12⁺ (TOXO = 43 e CTL = 10). Os resultados demonstraram um ligeiro aumento no desempenho geral com o uso de CXCL9 \rightarrow CXCL10 combinado (Acurácia = 91%) em comparação com o uso de CXCL9 sozinho (Acurácia = 84%) (Figura 2A). No entanto, a acurácia diminuída foi obtida para a combinação dos biomarcadores células T CD4⁺ CD25⁺ \rightarrow células T γ δ = 84% e células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ \rightarrow MON IL-12⁺ = 84% em comparação com o uso de parâmetros únicos (células T CD4⁺ CD25⁺ = 85% e células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ = 81%) (Figura 2B e C).

FIGURA 2

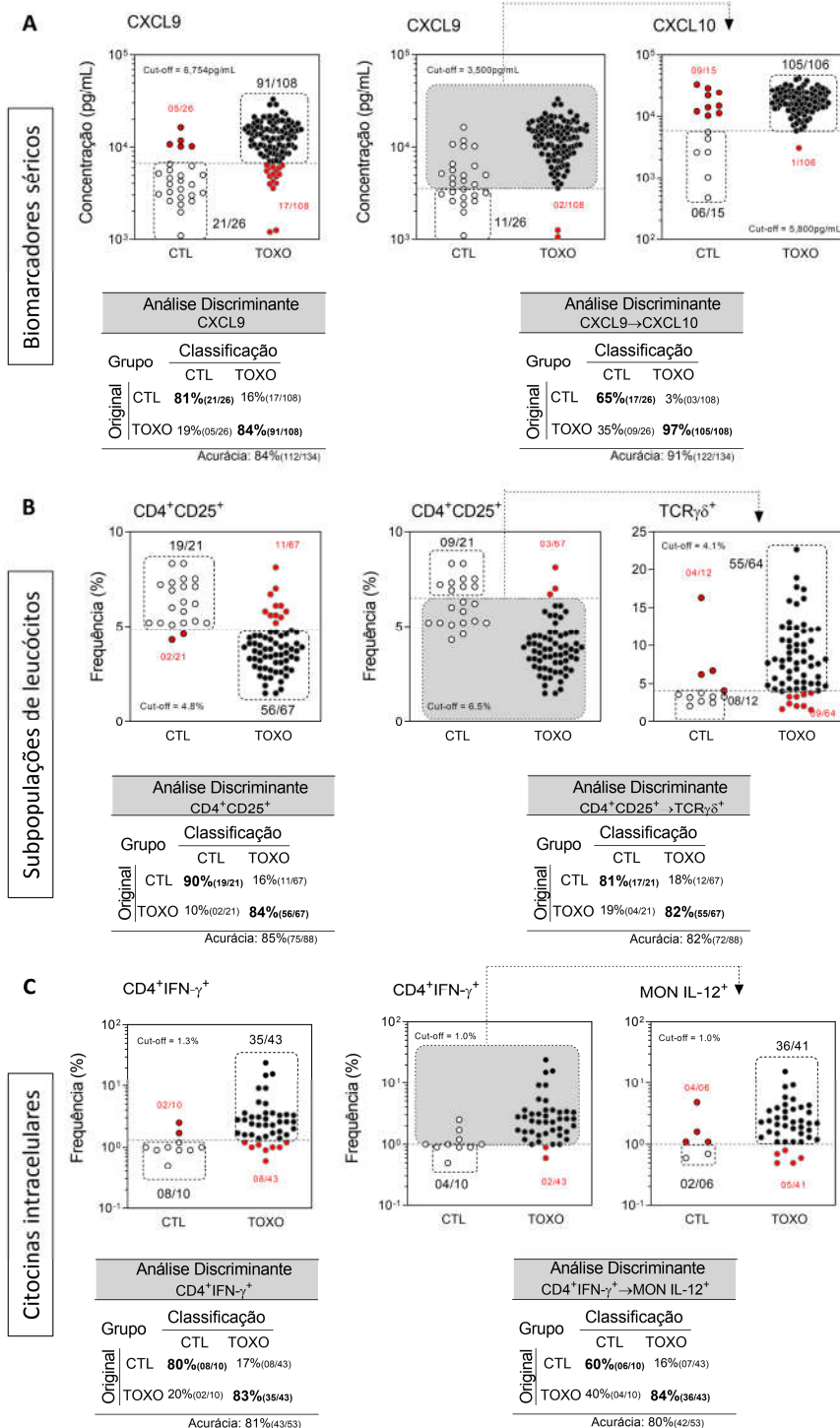


Figura 2 - Desempenho da análise de biomarcadores individuais e combinados para o diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita. Três conjuntos de biomarcadores incluindo (A) quimiocinas séricas, (B) subpopulações de leucócitos e (C) citocinas intracelulares foram avaliados como parâmetros individuais e em combinação para segregar TOXO de CTL. A análise de biomarcador individual é exibida por gráficos de dispersão individuais para os níveis séricos de CXCL9 (pg / mL) e porcentagens de células T CD4⁺ CD25⁺ e células T CD4⁺ IFN-γ⁺ circulantes em lactentes com toxoplasmose congênita (TOXO, círculos pretos, "n" é indicado para cada biomarcador) e controles saudáveis (CTL, círculos brancos, "n" é indicado para cada

biomarcador). A linha pontilhada representa os pontos de corte previamente selecionados pela análise da curva ROC. A proporção de TOXO e CTL entre os *cut-offs* é mostrada em cada gráfico de dispersão. Os resultados falso-positivos e falso-negativos são sublinhados por círculos vermelhos. A análise de biomarcadores combinada foi realizada usando os dois principais biomarcadores com maior desempenho durante a análise individual. Novos pontos de corte (*cut-off*) foram definidos para cada atributo (células T, CXCL9, células T CD4⁺ CD25⁺ e células T CD4⁺ IFN- γ ⁺) para melhorar a sensibilidade para fins de triagem. O segundo biomarcador (CXCL10, células T γ δ e MON IL-12⁺, respectivamente) foi empregado como um atributo rigoroso para fornecer especificidade complementar. Planos de fundo cinza exibem os pacientes selecionados para a segunda rodada de análise. A análise dos dados foi realizada com grupos de lactentes com medições pareadas (“n” é fornecido para cada par de biomarcadores). A análise discriminante para análise de biomarcador individual e combinada é fornecida abaixo de cada gráfico de dispersão. A acurácia da análise discriminante é exibida no canto esquerdo inferior de cada tabela inserida.

A análise adicional foi realizada com a combinação gradual de células T $CD4^+ CD25^+$ → CXCL9, usando um grupo selecionado de lactentes (TOXO = 37 e CTL = 15) com medição pareada desses atributos. Os resultados demonstraram um aumento relevante na acurácia para células T $CD4^+ CD25^+$ → combinação CXCL9 (acurácia = 96%) em comparação com células T $CD4^+ CD25^+$ usadas como um único parâmetro (acurácia = 90%) (Figura 3).

FIGURA 3

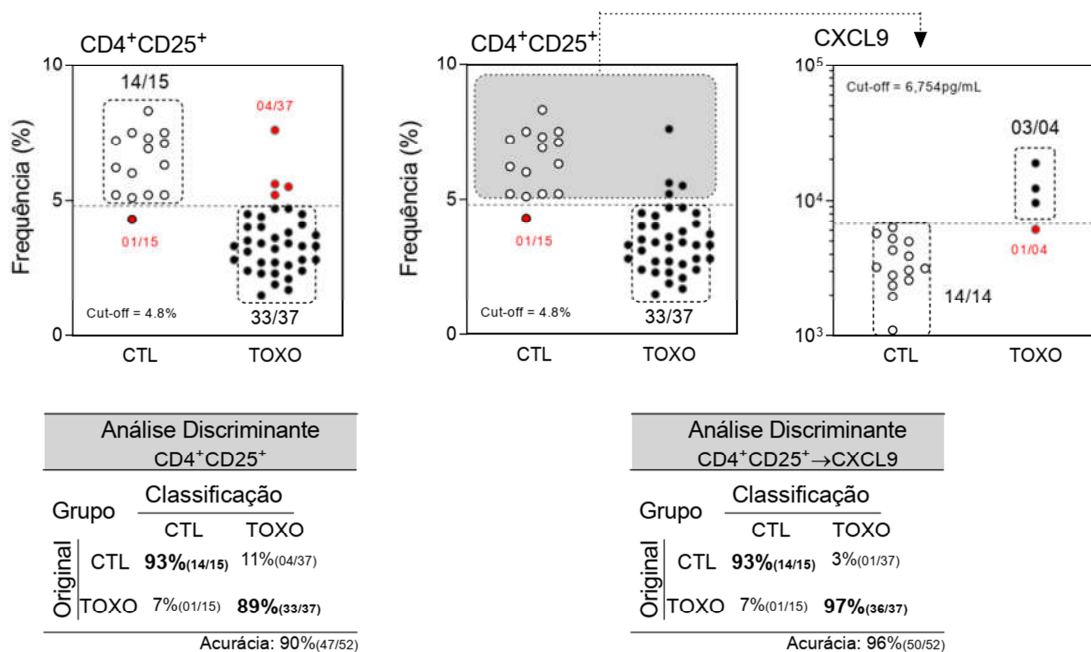


Figura 3 - Desempenho de análise individual de células T $CD4^+ CD25^+$ e análise combinada de células T $CD4^+ CD25^+$ e CXCL9 para o diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita. O gráfico de dispersão ilustra a análise individual de células T $CD4^+ CD25^+$ em lactentes com toxoplasmose congênita (TOXO, círculos pretos, $n = 37$) e controles saudáveis de mesma idade (CTL, círculos brancos, $n = 15$). A linha pontilhada representa o corte previamente selecionado pela análise da curva TG-ROC e curva ROC. As frequências das amostras TOXO (Se) e CTL (Sp) segregadas pelos *cut-offs* são exibidas em cada gráfico de dispersão. Os resultados falso-positivos e falso-negativos são sublinhados por círculos vermelhos. A análise individual de biomarcadores foi realizada usando a frequência das porcentagens de células T $CD4^+ CD25^+$ circulantes para a triagem e os níveis séricos de CXCL9 como uma segunda etapa para segregar lactentes com toxoplasmose congênita (TOXO, olheiras, $n = 37$) de crianças da mesma idade saudáveis (CTL, círculos brancos, $n = 15$). A linha pontilhada representa o corte previamente definido pela análise da curva ROC para o uso de um único biomarcador. Planos de fundo cinza exibem os pacientes selecionados para a segunda rodada de análise. A proporção de TOXO e CTL entre os *cut-offs* é mostrada em cada gráfico de dispersão. Os retângulos de linha pontilhada mostram o número de casos contabilizados na análise discriminante como resultados precisos. Os resultados da análise discriminante, incluindo a análise de biomarcadores individuais e combinados, são demonstrados nas tabelas inseridas abaixo de cada gráfico de dispersão. A acurácia da análise discriminante é exibida no canto esquerdo inferior de cada tabela inserida.

5.6. Desempenho de células T $\text{IFN-}\gamma^+$ CD4^+ mais $\text{IFN-}\gamma^+$ CD8^+ como diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita.

O desempenho da produção de células T $\text{IFN-}\gamma^+$ induzida por *T. gondii* observada em estímulos de curto prazo *in vitro* foi ainda avaliada como biomarcador complementar para o diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita. Para este propósito, a soma das células T CD4^+ $\text{IFN-}\gamma^+$ e células T CD8^+ $\text{IFN-}\gamma^+$ ($\sum \text{IFN-}\gamma^+$ CD4^+ & CD8^+) foi calculada e o desempenho avaliado por TG-ROC e análise da curva ROC (Figura 4). A borda de corte (Índice STAg / CC = 1%) foi definida pela análise TG-ROC como o valor mais confiável para obter os maiores índices de desempenho. Foi obtida uma alta acurácia global (AUC = 0,9) juntamente com elevada sensibilidade (Se = 98%) e especificidade moderada (Sp = 70%) (Figura 4).

FIGURA 4

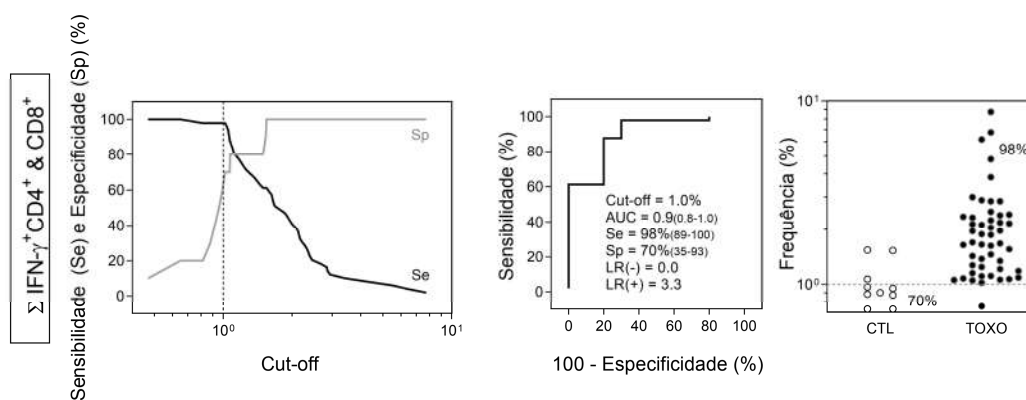


Figura 4: Desempenho das células T produtoras de $\text{IFN-}\gamma$ ($\sum \text{IFN-}\gamma^+$ CD4^+ e CD8^+) para o diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita. A curva TG-ROC foi plotada com base no eixo y versus corte no eixo x. A linha pontilhada vertical representa *cut-off* com maior acurácia. As curvas ROC foram traçadas considerando a sensibilidade (Se%) e o complemento da especificidade (100-Sp%). Os índices de desempenho (*Cut-off*; Área sob a curva - AUC; Sensibilidade (Se); Especificidade (Sp); Razão de verossimilhança - LR (-) / LR (+)) são fornecidos na figura. Os gráficos de dispersão ilustram as porcentagens de células T positivas para $\text{IFN-}\gamma$ ($\sum \text{IFN-}\gamma^+$ CD4^+ & CD8^+) em lactentes com toxoplasmose congênita (TOXO, círculos pretos, n = 49) e controles saudáveis de mesma idade (CTL, círculos brancos, n = 10). A linha pontilhada representa o *cut-off* previamente selecionado pela análise das curvas TG-ROC e ROC. As frequências das amostras TOXO (Se) e CTL (Sp) segregadas pelos *cut-offs* são exibidas no gráfico de dispersão.

5.7. Desempenho de células T CD4⁺ IL5⁺ e células NK IFN- γ ⁺ para o prognóstico precoce de toxoplasmose congênita

A fim de verificar a característica operacional de novos biomarcadores para o prognóstico precoce da infecção congênita por *T. gondii*, uma análise detalhada de células T CD4⁺ IL5⁺ e células NK IFN- γ ⁺ foi realizada em subgrupos TOXO comparando NL vs L e AL vs CL, respectivamente (Figura 5). As curvas TG-ROC foram usadas para determinar os pontos de corte do Índice STAg / CC mais adequados (células T CD4⁺ IL5⁺ = 1,1% e células células NK IFN- γ ⁺ = 1,3%) para o prognóstico precoce preciso da infecção congênita por *T. gondii* (Figura 5, painéis da esquerda). A análise da curva ROC indicou o alto desempenho desses biomarcadores para distinguir NL de L (AUC = 0,8) e AL de CL (AUC = 0,9) (Figura 5, painéis do meio). Os gráficos de dispersão de valores individuais ilustram ainda a capacidade das células T CD4⁺ IL5⁺ e células NK IFN- γ ⁺ para categorizar lactentes TOXO com base em seu estado de lesões retinocoroidais (Figura 5, painéis direitos).

