

JÚLIA GATTI LADEIA COSTA

Toxoplasma gondii: disseminação de parasitos,
histopatologia e resposta imune celular em um modelo
experimental agudo de reinfeccção com cepas atípicas.

BELO HORIZONTE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Pós-Graduação em Parasitologia

***Toxoplasma gondii*: disseminação de parasitos, histopatologia
e resposta imune celular em um modelo experimental agudo
de reinfecção com cepas atípicas.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Protozoologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

Colaboração: Dra. Rosa Maria Esteves Arantes
Dr. Olindo Assis Martins Filho
Dr. Stefan Michael Geiger

JÚLIA GATTI LADEIA COSTA

BELO HORIZONTE, 2016

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Dedico este trabalho ao meu esposo Daniel Assumpção Miguel. Meu incentivador, meu consolador, meu companheiro, meu suporte, meu parceiro, meu amigo, minha família, meu amor!

Agradecimentos

Tenho muito a agradecer, sobretudo a Deus pelo dom da vida, pelas bênçãos e graças recebidas e por me fortalecer na fé. Também por ELE me proporcionar a oportunidade de vivenciar esse doutorado aprendendo e amadurecendo ao longo desses quatro anos.

Aos meus pais Wilson e Valéria que são o meu alicerce, por sempre apoiarem todas as minhas decisões na trajetória acadêmica e na vida. Sobretudo pelo amor incondicional e exemplos maravilhosos que são para mim! Amo muito vocês!

À minha grande e agitada família sempre repleta de amor e alegria, núcleo de aprendizado e crescimento em minha vida. Em especial meu irmão Hugo, minhas cunhadas Isabela e Débora e meu concunhado Fred: companheiros de jornada, conselheiros e ouvintes a qualquer tempo.

Aos melhores amigos que alguém poderia ter: Gaby (mais que amiga, irmã de alma), Lulys (Babá, Nanda, Nina, Lelê e Pri), Bruninha, Pato, Aninha e Dri por estarem sempre presentes, por me alegrarem e me fazerem uma pessoa melhor.

Ao meu orientador Ricardo Wagner de Almeida Vitor que é para mim a definição de mestre! Profissional íntegro, dedicado, correto, educado, justo e humano. Se eu aprendi um pouco sobre *Toxoplasma gondii* e sobre ciência o maior mérito é dele. Agradeço por confiar em mim, por me apoiar sempre, por toda a paciência comigo e pela amizade construída ao longo de mais de dez anos! Obrigada por ter sido meu exemplo na ciência e na vida.

À Rosa sem a qual esse trabalho não teria acontecido! Com toda sua experiência no laboratório e em logística me ensinou a planejar, a gerenciar, a organizar e a fazer! Como se não bastasse, está sempre me ensinando a pedir e a agradecer a Deus por tudo! Agradeço por todo carinho e amizade comigo ao longo de todos esses anos! A convivência diária com uma pessoa tão especial como você é luz na minha vida!

Aos alunos de iniciação científica: Alice, Daliane, Lorena e Ramon pela ajuda essencial e indispensável na realização desse projeto, por termos aprendido juntos, pelos bons momentos, pela amizade e pelo carinho.

Aos amigos do Laboratório de Toxoplasmose: Anderson, Breno, Mari, Letícia, Matheus, Wagner e Gabi por tornarem a rotina muito mais divertida. Em especial à Carol, minha mentora, madrinha e parceira!

Em memória de Kléber Portela Fortes e com o coração repleto de saudades agradeço a Turma do Pepino (a melhor turma de mestrado de todos os tempos)! Especialmente aos queridos Bruna Torres, João, Lú Lima, Érica e prof. Alan por tornarem essa trajetória mais leve!

À prof. Dr^a. Rosa Arantes e ao pessoal do Nipe, especialmente à Dr^a. Maria Noviello, por todo o apoio com os experimentos e análises de histopatologia.

Ao Dr. Olindo e ao Dr. Marcio Sobreira pelo apoio na realização das análises de citocinas por CBA e interpretação dos resultados.

Ao prof. Dr. Stefan pela orientação na padronização e realização dos ensaios de ELISA de citocinas e na programação inicial dos experimentos.

Ao Departamento de Parasitologia, na pessoa da sua chefe Dr^a. Élide Mara Leite Rabelo e ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa do coordenador Dr. Ricardo Toshio Fujiwara. Esse agradecimento é também extensivo a todos os professores e funcionários, que contribuíram na minha formação como parasitologista.

As secretárias Sumara e Sibebe, pelo apoio e atenção dedicados a todos os alunos.

SUMÁRIO

Resumo	xi
Abstract.....	xiii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas.....	xvi
1. Introdução	1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> : Ciclo biológico e transmissão	1
1.2. Estrutura populacional e virulência de cepas de <i>T. gondii</i>	3
1.2. Resposta imune contra <i>T. gondii</i>	7
1.3. Mecanismos modulatórios induzidos pelo parasito	10
1.4. Reinfecção pelo <i>T. gondii</i>	12
1.4.1. Modelos experimentais de reinfecção	14
2. Justificativa.....	18
3. Objetivos.....	20
3.1. Objetivo Geral.....	20
3.2. Objetivos Específicos	20
4. Materiais e Métodos	21
4.1. Camundongos	21
4.2. Cepas de <i>T. gondii</i>	21
4.3. Infecção primária e desafio com cepas de <i>T. gondii</i>	23
4.4. Critérios de mortalidade e morbidade.....	25
4.5. Identificação molecular da reinfecção e disseminação do parasito através de PCR-RFLP	26
4.5.1. Extração de DNA de tecidos de camundongos experimentalmente infectados	26
4.5.2. Padronização de marcador molecular para identificação da cepa desafio em tecido de camundongos	28
4.5.3. Nested PCR-RFLP do <i>locus</i> L358	31
4.6. Histopatologia	31
4.7. Quantificação de citocinas	32
4.7.1. Citocinas no homogenato de intestino	32
4.7.2. Citocinas no soro.....	33

4.8. Avaliação dos genes codificadores das proteínas do parasito envolvidas na virulência	34
4.9. Análise estatística	37
5. Resultados.....	38
5.1. Mortalidade.....	38
5.2. Variação no peso corporal	39
5.3. Número total de cistos cerebrais	41
5.4. Ocorrência de reinfecção e disseminação do parasito	42
5.4.1. Marcadores genômicos apresentam eficácia variável na detecção da reinfecção	42
5.4.2. Disseminação dos parasitos nos animais desafiados.....	45
5.5. Alterações histopatológicas	48
5.6. Parâmetros imunológicos.....	58
5.6.1. Quantificação de citocinas no intestino.....	58
5.6.2. Quantificação de citocinas sistêmicas	61

.....	65
5.7. Proteínas de Virulência	66
6. Discussão	68
7. Conclusões.....	81
8. Perspectivas	82
9. Referências Bibliográficas.....	83
Anexo 1 – Certificado do Comitê de Ética.....	97
Anexo 2 - Resultados individuais da padronização do marcador por <i>Multiplex-Nested</i> PCR dos grupos D8+EGS e D8+CH3	98
Anexo 3 - Resultados individuais da <i>Nested</i> PCR.....	102

RESUMO

A reinfecção por *Toxoplasma gondii* em modelo animal vem sendo estudada desde que relatos de caso sugeriram a ocorrência de reinfecção natural em humanos. O Brasil é uma região endêmica para a toxoplasmose e com enorme diversidade de genótipos do parasito, que sugere que múltiplas exposições a diferentes tipos genéticos aumentem o risco de reinfecção. Apesar da demonstração da reinfecção em modelo animal, muito pouco se conhece sobre os eventos que ocorrem logo após o desafio, momento no qual os taquizoítos circulantes podem alcançar o feto causando toxoplasmose congênita. Neste estudo foi utilizado um modelo de reinfecção em que camundongos BALB/c cronicamente infectados por uma cepa avirulenta (D8 - genótipo ToxoDB#8 BrIII) foram desafiados com cepas de elevada virulência e genótipos distintos: EGS (genótipo ToxoDB #229 - virulenta) e CH3 (genótipo ToxoDB#19 – virulência intermediária) ou com a própria cepa D8. Os resultados foram comparados com controles de infecção aguda por cada uma dessas três cepas assim como com a infecção crônica pela cepa D8. A infecção primária protegeu os animais do desafio com as cepas letais. A morbidade foi reduzida nos animais reinfetados conforme demonstrado pelo acompanhamento do peso e pela análise histopatológica do intestino, pulmão, fígado, cérebro e baço que mostraram alterações patológicas minimizadas. A reinfecção foi confirmada, entretanto o padrão de disseminação do parasito se deu de forma distinta daquele que ocorre na primoinfecção. Foi observada a chegada precoce dos parasitos aos pulmões e atraso tanto na multiplicação destes no intestino quanto na chegada ao cérebro. Nos animais desafiados não ocorre um aumento de citocinas inflamatórias ou modulatórias no soro ou mesmo no local de infecção (intestino) em comparação aos animais apenas com infecção crônica. Outros mecanismos da resposta imune devem estar envolvidos garantindo esse equilíbrio entre parasito e hospedeiro que permite a sobrevivência de

ambos. A análise da proteína de virulência ROP16 auxiliou no entendimento da maior inflamação causada na infecção pela cepa EGS. Porém a análise combinada das proteínas ROP5 e ROP18 na predição da virulência das cepas foi adequada em apenas duas das três cepas em estudo.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, reinfecção, resposta imune, disseminação, parasitismo tecidual.

ABSTRACT

Animal model of *Toxoplasma gondii* reinfection has been studied after cases of natural human reinfection were described. Brazil is an endemic area for toxoplasmosis with enormous genetic diversity of parasites. Multiples exposures with different strains likely occur with great frequency, increasing reinfection risk. Although animal model prove reinfection, little is known about the events that occur just after challenge. To better understand these events, BALB/c mouse were chronically infected with D8 strain (genotype ToxoDB#8 BrIII) and challenge with two different strains: EGS (genótipo ToxoDB #229) and CH3 strain (genotype ToxoDB #19) or with D8 strain. The results were compared to acute infection of each strain and also compared to D8 chronic infection. Primary infection protects animals from lethal challenge. Morbidity was reduced in reinfected mice as demonstrated by monitoring the weight and organs histology showing that pathological changes were minimized. Reinfection was confirmed however different parasite spread occurs in challenge animals. A parasitism delay in brain and intestine has been observed and parasites early reached the lungs. Unlike acute infection, inflammatory or immunomodulatory cytokine increase was not observed in sera or ileum of challenge group. Other immune response mechanisms must be involved in host parasite balance that allows the survival of both. ROP16 virulence protein analysis support understanding about high inflammation caused by EGS strain infection. Nevertheless combined analysis of ROP5 and ROP18 did not proper to predicted virulence in one of three strains used in this study.