FIGURA 5

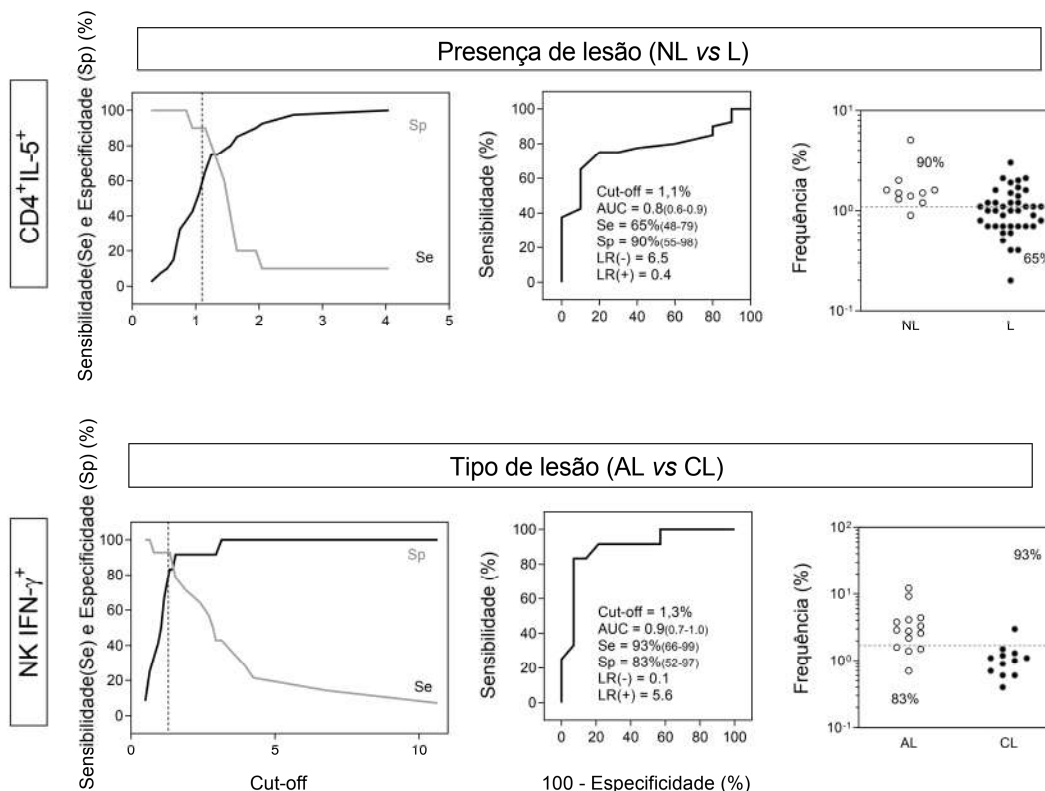


Figura 5: Desempenho de citocinas intracelulares produzidas por células T para o prognóstico precoce da toxoplasmose congênita ocular. Os biomarcadores selecionados, células T CD4⁺ produzindo IL-5 (CD4⁺ IL-5⁺) e células NK produzindo IFN- γ (NK IFN- γ ⁺), foram avaliados quanto ao seu desempenho como novos parâmetros laboratoriais para o prognóstico precoce da infecção ocular congênita por *T. gondii*. O desempenho de células CD4⁺ IL-5⁺ foi testado para discriminar lactentes com toxoplasmose congênita com lesões retinocoroidais (L) daqueles sem (NL) lesões retinocoroidais. A frequência de células NK IFN- γ ⁺ foi testada quanto à sua capacidade de segregar lactentes com lesões retinocoroidais ativas (AL) ou cicatriciais (CL). A curva TG-ROC foi construída considerando a sensibilidade (Se) e a especificidade (Sp) no eixo y versus corte no eixo x. A linha pontilhada vertical mostra o corte com a maior acurácia. As curvas ROC foram traçadas considerando a sensibilidade (Se%) e o complemento da especificidade (100-Sp%). Os índices de desempenho (corte; Área sob a curva - AUC; Sensibilidade (Se); Especificidade (Sp); Razão de verossimilhança - LR (-) / LR (+) são fornecidos na figura. Os gráficos de dispersão ilustram as porcentagens de células CD4⁺ IL-5⁺ em lactentes com (L, círculos pretos, n = 41) ou sem lesões retinocoroidais (NL, círculos brancos, n = 10), bem como a porcentagem de células NK IFN- γ ⁺ em lactentes com lesão ativa (AL, círculos brancos, n = 14) ou lesão retinocoroidal cicatricial (CL, círculos pretos, n = 12). A linha pontilhada exibe os pontos de corte (*cut-off*) selecionados pela análise da curva TG-ROC e ROC. As frequências dos lactentes acima e abaixo dos *cut-off* são exibidos em cada gráfico de dispersão.

6. DISCUSSÃO

A infecção congênita por *T. gondii* pode levar a graves sequelas neurológicas e oftalmológicas e, portanto, o diagnóstico precoce é relevante para apoiar o manejo clínico imediato e a intervenção terapêutica (DE CASTRO et al., 2017). Os métodos mais comumente empregados para o diagnóstico da toxoplasmose congênita em recém-nascidos e lactentes são a detecção com base na sorologia de anticorpos IgM, IgG e IgA específicos para *T. gondii* (ZHANG et al., 2016, VILLARD et al., 2006). Embora esses métodos clássicos possam fornecer diagnóstico diferencial de toxoplasmose adquirida aguda, crônica ou reativada, eles têm pouca relevância para o diagnóstico precoce de toxoplasmose congênita, especialmente devido à transferência passiva de persistência de longo prazo de IgG específico de *T. gondii* materno para crianças em risco para toxoplasmose congênita (PINON et al., 1996). Em geral, o diagnóstico sorológico definitivo de toxoplasmose congênita requer acompanhamento subsequente por pelo menos um ano (POMARES; MONTOYA, 2016, DARD et al., 2017).

Vários métodos analíticos têm sido propostos como biomarcadores laboratoriais complementares para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita, com alta sensibilidade e especificidade, visando melhorar a tomada de decisão clínica (DE CASTRO et al., 2017, MAHMOUDI et al., 2017). No presente trabalho avaliamos a sensibilidade e especificidade de um amplo espectro de parâmetros imunológicos e caracterizamos sua acurácia como biomarcadores complementares para o diagnóstico precoce e prognóstico da toxoplasmose congênita. A análise incluiu a medição dos níveis séricos de quimiocinas e citocinas, juntamente com a quantificação de subconjuntos de leucócitos circulantes e análise de citocinas intracelulares por estimulação *in vitro* de curto prazo específica para antígenos.

Nossos dados demonstraram que CXCL9 e CXCL10 têm bom desempenho para discriminar lactentes infectados por *T. gondii* de controles não infectados de mesma idade. Além disso, também observamos que a análise combinada de CXCL9 e CXCL10 melhora a acurácia desses biomarcadores para diagnosticar toxoplasmose. Anteriormente, mostramos níveis aumentados de CXCL9 e CXCL10 séricos em lactentes infectados por *T. gondii* logo após o nascimento (DE ARAÚJO et al., 2017). Altos níveis de quimiocinas também foram descritos no humor aquoso de pacientes com toxoplasmose ocular primária ou recorrente em comparação com controles sem doença (THIEME et al., 2019). É bem descrito que a resposta imune induzida pela infecção por *T. gondii* é mediada por um microambiente rico de células

ativadas e mediadores inflamatórios solúveis, incluindo quimiocinas, citocinas e fatores celulares (DUNAY et al., 2008, NOROSE et al., 2011, FURTADO et al., 2012, GOLDSZMID et al., 2012, ANDRADE et al., 2013, OCHIAI et al., 2015, TOSH et al., 2016, DE ARAÚJO et al., 2017). Já foi relatado que a expressão de CXCL9 e CXCL10 na retina foi significativamente regulada positivamente em modelo experimental de toxoplasmose ocular (NOROSE et al., 2011). CXCL9 tem se mostrado crucial para recrutar e ativar células T para controlar a infecção por *T. gondii* (OCHIAI et al., 2015). É importante notar que CXCL10 aumentou a transmigração de preparações de células dendríticas derivadas de monócitos humanos infectadas com *T. gondii* em direção ao endotélio retinal humano (FURTADO et al., 2012). Esses achados apoiam a relevância da medição de CXCL9 e CXCL10 como ferramentas complementares para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita.

Além da análise de biomarcadores séricos, nossos resultados mostraram que a análise *ex vivo* de subpopulações de leucócitos circulantes pode ser empregada como teste imunológico complementar para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita. A avaliação de células $T\gamma\delta$ e células $T CD4^+ CD25^+$ apresentou alto desempenho para distinguir TOXO de CTL. Embora a análise combinada de células $T CD4^+ CD25^+$ e $T\gamma\delta$ não melhore a acurácia desses biomarcadores para o diagnóstico precoce, a avaliação de células $T CD4^+ CD25^+$ seguida de CXCL9 levou a um aumento no desempenho do diagnóstico. Demonstramos anteriormente que as características fenotípicas das respostas imunes inatas e adaptativas em lactentes com toxoplasmose congênita forneceram informações relevantes para a pesquisa adicional de parâmetros laboratoriais com aplicações clínicas putativas (MACHADO et al., 2014). Da mesma forma, outros estudos mostraram alterações em elementos do sistema imunológico durante a toxoplasmose congênita. Machado et al. (2014) sugeriram que o nível aumentado de contagem de células $T TCR\gamma\delta^+$ foi um bom biomarcador de morbidade em lactentes com toxoplasmose congênita. Estudos anteriores propuseram a dosagem de células $T CD25^+$ por estimulação específica do *T. gondii* como um teste simples, sensível e específico para o diagnóstico de toxoplasmose congênita para os casos em que os testes sorológicos eram imprecisos (FATOOHI et al., 2003, CIARDELLI et al., 2008). Um desses estudos também mostrou que a avaliação da resposta específica de células T, como expressão de CD25 e HLA-DR, produção de IFN- γ por células T e proliferação de células T suportou o diagnóstico de neonatos infectados por *T. gondii*, 3 meses ou mais (CIARDELLI et al., 2008). Em relação ao marcador de ativação CD25, foi demonstrado que a expressão de

CD25 aumenta nas células T após estimulação *in vitro* de longo prazo de células mononucleares do sangue periférico com antígenos de *T. gondii*. Nossos dados mostraram uma diminuição na frequência de células T CD25⁺ CD4⁺ circulantes de recém-nascidos com 30-45 dias de idade infectados com TOXO *T. gondii* em comparação com controles não infectados da mesma idade.

Uma resposta pró-inflamatória proeminente de células T CD4⁺ e CD8⁺, caracterizada por altos níveis de IFN- γ , foi relatada durante uma toxoplasmose congênita; tanto nos casos sem envolvimento ocular quanto naqueles com lesão retinocoroidal ativa ou cicatricial (CARNEIRO et al., 2016). Nesse contexto, nossos resultados induzidos que a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ após estimulação de duração com antígeno de *T. gondii* tem alta acurácia para o diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita. Além disso, a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ revela um desempenho ainda maior para o diagnóstico. Uma análise do IFN- γ secretado produzido pela estimulação com antígenos do *T. gondii*, conhecido como IGRA, tem sido usado como método de diagnóstico da toxoplasmose. Em geral, esses testes baseados em células T têm sido considerados uma ferramenta diagnóstica sensível e específica para toxoplasmose congênita, complementar aos testes sorológicos (CHAPEY et al., 2010, CHAPEY et al., 2015, MAHMOUDI et al., 2017). A medição de citocinas intracelulares adiciona informações relevantes àquelas realizadas no soro, uma vez que descreve em detalhes a fonte celular de mediadores imunológicos relevantes. Esse conhecimento é relevante não apenas para propor novas ferramentas laboratoriais, mas também como uma importante contribuição para o melhor entendimento da resposta imune na toxoplasmose congênita.

Nesse sentido, mostramos que a produção de IFN- γ pelas células NK apresenta alta acurácia para discriminar lactentes com lesões retinocoroidais ativas ou cicatriciais. O IFN- γ produzido pelas células NK é importante para regular a dinâmica das células inflamatórias e também para conduzir a diferenciação celular para o início da resposta imune ao *T. gondii* (ANDRADE et al., 2013). No entanto, em que extensão essa citocina está associada ao envolvimento ocular ainda não é conhecido. Nossos resultados também mostraram que a produção de IL-5 pelas células T CD4⁺ foi capaz de distinguir com alta acurácia lactentes com lesões retinocoroidais daqueles sem doença ocular. Assim, embora a avaliação de células NK produtoras de IFN- γ forneça um biomarcador putativo para o prognóstico precoce de toxoplasmose congênita, a análise de células T CD4⁺ IL-5⁺ após estimulação de antígenos de *T. gondii* é um marcador prognóstico potencial de envolvimento ocular em lactentes com

toxoplasmose congênita. A regulação positiva de IL-5 foi relacionada a características clínicas graves de toxoplasmose ocular com níveis aumentados de IL-5 encontrados em amostras de humor aquoso de pacientes com toxoplasmose ocular aguda e recorrente (DE-LA-TORRE et al., 2014).