Keywords: reinfection, immune response, dissemination, tissue parasitism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do delineamento experimental.....	25
Figura 2: Taxas de sobrevivências dos camundongos desafiados com cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	38
Figura 3: Cinética de ganho de peso de camundongos desafiados com cepas de <i>T. gondii</i> e controles.....	40
Figura 4: Mediana do total de cistos cerebrais nos grupos desafiados (D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8) e no grupo D8 crônico 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio.....	41
Figura 5: Alterações histológicas por <i>Toxoplasma gondii</i> no íleo de camundongos BALB/c desafiados e controle.....	49
Figura 6: Alterações histológicas por <i>Toxoplasma gondii</i> no íleo de camundongos BALB/c do grupo EGS agudo.....	50
Figura 7: Alterações histológicas por <i>Toxoplasma gondii</i> nos pulmões de camundongos BALB/c desafiados e controle.....	52
Figura 8: Alterações histológicas por <i>Toxoplasma gondii</i> no fígado de camundongos BALB/c desafiados e controle.....	54
Figura 9: Alterações histológicas por <i>Toxoplasma gondii</i> no baço de camundongos BALB/c desafiados e controle.....	55
Figura 10: Alterações histológicas por <i>Toxoplasma gondii</i> no cérebro de camundongos BALB/c desafiados e controle.....	57
Figura 11: Quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-17, IL-4 e IL-10 no íleo de camundongos BALB/c 48 horas após a infecção ou desafio com <i>Toxoplasma gondii</i>	60
Figura 12: Cinética da concentração sistêmica das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-17.....	63
Figura 13: Cinética da concentração sistêmica das citocinas IL-4 e IL-10.....	64
Figura 14: Análise de citocinas no intestino e no soro de camundongos BALB/c infectados e reinfectados com <i>Toxoplasma gondii</i>	65
Figura 15: Padrão de RFLP para os genes GRA15, ROP5, ROP16 e ROP18 nas cepas D8, EGS e CH3 de <i>Toxoplasma gondii</i>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genotipagem através de PCR-RFLP multilocus das cepas D8, EGS e CH3 de <i>Toxoplasma gondii</i>	22
Tabela 2: Sequência de iniciadores externos e internos utilizados na <i>Multiplex</i> e na <i>Nested</i> PCR, respectivamente, assim como tamanho do fragmento de DNA obtido e endonucleases de restrição utilizadas para cada um dos marcadores genômicos testados.	30
Tabela 3: Sequência de iniciadores e descrição das condições de digestão com as endonucleases específicas para a genotipagem dos marcadores de virulência de <i>Toxoplasma gondii</i> : GRA15, ROP5, ROP16 e ROP18.....	36
Tabela 4: Eficiência de amplificação e demonstração da reinfecção por <i>Toxoplasma gondii</i> para os marcadores <i>PK1</i> , <i>c22-8</i> , <i>c29-2</i> e <i>L358</i> no DNA extraído dos pulmões de camundongos BALB/c cronicamente infectados pela cepa D8 e desafiados com as cepas EGS (D8+EGS) ou CH3 (D8+CH3) 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio.....	44
Tabela 5: Presença e tipo genético de <i>Toxoplasma gondii</i> para o marcador <i>L358</i> no intestino, pulmões e cérebro de camundongos BALB/c dos grupos controle da infecção aguda (D8 agudo, EGS agudo e CH3 agudo), controle da infecção crônica (D8 crônico) e grupos desafiados (D8+EGS e D8+CH3) 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

CH3 agudo - grupo de animais com infecção aguda pela cepa CH3

d.a.d. – Dias após o desafio

D8 agudo - grupo de animais com infecção aguda pela cepa D8

D8 crônico– grupo de animais com infecção crônica pela cepa D8

D8+CH3 – grupo de animais cronicamente infectados pela cepa D8 e desafiados após 45 dias com a cepa CH3

D8+D8 – grupo de animais cronicamente infectados pela cepa D8 e reestimulados após 45 dias com a mesma cepa D8

D8+EGS – grupo de animais cronicamente infectados pela cepa D8 e desafiados após 45 dias com a cepa EGS

DC – células dendríticas

EGS agudo - grupo de animais com infecção aguda pela cepa EGS

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

GFP- *Green Fluorescent Protein*

GRA – Proteínas de Grânulos Densos

H&E – Hematoxilina e eosina

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintetase indutível

IRG – GTPases relacionadas a imunidade

MHC – Complexo de histocompatibilidade

MIC – Proteínas de Micronemas

Ni – grupo de animais controle não infectados

Ni+CH3 – grupo de animais não infectados previamente pela cepa D8 e infectados com a cepa CH3 no momento do desafio

Ni+EGS – grupo de animais não infectados previamente pela cepa D8 e infectados com a cepa EGS no momento do desafio

NK – células *natural killer*

NO – *Nitric Oxide*

PBS – *Phosphate buffer solution*

PCR – Reação em cadeia da Polimerase
RIFI – Reação de Imunofluorescência indireta
RFPL – *Restriction Frgment Lenght Polimorphism*
ROI – Intermediários reativos de oxigênio
ROP – Proteínas de Roptrias
SNP – *Single Nucleotide Polimorphism*
STAg – Antígeno solúvel de *T. gondii*
TNF- α – *Tumor Necrosis Factor- α*

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*: CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

Toxoplasma gondii foi identificado pela primeira vez em roedores no norte da África (Nicolle e Manceaux 1909) e em coelhos no Brasil (Splendore 1908). Os felídeos foram descritos como sendo os hospedeiros definitivos por diversos grupos na década de 70 (Kim e Weiss, 2008). Esse protozoário é classificado por Levine e colaboradores (1998) como pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidia, e à Subfamília Toxoplasmatinae (Levine 1998). O gênero *Toxoplasma* possui apenas uma espécie, *T. gondii*. Uma nova proposta de classificação dos eucariotas foi feita por Adl e colaboradores (2012) e posiciona *T. gondii* da seguinte forma: *Toxoplasma gondii* [Apicomplexa: Conoidasida: Coccidia: Eimeriorina].

Os parasitos dessa espécie são intracelulares obrigatórios e se encontram amplamente distribuídos em diversas regiões mundiais. *T. gondii* é capaz de infectar um enorme espectro de hospedeiros intermediários dentre mamíferos e aves. Estima-se que um terço da população humana mundial esteja exposta ao parasito (Montoya e Liesenfeld, 2004).

O ciclo de *T. gondii* é considerado heteroxênico facultativo, podendo ser mantido apenas com a participação dos hospedeiros intermediários através de expansões clonais do parasito (Tenter et al., 2000). Após a ingestão de cistos teciduais ou de oocistos por um hospedeiro intermediário susceptível, os bradizoítos ou os esporozoítos, respectivamente, são liberados no tubo digestivo, invadem os enterócitos, e se diferenciam em taquizoítos dando início ao parasitismo.

A invasão celular é um processo ativo e dirigido pelo parasito, que ocorre com a descarga sequencial de proteínas contidas no interior das organelas que compõem o

complexo apical, resultando inicialmente num elaborado motor de actina e miosina. Essa maquinaria especializada de invasão fornece ao parasito a capacidade de atravessar barreiras como a hematocefálica e a placentária. A secreção das proteínas das organelas apicais é fundamental na invasão celular e ocorre de maneira coordenada, sendo que as proteínas das micronemas (MIC) são as primeiras a serem liberadas. Elas estão envolvidas na adesão inicial do parasito à membrana da célula alvo. Em seguida as proteínas das roptrias (ROP) e dos grânulos densos (GRA) são liberadas, respectivamente. O resultado é a formação de um vacúolo não fusogênico também denominado de vacúolo parasitóforo. As proteínas das roptrias assim como dos grânulos densos são responsáveis por tornar o microambiente do vacúolo parasitóforo adequado ao crescimento do parasito modulando uma grande variedade de processos da célula hospedeira (Blader e Saeij, 2009). No interior desses vacúolos os taquizoítos se multiplicam rápida e assexuadamente, através de endodiogenia. Essa fase perdura até que se estabeleça uma resposta imune adequada capaz de controlar a proliferação de taquizoítos e que induz também a diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos. Essas formas do parasito também se multiplicam por endodiogenia, porém muito lentamente no interior de cistos teciduais caracterizando o início da fase crônica (Kravetz e Federman, 2005; Hill et al., 2005).

A disseminação sistêmica do parasito ocorre através da via hematogênica, linfática ou em leucócitos sanguíneos infectados. Em modelo animal, genericamente, uma hora após a infecção oral já é possível encontrar o parasito no epitélio intestinal e na lâmina própria. Após 24 horas os linfonodos mesentéricos apresentam-se parasitados e a disseminação sistêmica pode ser evidenciada pela presença do parasito no sangue, pulmão e fígado entre dois e quatro dias após a infecção. Aproximadamente 10 dias após a infecção é possível encontrar cistos cerebrais (Dubey et al., 1997).

Quando os hospedeiros definitivos, membros da família Felidae, ingerem cistos teciduais (ou até mesmo oocistos), ocorre não apenas a multiplicação assexuada, mas também a reprodução sexuada no epitélio intestinal. Após uma série de merogonias, ocorre então a gamogonia resultando na produção de oocistos não esporulados. Em seguida, a membrana da célula epitelial parasitada se rompe liberando o oocisto no lúmen intestinal e conseqüentemente nas fezes. No meio externo, em condições adequadas de temperatura e umidade, ocorre a esporogonia. Após a esporulação o oocisto torna-se infectante contendo dois esporocistos cada um com quatro esporozoítos em seu interior (Dubey et al., 1970).

Classicamente, o consumo de carne crua ou mal cozida tem sido descrito como importante fator de risco para a toxoplasmose em humanos (Bonametti et al., 1997; El-Nawawi et al., 2008). Entretanto, além dos bradizoítos presentes nos cistos teciduais, os esporozoítos e os taquizoítos também são infectantes. Os oocistos, eliminados em grandes quantidades pelos felídeos, são responsáveis pela contaminação ambiental. Sendo assim, o contato com o solo ou a ingestão de água não tratada são corriqueiramente identificados na literatura como fatores de risco (Cenci-Goga et al., 2011). Os taquizoítos, circulantes na fase aguda da infecção, são capazes de atravessar a placenta estando assim envolvidos na transmissão vertical (ou congênita) da toxoplasmose (Tenter et al., 2000).

1.2. ESTRUTURA POPULACIONAL E VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *T. gondii*

T. gondii foi considerado por muito tempo um organismo de estrutura genética populacional clonal (Howe e Sibley, 1995). Os primeiros estudos com cepas do *T. gondii* foram geográfica e numericamente restritos. As conclusões apontaram para a existência de três linhagens clonais, definidas como Tipo I, II e III, que possuem uma pequena divergência genética entre si, inferior a 2% (Dardé, 2008). Na Europa e

América do Norte a maioria dos isolados, tanto de humanos como de animais domésticos, pertencem a uma dessas três linhagens clonais. Entretanto, esse panorama mudou a partir do momento em que se ampliaram o número de isolados e de marcadores analisados para a genotipagem, independente da metodologia utilizada (PCR-RFLP ou microssatélites). Em 2006, Ferreira e colaboradores descreveram na análise genética de isolados do Brasil um padrão distinto da distribuição clonal. Outros estudos realizados com isolados de toda a América do Sul têm confirmado as divergências destes com as populações de *T. gondii* da Europa e América do Norte (Khan et al., 2006; Carneiro et al., 2013; Silva et al., 2014, Shwab et al., 2014). Essas cepas de genótipo não clonal são denominadas de atípicas. Atualmente, observa-se de maneira geral que a diversidade genética do parasito segue uma distribuição geográfica. Enquanto alguns poucos genótipos dominam o hemisfério Norte, no hemisfério Sul centenas de genótipos coexistem. Apesar de nenhum desses serem notavelmente dominantes sobre os demais, alguns genótipos ocorrem com uma frequência relativa mais elevada (Shwab et al., 2014). No Brasil, por exemplo, quatro genótipos de ampla circulação e descritos em diferentes hospedeiros foram propostos como sendo linhagens clonais brasileiras. Essas linhagens foram denominadas BRI, BRII, BRIII e BRIV e são distintas das linhagens arquetípicas tipo I, II e III (Pena et al., 2008; Dubey e Su, 2009).

Paralelamente aos avanços no entendimento da estrutura genética populacional de *T. gondii*, questões acerca de sua virulência vêm sendo esclarecidas. Classicamente, cepas clonais tipo I são associadas ao fenótipo virulento, sendo letais em camundongos, enquanto cepas tipo II e III são consideradas avirulentas por evoluírem para uma infecção crônica com a produção de cistos teciduais (Howe e Sibley, 1995). Porém essas associações ainda não são claras quando se tratam de genótipos atípicos. Usualmente observa-se virulência elevada nas cepas atípicas. No estado de Minas

Gerais, menos de 10% das cepas atípicas obtidas de humanos e animais domésticos foram classificadas como avirulentas para camundongos (Carneiro et al., 2013; Silva et al., 2014).

A aplicação da genética clássica na análise da virulência revelou que essa característica é estável, herdável e determinada por relativamente poucos *loci*. Cruzamentos genéticos entre cepas clonais virulentas do tipo I e avirulentas do tipo III foram feitos para identificar os genes responsáveis pela maior virulência observada no genótipo I (Saeij et al., 2006; Taylor et al., 2007; Khan et al., 2009). Foram identificados polimorfismos em algumas proteínas pertencentes às organelas do complexo apical: micronemas, roptrias e grânulos densos. Essas proteínas, especialmente *ROP5*, *ROP16*, *ROP18* e *GRA15*, têm sido identificadas como importantes fatores de virulência. Foi demonstrado, em modelo animal, que proteínas de cepas pertencentes a tipos genéticos distintos I, II ou III possuem capacidade diferente de modular as vias pró-inflamatórias da célula hospedeira (Melo et al., 2011).