Em conjunto, nossos achados reforçam a importância da avaliação de elementos da resposta imune como biomarcadores para definir o diagnóstico precoce e o prognóstico da toxoplasmose congênita. Este estudo rastreou uma variedade de ensaios imunológicos para medir parâmetros específicos *ex vivo* e pós-estimulação do *T. gondii* definindo biomarcadores com alta acurácia para o diagnóstico e prognóstico da toxoplasmose congênita. Propomos os níveis de CXCL9 e CXCL10, as frequências de células T CD4⁺ CD25⁺ e a frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ específicas de *T. gondii* apresentadas como biomarcadores capazes de distinguir com alta acurácia lactentes com toxoplasmose congênita de não infectados controles saudáveis. As análises combinadas de células T CD4⁺ CD25⁺ e CXCL9 e produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e CD8⁺ têm uma acurácia ainda maior como biomarcadores de toxoplasmose congênita. Quanto ao prognóstico precoce, células T IL5⁺ CD4⁺ específicas de *T. gondii* e IFN- γ produzidos por células NK apresentaram alta acurácia para definir, respectivamente, o envolvimento ocular e a fase aguda / crônica da toxoplasmose ocular em lactentes com doença congênita. Juntos, esses achados apoiam a relevância do emprego dos elementos da resposta imune mediada por células como biomarcadores com potencial para endossar o diagnóstico precoce e o prognóstico da toxoplasmose congênita. Essas análises desses biomarcadores têm potencial para serem utilizadas como abordagens complementares para contribuir para um melhor manejo clínico e intervenção terapêutica durante a toxoplasmose congênita. O presente estudo pode ter algumas limitações em relação ao número de amostras avaliadas e requer validação adicional em investigações futuras. No geral, esses achados apoiam a relevância de empregar os elementos da resposta imune mediada por células como biomarcadores com potencial para endossar o diagnóstico precoce e o prognóstico da toxoplasmose congênita. Nossa proposta é que, mediante sorologia positiva para toxoplasmose congênita logo após o nascimento (rastreamento IgM positivo em amostras de punção de calcanhar, imediatamente após o nascimento, e IgM / IgG positivo 30-45 dias após o nascimento) deve ser realizada análise complementar por biomarcadores séricos, imunofenotípicos e funcionais em laboratórios de referência especializados.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, W. A. et al. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Cell host & microbe**, v.13, n.1, p.42–53, 2013. doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.003
- CARNEIRO, A.C. et al. Cytokine Signatures Associated With Early Onset, Active Lesions and Late Cicatricial Events of Retinochoroidal Commitment in Infants With Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v.213, n.12, p.1962-70, 2016 . doi: 10.1093/infdis/jiw041.
- CHAPEY, E. et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n.1, p. 41-5, 2010. doi: 10.1128/JCM.01903-09
- CHAPEY, E. et al. Place of Interferon- γ Assay for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **The Pediatric infectious disease journal**, v.34, n.12, p.1407–1409, 2015. doi.org/10.1097/INF.0000000000000901
- CIARDELLI, L. et al. Early and accurate diagnosis of congenital toxoplasmosis. **The Pediatric infectious disease journal**, v.27, n.2, p.125–129, 2008. doi.org/10.1097/INF.0b013e3181586052.
- DARD, C. et al. Late diagnosis of congenital toxoplasmosis based on serological follow-up: A case report. **Parasitology international**, v.66, n. 2, p.186–189, 2017. doi.org/10.1016/j.parint.2016.12.004
- DE ARAÚJO, T. E. et al. Early serum biomarker networks in infants with distinct retinochoroidal lesion status of congenital toxoplasmosis. **Cytokine**, v.95, p. 102–112, 2017. doi.org/10.1016/j.cyto.2017.02.018
- DE CASTRO, A. Z. T. et al. Establishing tools for early diagnosis of congenital toxoplasmosis: Flow cytometric IgG avidity assay as a confirmatory test for neonatal screening. **Journal of Immunological Methods**, v.451, p.37-47. doi: 10.1016/j.jim.2017.08.005
- DE JESUS, L.N. et al. IgA and IgG1 reactivities assessed by flow cytometry mirror clinical aspects of infants with ocular congenital toxoplasmosis. **Journal of Immunological Methods**. v.1, n.428, p.1-8, 2016. doi: 10.1016/j.jim.2015.11.004
- DE-LA-TORRE, A. et al. Ocular cytokinome is linked to clinical characteristics in ocular toxoplasmosis. **Cytokine**, v.68, n.1, p.23–31, 2014. doi.org/10.1016/j.cyto.2014.03.005

DENKERS, E.Y. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infection**, v.1, n.9, p.699-708, 1999.

DUNAY, I. R. et al. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v.29, n.2, p. 306–317, 2008. doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.019.

FATOOHI, A.F. et al. Cellular immunity to *Toxoplasma gondii* in congenitally infected newborns and immunocompetent infected hosts. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v.22, n.3, p.181-4, 2003. doi.org/10.1007/s10096-003-0903-9

FURTADO, J. M. et al. Migration of *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells across human retinal vascular endothelium. **Investigative ophthalmology & visual science**, v.53, n.11, p.6856–6862, 2012. doi.org/10.1167/iovs.12-10384

GAZZINELLI, R. T. et al. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of immunology**, v.146, n.1, p.286–292, 1991.

GOLDSZMID, R. S. et al. NK cell-derived interferon- γ orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. **Immunity**, v.36, n.6, p.1047–1059, 2012. doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.026

LEBECH, M. et al. Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v.15, n.10, p.799-805, 1996.

MACHADO, A. S. et al. Biomarker analysis revealed distinct profiles of innate and adaptive immunity in infants with ocular lesions of congenital toxoplasmosis. **Mediators of Inflammation**, v.2014, n.1, p. 1-13, 2014. doi: 10.1155/2014/910621

MAHMOUDI, S.; MAMISHI, S.; SUO, X.; KESHAVARZ, H. Early detection of *Toxoplasma gondii* infection by using a interferon gamma release assay: A review. **Experimental parasitology**, v.172, p. 39–43, 2017. doi.org/10.1016/j.exppara.2016.12.008

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- α)? **Clinical & developmental immunology**, v.2009, n.374696, p.1-4, 2009. doi.org/10.1155/2009/374696

MOMBRÒ, M. et al. Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection, **European Journal of Pediatrics**. v.162, n.10, p.703-6, 2003. doi: 10.1007/s00431-003-1248-1

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

NOROSE, K. et al. CXCL10 is required to maintain T-cell populations and to control parasite replication during chronic ocular toxoplasmosis. **Investigative ophthalmology & visual science**, v.52, n.1, p.389–398, 2011. doi.org/10.1167/iovs.10-5819

- OCHIAI, E. et al. CXCL9 is important for recruiting immune T cells into the brain and inducing an accumulation of the T cells to the areas of tachyzoite proliferation to prevent reactivation of chronic cerebral infection with *Toxoplasma gondii*. **The American journal of pathology**, v.185, n.2, p.314–324, 2015. doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.10.003
- PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* s and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v.39, n.12, p.1385–1394, 2009. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.04.003
- PINON, J. M. et al. Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM) or IgA immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. **Journal of clinical microbiology**, v.34, n.3, p.579–583, 1996. doi.org/10.1128/jcm.34.3.579-583.1996
- POMARES, C; MONTOYA, J.G. Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, n.10, p.2448-54, 2016. doi: 10.1128/JCM.00487-16.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Review**, v.25, n.2, p.264-96, 2012. doi:10.1128/CMR.05013-11
- THIEME, C. et al. Immune Mediator Profile in Aqueous Humor Differs in Patients with Primary Acquired Ocular Toxoplasmosis and Recurrent Acute Ocular Toxoplasmosis. **Mediators of inflammation**, v.2019, n.9356728, 2019. doi.org/10.1155/2019/9356728
- TORGERSON, P.R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bull World Health Organ**, v.91, n.7, p.501-8, 2013 doi: 10.2471/BLT.12.111732
- TOSH, K. W. et al. The IL-12 Response of Primary Human Dendritic Cells and Monocytes to *Toxoplasma gondii* Is Stimulated by Phagocytosis of Live Parasites Rather Than Host Cell Invasion. **Journal of immunology**, v.196, n.1, p.345–356, 2016. doi.org/10.4049/jimmunol.1501558
- VASCONCELOS-SANTOS, D. V. et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology**, v.116, n.11, p.2199–205.e1, 2009. doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.04.042
- VILLARD, O. et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.84, n.1, p. 22–33, 2016. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.009
- ZHANG, K. Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization. **Clinica chimica acta**, v. 461, p. 83–89, 2016. doi.org/10.1016/j.cca.2016.07.018

CAPÍTULO 2

Impacto de longo prazo da toxoplasmose congênita nas características fenotípicas e funcionais dos leucócitos circulantes de lactentes um ano após o início do tratamento

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose congênita (TC) é uma doença parasitária resultante da transmissão transplacentária do parasita protozoário *Toxoplasma gondii* que ocorre predominantemente após a infecção primária durante a gravidez (MONTROYA; REMINGTON, 2008; PIAO et al., 2018). A incidência de TC depende da ausência de imunidade prévia da mãe e da taxa de exposição ao *T. gondii* durante a gravidez. A prevalência de CT difere entre as regiões como resultado de multifatoriais epidemiológicos, ambientais, comportamento cultural e condições sanitárias (PETERSEN et al., 2012; MAREZE et al., 2019). A incidência global estimada de TC é de aproximadamente 1,5 casos em 1.000 nascidos vivos (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013). A América do Sul é a região geográfica com maior prevalência de CT, com circulação dos genótipos mais patogênicos de *T. gondii* (SHWAB et al., 2018). No Brasil, a prevalência estimada varia de 0,3-3,4 / 1.000 nascidos vivos (DA SILVA et al., 2015).

Embora a TC seja subclínica em aproximadamente 75% dos recém-nascidos infectados, a infecção pode apresentar uma ampla gama de manifestações clínicas, causando doença grave e incapacitante tanto no feto em desenvolvimento quanto no recém-nascido (MOMBRÒ et al., 2015, ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012, MCAULEY, 2014). A retinocoroidite, calcificações intracranianas e hidrocefalia são consideradas a tríade clássica da TC (GRAS et al., 2002). Dentre as manifestações clínicas da TC, a retinocoroidite é um dos desfechos mais comuns relatados no Brasil (STRANG et al., 2020). As consequências para os lactentes que podem resultar em perda parcial ou total da visão dependem do local onde as lesões se desenvolvem e da extensão do tecido afetado (PLEYER et al., 2014). Novas lesões retinocoroidais desenvolvidas após o primeiro ano de vida são comuns mesmo em pacientes tratados, o que indica a importância do acompanhamento em longo prazo dos pacientes com TC (LAGO et al., 2020).

Os eventos fisiopatológicos associados ao desenvolvimento da lesão ocular na TC envolvem mecanismos multifatoriais, sendo a lise celular mediada pelo parasita relatada como a principal causa de destruição tecidual. Além disso, as respostas inflamatórias exacerbadas também podem contribuir para a gravidade da doença ocular (DODDS et al., 2008; REY et al., 2013) e eventos modulatórios, capazes de contrabalançar a resposta inflamatória exacerbada, são relevantes para controlar os danos causados pela infecção (CALABRESE et al., 2008, CORDEIRO et al., 2017). Alguns estudos apoiam que diferentes microambientes imunológicos nos estágios iniciais da TC estão associados a estados distintos de lesões

retinocoroidais (MACHADO et al., 2014). Altos níveis de monócitos CD14⁺ CD16⁺ HLA-DR^{high} e células NK-CD56^{dim} e um estado pró-inflamatório proeminente de células T CD4⁺ e CD8⁺, mediado pela produção de IFN- γ e IL-17 são predominantes em lactentes com lesão retinocoroidal ativa (MACHADO et al., 2014, CARNEIRO et al., 2016). Por outro lado, a alta produção de IL-10 por neutrófilos e monócitos foi a marca registrada de lactentes com lesões retinocoroidais cicatriciais (CARNEIRO et al., 2016).

Com o objetivo de controlar o desfecho clínico da TC, o esquema terapêutico mais utilizado inclui o uso combinado de pirimetamina com sulfonamida (VILLENA et al 1998, PETERSEN; SCHMIDT, 2003). O objetivo imediato do início terapêutico precoce é inativar rapidamente as formas proliferativas do parasita, controlando assim o estado inflamatório e reduzir o risco de ativação da infecção mais tarde na vida. Esquema terapêutico estendido durante o primeiro ano de vida tem sido proposto para controlar a infecção até que a criança desenvolva uma resposta imune eficaz para inibir a proliferação do parasita (PETERSEN; SCHMIDT, 2003, GILBERT et al., 2009). No entanto, foram relatados efeitos adversos de longo prazo da terapia com sulfadiazina / pirimetamina, incluindo distúrbios hematológicos, principalmente neutropenia, como resultado da supressão da medula óssea (CARELLOS et al., 2014).

Embora alguns estudos relatem o efeito terapêutico benéfico no estado das lesões retinocoroidais, efeitos adversos putativos também foram observados em crianças com TC (PHAN et al., 2008, CARELLOS et al., 2014). No entanto, não há estudos abordando o impacto da intervenção terapêutica no perfil imunológico de crianças com toxoplasmose congênita.

No presente estudo, avaliamos o perfil imunológico de crianças com toxoplasmose congênita, um ano após o início do tratamento etiológico, durante o acompanhamento desta coorte. A fenotipagem imune de leucócitos circulantes *ex vivo* e perfis de citocinas intracelulares foram avaliados por estimulação de curto prazo usando pequenos volumes de amostras de sangue total. Embora a intervenção terapêutica precoce resulte em lesões cicatriciais em todos os lactentes avaliados, alterações de longo prazo no estado fenotípico e funcional das células imunes são encontradas um ano após o tratamento, revelando perfis distintos dependendo do envolvimento ocular observado antes do início do tratamento.

2. JUSTIFICATIVA

A transmissão vertical de *T. gondii* pode causar várias sequelas, com apresentação de manifestações clínicas do nascimento até a vida adulta. O resultado varia entre infecção assintomática, morte fetal intrauterina e nascimento de crianças gravemente afetadas. Além das lesões oculares, o comprometimento cerebral é uma das manifestações da toxoplasmose congênita. Dentre os fatores que parecem agravar esta situação estão a ausência do diagnóstico e tratamento precoces, decorrentes da ausência de um acompanhamento inadequado ou ausente de gestantes de alto risco. O tratamento imediato de gestantes e recém-nascidos com suspeita de TC pode minimizar os efeitos da doença.

Após o diagnóstico e início do tratamento da toxoplasmose congênita é de extrema importância que o monitoramento de lactentes nascidos de mães soropositivas para a infecção continue, devido a possibilidade de novas manifestações clínicas se desenvolverem depois do primeiro ano de vida. Apesar dessa necessidade, atualmente pouco se sabe sobre os efeitos da intervenção terapêutica na resposta imunológica de lactentes tratados. A literatura mostra que existe uma complexa interação entre o hospedeiro e o *T. gondii* durante a toxoplasmose congênita e adquirida, que pode ser a base de mudanças de longo prazo nas características metabólicas, epigenéticas, fenotípicas e funcionais da resposta imune. Com isso, ressalta-se a importância deste trabalho, que teve como foco analisar o perfil de biomarcadores celulares e moleculares de lactentes com toxoplasmose congênita, após um ano do início do tratamento etiológico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o impacto do tratamento etiológico precoce no perfil de biomarcadores celulares e moleculares na toxoplasmose congênita.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar alterações no perfil imunológico de leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita, após tratamento etiológico.
- Avaliar alterações na produção de citocinas intracitoplásticas, após estímulo de curto prazo com antígeno de *T. gondii in vitro*, de lactentes com toxoplasmose congênita, após tratamento etiológico.
- Verificar se as alterações no perfil imunológico após tratamento etiológico estão relacionadas com os achados clínicos da avaliação oftalmológica no período de 30 a 45 dias após nascimento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. População de estudo e amostragem.

Trata-se de um estudo observacional realizado como parte de uma investigação prospectiva da triagem neonatal para toxoplasmose congênita, coordenada pelo grupo de pesquisa multidisciplinar (Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita da UFMG), implementada entre novembro de 2006 a maio de 2007 em Minas Gerais, Brasil. A investigação prospectiva original compreende a coleta em papel de filtro de sangue total por punção de calcanhar, imediatamente após o nascimento, de um total de 146.307 recém-nascidos para rastreamento de IgM anti-*T. gondii* (Q-Preven TOXO ELISA, Symbiosis, Leme, Brasil). Lactentes com resultados positivos ou indeterminados com IgM anti-*T. gondii* e suas respectivas mães foram submetidos à punção venosa para coleta de sangue total para testes sorológicos confirmatórios pela pesquisa de IgM e IgG anti-*T. gondii* (Enzyme-Linked Fluorometric Assay, ELFA-VIDAS, BioMérieux SA, Lyon, França). Todas as mães apresentaram resultados positivos para IgM e / ou IgG anti-*T. gondii* por ELFA-VIDAS.