De maneira indireta, a virulência de determinado isolado pode ser avaliada também pelas alterações patológicas causadas durante a infecção. Os estudos de patogênese focam principalmente na infecção primária em modelo animal usando isolados da América do Norte e Europa. De forma geral, segundo Dubey e colaboradores (1997), infecções experimentais letais em camundongos são decorrentes de enterite quando a morte ocorre na primeira semana, ou pneumonite quando ocorre a partir da segunda. Após quatro semanas, já na fase crônica da infecção, a encefalite é o principal acometimento. Camundongos inoculados com cepas do tipo I apresentam danos sistêmicos, independente da linhagem de camundongo e da rota de infecção. Nesses casos, o fígado é o principal órgão afetado, com aumento do volume de hepatócitos, degeneração hidrópica, esteatose e perda da arquitetura sinusóide, associado à

infiltração celular e focos de necrose coagulativa (Mordue et al. 2001). Acredita-se que a destruição tecidual em infecções experimentais com cepas do tipo I é, primordialmente, causada pelo parasito, uma vez que as lesões são associadas à alta carga parasitária (Howe e Sibley 1995; Melo et al., 2011). Em contrapartida, a patogenicidade de cepas clonais do tipo II depende de outros fatores como genética do hospedeiro, dose e rota de infecção. Infecção oral com inóculo de alta dose (100 cistos) da cepa avirulenta ME49 (clonal do tipo II) em camundongos susceptíveis C57BL/6 acarreta em uma resposta imunológica pró-inflamatória do tipo Th1 exacerbada que culmina com a morte dos camundongos por uma ileíte fulminante. As lesões intestinais são caracterizadas por infiltrados mono e polinucleares na lâmina própria e nas camadas submucosa e muscular, além de destruição das vilosidades e hemorragias que levam a 100% de letalidade dos animais (Liesenfeld et al. 1996). Essas alterações no íleo são pouco expressivas no modelo BALB/c, linhagem resistente ao *T. gondii* (Fux et al., 2003).

Recentemente, Pinheiro e colaboradores (2015) estudaram as alterações patológicas em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados pela via oral com 10 cistos de três cepas de genótipos atípicos isoladas de recém-nascidos no Estado de Minas Gerais. Os camundongos C57BL/6 exibiram um padrão inflamatório mais extenso e intenso. O fígado e o pulmão foram os órgãos mais afetados, independente das cepas utilizadas. As alterações no íleo foram discretas. Os autores acreditam que isso possa estar relacionado à baixa dose do inóculo.

Fica claro portanto, que além das características intrínsecas do parasito, outros fatores afetam o curso da infecção, dentre eles a carga parasitária, o *background* genético do hospedeiro e também o seu estado imunológico (Montoya e Liesenfeld, 2004).

1.2. RESPOSTA IMUNE CONTRA *T. gondii*

Durante a fase aguda da infecção, *T. gondii* induz uma resposta imune pró-inflamatória potente e bem descrita na literatura (Denkers e Gazzinelli, 1998; Liesenfeld 2002; Filisetti e Candolfi, 2004; Denkers et al., 2004; Buzoni-Gatel et al., 2006; Pifer e Yarovinsky, 2011; Munoz et al., 2011; Yarovinsky 2014). Como mencionado anteriormente esse parasito é mais comumente adquirido através da ingestão de cistos teciduais ou mesmo oocistos. Dessa forma, o epitélio intestinal é a primeira linha de defesa contra *T. gondii* (Buzoni-Gatel et al., 2006). Os fibroblastos e as células epiteliais intestinais secretam quimiocinas (como CXCL1 e CXCL2) que recrutam neutrófilos, sendo estas as primeiras células a chegar ao local de infecção e exercerem a sua função clássica de fagocitose e liberação de moléculas microbidas degradativas (Denkers et al., 2004). A secreção de quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 pelos neutrófilos atraem outras células de defesa como células dendríticas (DCs) e macrófagos (Denkers et al., 2004). O reconhecimento do parasito pelas células dendríticas ocorre principalmente via receptor do tipo Toll (TLR) 11 e também TLR12. O TLR11 reconhece uma proteína denominada profilina que é liberada pelo parasito por mecanismos desconhecidos. O TLR7 e TLR9 têm sido implicados no reconhecimento de RNA e DNA de *T. gondii* respectivamente. TLR2 e TLR4 estão envolvidos na detecção do glicosilfosfatidilinositol (GPI) do parasito durante a infecção (Yarovinsky 2014).

As DCs são as maiores produtoras de IL-12 na infecção por *T. gondii* polarizando a resposta adaptativa preferencialmente para o tipo Th1 (Denkers et al., 2004). A citocina IL-12 possui importância crucial na ativação das células *natural killer* (NK), que passam a produzir IFN- γ , bem como no direcionamento da proliferação de células TCD4⁺ tipo Th1 e TCD8⁺ citotóxicas que, por sua vez, também produzem IFN- γ (Pifer

e Yarovsky, 2011). A principal fonte de IFN- γ durante a infecção aguda são as células NK (Gazzinelli et al., 1993). IFN- γ possui numerosas atividades biológicas, incluindo: ativação de macrófagos e células NK, indução de expressão principalmente de MHC tipo II e inibição da resposta do tipo Th2 através da inibição da síntese de IL-4 e indução da expressão de receptores de IL-12 nas células T (Filisetti e Candolfi, 2004). IFN- γ também desempenha um papel importante na indução da conversão dos taquizoítos em bradizoítos, além de suprimir a conversão dos bradizoítos novamente em taquizoítos durante a fase crônica (Filisetti e Candolfi, 2004). Outra forma importante de controle do parasito é a indução da síntese de GTPases relacionadas à imunidade (IRG) em células ativadas por IFN- γ . O mecanismo de ação desta família de enzimas envolve adesão e ruptura da membrana do vacúolo parasitóforo, resultando na destruição do parasito (Taylor et al., 2007). Altos níveis de IFN- γ estão relacionados com imunopatologia intestinal em camundongos susceptíveis C57BL/6 (Filisetti e Candolfi, 2004). A neutralização de IL-12 em camundongos infectados com *T. gondii* resulta na diminuição da produção de IFN- γ e aumento da susceptibilidade à infecção aguda devido à proliferação dos parasitos (Denkers e Gazzinelli, 1998).

Os macrófagos infectados também são importante fonte de IL-12 nos momentos iniciais da infecção e esta citocina atua nas células NK e mais tarde nas células T, promovendo a produção de IFN- γ . Esta citocina por sua vez, é sabidamente o maior indutor da ativação clássica dos próprios macrófagos e atuam em sinergia com TNF- α endógeno. Os monócitos inflamatórios migram do sistema circulatório para a lâmina própria onde expressam mecanismos efetores antimicrobianos que controlam a infecção (Muñoz et al., 2011). Macrófagos ativados fagocitam e destroem os parasitos pela liberação de enzimas lisossomais, intermediários reativos de oxigênio (ROI) e óxido nítrico (NO) (Gazzinelli et al., 1996). O óxido nítrico é produzido nestas condições pela enzima

iNOS, que é ativada em resposta a citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β . NO é microbicida, pois inibe enzimas mitocondriais e nucleares essenciais ao parasito. A produção exacerbada de NO na fase aguda da infecção controla o parasito, porém contribui para a patologia associada com o aumento de citocinas pró-inflamatórias (Khan et al., 1997).

A apresentação de antígenos aos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ por macrófagos e DCs ocorrendo em um ambiente de IL-12 e IFN- γ , descrito anteriormente, induz a diferenciação do fenótipo Th1 efetor (Correa et al., 2007). Tanto os linfócitos Th1 CD4⁺ auxiliares e CD8⁺ citotóxicos são essenciais para uma imunidade protetora e sobrevivência durante a infecção crônica (Denkers et al., 2004). Essas células são fontes críticas de IFN- γ durante a fase crônica (Gazzinelli et al., 1992). Enquanto linfócitos TCD4⁺ são importantes na regulação da resposta imune através da produção de IL-12, os linfócitos TCD8⁺ têm um papel efetor principal contra o parasito por sua atividade citotóxica contra células infectadas. TCD4⁺ atuam na indução, geração e manutenção de células TCD8⁺ ativas e funcionais nas infecções persistentes (Sabauste et al., 1991; Denkers et al., 2004).

Aspectos da resposta Th17 ainda estão sendo elucidados. Sabe-se que o recrutamento inicial de neutrófilos é dependente da sinalização via receptor de IL-17 e que a produção de IL-17 pelas células NK é desencadeada pela citocina IL-6 (Kelly et al., 2005; Gaddi e Yap 2007; Passos et al., 2010). A participação da citocina IL-17 na toxoplasmose ainda é controversa na literatura. Alguns autores afirmam a sua contribuição no desenvolvimento da imunopatologia intestinal (Guiton et al., 2010; Benevides et al., 2013; Cortez et al., 2014) enquanto outros excluem essa possibilidade (Muñoz et al., 2009).

A resposta inflamatória é controlada por citocinas regulatórias ou modulatórias. A citocina IL-10 desempenha um papel crítico nessa regulação (Gazzinelli et al., 1996). Sua função está relacionada à inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e TNF- α , assim como inibição da secreção de moléculas efetoras como NO e ROI. O efeito da IL-10 é potencializado pela ação da citocina IL-4 (Gazzinelli et al., 1992). Por sua vez, TGF- β é também importante na proteção contra ileíte por inibir a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 por células TCD4⁺ intestinais e reduzir a síntese de NO pelos macrófagos efetores (Buzoni-Gatel et al., 2006).

Apesar de altamente efetiva, a resposta pró-inflamatória desencadeada durante a infecção não é suficiente para eliminar o parasito. Pelo contrário, muitas das vezes um balanço é alcançado, no qual *T. gondii* e hospedeiro mantêm um equilíbrio que pode permanecer estável por toda a vida do hospedeiro (Denkers et al., 2004). Sabe-se também que quando a infecção crônica progride, os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1, TNF- α e IFN- γ reduzem enquanto a IL-10 aumenta (Denkers e Gazzinelli, 1998). O requerimento absoluto de IFN- γ para sobrevivência do hospedeiro durante a infecção crônica é bem estabelecido na literatura assim como a importância de TCD8⁺, porém a atividade citotóxica parece ser menos importante que aquela relacionada à produção de IFN- γ (Denkers e Gazzinelli, 1998).

1.3. MECANISMOS MODULATÓRIOS INDUZIDOS PELO PARASITO

T. gondii exibe tanto efeitos indutivos quanto supressivos no sistema imune. Essa dupla propriedade provavelmente contribui para o notável sucesso do parasito em infectar humanos e animais em todo o mundo (Denkers et al., 2004). Mas apesar dos diversos pontos em comum na resposta imune experimental induzida pela infecção por *T. gondii*,

tem sido observadas variações decorrentes de diversos fatores, dentre eles a cepa do parasito utilizada (Yap et al., 2006).

Em momentos iniciais da infecção, as cepas clonais do tipo I não ativam a resposta pró-inflamatória. GRA15 é uma proteína secretada por grânulos densos do parasito capaz de ativar NF- κ B que, dentre outros, inibe a apoptose, aumenta o recrutamento celular e induz a produção e liberação de IL-12. Porém, o alelo do tipo I de GRA15 resulta numa proteína truncada e não funcional, permitindo uma infecção silenciosa sem a ativação de NF- κ B (Rosowski et al., 2011). Associado a isso, nas cepas do tipo I, a proteína ROP16 (tirosina quinase) induz a ativação persistente das vias STAT3 e STAT6, reduzindo a produção de mediadores da inflamação como IL-12, IL-1 β e IL-6 (Saeij et al., 2007). As cepas do tipo I, além da capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, também expressam os alelos da proteína ROP5 associados a uma maior virulência. Essa proteína é uma pseudoquinase envolvida na regulação da transdução de sinal intracelular (Behnke et al. 2011, Reese et al., 2011). Por fim, a serina treonina quinase denominada ROP18 do tipo I, fosforila IRGs bloqueando o seu recrutamento para o vacúolo parasitóforo, que é um requerimento para a destruição do parasito, permitindo dessa forma um crescimento descontrolado de *T. gondii* (Fentress et al., 2010). Entretanto, com o decorrer da infecção, algumas proteínas conservadas e secretadas pelas células infectadas, como profilina e ciclofilina-18, são reconhecidas pelas DCs desencadeando uma ativação tardia de NF- κ B e produção de IL-12 que ativa NK e células T a produzirem IFN- γ (Aliberti et al., 2000). O atraso na indução da resposta imune resulta no comprometimento da sobrevivência do hospedeiro que já se encontra com elevada carga parasitária.

Assim como nas cepas do tipo I, as do tipo III secretam GRA15 e ROP16 que não ativam NF- κ B e induzem uma ativação persistente de STAT3/6 respectivamente,

limitando a produção inicial de citocinas pró-inflamatórias (Saeij et al., 2007, Rosowski et al., 2011). Por outro lado, esses parasitos expressam uma forma inativa de ROP18, sendo, portanto, incapazes de evitar a morte intracelular mediada por IRGs (Fentress et al., 2010). Neste caso, a produção de IL-12 pelas DCs desencadeia uma resposta do tipo Th1, que é suficiente para controlar o aumento da carga parasitária e induzir a formação de cistos, permitindo uma infecção crônica. ROP5_{III} também está relacionada com elevada virulência.

Cepas tipo II do parasito, por outro lado, são bastante eficazes na ativação da resposta inflamatória no início da infecção. Esses parasitos expressam a forma funcional da proteína GRA15, que é capaz de ativar NF- κ B nas células infectadas (Rosowsky et al., 2011), e uma forma menos funcional de ROP16 que permite apenas uma ativação transitória de STAT3/6 (Saeij et al., 2007). Como consequência é observada uma produção maciça de citocinas pró-inflamatórias no momento inicial da infecção. Este ambiente induzido pelo parasito modula a ativação de diversos subtipos de células T, principalmente direcionando a resposta para o tipo Th1 (Denkers e Gazzinelli, 1998). A expressão intracelular dos alelos ROP5_{II} está associada com menor virulência (Behnke et al., 2011, Reese et al., 2011), porém animais susceptíveis morrem devido à ileíte grave (Liesenfeld et al., 1996). As ROP18 do tipo II não são capazes de fosforilar IRGs e dessa forma os mecanismos de destruição do parasito nos vacúolos parasitóforos permanecem ativos (Fentress et al., 2010).

1.4. REINFECÇÃO PELO *T. gondii*

Na toxoplasmose humana e experimental ocorre a persistência de linfócitos T de memória, que provavelmente é mantida pela ruptura ocasional de cistos intracelulares e talvez por infecções recorrentes através de alimentação. Os anticorpos anti- *T. gondii*

permanecem detectáveis durante toda a vida do hospedeiro (Filisetti e Candolfi, 2004). Esses fatores imunológicos, em conjunto, seriam importantes para proteger o indivíduo primoinfectado de um evento subsequente de reinfecção (Buzoni-Gatel et al., 2006).

Entretanto existem relatos na literatura de casos de toxoplasmose congênita em mulheres imunocompetentes na fase crônica da infecção, sugerindo a possibilidade de reinfecção em humanos. Fortier e colaboradores (1991) relatam um caso de uma gestante que apresentava níveis positivos e estáveis de IgG específicos anti- *T. gondii* e teve um aborto espontâneo com causa atribuída à reinfecção pelo parasito. Relatos de caso similares foram feitos posteriormente, entretanto, com crianças a termo apresentando toxoplasmose congênita sintomática com retinocoroidite (Hennequin et al., 1997; Gavinet et al., 1997; Silveira et al., 2003; Valdès et al., 2010) ou mesmo doença disseminada (Lebas et al., 2004).

Elbez-Rubinstein e colaboradores (2009) descreveram um relato de caso de toxoplasmose congênita disseminada em um recém-nascido de uma mãe francesa imunocompetente e soropositiva para toxoplasmose alguns anos antes da concepção. O parasito foi isolado do sangue periférico do recém-nascido com oito dias de vida através de bioensaio em camundongos. Essa cepa foi descrita como virulenta para camundongos e caracterizada como atípica, possuindo um genótipo bastante incomum na França. Neste país, 96% dos casos de toxoplasmose congênita são decorrentes de infecções com cepas clonais do tipo II. A infecção provavelmente ocorreu devido à ingestão de carne de cavalo mal cozida importada, como relatado pela gestante. Os autores concluem que a presença de IgG específico residual nem sempre é sinônimo de proteção contra o *T. gondii*.

Após a descoberta da variabilidade genética do parasito, alguns estudos tentam compreender o quanto a infecção por uma cepa é capaz de proteger contra outra, no que pode ser denominada “imunidade heteróloga”. Portanto, esses trabalhos derrubam o paradigma de que a imunidade desenvolvida pela infecção inicial protege contra infecções futuras (Jensen et al., 2015).

1.4.1. MODELOS EXPERIMENTAIS DE REINFECÇÃO

Alguns modelos experimentais foram propostos para verificar a ocorrência da reinfecção. Dao e colaboradores (2001) demonstraram a reinfecção em camundongos OF1 infectados e desafiados pela via oral utilizando cepas clonais. Entretanto, a reinfecção ocorreu apenas quando o desafio foi realizado com uma cepa de genótipo diferente daquele da cepa utilizado na primoinfecção.

Freyre e colaboradores (2004) avaliaram a reinfecção em ratos Wistar primoinfectados, pela via intraperitoneal, com cepas clonais (tipo I) e desafiadas com cistos ou oocistos de cepas pertencentes a diferentes genótipos. Nesse modelo, a primoinfecção foi capaz de proteger os animais da reinfecção somente quando o desafio foi realizado com algumas cepas de genótipo clonal tipo II. Porém, em outras cepas desse mesmo genótipo (tipo II) foi verificada a reinfecção.

Dziko e colaboradores (2006) utilizaram como modelo camundongos BALB/c infectados intraperitonealmente com cistos de uma cepa clonal tipo II e desafiados, também intraperitonealmente, com taquizoítos ou cistos de uma cepa clonal tipo I. Foi verificado que a infecção primária protegeu os camundongos desafiados com uma dose letal de taquizoítos, mas não preveniu a reinfecção. Esta foi demonstrada pela parasitemia e forte resposta imune sorológica.

Em 2009, após ter isolado a cepa responsável pela infecção congênita em uma gestante IgG positiva, Elbez-Rubinstein e colaboradores (2009) testaram a hipótese de reinfecção em um modelo animal. Eles primoinfectaram camundongos através de inóculo oral de 20 cistos com uma cepa clonal tipo II que expressa GFP, e desafiaram com a cepa recém-isolada atípica (20 cistos pela via oral), um ou quatro meses após a primoinfecção. A confirmação da reinfecção foi feita após seis semanas pela observação de cistos não corados no cérebro e através de PCR. Os resultados demonstraram que a reinfecção ocorreu em 10 dos doze animais desafiados, independente do tempo de primoinfecção.

Franco e colaboradores, em 2011, avaliaram a transmissão vertical de *T. gondii* no roedor *Calomys callosus* após reinfecção experimental com cepas heterólogas. Os animais foram primoinfectados pela via oral com a cepa avirulenta ME49 (clonal tipo II) e desafiados, já no primeiro dia de gestação, com 100 taquizoítos da cepa RH (clonal tipo I). Foram observados parasitos na placenta, porém não nos tecidos fetais, indicando que a primoinfecção preveniu a transmissão congênita nestas condições. Em 2015, Franco e colaboradores repetiram os experimentos, porém, realizaram o desafio com cepas atípicas. Os autores identificaram a presença de parasitos tanto da cepa da primoinfecção (clonal tipo II) quanto de cepas atípicas nos fetos dos animais reinfectedos. Os autores concluíram que durante a gestação a proteção contra o *T. gondii* pode ser alterada particularmente quando cepas não clonais estão envolvidas nesse processo.

Jensen e colaboradores (2015) estudaram camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com uma cepa tipo III (10^4 taquizoítos inoculados intraperitonealmente) submetidos ao desafio 30 dias após a infecção primária. O desafio foi feito com inóculo intraperitoneal de taquizoítos de diferentes cepas atípicas. Eles observaram que a

infecção primária não protegeu contra a maioria dos desafios. No cérebro dos animais desafiados sobreviventes foi verificada a presença simultânea da cepa da primoinfecção e da cepa do desafio. Os autores hipotetizaram que essas evidências poderiam estar relacionadas com a estrutura populacional não clonal de *T. gondii* na América do Sul. Nessa região a maioria dos isolados são letais numa primoinfecção, mas acredita-se que não seriam letais num evento de reinfecção. Isso proporcionaria a presença de duas cepas em uma mesma presa e, conseqüentemente, facilitaria a ocorrência de recombinação nos felídeos, dessa forma ampliando a diversidade genética da espécie.

A reinfecção experimental em camundongos com cepas atípicas tem sido estudada pelo nosso grupo. Utilizando um modelo no qual tanto a infecção primária quanto o desafio foram realizados pela via oral, Brandão e colaboradores (2009) demonstraram que as taxas de reinfecção aumentam com o passar do tempo da infecção primária. Provavelmente essa diferença se deva ao aumento dos níveis de IL-10 em relação ao IFN- γ comparando animais cronicamente infectados pela cepa D8 (atípica) com 45 e 180 dias de infecção. Essa cepa foi utilizada na primoinfecção e as citocinas quantificadas em cultura de esplenócitos estimulados com antígeno de *T. gondii*. Os autores encontraram ainda diferenças nas taxas de reinfecção dependendo da cepa utilizada no desafio. A confirmação da reinfecção se deu através do bioensaio i.p. do cérebro dos animais sobreviventes seguido de PCR-RFLP do DNA extraído dos taquizoítos recuperados do peritônio. No grupo de camundongos infectados pela cepa D8 e desafiados pela cepa atípica CH3 (D8+CH3) não foi demonstrada reinfecção quando o desafio ocorreu 45 dias após a infecção primária. No caso do desafio com a cepa atípica EGS (D8+EGS), a reinfecção foi confirmada em 75% dos casos. Quando o desafio foi realizado após 180 dias da infecção primária a reinfecção foi confirmada em 66,7% dos casos no grupo D8+CH3 e em 100% no grupo D8+EGS. Os autores

avaliaram ainda a produção de anticorpos e observaram um pequeno aumento, porém significativo, de IgA e IgG1 séricos no 180º dia após a infecção (dpi) em relação ao 45 dpi.

Posteriormente os experimentos de desafio após 45 dias da infecção primária foram repetidos, porém comparando camundongos resistentes da linhagem BALB/c aos camundongos C57BL/6 susceptíveis (Brandão et al., 2011). Em C57BL/6 as taxas de reinfecção foram maiores e a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 foi menor do que nos BALB/c, ressaltando que a ocorrência de reinfecção também é dependente do *background* genético do hospedeiro. Por fim, também foi demonstrado pelo nosso grupo que a imunossupressão aumenta as taxas de reinfecção (Silva et al., 2012).

Apesar dos avanços e contribuições do nosso grupo ainda restam diversas questões a serem respondidas nesse modelo, tanto aquelas relacionadas ao parasito quanto as envolvidas na resposta imune do hospedeiro. Podemos citar, por exemplo, como se dá a disseminação da cepa durante a reinfecção em um hospedeiro imune, qual seria a participação das proteínas de virulência no processo de reinfecção, o que ocorre na resposta imune do hospedeiro durante o processo e quais as alterações sofridas pelo hospedeiro reinfestado, dentre outras.

2. JUSTIFICATIVA

T. gondii apresenta grande importância na transmissão congênita, sendo responsável por abortos, natimortos e mortalidade neonatal. Esse parasito é modelo para diversos estudos em imunologia e nesse campo existe um paradigma estabelecido de que a infecção prévia por *T. gondii* protege o hospedeiro em uma subsequente reexposição devido à geração de uma memória imunológica protetora. Contudo, após relatos de casos que identificaram a reinfecção natural em humanos, alguns modelos animais de reinfecção têm sido estudados. A maioria deles se baseia no estudo com cepas clonais da América do Norte e Europa. Entretanto, o Brasil é sabidamente uma região com extensa diversidade genética e alta prevalência do parasito. Esses dois fatores juntos, sugerem que as chances de reexposição do hospedeiro a uma cepa do parasito geneticamente distinta são maiores nessa região do que em outras partes do mundo. Esse fato torna-se especialmente importante no caso de gestantes positivas para IgG anti- *T. gondii* que atualmente tem o risco de toxoplasmose congênita descartado pela maioria dos médicos ginecologistas. Apesar da confirmação experimental da reinfecção, pouco se sabe sobre os eventos que ocorrem nos momentos iniciais após o desafio com uma nova cepa, nem o que diz respeito à resposta do hospedeiro, ou ao comportamento de disseminação do parasito. Como a possibilidade de transmissão congênita existe justamente na fase aguda da infecção, é de suma importância aprimorar o conhecimento dos mecanismos de reinfecção nos momentos iniciais após o desafio. A compreensão desses eventos poderão ser extrapolados para a história natural da doença promovendo o conhecimento para o desenvolvimento futuro de ferramentas terapêuticas e profiláticas para a toxoplasmose.