Todos os lactentes receberam atendimento médico mensal de especialistas clínicos primários em doenças infecciosas. A avaliação oftalmológica foi realizada 30-45 dias após o nascimento por dois médicos especialistas em retina / uveíte independentes, assistidos por uma enfermeira treinada de acordo com um protocolo padrão, conforme relatado anteriormente por Vasconcelos et al. (2009). Os achados fundoscópicos foram usados para definir o estado basal da lesão retinocoroidal. Após a primeira consulta, lactentes positivos com IgM e / ou IgG anti-*T. gondii* por ELFA-VIDAS receberam o tratamento clássico proposto pelo *Chicago Toxoplasmosis Study Group* (McAuley et al., 1994) compreendendo: Sulfadiazina (duas doses diárias de 100mg / kg / dia) e Pirimetamina (dose diária nos primeiros 6 meses seguidos por uma dose 3 vezes por semana de 1mg / kg / dia) durante 1 ano. O ácido fólico foi usado continuamente 3 vezes por semana na dose de 7,5mg / dose por um ano e interrompido uma semana após o término do tratamento com Sulfadiazina e Pirimetamina. As doses foram ajustadas mensalmente de acordo com os pesos corporais.

Lactentes com resultados positivos persistentes para anti-*T. gondii* (IgG ELFA) com um ano de idade foram considerados casos de toxoplasmose congênita (TOXO). Lactentes com resultados negativos para anti-*T. gondii* aos 12 meses de idade foram considerados controles não infectados (NI, n = 6). O acompanhamento oftalmológico foi realizado um ano após o nascimento. Os lactentes com diagnóstico confirmado de toxoplasmose congênita,

submetidos ao tratamento, foram selecionados um ano após o início do tratamento, em amostragem não probabilística de conveniência para coleta adicional de sangue periférico (TOXO1-_{anoAT}, n = 81). Os achados oftalmológicos observados um ano após o início do tratamento foram considerados para definir o "estado de lesão retinocoroidal atual" como: L (-) = lactentes sem lesões retinocoroidais (n = 18) e L (+) = lactentes com lesões retinocoroidais cicatriciais (n = 63). O estado basal da lesão retinocoroidal, definido 30-45 dias após o nascimento, foi usado para categorizar retrospectivamente o L (+) (n = 63, todos com lesões retinocoroidais cicatriciais atuais) em três subgrupos de acordo com a "evolução do estado basal da lesão retinocoroidal" da seguinte forma: AL → CL (n = 9) - lactentes com lesões retinocoroidais ativas no início do estudo, ACL → CL (n = 30) - lactentes com lesões retinocoroidais ativas / cicatriciais mistas no início do estudo e CL≈CL (n = 24) - lactentes com lesões retinocoroidais cicatriciais desde o início.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo 298/06. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentações brasileiras. Mediante consentimento informado assinado pela mãe ou representante legal, amostras de sangue total (5mL em EDTA e 7mL em heparina) foram coletadas de cada bebê para caracterizar o perfil fenotípico e funcional de subconjuntos de leucócitos circulantes.

4.2. Imunofenotipagem de leucócitos circulantes *ex vivo*

Amostras de sangue total, coletadas em EDTA, foram utilizadas para análise imunofenotípica de leucócitos circulantes *ex vivo* de acordo com relatado anteriormente (DE ARAÚJO et al., 2020). Aliquotas de sangue total (50 uL) foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos com um painel de anticorpos monoclonais para marcadores de superfície celular, para identificar: Subconjuntos de monócitos - anti-CD14 (TüK4), anti-CD16 (3G8) anti-CD32 (FLI8.26), anti-CD64 (10.1), anti-HLA-DR (TÜ36); Subconjuntos de células NKT e células NK - anti-CD16 (3G8), anti-CD56 (B159); Subconjuntos de células T - anti-CD3 (UCHT1), anti-TCR $\alpha\beta$ (WT31), anti-TCR $\gamma\delta$ (11F2), anti-CD4 (RPA-T4), anti-CD8 (B9.11) anti-HLA -DR (TÜ36) e subconjuntos de células B - anti-CD5 (L17F12), anti-CD19 (4G7), anti-CD23 (M-L233), conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou Tricolor (TC), adquirido na Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA) e na

BD Bioscience (San Diego, CA, EUA). Após a incubação, as amostras foram tratadas, por 10 minutos à temperatura ambiente, com 1mL de solução de lise FACS (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Em seguida, a suspensão celular foi lavada (800 xg, 7min a 4°C) com 1mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixada com 300 µL de solução fixadora de FACS (10g / L de paraformaldeído, 10,2g / L de cacodilato de sódio, 6,67g / L de cloreto de sódio, pH 7,2, todos adquiridos de SIGMA, St. Louis, MO, EUA). As células coradas foram mantidas a 4°C por até 24 horas antes da aquisição por citometria de fluxo. Um total de 30.000 eventos / amostra foram adquiridos em um instrumento FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) usando o software CellQuest. A análise dos dados foi realizada com o software FlowJo (versão 10.3; TreeStar, Ashland, OR, EUA). Os resultados foram expressos inicialmente como porcentagem de células selecionadas (Figura 1A). Os dados finais foram expressos em contagens absolutas (células / mm³), considerando as contagens diferenciais de leucócitos realizadas em analisador hematológico automatizado (Sysmex XE2100, Kobe, Hyogo, Japão).

4.3. Perfil funcional de leucócitos circulantes *in vitro* em cultura de curto prazo

Amostras de sangue total heparinizado foram utilizadas para cultura de curto prazo *in vitro* realizada em tubos de polipropileno de 5mL (BD Bioscience, Bedford, MA, EUA), como segue: 500µL de sangue total foram incubados com 500µL de meio do Roswell Park Memorial Institute (RPMI-16-40) na presença de 10µL de antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg, preparado conforme descrito anteriormente por Gazzinelli et al. (1991), na concentração final de 5µg / mL (cultura estimulada por STAg) ou na presença de 10µL de RPMI-1640 [Cultura de controle - (CC)] por 12 horas a 37 ° C, 5% de atmosfera de CO₂ em uma incubadora umidificada. Após a incubação, 10µL de Brefeldin A (SIGMA, St Louis, MO, EUA), a uma concentração final de 10 µg / mL, foi adicionado a cada tubo e as culturas de células incubadas por mais 4 horas. As culturas de células foram então tratadas com 100µL de EDTA a uma concentração final de 2 mM por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação das células foram lavados (800 xg, 7min a 4°C) com 2mL de PBS suplementado com 5% de albumina de soro bovino (PBS-5% BSA) e ressuspensos i n 1mL de PBS-5% BSA. Alíquotas de células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com anticorpos monoclonais para marcadores de superfície celular marcados com FITC ou TC, para identificar: monócitos –anti-CD14-TC; Células NK - anti-CD16-TC; Subconjuntos de

células T - anti-CD4-TC, anti-CD8-TC e células B - anti-CD19-TC, todos adquiridos na BD Bioscience, San Diego, CA, EUA. Os eritrócitos foram então lisados e as células fixadas com 1mL de solução de lise FACS (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) por 10 minutos em temperatura ambiente, as células foram lavadas com 1mL de PBS-5% BSA e permeabilizadas com 1mL de PBS-5 % BSA com 0,5% saponina durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com anticorpos monoclonais para citocinas, conjugados com PE: anti-IL-8 (AS14), anti-IL-1 β (AS10), anti-IL-6 (AS12) , anti-TNF (Mab11), anti-IL-12 (C11.5), anti-IFN- γ (4S.B3), anti-IL-17A (SCPL1362), anti-IL-4 (8D4-8), anti-IL-5 (TRFK5) ou anti-IL-10 (JES3-19F1), todos adquiridos na BD Bioscience, San Diego, CA, EUA. Após a lavagem, as células foram fixadas com solução fixadora FACS e armazenadas a 4°C por até 24 horas antes da aquisição da citometria de fluxo. Um total de 20.000 eventos / amostra foram adquiridos em um instrumento FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e o software CellQuest. Os dados foram analisados por meio do software FlowJo (versão 10.3; TreeStar, Ashland, OR, EUA). Estratégias distintas de *gating* foram empregadas para selecionar monócitos (CD14High) e linfócitos (FSCLowSSCLow) e gráficos de pontos bidimensionais usados para avaliar a frequência de células positivas para citocinas em culturas estimuladas por CC e STAg (Figura 1B). Os resultados foram expressos como índice STAg / CC calculado como a proporção de citocina + células na cultura STAg dividida pela cultura CC correspondente.

FIGURA 1

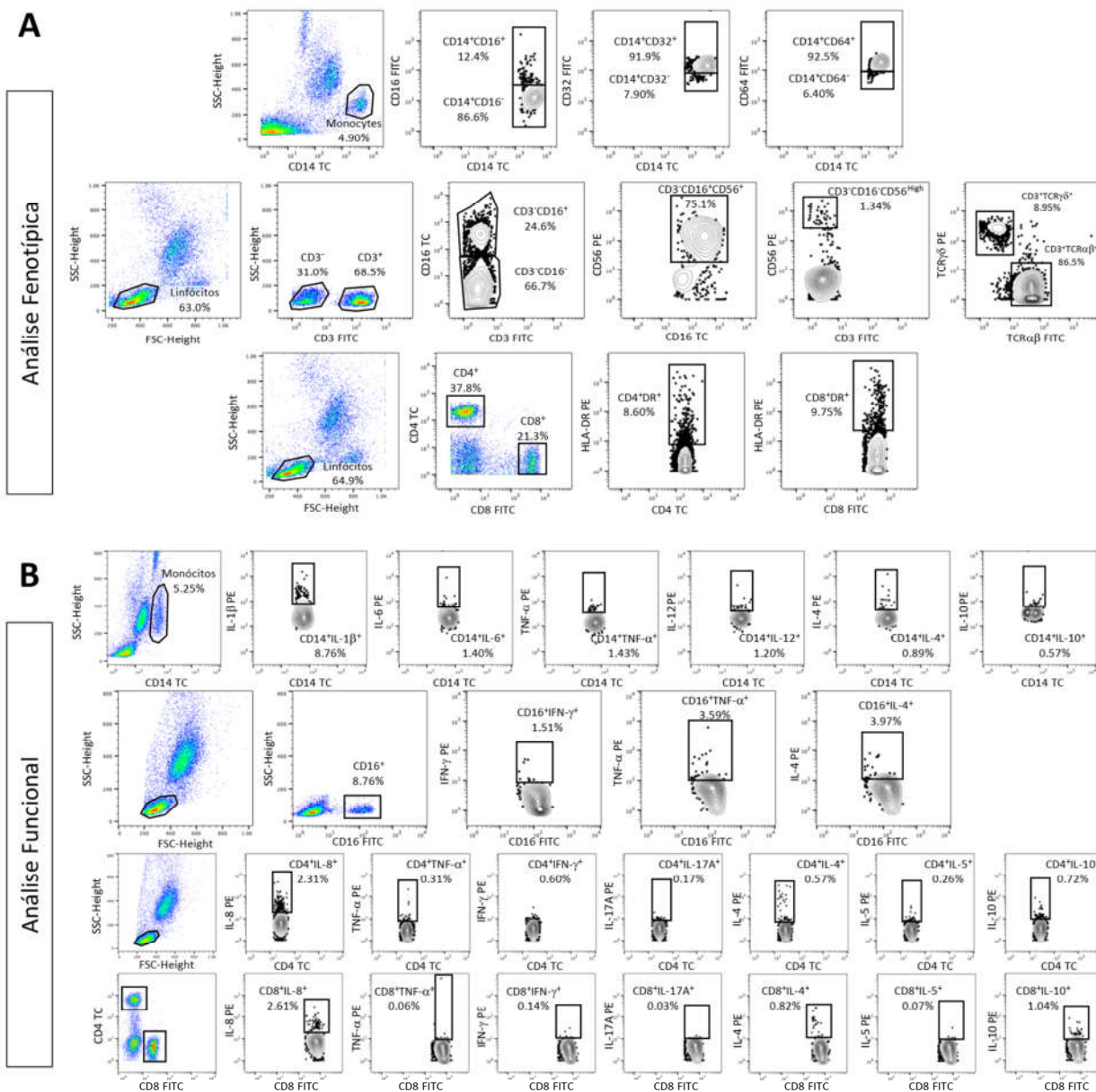


Figura 1. Gráficos de citometria de fluxo representativos empregados para estratégia de *gating* para análise fenotípica e funcional de leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita. (A) Fluxogramas ilustrativos da estratégia de *gating* empregada para a análise fenotípica de subpopulações de monócitos, de células T e NK. Os monócitos foram selecionados pela primeira vez com base em sua alta expressão de CD14. A seguir, características fenotípicas adicionais foram analisadas conforme ilustrado pela expressão de CD16, CD32 e CD64. A análise das células NK iniciou-se com a seleção dos linfócitos de acordo com suas propriedades morfométricas (Tamanho-FSC e granularidade-SSC) seguida da seleção da expressão de CD3 para identificar células NK (CD3⁺) e T (CD3⁺). Posteriormente, a análise da expressão de CD16 e CD56 foi empregada para identificar subconjuntos de células NK. Os subconjuntos de células T também foram analisados dentro dos eventos selecionados de CD3⁺, conforme ilustrado pela quantificação dos subconjuntos TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$. A análise de subpopulações de células T também foi realizada por seleção inicial de linfócitos totais seguido pela seleção de células CD4⁺ e CD8⁺ e análise de características fenotípicas adicionais, conforme ilustrado pela expressão de HLA-DR. (B) Fluxogramas ilustrativos da estratégia de *gating* empregada para análise funcional de subpopulações de monócitos, de células NK e T com base na expressão de

quimiocinas e citocinas intracitoplasmáticas após estímulos *in vitro* na ausência (Cultura de controle - CC) e na presença de 10 μ L de antígeno solúvel de *T. gondii* (cultura estimulada - STAg). Os monócitos foram selecionados inicialmente com base em sua alta expressão de CD14. Em seguida, a análise funcional foi baseada na expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-4 e IL-10. A análise funcional das células NK foi realizada por seleção inicial de linfócitos totais, seguido pela seleção de células CD16⁺ para posterior quantificação de eventos de citocina (IFN- γ , TNF- α e IL-4). A análise das propriedades funcionais das subpopulações de células T foi realizada pela seleção inicial de linfócitos totais, seguida pela seleção de eventos CD4⁺ e CD8⁺, com subsequente quantificação de células positivas para quimiocina (IL-8) e citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-5 e IL-10).

4.4. Análise estatística

A análise estatística convencional foi empregada para análise comparativa conforme apropriado, considerando a distribuição de normalidade de cada conjunto de dados: Teste t de Student ou Teste de Mann-Whitney foram usados para comparação entre dois grupos. ANOVA unilateral seguida pelo teste de Tuckey ou Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunns foram usados para comparações múltiplas entre subgrupos. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. O software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi usado para análise estatística e artes gráficas.

A análise da assinatura do biomarcador também foi realizada convertendo as medidas das variáveis contínuas (contagens absolutas / mm³) em dados categóricos relatados como a proporção (%) de lactentes com contagens absolutas acima do ponto de corte global mediano (valores medianos de todos os conjuntos de dados). Os seguintes pontos de corte foram usados: MON = 427,0; CD14⁺CD64⁺ = 206,5; CD14⁺CD32⁺ = 173,5; CD14⁺CD16⁺ = 24,4; CD14⁺CD16⁺DR^{High} = 22,0; CD3⁺CD16⁺ = 73,5; CD3⁺CD56⁺ = 65,5; Células NK = 586,9; CD3⁻CD16⁺CD56⁻ = 108,8; CD3⁻CD16⁺CD56⁺ = 376,9; CD3⁻CD16⁻CD56⁺ = 63,2; CD3⁻CD16⁻CD56^{High} = 21,0; CD3⁺ = 3.367,3; CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ = 2.936,0; CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ = 319,4; CD4⁺ = 1.883,3; CD8⁺ = 1.473,6; CD4⁺DR⁺ = 181,1; CD8⁺DR⁺ = 193,5; CD19⁺ = 1.004,0; CD19⁺CD5⁺ = 500,0 e CD19⁺CD23⁺ = 578,7 células / mm³. As proporções de lactentes com contagens absolutas acima do ponto de corte foram reunidas como assinaturas de biomarcadores ascendentes e aqueles biomarcadores com proporção superior a 50% selecionados para análise posterior. Os diagramas de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) foram construídos para identificar biomarcadores comuns e seletivos entre os grupos.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil fenotípico de leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento

As contagens absolutas de células do sistema imune inato e adaptativo em amostras de sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita (TOXO_{1-anoAT}) coletadas um ano após o início do tratamento foram comparadas com aquelas de lactentes não infectados (NI) (Figura 2). A exibição de TOXO_{1-anoAT} aumentou o número de monócitos circulantes, células NKT CD3⁺CD56⁺ e células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{High} em comparação com NI (Figura 2A). Além disso, também foram encontrados números aumentados de células CD3⁺ circulantes, células TCRαβ⁺ e TCRγδ⁺, bem como células T CD4⁺ em TOXO_{1-anoAT} em comparação com NI (Figura 2B).