Além disso, conhecer a variabilidade de fatores de virulência em cepas brasileiras de genótipo recombinante assim como as suas implicações nos eventos de reinfecção pode

auxiliar no entendimento da estrutura populacional do parasito na América do Sul e permitindo uma associação da maior gravidade das manifestações clínicas em pacientes deste continente.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a dinâmica da reinfecção por *T. gondii* e as suas consequências patológicas e imunológicas em um modelo experimental agudo de camundongos reinfectedados com cepas atípicas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferenças biológicas no hospedeiro murino após o desafio com diferentes cepas de *T. gondii*, utilizando como parâmetros a mortalidade, a variação no peso corporal, o número de cistos cerebrais nos grupos controle e experimentais.
- Verificar a presença de DNA de *T. gondii* cepa-específica em diferentes órgãos (pulmão, cérebro e intestino) dos camundongos a fim de estabelecer a dinâmica de disseminação do parasito após o desafio e a possível ocorrência de reinfecção localizada ou sistêmica.
- Verificar as possíveis alterações patológicas no íleo, pulmões, baço, fígado e cérebro dos camundongos experimentalmente infectados e reinfectedados com diferentes cepas de *T. gondii*.
- Quantificar as citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p70, IL-17, INF- γ , TNF- α e TGF- β no intestino dos animais desafiados e controle 48 horas após o desafio.
- Quantificar a cinética das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF- γ , TNF, IL-17A e IL-10 no soro dos animais desafiados e controle.
- Caracterizar os alelos de quatro genes codificadores das proteínas (ROP5, ROP16, ROP18 e GRA15) relacionadas à virulência nas cepas atípicas utilizadas neste modelo de reinfecção e associar o tipo da proteína ao perfil da resposta imune induzida *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CAMUNDONGOS

Fêmeas de camundongos BALB/c, de 6 a 8 semanas, foram utilizadas neste trabalho tanto para a manutenção das cepas de *T. gondii* quanto para os experimentos de reinfecção. Os camundongos foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia ICB-UFMG. Todos os animais utilizados nesse experimento foram tratados com o anti-helmíntico Sulfóxido de Albendazol (Ouro Fino Saúde Animal LTDA) na concentração de 0,6 µg/mL disponibilizado em bebedouro por 24 horas duas semanas antes do início do experimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo número 348/2012 (Anexo 1).

4.2. CEPAS DE *T. GONDII*

Neste estudo foram empregadas três cepas de *T. gondii* que possuem genótipos atípicos e distintos entre si. A virulência das cepas foi definida em estudos anteriores através do inóculo gradual de 10^0 a 10^3 taquizoítos intraperitonealmente, de acordo com os critérios de classificação definidos por Ferreira e colaboradores (2001). A genotipagem das cepas foi realizada recentemente por Silva e colaboradores (2014) através da técnica de PCR-RFLP utilizando 11 marcadores padronizados internacionalmente (Su et al., 2006).

A cepa D8 foi isolada de um cão eutanasiado no Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte no ano 2000. É uma cepa classificada como avirulenta (Brandão et. al., 2006), uma vez que se observou a sobrevivência da totalidade dos animais infectados, independente da dose de taquizoítos inoculados. Esta cepa possui o genótipo ToxoDB #8 (Silva et. al., 2014) que foi descrito por Pena e colaboradores (2008) como sendo um

genótipo clonal brasileiro denominado BrIII. Atualmente, de acordo com o banco de dados online ToxoDB (www.toxodb.org), esse mesmo genótipo já foi descrito em várias regiões do país e em diferentes hospedeiros: galinhas, gatos, porcos, capivaras, cachorros, gambás, ovelhas e, inclusive, em recém-nascidos infectados pela via congênita (Carneiro et al., 2013).

A cepa EGS foi isolada de líquido amniótico de um caso de toxoplasmose congênita no Hospital das Clínicas da UFMG no ano de 1998 (Vidigal et al., 2002) e foi caracterizada como virulenta por possuir a dose letal para 100% dos animais infectados correspondente a 10^0 taquizoíto em camundongos experimentalmente infectados (Ferreira et al., 2001). Essa cepa possui o genótipo ToxoDB #229 (Silva et al., 2014). Até o momento não foi encontrado nenhum outro isolado de *T. gondii* possuindo esse mesmo genótipo na literatura e no ToxoDB.

A cepa CH3 foi isolada de galinha caipira da zona metropolitana de Belo Horizonte no ano 2000. Essa cepa possui virulência intermediária, uma vez que foi verificada a sobrevivência de um animal com inoculo de 10^0 taquizoítos (Brandão et al., 2006), e genótipo ToxoDB #19 (Silva et al., 2014). Esse é um genótipo bastante frequente no Brasil. De acordo com o ToxoDB já foi descrito em gatos, bovinos, capivara, galinhas, coelhos e morcegos. Os resultados obtidos na genotipagem das cepas D8, EGS e CH3 por Silva e colaboradores (2014) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Genotipagem através de PCR-RFLP multilocus das cepas D8, EGS e CH3 de *Toxoplasma gondii*.

CEPA	SAG1	5'-3' SAG2	SAG2 alt	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico
D8	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III
EGS	I	I	II	III	III	II	I	I	I	II	I
CH3	I	III	III	III	III	III	I	I	I	U-1	I

Adaptado de Silva et al., 2014

4.3. INFECÇÃO PRIMÁRIA E DESAFIO COM CEPAS DE *T. GONDII*

Os cistos utilizados na infecção e desafio dos animais foram obtidos de camundongos BALB/c com um a três meses de infecção de acordo com Brandão e colaboradores (2009).

A infecção primária dos animais experimentais ocorreu com 10 cistos da cepa D8. Após a contagem dos cistos realizou-se a diluição do material em PBS pH 7,2 estéril suficiente para se obter uma concentração de 10 cistos em 100 µL. Esse material foi inoculado nos animais experimentais pela via oral com o auxílio de agulha de gavagem.

A infecção primária dos animais experimentais foi confirmada após 30 dias através da pesquisa de IgG anti-*T. gondii* por ELISA em eluato de sangue em papel filtro. O sangue foi coletado por lancetamento da cauda dos camundongos. Três picotes de 0,5 mm de papel filtro com sangue seco foram eluídos por 30 minutos em 0,5 ml de PBS a temperatura ambiente, resultando em uma diluição aproximada de 1:50 (Machado Coelho et al., 1995). Foram incluídos em cada placa dois eluatos controle positivos e seis eluatos negativos, previamente testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). As placas foram incubadas a 37°C durante 45 minutos.

O delineamento experimental encontra-se representado na Figura 1. Os animais com infecção crônica confirmada foram desafiados 45 dias após a infecção primária. O desafio ocorreu com 10 cistos da cepa EGS (grupo D8+EGS), CH3 (grupo D8+CH3) ou da própria cepa D8 (D8+D8). Esse último grupo visa elucidar o comportamento do hospedeiro frente a um novo estímulo com o mesmo repertório antigênico.

Para um controle da infecção aguda promovida pelas cepas em estudo, grupos de animais *naive* foram infectados com 10 cistos da cepa EGS, CH3 ou D8 e compuseram, respectivamente, os grupos: EGS agudo, CH3 agudo e D8 agudo.

Uma parcela dos animais crônicos não foi desafiada e representa o grupo controle da infecção crônica, denominado D8 crônico. Esse grupo recebeu apenas 100 µL de PBS estéril pH 7,2 pela via oral no momento do desafio.

Outra parcela de animais não foi infectada e nem desafiada. Esse grupo recebeu 100 µL de PBS estéril pH 7,2 pela via oral no momento da infecção e/ou desafio e compuseram, portanto, o grupo controle não infectado, denominado PBS.

As análises foram realizadas no período de duas semanas, o que correspondente à fase aguda da reinfeção. Nesse intervalo foram escolhidos os pontos: 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio. Foram avaliadas nesses pontos: a cinética de disseminação do parasito através de ferramentas moleculares (PCR-RFLP), a resposta imunológica do hospedeiro através da quantificação de citocinas locais (intestino) e sistêmicas (soro), e também a contagem do número de cistos cerebrais. Os eventos histológicos são subsequentes às alterações bioquímicas e, portanto, não detectáveis num prazo muito curto após a infecção. Por isso optou-se pelo maior intervalo de dias após o desafio no qual havia animais vivos de todos os grupos experimentais para a realização da avaliação histopatológica. Esse momento foi definido em estudo piloto prévio como sendo o 9º dia após o desafio (dados não mostrados). A mortalidade foi avaliada diariamente e a pesagem dos animais a cada dois dias ao longo dos 30 dias após o desafio (Figura 1).

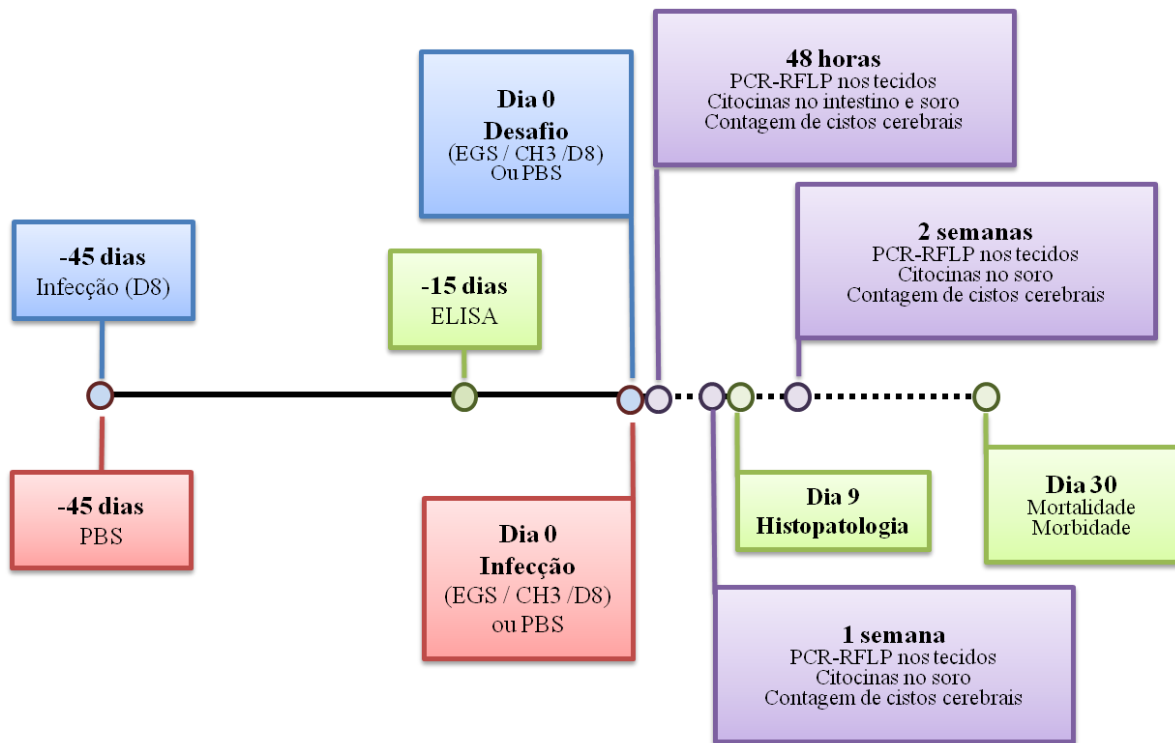


Figura 1: Representação do delineamento experimental. As análises moleculares por PCR-RFLP no fígado, pulmão e cérebro foram realizadas 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio ($n = 7$ camundongos BALB/c/grupo). A quantificação de citocinas no fígado foi realizada 48 horas após o desafio ($n = 7$ camundongos BALB/c /grupo). A quantificação de citocinas no soro foi realizada 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio ($n = 7$ camundongos BALB/c /grupo). A contagem dos cistos cerebrais foi realizada 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio ($n = 7$ camundongos BALB/c /grupo). A análise histopatológica foi realizada nove dias após o desafio ($n = 3$ animais/grupo). A mortalidade foi avaliada diariamente ($n = 10$ camundongos BALB/c /grupo) e a pesagem dos animais ($n = 6$ camundongos BALB/c /grupo) a cada dois dias durante 30 dias (representada na figura pela linha tracejada).

4.4. CRITÉRIOS DE MORTALIDADE E MORBIDADE

A curva de sobrevivência foi realizada a partir do registro diário da mortalidade de dez camundongos de cada grupo durante 30 dias após o desafio conforme Pinheiro e colaboradores (2015).

Para avaliação da perda de peso como critério de morbidade, seis camundongos de cada grupo experimental foram pesados em balança digital portátil semi-analítica de dois em dois dias durante 30 dias a partir da data do desafio. A pesagem dos animais ocorreu sempre no período matutino. Foi obtido o peso corporal individual de cada

camundongo. No dia do desafio, dia 0, o peso de cada animal foi considerado 100%. Nos outros dias foi calculada a porcentagem do peso em relação ao peso inicial no dia 0. A comparação entre os grupos se deu através da mediana da porcentagem do peso de cada animal em cada dia de experimento.

Para a contagem do número de cistos cerebrais sete animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical respectivamente com 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio. O cérebro foi retirado e o quarto inferior direito foi macerado a seco em tubos de hemólise e suspenso e homogeneizado em 250 µl de PBS pH 7,2 estéril. A contagem dos cistos foi feita em duplicata, cada uma contendo 10 µL do material que foi examinado ao microscópio óptico entre lâmina e lamínula. Foi considerada a média das duplicatas e o número de cistos totais no cérebro foi estimado a partir desse valor.

4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA REINFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO DO PARASITO ATRAVÉS DE PCR-RFLP

4.5.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDOS DE CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Sete camundongos de cada grupo experimental foram sacrificados 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio por deslocamento cervical e foram coletados para análise molecular o cérebro, os pulmões e o íleo. A quarta parte superior direita do cérebro foi utilizada nos ensaios moleculares.

O fragmento de cérebro e os pulmões foram armazenados a -20 °C até o momento da extração de DNA que foi realizada utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®), com modificações no protocolo do produto. Após o descongelamento dos

órgãos em temperatura ambiente, foi retirado um fragmento de região aleatória do pulmão (aproximadamente 70 mg). Esse fragmento assim como o quarto de cérebro, foi macerado com o auxílio de um homogeneizador de tecidos para tubos de microcentrífuga modelo Z359971-1EA (Sigma-Aldrich®). Ao tecido macerado foram adicionados 500 µL da solução de lise nucleica fornecida no kit, 100 µL EDTA 0,5 M e 20 µL de proteinase K (20mg/mL). A suspensão permaneceu a 55 °C *overnight*. Foi adicionado 3 µL de RNase e feita a homogeneização por inversão do tubo seguida de incubação de 30 minutos a 37 °C. Após manter as amostras a temperatura ambiente por cinco minutos, foram adicionados 200 µL de solução de precipitação de proteínas, seguida de homogeneização no vórtex por 20 segundos, resfriamento no gelo por 5 minutos e centrifugação a 16.000 x g por 5 minutos. O DNA presente no sobrenadante foi precipitado após transferência para um novo tubo contendo 600 µL de isopropanol. Em seguida, o precipitado foi centrifugado por 1,5 minutos a 16.000 x g, o sobrenadante foi descartado e lavado duas vezes com etanol 70%. O tubo contendo o DNA extraído foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos, reidratado com água ultrapura para PCR (Phoneutria®) e armazenadas a 4°C para posterior amplificação.

O intestino foi aberto longitudinalmente, o conteúdo foi retirado e a mucosa lavada em PBS estéril pH 7,2. Foi coletado 100 mg da porção terminal do intestino delgado, correspondente ao íleo, e o restante do material descartado. O intestino foi armazenado a -80 °C até o seu processamento. O íleo foi macerado com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.) em solução tampão contendo inibidores de protease (SigmaFast™) para coleta do sobrenadante a fim de realizar a quantificação de citocinas, como será detalhado no item 4.7.1. O pellet resultante deste procedimento foi lavado uma vez com PBS estéril pH

7,2 e a extração de DNA se deu conforme descrito anteriormente para o pulmão e o cérebro.

4.5.2. PADRONIZAÇÃO DE MARCADOR MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DA CEPA

DESAFIO EM TECIDO DE CAMUNDONGOS

Dos 11 marcadores empregados na genotipagem, quatro marcadores genômicos diferenciam a cepa utilizada na primoinfecção (D8) das cepas utilizadas no desafio (EGS e CH3), são eles: c22-8, c29-2, L358 e PK1 (Silva et. al., 2014). Dessa forma, foi realizada uma reação de *Multiplex-Nested* PCR em quatro *loci* segundo Su et al. (2010). As reações de amplificação por *Multiplex* PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ L, contendo 2,5 μ L de Tampão 5X *green* (Promega®), 25 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen®), 5 u/ μ L de *Taq* DNA polimerase (Promega), 25 μ M de cada iniciador e 1,5 μ L de DNA molde. Nos ensaios de padronização o DNA molde utilizado foi extraído do pulmão dos camundongos dos grupos D8+EGS e D8+CH3 48 horas, uma e duas semanas após o desafio. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em cada reação. A reação foi feita no termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus, com as seguintes etapas: desnaturação a 95 °C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de: 94 °C por 30 segundos; 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos.

Em seguida foram realizadas as reações de *Nested* PCR para cada um dos quatro pares de iniciadores internos, individualmente, tendo como DNA molde o produto da primeira reação diluído 1:2. Esta nova PCR teve volume final de 25 μ L, contendo 2,5 μ L de Tampão 5X *green* (Promega), 25 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen®), 5 u/ μ L de *Taq* DNA polimerase (Promega®), 10 μ M do iniciador interno forward, 10 μ M do iniciador interno reverse e 1,5 μ L do

produto do *Multiplex* PCR diluído 1:2. A *Nested* PCR seguiu as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 60°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos. O produto desta segunda reação foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e corado com nitrato de prata.

Os produtos da *Nested* PCR foram digeridos utilizando-se as endonucleases de restrição apropriadas (Tabela 2). As digestões foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo 3 µL do produto da *Nested* PCR diluído 1:5, 1 µL do tampão CutSMART™ (New England Biolabs) e 1 unidade de cada endonuclease de restrição específica (New England Biolabs), a 37 °C, por três horas. Após a digestão o DNA foi purificado por extração com igual volume de fenol/clorofórmio (1:1), submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata e fotografado. Os perfis de bandas resultantes foram comparados com os perfis de cepas D8, EGS e CH3 individualmente cujo DNA foi obtido de taquizoítos recuperados do exudato peritoneal de camundongos previamente infectados.

Tabela 2: Sequência de iniciadores externos e internos utilizados na *Multiplex* e na *Nested PCR*, respectivamente, assim como tamanho do fragmento de DNA obtido e endonucleases de restrição utilizadas para cada um dos marcadores genômicos testados.

Marcadores	Iniciadores Externos	Iniciadores internos	Tamanho do fragmento (pb)	Enzimas de restrição
C22-8	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R:AGGTGCTTGGATATTCGC	521	BsmAI+MboII
C29-2	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATAACAT	F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC R:TGTCTAGGAAAGAGGCCGC	446	HpyCH4IV+RsaI
L358	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTCCTCGAAGACAGG	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	HaeIII+NlaIII
PK1	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	AvaI+RsaI

Adaptado de Su e colaboradores (2010).

4.5.3. NESTED PCR-RFLP DO *LOCUS* L358

As reações para amplificação do *locus* L358 foram realizadas através de *Nested* PCR. As reações de PCR contendo os iniciadores externos foram realizadas nas mesmas condições que as reações de *Multiplex* descritas no item anterior. O DNA extraído do íleo, pulmão e cérebro foi utilizado como molde. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em cada reação. Em seguida, foram realizadas as reações com o par de iniciadores internos (*Nested*). Esta reação continha volume final de 25 μ L, contendo 2,5 μ L de Tampão 5X green (Promega), 25 mM de $MgCl_2$, 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen®), 5 u/ μ L de *Taq* DNA polimerase (Promega®), 10 μ M de cada iniciador e 1,5 μ L do produto da PCR realizada anteriormente com os iniciadores externos diluído 1:2. A PCR seguiu as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 65°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos. O produto final foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e corado com nitrato de prata e fotografado. Novamente os perfis de bandas encontrados após digestão foram comparados com os perfis de cepas isoladamente, D8, EGS e CH3, conforme descrito no item anterior.

4.6. HISTOPATOLOGIA

Três camundongos de cada grupo foram eutanasiados ao 9º dia após o desafio com sobredose de anestésico (cetamina e xilazina), administrada pela via intraperitoneal. O cérebro foi fixado em formaldeído 8% por 24h, e em seguida a solução foi substituída por formaldeído tamponado a 10%. O fígado, o baço e o pulmão foram coletados e fixados em formaldeído 10%. A porção do íleo do intestino delgado foi coletada, estendida com a serosa em contato com papel filtro e aberta pela borda anti-mesentérica

retirando-se cuidadosamente todo o conteúdo. Esses fragmentos foram imersos em solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial, para pré-fixação, até serem enrolados em espiral com a mucosa voltada para dentro, formando um “rolo suíço” permitindo uma análise de toda a extensão do segmento em uma única lâmina (Arantes e Nogueira, 1997). Após serem fixadas em formaldeído tamponado a 10%, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em duas trocas de xilol, embebidas e incluídas em parafina. Os blocos de parafinas obtidos foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes semi-seriados entre 3 e 5 micrômetros e, em seguida, corados com hematoxilina-eosina (H&E). Foram avaliados os aspectos qualitativos decorrentes da infecção e reinfecção por *T. gondii* nos tecidos. As imagens obtidas ao microscópio foram capturadas com resolução de 1392 X 1040 pixels e transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador através do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

4.7. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

4.7.1. CITOCINAS NO HOMOGENATO DE INTESTINO

Os níveis de citocinas presentes na mucosa intestinal de camundongos infectados foram avaliados no homogenato obtido pela maceração de 100 mg de tecido coletado 48 horas após o desafio. O intestino dos animais foi aberto longitudinalmente e lavado com PBS estéril pH 7,2. Cerca de 100 mg da porção final do intestino, correspondente ao íleo foi recolhido, pesado e congelado a -80 °C. A maceração do órgão foi realizada com auxílio de um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.) na presença de 1 mL de solução de inibidor de protease constituída por

PBS contendo 0,05% de Tween20, 0,5% de albumina de soro bovino (BSA), 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e inibidores de serina, cisteína e metaloproteases presentes no SigmaFAST™ Protease Inhibitor Tablet (AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, Bestatin 130 µM, E-64 µM, Leupeptin 1 µM e Aprotinin 0,3 µM). A proporção utilizada foi de 1 mL de solução de inibidores de protease para cada 100 mg de tecido de acordo com o protocolo descrito por Negrão-Corrêa e colaboradores (2004). O homogenato resultante foi centrifugado a 4° C por 10 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante recolhido, aliquotado e imediatamente congelado a -80 °C para posterior quantificação de citocinas através da técnica de ELISA. Foram quantificadas as citocinas IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p70, IL-17, INF- γ , TNF- α e TGF- β utilizando kits comerciais da R&D Systems (MN, USA) e a reação foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Foi realizada, para cada placa, regressão linear com os valores de absorbância obtidos após diluição seriada do padrão de citocinas fornecido pelo kit. A estimativa da concentração das citocinas foi feita através de interpolação na reta resultante da média da absorbância das duplicatas das amostras.

4.7.2. CITOCINAS NO SORO

Para obtenção do soro os animais foram anestesiados com 0,1mL de solução anestésica Cetamina-Xilazina (nas concentrações de 10mg/mL e 2mg/mL, respectivamente) para cada 10g de peso do animal. Os camundongos anestesiados foram sangrados através do plexo axilar com 48 horas. Outros dois grupos de camundongos foram sangrados com uma e duas semanas após o desafio. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 1000 x g e o soro obtido foi armazenado a -80 °C para posterior dosagem de citocinas.

A quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF- γ , TNF, IL-17A e IL-10 presentes no soro dos camundongos foi realizada através da técnica de citometria de fluxo, utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit apresenta uma alta sensibilidade, sendo capaz de detectar baixas concentrações destas citocinas. Em resumo, os soros e os padrões de citocinas fornecidos pelo kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para cada citocina, e também com anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após três horas de incubação no agitador orbital, foram acrescentados 160 μ l da solução de lavagem e o material centrifugado a 400 x g, 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as amostras foram resuspendidas em 200 μ l da solução de lavagem e a leitura foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo FACSverseTM (Becton Dickinson, USA). Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software BD CBA Analysis Software, por meio da obtenção de curvas de calibração a partir dos padrões de citocinas fornecidos no kit, sendo a concentração dos analitos na amostra determinado em pg/mL.

4.8. AVALIAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DAS PROTEÍNAS DO PARASITO ENVOLVIDAS NA VIRULÊNCIA

Foram obtidos taquizoítos das cepas D8, CH3, EGS assim como das cepas clonais tipo I (RH), tipo II (ME49) e tipo III (VEG) a partir do exudato intraperitoneal de camundongos BALB/c inoculados cinco dias antes com 300-400 cistos pela via intraperitoneal. O DNA dessas cepas foi obtido com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. DNA da cepa atípica MAS (u-1), gentilmente cedido pelo Dr. Chunley Su, também foi utilizado como controle.