5.2. Contagens absolutas de subpopulações de leucócitos de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, de acordo com o status atual da lesão retinocoroidal

O perfil fenotípico das células do sistema imune inato e adaptativo em amostras de sangue periférico de lactentes um ano após o início do tratamento da toxoplasmose congênita (TOXO_{1-anoAT}) foi analisado de acordo com o status da lesão retinocoroidal [L (-) e L (+)] em comparação com os valores observados em crianças não infectadas (faixa de cinza) (Figura 3). Números aumentados de monócitos circulantes, células NKT CD3⁺CD56⁺, células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{High} (Figura 3A) e células T CD4⁺ (Figura 3B) foram observados em TOXO_{1-anoAT} em comparação com NI, independentemente do status da lesão retinocoroidal [L (-) ou L (+)]. Além disso, enquanto contagens aumentadas de células TCRγδ⁺ foram observadas apenas em L (-) em comparação com NI, níveis mais baixos de células NK CD3⁻CD16⁻CD56⁺ (Figura 3A) e células TCRγδ⁺ (Figura 3B) foram observado em L (+) em comparação com L (-).

FIGURA 2

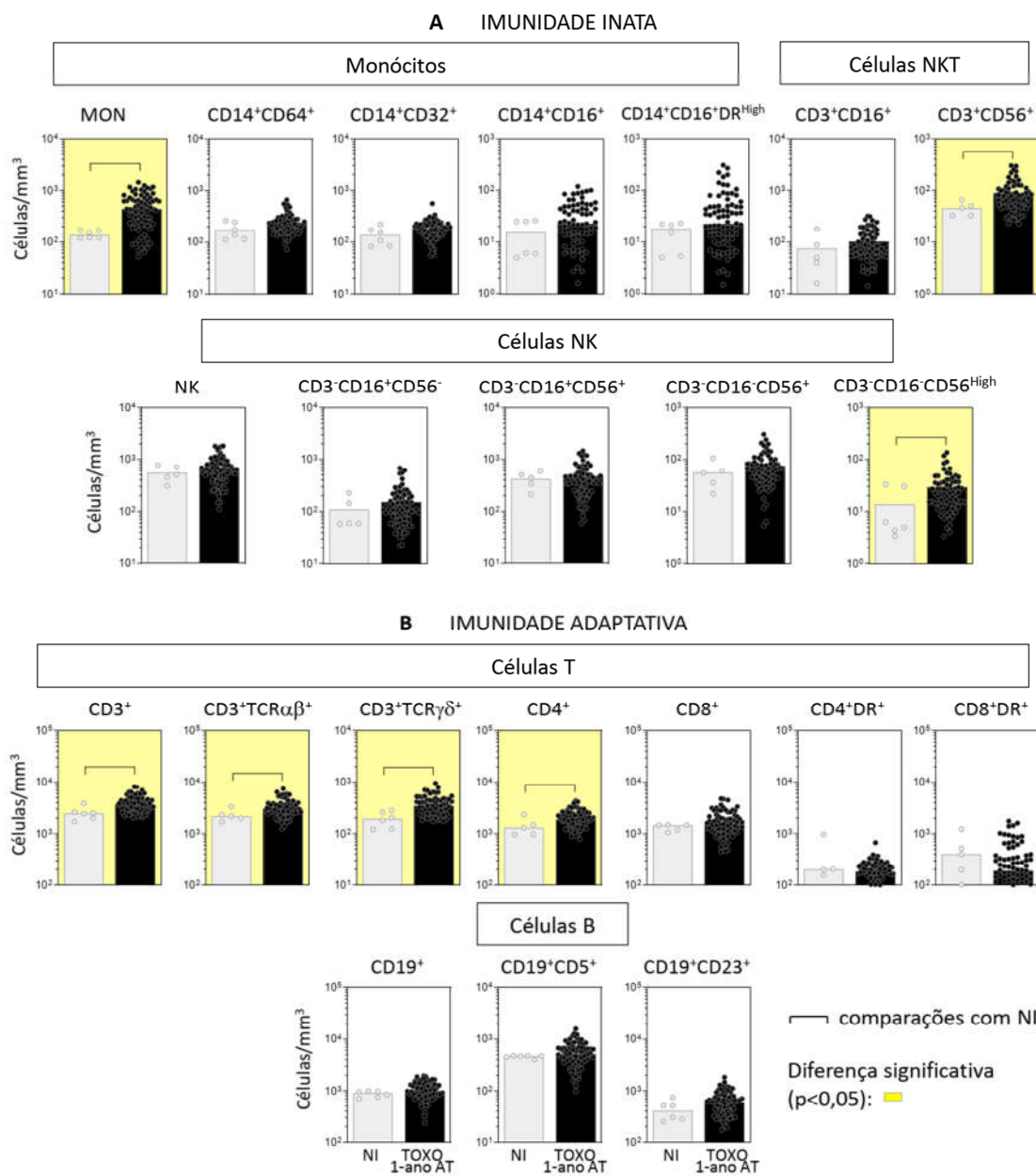


Figura 2: Perfil fenotípico de leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento. As contagens absolutas de subconjuntos de leucócitos do sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita foram determinadas um ano após o início do tratamento (TOXO_{1-anoAT}, n = 81) e comparadas com controles não infectados (NI, n = 6). O perfil fenotípico *ex vivo* das células da resposta inata (A) (células de monócitos, NKT e NK) e (B) adaptativas (células T e B) foi caracterizado por citometria de fluxo, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da contagem absoluta de células / mm³.

FIGURA 3

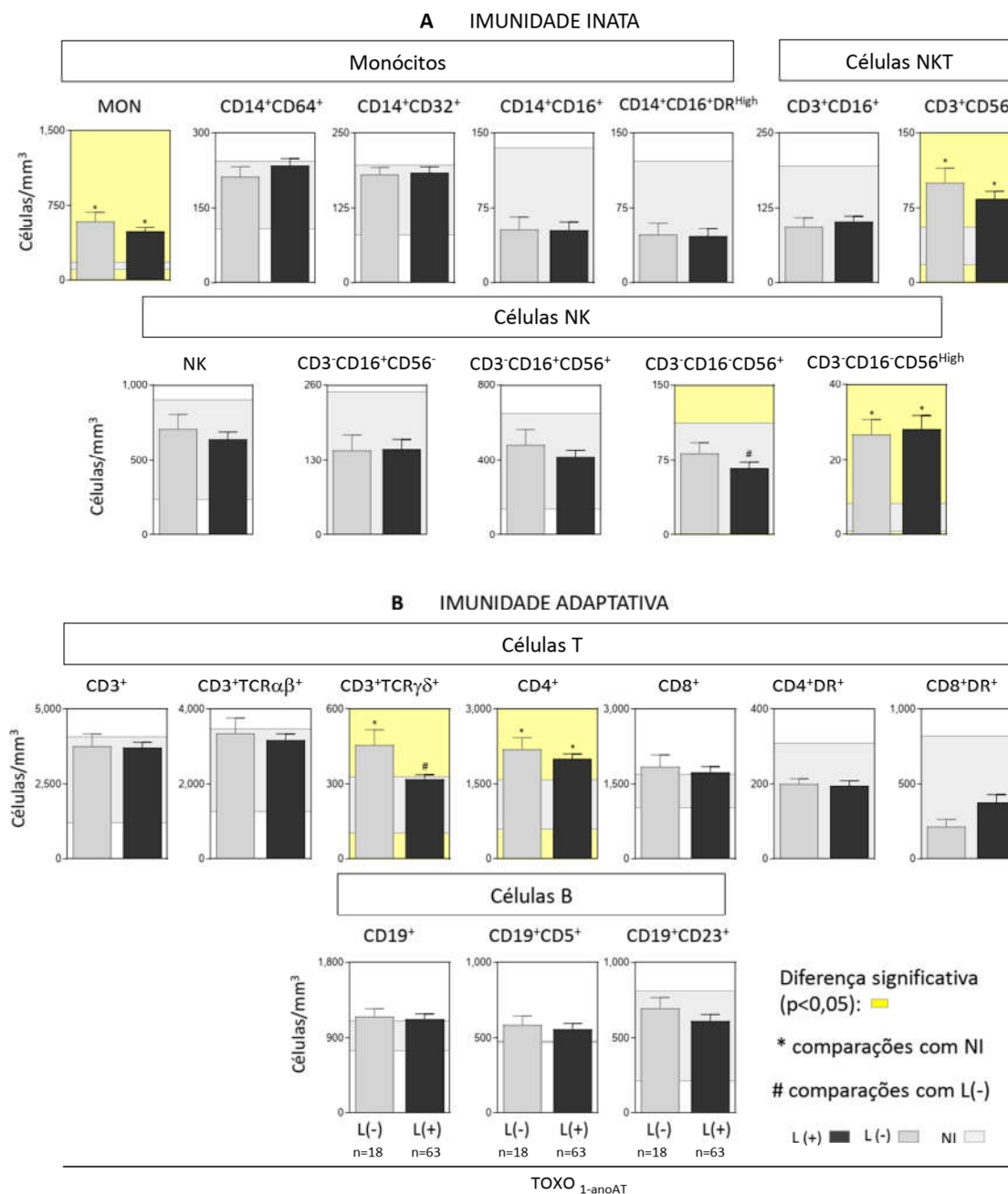


Figura 3: Perfil fenotípico de lactentes com toxoplasmose congênita de acordo com a lesão retinocoroidal atual um ano após o início do tratamento. As contagens absolutas de subpopulações de leucócitos do sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita foram determinadas um ano após o início do tratamento (TOXO_{1-anoAT}), categorizadas de acordo com o status atual da lesão retinocoroidal [L (-), n = 18 e L (+), n = 63] e em comparação com controles não infectados (NI, n = 6, faixa de cinza). Perfil fenotípico *ex vivo* de células (A) inatas (monócitos, células NKT e NK) e células adaptativas (B) (células T e B) foram caracterizadas por citometria de fluxo conforme descrito em Material e métodos. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da contagem absoluta de células / mm³.

5.3. Características fenotípicas de leucócitos circulantes em lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, de acordo com a evolução do estado basal da lesão retinocoroidal

O perfil dos leucócitos do sangue periférico de crianças com toxoplasmose congênita foi caracterizado um ano após o início do tratamento (TOXO_{1-anoAT}) e analisado de acordo com a evolução do estado de lesão retinocoroidal basal (AL → CL, ACL → CL e CL≈CL). Os resultados foram comparados com os observados no TOXO_{1-anoAT} L (-) (faixa de cinza escuro) e também com os valores observados em lactentes não infectados (faixa de cinza claro) (Figura 4). Números aumentados de células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{High} circulantes (Figura 4A) e células T CD4⁺ (Figura 4B) foram observados em TOXO_{1-anoAT} L (+), independentemente da evolução do estado de lesão retinocoroidal basal (AL → CL, ACL → CL ou CL≈CL) quando comparado com NI, mas não foram observadas diferenças entre os subgrupos L (+) e L (-) de TOXO_{1-anoAT} (Figura 4A e B). Além disso, foram observados números aumentados de células T CD8⁺DR⁺ em AL → CL em comparação com NI e os outros subgrupos TOXO_{1-anoAT} L (+) (Figura 4B). Além disso, contagens aumentadas de monócitos CD14⁺CD64⁺ (Figura 4A), mas números menores de células TCRγδ⁺ (Figura 4B) foram observados em CL≈CL em comparação com L (-).

FIGURA 4

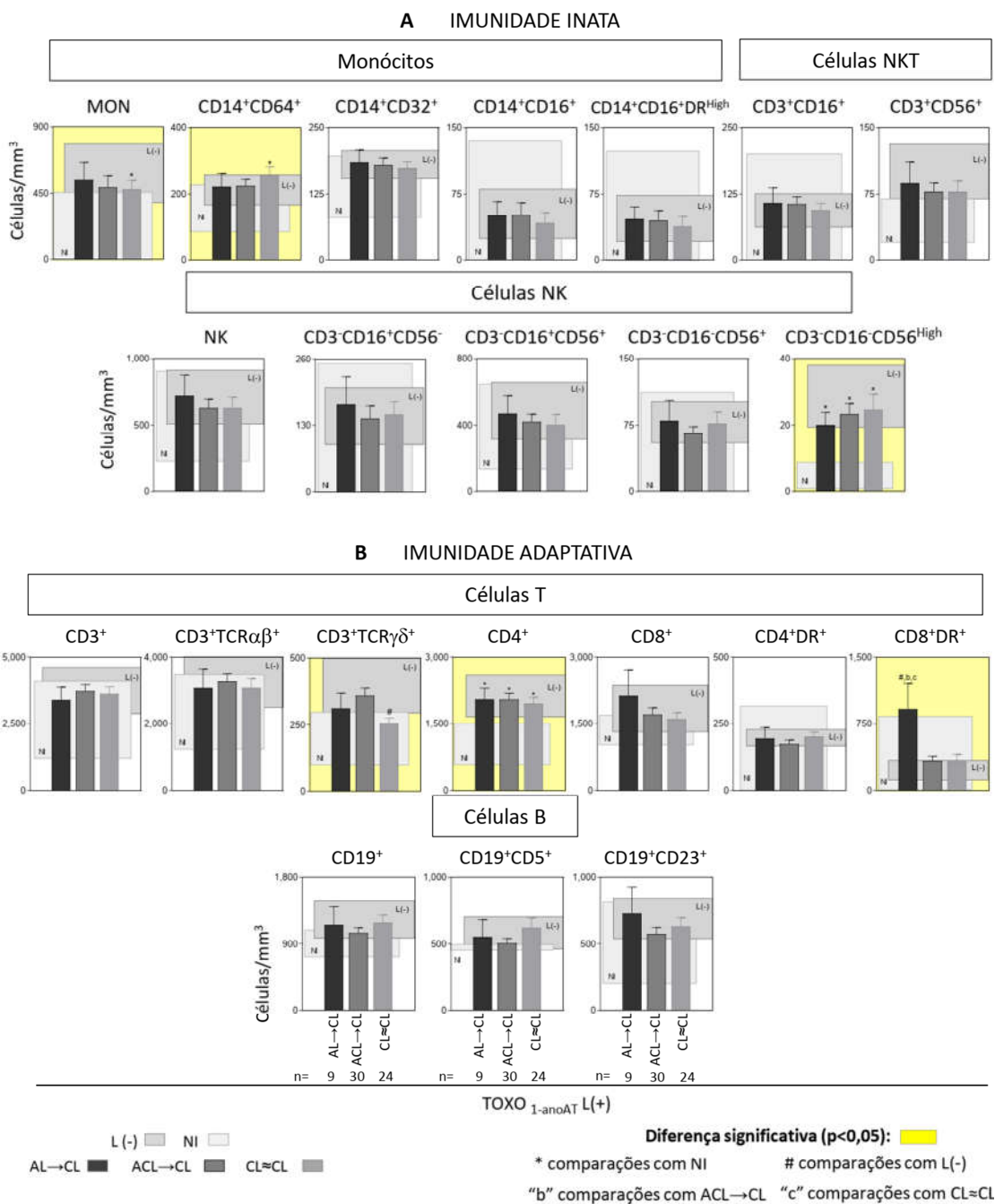


Figura 4: Perfil fenotípico dos leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, de acordo com a evolução do estado basal da lesão retinocoroidal. As contagens absolutas de subconjuntos de leucócitos do sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita foram determinadas um ano após o início do tratamento (TOXO_{1-anoAT}), categorizadas de acordo com a evolução do estado de lesão retinocoroidal basal (AL → CL, n = 9; ACL → CL, n = 30 e CL≈CL, n = 24). Os resultados foram comparados com aqueles observados em TOXO_{1-anoAT} L (-) (faixa de cinza escuro) e com os valores de referência observados em lactentes NI (faixa de cinza claro). Perfil fenotípico *ex vivo* de células (A) inatas (monócitos, células NKT e NK) e células adaptativas (B) (células T e B) foram caracterizadas por citometria de fluxo conforme descrito em Material e métodos. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da contagem absoluta de células / mm³.