Foi realizada uma genotipagem através de PCR-RFLP para os marcadores ROP5, ROP18, ROP16 e GRA15, conforme descrito por Dubey e colaboradores (2014). De acordo com os autores, esses marcadores revelam 5, 4, 2 e 2 alelos, respectivamente. Foi feita uma PCR simples com os iniciadores internos descritos pelos autores (Tabela 3) e o fragmento de DNA obtido foi digerido com as enzimas de restrição (New England Biolabs) e condições específicas (Tabela 3). A purificação do DNA assim como a obtenção das imagens do produto da PCR foi realizada conforme descrito no item 4.5.2. O padrão de bandas obtido foi comparado aos controles RH (tipo I), ME49 (tipo II), VEG (tipo III) e MAS (atípico – u-1).

Tabela 3: Sequência de iniciadores e descrição das condições de digestão com as endonucleases específicas para a genotipagem dos marcadores de virulência de *Toxoplasma gondii*: GRA15, ROP5, ROP16 e ROP18.

Marcadores	Iniciadores	Enzimas de restrição, tempo e temperatura de incubação	Interpretação
GRA15	F- GACCACCCAGAACAGAAAA R- CCCTTATCGGTTTTTGGTCA	Não é necessária a digestão com enzimas	Diferencia tipo II dos demais tipos (I, III ou atípico).
ROP5	F- GTGGCAGTTCAGTCTCAGC R- CGAAGTTGAGGAACCGTCT	BfaI * 37°C- 3 horas	Diferencia tipos I, II, III e atípico.
ROP16	F- ACCAAACCCAGCTTTCACC R- CGTCAACAGCTGACTCCAC	NlaIII + TaqαI, 37°C 1 hora e 10 min, e 65°C 1 hora e 30 min	Diferencia tipo II dos demais tipos (I, III ou atípico).
ROP18-UPS	F- AGCATGAGCTTAAGAGTTG R- CGCAAGACAGGCTGTCTTC	Não é necessária a digestão com enzimas	Tipo III tem PCR positiva. Tipos I, III ou atípico são negativos.
ROP18-DEL	F-AGTTCCCTTCCCTGGTGTCT R- CAAACTGGACTGGGGTGAG	ScrFI + MfeI 37°C- 3 horas	Tipo III é negativo. Diferencia tipos I, II e atípico.

* Foi utilizada a enzima BfaI, isosquizômero da enzima FspBI descrita originalmente por Dubey et al., 2014).

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados com o *software* GraphPad Prism 5.00 (Prism Software, Irvine, CA, USA) e as diferenças obtidas foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann Whitney. Para múltiplas comparações foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's para identificar entre quais grupos as diferenças se encontravam.

A identificação de valores *outlier* (valores discordantes, que se afastam do padrão geral dos dados) na contagem do número de cistos cerebrais foi feita no *software* disponível online Graphpad Quickcalcs (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>) através da análise de dados contínuos pelo teste de Grubbs. Os valores *outliers* encontrados foram retirados das análises estatísticas subsequentes.

5. RESULTADOS

5.1. MORTALIDADE

Os animais *naive* infectados com as cepas EGS e CH3 apresentaram mortalidade de 100%. No grupo EGS agudo todos os camundongos morreram entre o 9° e 10° dia após a infecção enquanto no grupo CH3 agudo a mortalidade ocorreu entre o 9° e 13° dia após a infecção. A infecção aguda com a cepa não virulenta D8 (D8 agudo) resultou na sobrevivência de 90% dos animais infectados (Figura 2). Por outro lado, os camundongos cronicamente infectados pela cepa D8 que foram desafiados, independente da cepa utilizada (D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8), apresentaram 100% de sobrevivência ao final do experimento. Essa taxa de sobrevivência foi a mesma observada para o grupo não desafiado (grupo D8 crônico - Figura 2).

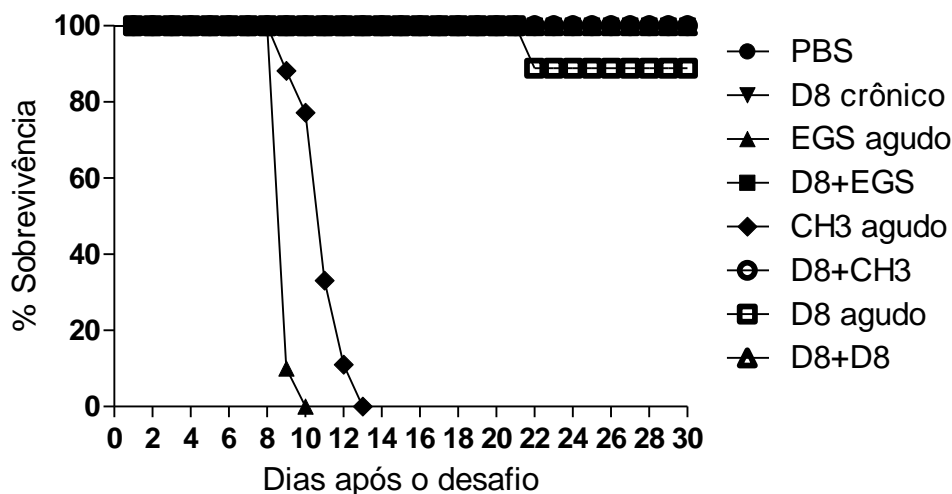


Figura 2: Taxas de sobrevivências dos camundongos desafiados com cepas de *Toxoplasma gondii*. A mortalidade foi observada durante 30 dias após o desafio (10 animais/grupo). Os grupos PBS, D8 crônico, D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8 apresentaram 100% de sobrevivência. Nenhum camundongo dos grupos EGS e CH3 agudo sobreviveu. O grupo D8 agudo apresentou sobrevivência de 90%. Camundongos não infectados (PBS); camundongos BALB/c infectados cronicamente com 10 cistos da cepa D8 (D8 crônico); camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa EGS (EGS agudo); camundongos BALB/c desafiados com 10 cistos da cepa EGS após a infecção primária com a cepa D8 (D8+EGS); camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa CH3 (CH3 agudo); camundongos BALB/c desafiados com 10 cistos da cepa CH3 após a infecção primária com a cepa D8 (D8+CH3); camundongos BALB/c infectados com 10 cistos da cepa D8 (D8 agudo); camundongos BALB/c desafiados com 10 cistos da cepa D8 após a infecção primária com a cepa D8 (D8+D8).

5.2. VARIAÇÃO NO PESO CORPORAL

Com exceção dos grupos com infecção aguda foi observado um ganho de peso ao longo do experimento em todos os grupos experimentais.

Os animais do grupo EGS agudo apresentaram perda de peso rápida e progressiva de forma que no 8º dia após o desafio a mediana desse grupo foi significativamente diferente daquela dos grupos PBS, D8 crônico e D8+EGS (Figura 3A). O grupo desafiado, D8+EGS, por sua vez, apresentou ligeiro aumento do peso corporal ao longo dos 30 dias e a mediana deste grupo não foi diferente estatisticamente da mediana dos grupos controles PBS e D8 crônico em nenhum momento analisado (Figura 3A).

Os animais do grupo CH3 agudo apresentaram a porcentagem do seu peso estatisticamente inferior àquela do grupo PBS, desde o 6º até o 10º dia após a infecção. No 8º dia após a infecção também foi observada diferença entre este grupo e o grupo D8 crônico (Figura 3B). A perda de aproximadamente 20% do peso corporal foi irreversível no grupo CH3 agudo, assim como em EGS agudo, e todos os animais sucumbiram à infecção conforme demonstrado na Figura 2. Apesar da porcentagem de peso do grupo D8+CH3 aumentar ao longo do experimento, foi observada diferença significativa quando comparada ao controle não infectado (PBS) no 12º e no 26º dias após a infecção. Também foi observada diferença entre este grupo e o D8 crônico nos dias 18, 24 e 28 após a infecção (Figura 3B).

Os animais com infecção aguda pela cepa D8 apresentaram o peso significativamente inferior aos do grupo PBS do 16º até o 22º dia e novamente ao 28º dia. Também foi observada diferença estatística deste grupo em relação ao grupo D8 crônico desde o 18º dia até o final do experimento. O grupo D8 agudo chegou ao final dos 30 dias de experimento com a mediana do peso praticamente igual àquela apresentada no dia 0.

Pontualmente no dia 26 o grupo D8+D8 apresentou porcentagem do peso inferior ao grupo D8 agudo. Em todos os demais dias não foi observada diferença entre o peso de D8+D8 e o peso de nenhum outro grupo (Figura 3C).

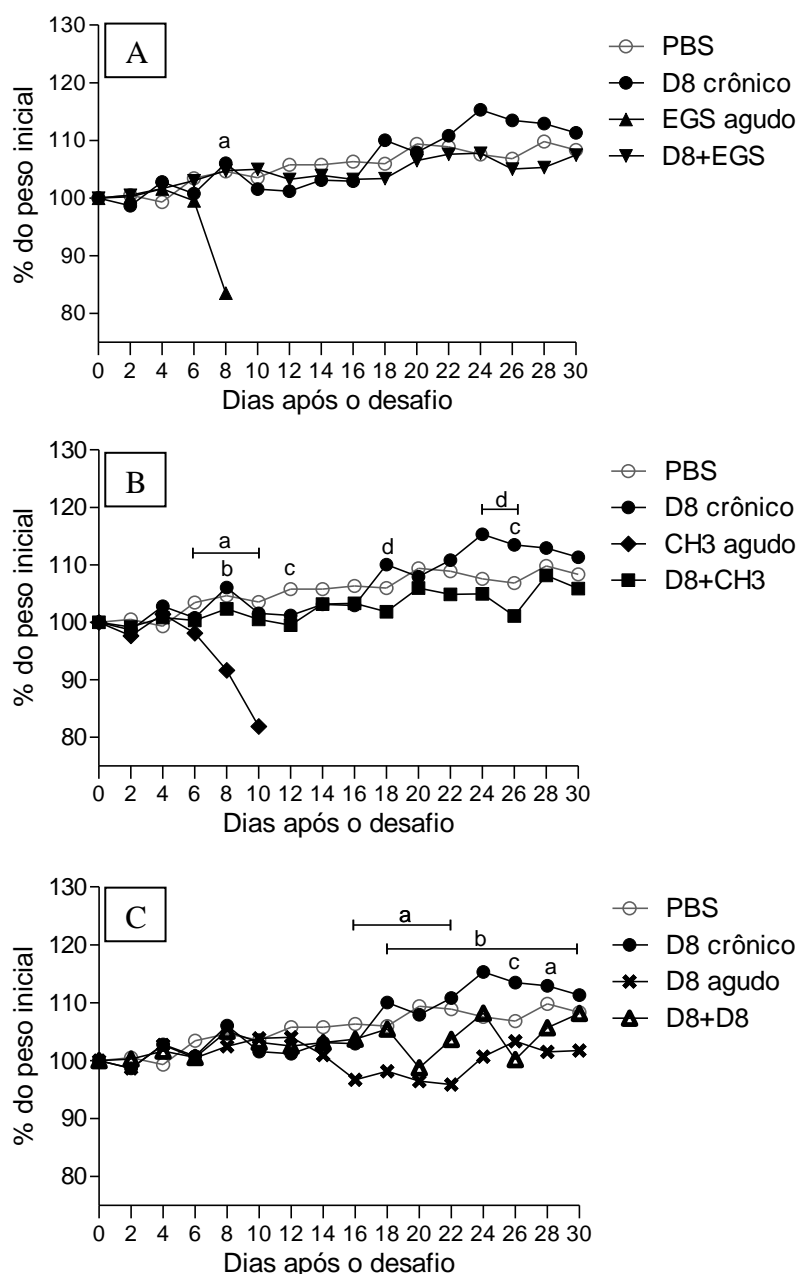


Figura 3: Cinética de ganho de peso de camundongos desafiados com cepas de *T. gondii* e controles. Estão representadas as medianas de cada grupo (6 animais/grupo) nos dias em que a pesagem foi realizada. As letras distintas representam valores significativamente diferentes ($P < 0.05$, teste Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's). **A)** Curva de variação do peso corporal dos animais desafiados com a cepa EGS e seus controles. a = grupo EGS agudo tem peso estatisticamente diferente dos demais grupos. **B)** Curva de variação do peso corporal dos animais desafiados com a cepa CH3 e seus controles. a = CH3 agudo é diferente de PBS, b = CH3 agudo é diferente de D8 crônico, c = D8+CH3 é diferente de PBS, d = D8+CH3 é diferente de D8 crônico. **C)** Curva de variação do peso corporal dos animais desafiados com a cepa D8 e seus controles. a = D8 agudo é diferente de PBS, b = D8 agudo é diferente de D8 crônico, c = D8+D8 é diferente de D8 agudo.