5.4. Assinaturas fenotípicas de leucócitos do sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento

As assinaturas fenotípicas dos leucócitos do sangue periférico de crianças com toxoplasmose congênita foram reunidas um ano após o início do tratamento (TOXO1-_{anoAT}) e comparadas com NI. Além disso, as assinaturas também foram analisadas com base no estado atual [L (-) e L (+)] e na evolução das lesões retinocoroidais basais (AL → CL, ACL → CL e CL≈CL) (Figura 5). TOXO1-_{anoAT} apresentou uma ampla gama de características fenotípicas alteradas em comparação com NI, especialmente monócitos, NKT, NK e subpopulações de células T, com CD3⁻CD16⁺CD56⁻, CD3⁺CD16⁺ e CD4⁺DR⁺ destacados como os três principais biomarcadores (Figura 5A).

A análise comparativa entre L (-) e L (+) demonstrou que o aumento do número de monócitos circulantes, células NKT (CD3⁺CD56⁺), células NK (CD3⁻CD16⁻CD56^{High}), células T (CD4⁺) e células B (CD19⁺) foram observados em ambos os grupos (Figura 5B, D). No entanto, mudanças seletivas foram observadas em L (-), incluindo níveis aumentados de subpopulações de monócitos (CD14⁺CD16⁺ e CD14⁺CD32⁺), células NKT (CD3⁺CD16⁺), células NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁻, CD3⁻CD16⁻CD56⁺), células T (CD3⁺TCRγδ⁺, CD4⁺DR⁺) e células B (CD19⁺CD5⁺ e CD19⁺CD23⁺). Por outro lado, L (+) apresentou níveis aumentados de monócitos CD64⁺ (CD14⁺CD64⁺), células NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) e células T (CD3⁺, CD3⁺TCRαβ⁺ e CD8⁺).

Múltiplas comparações entre os subgrupos TOXO1-_{anoAT} L (+), categorizados de acordo com a evolução do estado de lesão retinocoroidal basal, demonstraram que as células NK (CD3⁻CD16⁻CD56^{High}) e células T CD4⁺ foram biomarcadores aumentados em AL → CL, ACL → CL e CL≈CL. O conjunto de biomarcadores em comum observados em AL → CL e ACL → CL inclui monócitos, células NKT (CD3⁺CD56⁺), NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) e células T (CD8⁺DR⁺) (Figura 5C, D). Biomarcadores seletivos de AL → CL incluem monócitos (CD14⁺CD16⁺, CD14⁺CD32⁺ e CD14⁺CD16⁺DR^{High}) e células NK, enquanto biomarcadores seletivos de ACL → CL compreendem níveis aumentados de células T (CD3⁺ e TCRαβ⁺). Os biomarcadores comuns observados em ACL → CL e CL≈CL incluíram níveis predominantemente aumentados de monócitos CD14⁺CD64⁺. Além disso, CL≈CL apresentou

níveis aumentados de células NKT (CD3⁺CD16⁺), células T (CD8⁺) e subconjuntos de células B (CD19⁺, CD19⁺CD5⁺, CD19⁺CD23⁺) (Figura 5C, D).

FIGURA 5

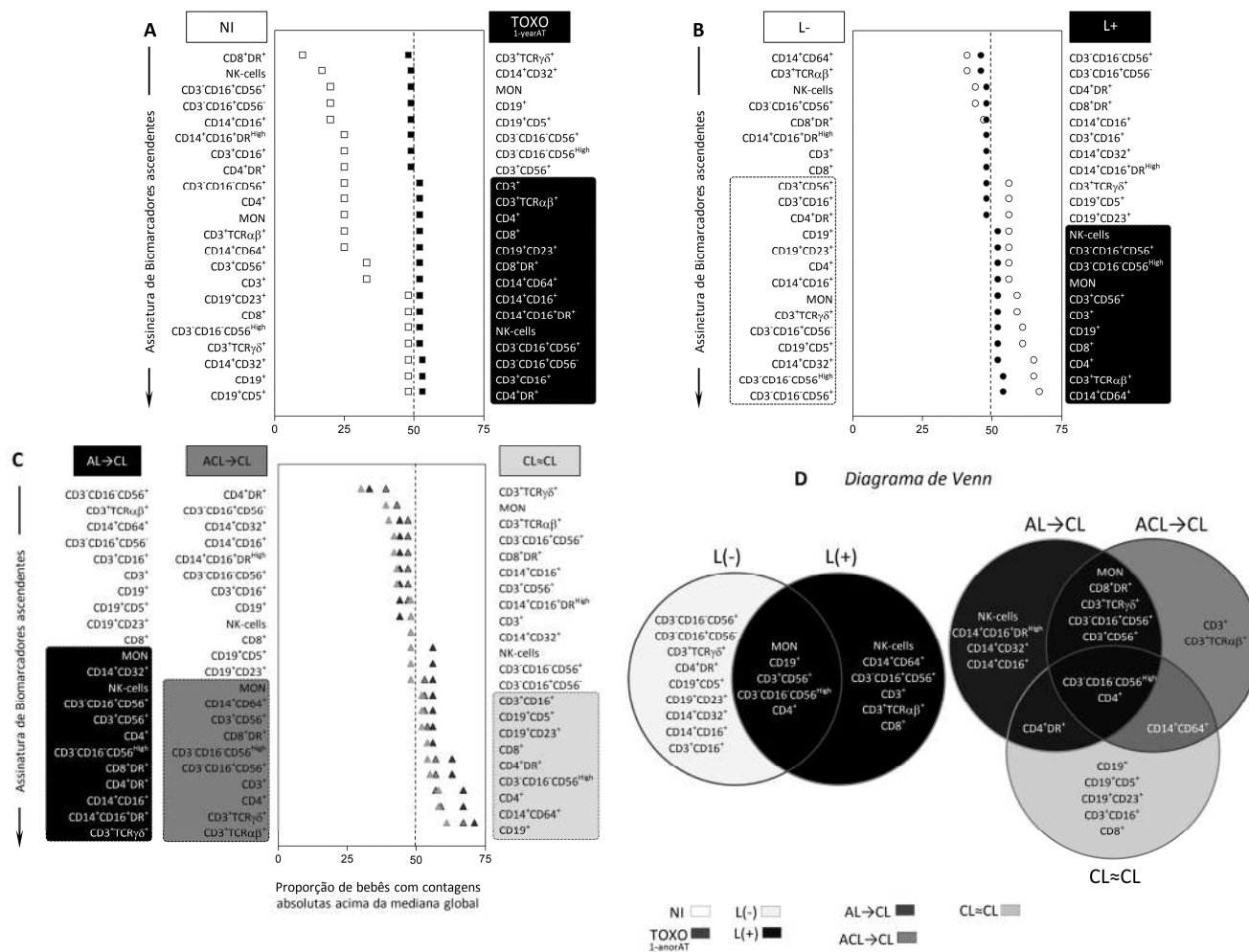


Figura 5: Assinaturas fenotípicas de leucócitos do sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento. Assinaturas de biomarcadores de características fenotípicas de leucócitos do sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento e controles não infectados foram construídas. As análises foram realizadas convertendo as medidas de variáveis contínuas (contagens absolutas / mm³) em dados categóricos relacionados como a proporção (%) de lactentes com contagens absolutas acima do ponto de corte global mediano (valores medianos de todos os conjuntos de dados), conforme descrito em Material e Métodos. As proporções de lactentes com contagens absolutas acima do ponto de corte foram reunidas como assinaturas de biomarcadores ascendentes sobrepostos de (A) NI vs TOXO1-anoAT, (B) L (-) vs L (+) e (C) AL → CL vs ACL → CL vs CL≈CL. (D) Biomarcadores com proporção superior a 50% selecionados para análises posteriores. Os diagramas de *Venn* foram construídos para identificar biomarcadores comuns e seletivos entre os grupos.

5.5. Perfil funcional dos leucócitos do sangue periférico de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, de acordo com o estado da lesão retinocoroidal

O estado funcional das células do sistema imune inato e adaptativo de lactentes com toxoplasmose congênita foi avaliado um ano após o início do tratamento (TOXO1-_{anoAT}) após antígeno *in vitro* com antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg). Os dados são relatados como índice STAg / CC calculado como a proporção entre culturas estimuladas por STAg emparelhadas e culturas de controle *in vitro*.

A análise comparativa de lactentes categorizados de acordo com o estado atual das lesões retinocoroidais [L (-) e L (+)] demonstrou que L (-) apresentou proporções aumentadas de células NK TNF⁺, IFN- γ ⁺ e IL-4⁺ em estimulação *in vitro* com STAg (Figura 6A). Por outro lado, L (+) apresentou razões aumentadas de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ e IL-10⁺ em comparação com L (-) (Figura 6B).

Comparações múltiplas entre subgrupos (TOXO1-_{anoAT}) categorizados de acordo com a evolução das lesões retinocoroidais basais são apresentadas na Figura 7. Os resultados mostraram uma proporção diminuída de monócitos IL-4⁺ em AL \rightarrow CL e ACL \rightarrow CL. Uma diminuição geral da proporção de células NK IL-4⁺ foi observada independentemente do estado de evolução das lesões retinocoroidais (Figura 7A). Além disso, ACL \rightarrow CL apresentou uma proporção diminuída de células NK TNF⁺ (Figura 7A), bem como células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ e IL-5⁺ juntamente com alta proporção de IL-10⁺ por células T CD4⁺ (Figura 7B).

FIGURA 6

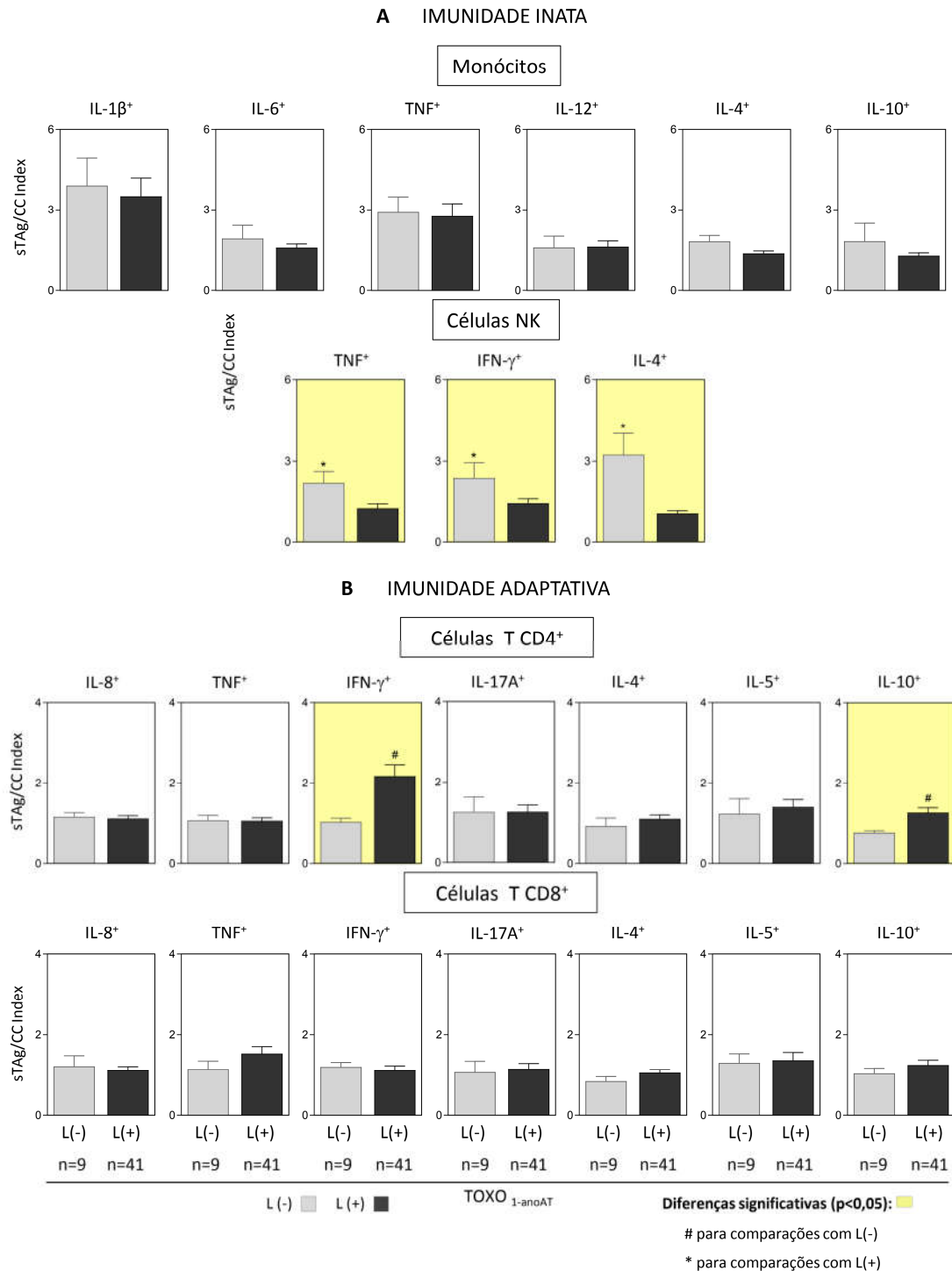


Figura 6: Perfil funcional dos leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, classificados de acordo com a lesão retinocoroidal atual. O perfil funcional de subconjuntos de leucócitos do sangue periférico de crianças com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento foi caracterizado. TOXO1-anoAT foi categorizado de acordo com o estado atual da lesão retinocoroidal [L (-): n = 41 e L (+): n = 6]. A produção específica de STAg de citocinas por (A) células inatas (monócitos e células NK) e (B) células adaptativas (células T CD4⁺ e CD8⁺) foi determinada por citometria de

fluxo após coloração intracitoplasmática, conforme descrito em Material e métodos. Os dados são relatados como a proporção de citocina + células em cultura STAg e cultura CC correspondente. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

FIGURA 7

A IMUNIDADE INATA

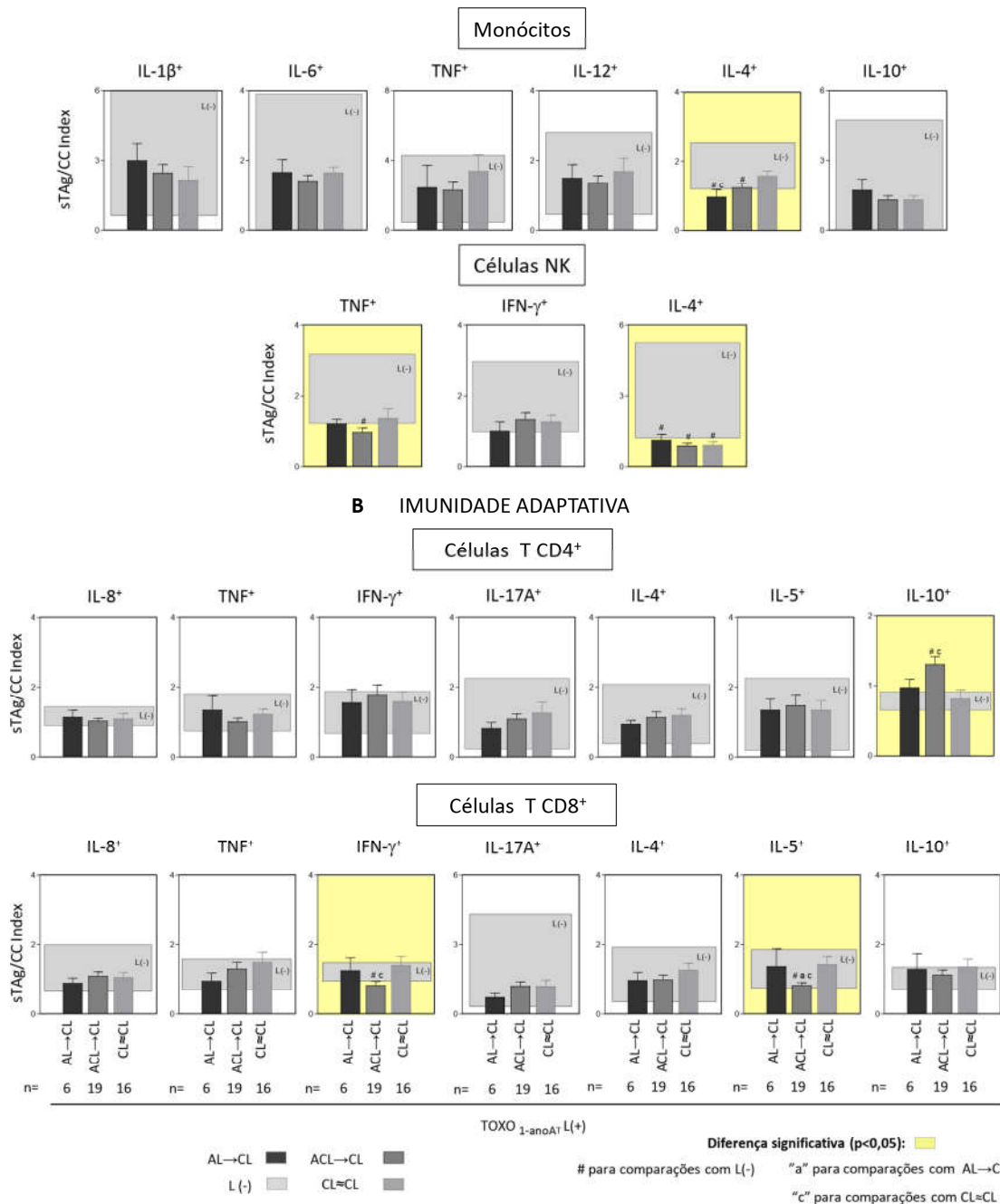


Figura 7: Perfil funcional dos leucócitos circulantes de lactentes com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento, classificados de acordo com a evolução da lesão retinocoroidal. O perfil funcional de subconjuntos de leucócitos do sangue periférico de crianças com toxoplasmose congênita um ano após o início do tratamento foi caracterizado. TOXO1-anoAT foi categorizado de acordo com o estado atual da lesão retinocoroidal (AL → CL, n = 9; ACL → CL, n = 30 e CL≈CL, n = 24). Os resultados foram comparados com

aqueles observados em TOXO1-yearAT L (-) (faixa de cinza claro). A produção específica de STAg de citocinas por (A) células inatas (monócitos e células NK) e (B) células adaptativas (células T CD4⁺ e CD8⁺) foi determinada por citometria de fluxo após coloração intracitoplasmática, conforme descrito em Material e métodos. Os dados são relatados como a proporção da proporção de citocina + células em cultura STAg e cultura CC correspondente. Os resultados são expressos como média ± erro padrão.

6. DISCUSSÃO

A complexa interação entre hospedeiro e *T. gondii* durante a toxoplasmose congênita e adquirida pode ser base para mudanças de longo prazo nas características metabólicas, epigenéticas, fenotípicas e funcionais da resposta imune (FLEGR et al., 2014, PITTMAN et al., 2015). Já foi demonstrado na literatura que o tratamento da TC no primeiro ano de vida dos lactentes parece melhorar o resultado clínico (LAGO et al., 2020, MCLEOD et al., 2006). No entanto, o impacto da infecção no perfil imunológico de pacientes, nos casos em que há intervenção terapêutica, é pouco abordado. Dessa forma, caracterizamos os aspectos fenotípicos e funcionais dos leucócitos circulantes de lactentes com TC após o início do tratamento etiológico.

Estudos anteriores do nosso grupo mostram que a infecção congênita por *T. gondii* desencadeia mudanças expressivas nas características fenotípicas e funcionais dos leucócitos circulantes logo após o nascimento. A perturbação resultante na resposta imune foi associada ao estado inicial das lesões retinocoroidais. Este fenômeno foi acompanhado por leucocitose, com aumento de monócitos e linfócitos juntamente com alterações na imunidade inata (expansão de monócitos CD14⁺CD16⁺HLA-DR^{High} e células NK CD56^{Dim}) e alterações em subpopulações de células da imunidade adaptativa (níveis aumentados de TCRγδ⁺ e células T CD8⁺) que atingem a resposta periférica em lactentes com lesões oculares ativas (MACHADO et al., 2014). Além disso, em nossos estudos as assinaturas de citocinas revelaram a existência de um ambiente imunológico progressivo que se move de um perfil inflamatório (mediado por IFN-γ e TNF) para um perfil modulado (mediado por IL-10) associado a eventos cicatriciais (CARNEIRO, et al., 2016, de ARAÚJO et al., 2017).

No presente estudo vimos que, após um ano de tratamento específico, a toxoplasmose congênita desencadeia aumento na contagem absoluta de monócitos, CD3⁺CD56⁺, CD3⁻CD16⁻CD56^{High} e células T CD4⁺ independentemente do estado da lesão retinocoroidal. No entanto, números mais baixos de CD3⁻CD16⁻CD56⁺ e células T TCRγδ⁺ foram observados apenas em lactentes com doença ativa no início do tratamento. Contagens mais altas de CD3⁻CD16⁻CD56^{High} e células T CD4⁺ foram universalmente observadas em todos os subgrupos de pacientes L (+). A análise das assinaturas dos biomarcadores revelou conjuntos comuns e

seletivos de biomarcadores observados nos subgrupos de crianças que apresentavam doença ativa no início do tratamento.

Apesar de nossos dados mostrarem um aumento da proliferação celular e na produção de citocinas na resposta imune específica, alguns outros estudos demonstram que a resposta proliferativa de linfócitos é mais baixa em crianças mais jovens infectadas congenitamente em comparação com crianças mais velhas. Esses dados indicam um comprometimento da resposta específica das células T aos antígenos do parasita, dependente da idade (MCLEOD et al., 1985, MCLEOD et al., 1990, GUGLIETTA et al., 2007). Ainda assim, foi vista alta produção de IFN- γ em leucócitos de pacientes com menos de 4 anos, após estímulo com antígeno, e pouca produção de IL-4 (GUGLIETTA et al., 2007). Não fizemos comparações com amostras de crianças infectadas mais velhas, porém esses resultados indicam, corroborando com nossos resultados, que crianças que nasceram com toxoplasmose congênita apresentam alterações imunológicas de longo prazo.

Ao analisar o perfil de citocinas produzidas por células em cultura após estímulo com STAg, vimos uma maior produção de TNF, IFN, e IL-4, produzidos por células NK em L (-), e a também a maior produção de IFN e IL-10 por células T CD4 em pacientes L(+), caracterizando um perfil de resposta misto, independente da lesão prévia. A produção de IL-4 associada à diminuição dos níveis de IFN já foi associada à presença de rebote sorológico, indicando que a uma resposta predominantemente de perfil Th2 pode causar esse efeito (Kahi et al., 1999). Nossos dados não indicam uma relação inversamente proporcional entre a produção de citocinas de perfil Th1 e Th2, porém a avaliação periódica do perfil de resposta de lactentes infectados com TC se faz necessária para descartar a possibilidade da ocorrência desse fenômeno.

Alguns estudos demonstram também a possibilidade de que *T. gondii* e outros agentes infecciosos sistêmicos podem induzir alterações de longo prazo na medula óssea e no timo (PETAKOV et al., 2002, KUGLER et al., 2016). *T. gondii* desencadeia a mobilização dos progenitores da medula óssea e induz a hipoplasia da medula óssea (PETAKOV et al., 2002). Além disso, vários patógenos podem desencadear uma atrofia do timo que pode não retornar aos níveis de estado estacionário após a infecção aguda, afetando a manutenção do pool e da diversidade de células T (DOUEK et al., 1998, BONZON et al., 1999, BORGES et al., 2012). A infecção por *T. gondii* induz alterações na função tímica em camundongos que se assemelham às alterações fisiológicas observadas durante o envelhecimento natural. Assim, a infecção sistêmica por *T. gondii* pode resultar em impacto de longo prazo na resposta imune,

desencadeando função tímica prejudicada acumulada durante o início da vida (KUGLER et al., 2016). Não pudemos avaliar especificamente a medula óssea ou a função tímica nessas crianças, mas as mudanças de longo prazo nas populações de células sugerem que esses órgãos estão sendo afetados também na TC humana.

Em relação ao impacto do tratamento etiológico, um estudo realizado pelo Grupo Brasileiro de Toxoplasmose Congênita da UFMG relatou alta frequência de depressão da atividade da medula óssea, avaliada pela incidência de anemia macrocítica, neutropenia e trombocitopenia, nos lactentes inscritos na presente investigação como um evento adverso importante relatado durante o tratamento da toxoplasmose congênita (CARELLOS et al., 2017). Embora as alterações na função da medula óssea, observadas durante as infecções, possam ser uma consequência direta da presença local de patógenos, como na *Leishmania infantum*, talvez o cenário sistêmico de superprodução de quimiocinas / citocinas e fatores de crescimento em locais distais também possa contribuir para alterar o compartimento da medula óssea (GLATMAN et al., 2014). Nesse sentido, é plausível levantar a hipótese de que as alterações de longo prazo observadas na resposta imune após a infecção congênita por *T. gondii* podem refletir a complexa interação entre os órgãos linfóides do hospedeiro, particularmente a medula óssea e o timo, com o *T. gondii* durante toxoplasmose congênita aguda e, a partir daí, início do tratamento etiológico.

7. CONCLUSÃO

Várias alterações foram observadas no perfil fenotípico / funcional dos leucócitos circulantes em TOXO1-anoAT, revelando que as sequelas são permanentemente registradas no sistema imunológico em lactentes mesmo um ano após o início do tratamento. Números aumentados de monócitos, células NK, células T TCR $\gamma\delta^+$, células T senescentes, CD8 $^+$ DR $^+$ ativados foram comumente encontrados em lactentes que tiveram envolvimento ocular agudo durante o início do tratamento. Por outro lado, o aumento do número de monócitos expressando CD64 estava comumente presente em lactentes com lesões oculares cicatriciais. Quanto à produção de citocinas, lactentes sem envolvimento ocular apresentam aumento na proporção de células NK produtoras de TNF, IFN- γ e IL-4. No entanto, a diminuição da proporção de células NK produtoras de TNF foi encontrada em ACL \rightarrow CL. É importante ressaltar que crianças com lesões oculares apresentaram maior proporção de células T CD4 $^+$ específicas para sTA γ , produtoras de IFN- γ e IL-10. Consequentemente, uma alta proporção de células T CD4 $^+$ produtoras de IL-10 foi encontrada no subgrupo ACL \rightarrow CL, que também exibe uma proporção diminuída de células T CD8 $^+$ produtoras de IFN- γ e IL-5 (Figura 7).

Apesar de nossos achados, o impacto preciso que a infecção congênita por *T. gondii* e o tratamento etiológico têm na resposta imune do hospedeiro continua não completamente compreendido. Na verdade, essas sequelas de longo prazo observadas na resposta imune de lactentes podem ser resultantes de eventos multifatoriais. Assim, embora a intervenção terapêutica orientasse a evolução clínica para um quadro cicatricial de lesões retinocoroidais, a implantação de um programa de triagem pré-natal ativa seria a garantia de prevenção da transmissão por TC, evitando o impacto a longo prazo dessa infecção na qualidade do lactente. da vida.

REFERÊNCIAS

BONZON, C.; FAN, H. Moloney murine leukemia virus-induced preleukemic thymic atrophy and enhanced thymocyte apoptosis correlate with disease pathogenicity. **Journal of virology**, v.73, n.3, p.2434–2441, 1999. doi.org/10.1128/JVI.73.3.2434-2441.1999

BORGES, M. et al. Molecular and cellular mechanisms of Mycobacterium avium-induced thymic atrophy. **Journal of immunology**, v.189, n.7, p.3600–3608, 2012. doi.org/10.4049/jimmunol.1201525

CALABRESE, K. S. 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.1335–1341, 2008. doi.org/10.1016/j.micron.2008.02.003

CARELLOS, E. et al. High Frequency of Bone Marrow Depression During Congenital Toxoplasmosis Therapy in a Cohort of Children Identified by Neonatal Screening in Minas Gerais, Brazil. *The Pediatric infectious disease journal*, v.36, n.12, p.1169–1176, 2017. doi.org/10.1097/INF.0000000000001561

CARNEIRO, A.C. et al. Cytokine Signatures Associated With Early Onset, Active Lesions and Late Cicatricial Events of Retinochoroidal Commitment in Infants With Congenital Toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v.213, n.12, p.1962-70, 2016. doi: 10.1093/infdis/jiw041

CORDEIRO, C. A. et al. T cell immunoregulation in active ocular toxoplasmosis. **Immunology letters**, v.184, p.84–91, 2017. doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.009

DA SILVA, M. G. et al. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of Toxoplasma gondii in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. **PloS one**, v.10, n.11, e0141700, 2015. doi.org/10.1371/journal.pone.0141700

DE ARAÚJO, T. E. et al. Early serum biomarker networks in infants with distinct retinochoroidal lesion status of congenital toxoplasmosis. **Cytokine**, v.95, p. 102–112, 2017. doi.org/10.1016/j.cyto.2017.02.018

DE ARAÚJO, T. E. et al. Putative biomarkers for early diagnosis and prognosis of congenital ocular toxoplasmosis. **Scientific reports**, v.10, n.1, 16757, 2020. doi.org/10.1038/s41598-020-73265-z

DODDS, E. M. et al. Intraocular inflammation associated with ocular toxoplasmosis: relationships at initial examination. **American journal of ophthalmology**, v.146, n.6, p.856–65.e2, 2008. doi.org/10.1016/j.ajo.2008.09.006

Douek, D. C. et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. **Nature**, v.396, n.6712, p.690–695, 1998. doi.org/10.1038/25374

FLEGR, J. et al. Difference of neuro- and immunomodulatory steroids and selected hormone and lipid concentrations between Toxoplasma-free and Toxoplasma-infected but not CMV-free and CMV-infected schizophrenia patients. **Neuro endocrinology letters**, v.35, n.1, p.20–27, 2014.

GAZZINELLI, R.T. et al. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 1, p. 286-92, 1991

GILBERT R. et al. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.2, p.305–311, 2009. doi.org/10.1590/s0074-02762009000200026

GLATMAN-ZARETSKY, A.; ENGILES, J. B.; HUNTER, C. A. Infection-induced changes in hematopoiesis. **Journal of immunology**, v.192, n.1, p.27–33, 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302061>

GRAS, L. et al. Effect of prenatal treatment on the risk of intracranial and ocular lesions in children with congenital toxoplasmosis. **International journal of epidemiology**, v.30, n.6, p.1309–1313, 2001. <https://doi.org/10.1093/ije/30.6.1309>

GUGLIETTA, S. 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.

KUGLER, D. G. et al. Systemic toxoplasma infection triggers a long-term defect in the generation and function of naive T lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v.213, n.13, p.3041–3056, 2016. doi.org/10.1084/jem.20151636

LAGO, E. G. et al. Ocular Outcome of Brazilian Patients With Congenital Toxoplasmosis. **The Pediatric infectious disease journal**, v.40, n.1, e21–e27, 2021. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002931>

MACHADO, A. S. 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. doi: 10.1155/2014/910621

MAREZE, M. et al. Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil. **PloS one**, v.14, n.2, e0212375, 2019. doi.org/10.1371/journal.pone.0212375

MCAULEY J. B. Congenital Toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, Suppl 1, S30–S35, 2014. doi.org/10.1093/jpids/piu077

MCAULEY, J. et al. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago Collaborative Treatment Trial. **Clinical infectious diseases**, v.18, n.1, p.38–72, 1994. doi.org/10.1093/clinids/18.1.38

MCLEOD, R. et al. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. **Clinical infectious diseases**, v.42, n.10, p.1383–1394, 2006. doi.org/10.1086/501360

MCLEOD, R. et al. Phenotypes and functions of lymphocytes in congenital toxoplasmosis. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v.116, n.5, p.623–635, 1990.

MCLEOD, R.; BEEM, M. O.; ESTES, R. G. Lymphocyte anergy specific to *Toxoplasma gondii* antigens in a baby with congenital toxoplasmosis. **Journal of clinical & laboratory immunology**, v.17, n.3, p.149–153, 1985.

MOMBRÒ, M. et al. Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection, **European Journal of Pediatrics**. v.162, n.10, p.703–6, 2003 .doi: 10.1007/s00431-003-1248-1.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical infectious diseases*, v.47, n.4, p.554–566, 2008. doi.org/10.1086/590149

PETAKOV, M. et al. Hematopoiesis during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Haematologia**, v.32, n.4, p.439–455, 2002.

PETERSEN, E.; KIJLSTRA, A.; STANFORD, M. Epidemiology of ocular toxoplasmosis. **Ocular immunology and inflammation**, v.20, n.2, p.68–75, 2012. doi.org/10.3109/09273948.2012.661115

PETERSEN, E.; SCHMIDT, D. R. Sulfadiazine and pyrimethamine in the postnatal treatment of congenital toxoplasmosis: what are the options? **Expert review of anti-infective therapy**, v.1, n.1, p.175–182, 2003. doi.org/10.1586/14787210.1.1.175

PHAN, L. et al. Longitudinal study of new eye lesions in treated congenital toxoplasmosis. *Ophthalmology*, v.115, n.3, p.553–559.e8, 2008. doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.06.022

PIAO, L.X. et al. Cellular immunopathogenesis in primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Parasite Immunology**, v.4, n.9, e12570, 2018. doi: 10.1111/pim.12570.

PITTMAN, K. J., KNOLL, L. J. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n.4, p.387–401, 2015. doi.org/10.1128/MMBR.00027-15

PLEYER, U.; SCHLÜTER, D.; MÄNZ, M. Ocular toxoplasmosis: recent aspects of pathophysiology and clinical implications. **Ophthalmic research**, v.52, n.3, p.116–123, 2014. doi.org/10.1159/000363141

REY, A. et al. Clinical pattern of toxoplasmic retinochoroiditis in a Spanish referral center. **International journal of ophthalmology**, v.229, n.3, p.173–178, 2013. doi.org/10.1159/000348740

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical microbiology reviews**, v.25, n.2, p.264–296, 2012. doi.org/10.1128/CMR.05013-11

SHWAB, E. K. et al. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.115, n.29, E6956–E6963, 2018. doi.org/10.1073/pnas.1722202115

STRANG, A. et al. The congenital toxoplasmosis burden in Brazil: Systematic review and meta-analysis. **Acta tropica**, v.211, 105608, 2020. doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105608

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, v.91, n.7, p.501–508, 2013. doi.org/10.2471/BLT.12.111732

VASCONCELOS-SANTOS, D. V. et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology**, v.116, n.11, p.2199–205.e1, 2009. doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.04.042

VILLENA, I.; QUEREUX, C.; PINON, J. M. Congenital toxoplasmosis: value of prenatal treatment with pyrimethamine-sulfadoxine combination. **Prenatal diagnosis**, v.18, n.7, p.754–756, 1988.

CONSIDERAÇÕES FINAIS DO TRABALHO

O presente trabalho é uma evidência sobre a importância do monitoramento de pacientes com toxoplasmose. Na gestação, os cuidados com prevenção devem ser redobrados, principalmente naquelas pacientes com sorologia negativa. Ainda assim, as mulheres que apresentarem em seu pré-natal sorologia positiva para *T. gondii* não se devem ser negligenciadas, devido a possibilidade de reinfecção com cepas diferentes da primo-infecção e/ou reativação. É necessário promover ações de promoção à saúde, com disseminação de informações sobre as medidas higieno-dietéticas necessárias para a prevenção da toxoplasmose, de preferência focadas no público de gestantes. Além disso, a atualização de profissionais de saúde é mandatória para não ocorrer disseminação de informações errôneas.

Da mesma forma, o monitoramento de crianças com toxoplasmose congênita é de extrema importância. O acompanhamento com uma equipe multidisciplinar incluindo oftalmologistas, otorrinolaringologistas e neurologistas faz-se necessário e políticas públicas devem ser promovidas para que essas crianças tenham o atendimento adequado. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais e o investimento do setor público em laboratórios de referência para que essas técnicas sejam executadas de forma eficiente são indispensáveis.

Outro desafio relacionado à toxoplasmose congênita é o tratamento etiológico. Como visto neste trabalho, a intervenção terapêutica foi eficiente na resolução das lesões oculares. Ainda assim, é interessante que sejam propostos estudos que abordem os efeitos deste tratamento na resposta imunológica e que abordem novas formas de tratamento. Essa necessidade é decorrente da possível manifestação de efeitos colaterais, da indisponibilidade de alguns medicamentos em algumas regiões do país e da ocorrência de resistência medicamentosa.

Neste trabalho, tentamos colaborar com a resolução de uma problemática complexa. Acreditamos que os resultados apresentados podem auxiliar na interpretação de como ocorre a relação entre *T. gondii* e o hospedeiro, e que a evolução natural do sistema imunológico decorrente da idade pode interferir nesse processo, mesmo em pacientes tratados. O monitoramento da resposta imunológica desses pacientes também pode trazer várias informações pertinentes, que podem ser úteis para o aprimoramento do diagnóstico e do tratamento.

ANEXOS

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

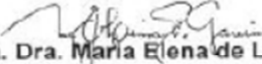
Parecer nº. ETIC 0298/06

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

ARTIGOS RELACIONADOS AO TRABALHO



OPEN Putative biomarkers for early diagnosis and prognosis of congenital ocular toxoplasmosis

Thádia Evelyn de Araújo^{1,2,3,4}, Luara Isabela dos Santos^{2,3}, Angelica Oliveira Gomes⁴, Ana Carolina Aguiar Vasconcelos Carneiro⁵, Anderson Silva Machado⁵, Jordana Graziela Coelho-dos-Reis⁶, Vanessa Peruhype-Magalhães², Samantha Ribeiro Béla², Gláucia Manzan Queiroz Andrade^{7,8}, Daniel Vítor Vasconcelos-Santos^{9,9}, José Nélio Januário⁸, Andréa Teixeira-Carvalho², Ricardo Wagner Almeida Vítor⁵, Lis Ribeiro do Valle Antonelli^{10,11}, Eloisa Amália Vieira Ferro³, Olindo Assis Martins-Filho¹² & the UFMG Congenital Toxoplasmosis Brazilian Group UFMG-CTBG, beside the authors*

In the present study we have evaluated the performance of several immunological biomarkers for early diagnosis and prognosis of congenital toxoplasmosis. Our results showed that ex vivo serum levels of CXCL9, and the frequencies of circulating CD4⁺CD25⁺ T-cells and *T. gondii*-specific IFN- γ CD4⁺ T-cells measured 30–45 days after birth presented high accuracy to distinguish *T. gondii*-infected infants from healthy age-matched controls (Global Accuracy/AUC = 0.9; 0.9 and 0.8, respectively). Of note was the enhanced performance (Accuracy = 96%) achieved by using a combined stepwise analysis of CD4⁺CD25⁺ T-cells and CXCL9. In addition, high global accuracy (AUC = 0.9) with elevated sensitivity (Se = 98%) was also reached by using the total frequency of in vitro IFN- γ -producing *T. gondii*-specific T-cells (Σ IFN- γ CD4⁺ & CD8⁺) as a biomarker of congenital toxoplasmosis. Furthermore, the analysis of in vitro *T. gondii*-specific ILS⁺CD4⁺ T-cells and IFN- γ NK-cells displayed a high accuracy for early prognosis of ocular lesion in infant with congenital toxoplasmosis (Global Accuracy/AUC = 0.8 and 0.9, respectively). Together, these findings support the relevance of employing the elements of the cell-mediated immune response as biomarkers with potential to endorse early diagnosis and prognosis of congenital ocular toxoplasmosis to contribute for a precise clinical management and effective therapeutic intervention.

The *Toxoplasma gondii* infection has a worldwide distribution, affecting about 25–30% of the human population^{1–3}. The seroprevalence may range from less than 10% to over 90%, depending on the nutrition and hygiene habits of populations from distinct geographical areas^{1,4}. *T. gondii* infection may result from the ingestion or handling of undercooked/raw meat containing cysts or water and food contaminated with oocysts. Moreover, congenital toxoplasmosis may occur as consequence of primary infection during pregnancy, possibly resulting in fetal

¹Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida João Naves de Ávila 2121, Santa Mônica, Uberlândia, MG 38408-100, Brazil. ²Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brazil. ³Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, Alameda Ezequiel Dias, 275, Centro, Belo Horizonte, MG 27530130-110, Brazil. ⁴Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Rua Frei Paulino, 30, Nossa Sra. da Abadia, 38025-180 Uberaba, MG, Brazil. ⁵Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, Pampulha, Belo Horizonte, MG 662731270-901, Brazil. ⁶Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil. ⁷Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena 190, Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG 30130-100, Brazil. ⁸Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD), Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena 190, Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG 30130-100, Brazil. ⁹Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil. *A comprehensive list of consortium members appears at the end of the paper. [✉]email: thadia_evelyn@hotmail.com; lis.antonelli@focruz.br



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yclim

Full Length Article

Long-term impact of congenital toxoplasmosis on phenotypic and functional features of circulating leukocytes from infants one year after treatment onset

Thádia Evelyn de Araújo^{a,b,*}, Angelica Oliveira Gomes^{c,1},
 Jordana Graziela Coelho-dos-Reis^d, Ana Carolina Aguiar Vasconcelos Carneiro^e,
 Anderson Silva Machado^e, Gláucia Manzan Queiroz Andrade^{f,g},
 Daniel Vitor Vasconcelos-Santos^{g,h}, José Nélio Januário^g, Vanessa Peruhype-Magalhães^b,
 Andréa Teixeira-Carvalho^b, Ricardo Wagner Almeida Vitor^e, Lis Ribeiro do Valle Antonelli^{b,*},
 Eloisa Amalia Vieira Ferro^a, Olindo Assis Martins-Filho^{a,b}, on behalf of the UFMG Congenital
 Toxoplasmosis Brazilian Group - UFMG-CTBG

^a Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida João Naves de Ávila 2121, Santa Mônica, 38408-100 Uberlândia, MG, Brazil

^b Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Rua Frei Paulino, 30, Nossa Sra. da Abadia, 38025-180 Uberaba, MG, Brazil

^d Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^f Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena 190, Santa Efigênia, 30130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

^g Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD), Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Professor Alfredo Balena 190, Santa Efigênia, 30130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

^h Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Phenotypic and functional biomarkers
 Immune response
 Infants
 Congenital
 Toxoplasmosis

ABSTRACT

Changes in immune response of children with congenital toxoplasmosis (CT) regarding infection evolution and therapeutic intervention was addressed. Infants with CT presented increased counts of monocytes, CD3⁺CD16⁺CD56^{high}, CD3⁺CD56⁺ and CD4⁺ T-cells 1-year after treatment onset (TOXO_{1-yearAT}). Smaller numbers of CD3⁺CD16⁺CD56⁺ and TCRγδ⁺ T-cells were specifically observed in infants with retinochoroidal lesions (L(+)). When infants were classified based on the baseline status, expansion of CD3⁺CD16⁺CD56^{high} and CD4⁺ T-cells were observed in L(+) who had active, active/cicatricial or cicatricial lesions. Infants who had active or active/cicatricial lesions display augmented numbers of monocytes, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD56⁺, CD8⁺DR⁺ and TCRγδ⁺ T-cells and those with active/cicatricial or cicatricial at baseline displayed increase in CD14⁺CD64⁺ monocytes. Moreover, all L(+) had increased IFN-γ⁺ and IL-10⁺ CD4⁺ T-cells, while L(-) had increased ratios of TNF⁺, IFN-γ⁺ and IL-4⁺ NK-cells upon antigen-specific stimulation. Persistent alterations in leukocytes in TOXO_{1-yearAT} suggest long-term sequels in the immune system of infants with CT.

Abbreviations: AL, infants with active retinochoroidal lesions; ACL, infants with active and cicatricial retinochoroidal lesions; BSA, bovine serum albumin; CC, control culture; CL, infants with cicatricial retinochoroidal lesions; CT, congenital toxoplasmosis; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; FITC, fluorescein isothiocyanate; HLA-DR, human leukocyte antigen – DR isotype; IL, interleukin; L(-), infants without retinochoroidal lesions; L(+), infants with retinochoroidal lesions; NI, non-infected control; TOXO, infants with congenital toxoplasmosis; PBS, phosphate buffered saline; PE, phycoerythrin; STAg, soluble *T. gondii* antigen; TC, tricolor.

* Corresponding authors at: Thádia Evelyn de Araújo and Lis Ribeiro do Valle Antonelli, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais 30190-002, Brazil.

E-mail addresses: thadia_evelyn@hotmail.com (T.E. de Araújo), lis.antonelli@focruz.br (L.R.V. Antonelli).

<https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108859>

Received 28 February 2021; Received in revised form 17 August 2021; Accepted 20 September 2021

Available online 23 September 2021

1521-6616/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.