5.3. NÚMERO TOTAL DE CISTOS CEREBRAIS

Não foram encontrados cistos cerebrais no grupo controle não infectado (PBS) em nenhum dos dias avaliados conforme esperado. Não foram encontrados cistos cerebrais nos grupos EGS e CH3 agudo nos dias em que foi possível realizar o exame, ou seja, 48 horas e uma semana após a infecção. Após duas semanas de infecção pela cepa D8 apenas um animal do grupo D8 agudo apresentou cistos visíveis, sendo o valor médio encontrado de 500 cistos no cérebro.

Após a retirada dos valores *outliers*, a mediana do número de cistos foi comparada entre os grupos desafiados (D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8) e o grupo D8 crônico. Não foi observada diferença entre as medianas do número de cistos dos grupos desafiados e grupo controle da infecção crônica (D8 crônico) em nenhum dos dias analisados (Figura 4).

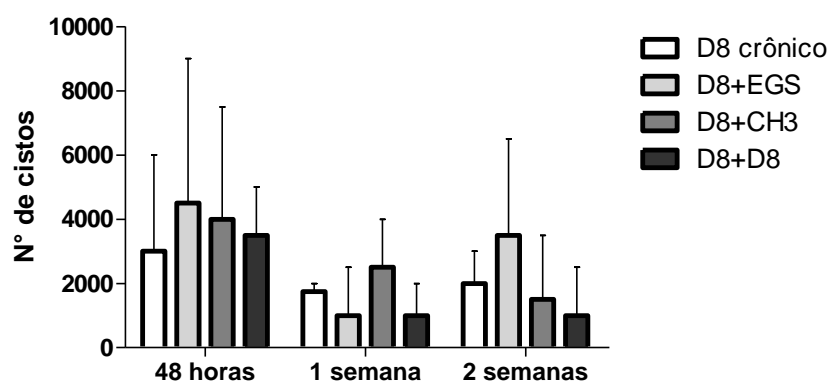


Figura 4: Mediana do total de cistos cerebrais nos grupos desafiados (D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8) e no grupo D8 crônico 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio.

5.4. OCORRÊNCIA DE REINFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO DO PARASITO

5.4.1. MARCADORES GENÔMICOS APRESENTAM EFICÁCIA VARIÁVEL NA DETECÇÃO DA REINFECÇÃO

A menor eficiência de amplificação foi obtida com o marcador c29-2 (Tabela 4). Do total de 42 amostras testadas, apenas 36 amplificaram adequadamente (85,7%). Para os marcadores PK1 e c22-8, a eficiência foi 88,1% (37/42) e 95,2% (40/42), respectivamente. Quando o marcador L358 foi utilizado, do total de 42 amostras de DNA de pulmão testadas, 41 amostras foram PCR positivas (97,6%) (Tabela 4).

Além da diferença observada nas taxas de amplificação, os marcadores também apresentaram diferença na capacidade de detectar a ocorrência de reinfecção (infecções mistas). Os marcadores PK1 e c22-8 apenas identificaram a presença da cepa EGS, como um perfil misto no grupo D8+EGS, em 28,6% dos camundongos duas semanas após o desafio. O marcador C22-8 ainda identificou a presença da cepa CH3 no grupo D8+CH3 duas semanas após o desafio em 14,3% dos animais (Tabela 4).

O marcador c29-2 foi capaz de identificar a cepa EGS no grupo D8+EGS duas semanas após o desafio em 33,3% dos camundongos e a cepa CH3 no grupo D8+CH3 uma semana (14,3%) e duas semanas após o desafio (80%). Finalmente, o marcador L358 identificou a presença da cepa EGS no grupo D8+EGS em 71,4% das amostras 48 horas após o desafio e em 100% delas, uma e duas semanas após o desafio. Para o grupo D8+CH3, o marcador L358 demonstrou a presença da cepa CH3 em todas as amostras de DNA de pulmão que foram positivas na PCR em todos os momentos testados (Tabela 4).

Por possuir a maior eficiência tanto na amplificação quanto na identificação da presença da cepa usada no desafio, o marcador L358 foi selecionado para os estudos posteriores.

Os resultados individuais de cada camundongo para os quatro marcadores moleculares testados encontram-se no Anexo 2.

Tabela 4: Eficiência de amplificação e demonstração da reinfecção por *Toxoplasma gondii* para os marcadores *PK1*, *c22-8*, *c29-2* e *L358* no DNA extraído dos pulmões de camundongos BALB/c cronicamente infectados pela cepa D8 e desafiados com as cepas EGS (D8+EGS) ou CH3 (D8+CH3) 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio.

Grupos		<i>PK1</i> ^a		<i>c22-8</i> ^a		<i>C29- 2</i> ^a		<i>L358</i> ^a	
		PCR +	RFLP	PCR +	RFLP	PCR +	RFLP	PCR +	RFLP
D8 + EGS	48 horas	5/7 ^b	100% III	7/7	100% II	5/7	100% III	7/7	71.4% III+I / 28.6% III
	1 semana	6/7	100% III	6/7	100% II	7/7	100% III	7/7	100% III+I
	2 semanas	7/7	28.6% III+II / 71.4% III	7/7	28.6% II+I / 71.4% II	6/7	33.3% III+I / 66.6% III	7/7	100% III+I
D8 + CH3	48 horas	6/7	100% III	6/7	100% II	6/7	100% III	6/7	100% III+I
	1 semana	7/7	100% III	7/7	100% II	7/7	14.3% III+I / 85.7% III	7/7	100% III+I
	2 semanas	6/7	100% III	7/7	14.3% II+I / 85.7% II	5/7	80% III+I / 20% III	7/7	100% III+I
Total		37/42		40/42		36/42		41/42	

^aPK1= cepa D8 (tipo III), cepa EGS (tipo II), cepa CH3 (tipo u-1)

c22-8= cepa D8 (tipo II), cepa EGS (tipo I), cepa CH3 (tipo I)

c29-2= cepa D8 (tipo III), cepa EGS (tipo I), cepa CH3 (tipo I)

L358= cepa D8 (tipo III), cepa EGS (tipo I), cepa CH3 (tipo I) (de acordo com a TABELA 1)

^b Amostras positivas na PCR/total de amostras testadas

5.4.2. DISSEMINAÇÃO DOS PARASITOS NOS ANIMAIS DESAFIADOS

Durante a infecção aguda independente das cepas utilizadas (EGS agudo, CH3 agudo e D8 agudo), o DNA do parasito não foi detectado 48 horas após a infecção em nenhum órgão testado (Tabela 5).

Pra o grupo D8 agudo, DNA do *T. gondii* estava presente em 100% do íleo e pulmões dos camundongos uma semana após a infecção. Duas semanas após a infecção, além do íleo e pulmões, o cérebro de todos os animais também apresentavam DNA da cepa D8. Para o grupo EGS agudo foi detectado DNA do parasito no íleo dos sete animais testados, mas no pulmão de apenas dois deles, uma semana após o desafio (Tabela 5). Para o grupo CH3 agudo, nós demonstramos a presença do DNA do parasito no íleo de todos os sete animais testados, nos pulmões de cinco e cérebro de dois deles. Duas semanas após o desafio a PCR não foi realizada nos grupos EGS agudo e CH3 agudo uma vez que todos os animais morreram em decorrência da toxoplasmose, como demonstrado na Figura 2.

Ao testar a presença das cepas EGS e CH3 durante a fase aguda após o desafio em camundongos cronicamente infectados pela cepa D8, foi observado um padrão distinto do descrito anteriormente. No grupo D8+EGS, foi detectado apenas DNA da cepa D8 no íleo e cérebro dos animais testados independentemente do tempo. Entretanto, nos pulmões dos animais deste grupo foi observado um perfil misto correspondente à presença das cepas D8 e EGS simultaneamente em 71,4% das amostras 48 horas após o desafio e em 100% delas, uma e duas semanas após o desafio. No grupo D8+CH3 foi observado um perfil misto em 14,3% das amostras de íleo testadas duas semanas após o desafio. Em todas as demais amostras de íleo e cérebro foi detectado apenas DNA da cepa D8. Nos pulmões, por outro lado, 100% das amostras apresentavam um perfil

misto correspondente à presença das cepas CH3 e D8 simultaneamente, independente do tempo analisado (Tabela 5).

Todas as amostras do grupo PBS foram negativas para a PCR. No grupo D8 crônico foi encontrado DNA referente a esta cepa em 100% dos animais em todos os órgãos (íleo, pulmões e cérebro) e em todos os tempos testados (Tabela 5).

As ferramentas moleculares empregadas nesse estudo não permitem a diferenciação dos parasitos da cepa D8 utilizados na infecção primária dos parasitos da mesma cepa utilizados no desafio. Isso porque a diferenciação foi feita a nível gênico. Por esse motivo, não foi realizada a *Nested-PCR* seguida de RFLP nas amostras do grupo D8+D8.

Os resultados individuais dos órgãos de cada camundongo e as imagens dos géis contendo o resultado da RFLP encontram-se no Anexo 3.

Tabela 5: Presença e tipo genético de *Toxoplasma gondii* para o marcador *L358* no intestino, pulmões e cérebro de camundongos BALB/c dos grupos controle da infecção aguda (D8 agudo, EGS agudo e CH3 agudo), controle da infecção crônica (D8 crônico) e grupos desafiados (D8+EGS e D8+CH3) 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio.

Grupos (alelo do locus <i>L358</i>)		Órgãos					
		Intestino		Pulmões		Cérebro	
		PCR +	RFLP	PCR +	RFLP	PCR +	RFLP
D8 agudo (III)	48 horas	0/7	-	0/7	-	0/7	-
	1 semana	7/7	100% III	7/7	100% III	0/7	-
	2 semanas	7/7	100% III	7/7	100% III	7/7	100% III
D8 crônico (III)	48 horas	7/7	100% III	6/6	100% III	7/7	100% III
	1 semana	7/7	100% III	7/7	100% III	7/7	100% III
	2 semanas	7/7	100% III	7/7	100% III	7/7	100% III
EGS agudo (I)	48 horas	0/7	-	0/7	-	0/7	-
	1 semana	7/7	100% I	2/7	100% I	0/7	-
	2 semanas	nr	nr	nr	nr	nr	nr
D8 + EGS (III+I)	48 horas	7/7	100% III	7/7	28.6% III / 71.4% III+I	7/7	100% III
	1 semana	7/7	100% III	7/7	100% III+I	7/7	100% III
	2 semanas	7/7	100% III	7/7	100% III+I	7/7	100% III
CH3 agudo (I)	48 horas	0/7	-	0/7	-	0/7	-
	1 semana	7/7	100% I	5/7	100% I	2/7	100% I
	2 semanas	nr	nr	Nr	nr	nr	nr
D8 + CH3 (III+I)	48 horas	7/7	100% III	6/7	100% III+I	7/7	100% III
	1 semana	7/7	100% III	7/7	100% III+I	7/7	100% III
	2 semanas	7/7	85.7% III / 14.3% III+I	7/7	100% III+I	7/7	100% III

^a Amostras positivas na PCR/Total de amostras testadas
nr: PCR não realizada, camundongos não sobreviveram

5.5. ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

INTESTINO

O íleo apresentou acometimento distinto de acordo com a virulência da cepa. Um discreto aumento da celularidade da lâmina própria foi encontrado no grupo D8 agudo (Figura 5). As alterações histopatológicas no grupo D8 crônico também foram discretas. As vilosidades se mantiveram com a arquitetura habitual, e foi observado um maior número de plasmócitos. Em comparação, os camundongos infectados com cepas mais virulentas apresentaram alterações patológicas significativas. O grupo CH3 agudo apresentou um aumento intenso da celularidade da lamina própria assim como edema de vilosidades. Nesse grupo a necrose foi focal e o epitélio de superfície apresentou padrão reativo com ausência ou raras células caliciformes (Figura 5). As alterações foram mais significativas no grupo EGS agudo caracterizado por uma ileíte aguda com inflamação bastante intensa. Também foram observados fenômenos vasculares na lamina própria: hemorragia, formação de êmbolos e edema. O intenso infiltrado inflamatório foi predominantemente polimorfonuclear e encontrado na lâmina própria e submucosa. Foi observada também necrose, abscesso em cripta, fusão, alargamento de vilosidades e até completo desaparecimento destas (Figura 6). Além disso, ocorreram algumas áreas de calcificação distrófica associada com necrose das vilosidades (Figura 6) e observa-se um padrão reativo de epitélio de superfície.

Entretanto, nos grupos reinfetados o dano foi menor e as alterações histológicas nesses grupos se assemelham àquelas do grupo controle D8 crônico. Os grupos D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8 apresentaram inflamação com aumento da celularidade na lâmina própria e alargamento e fusão de vilosidades discreta para os dois primeiros e moderada no grupo D8+D8 (Figura 5). O íleo dos camundongos BALB/c do grupo PBS apresentou-se sem alterações.

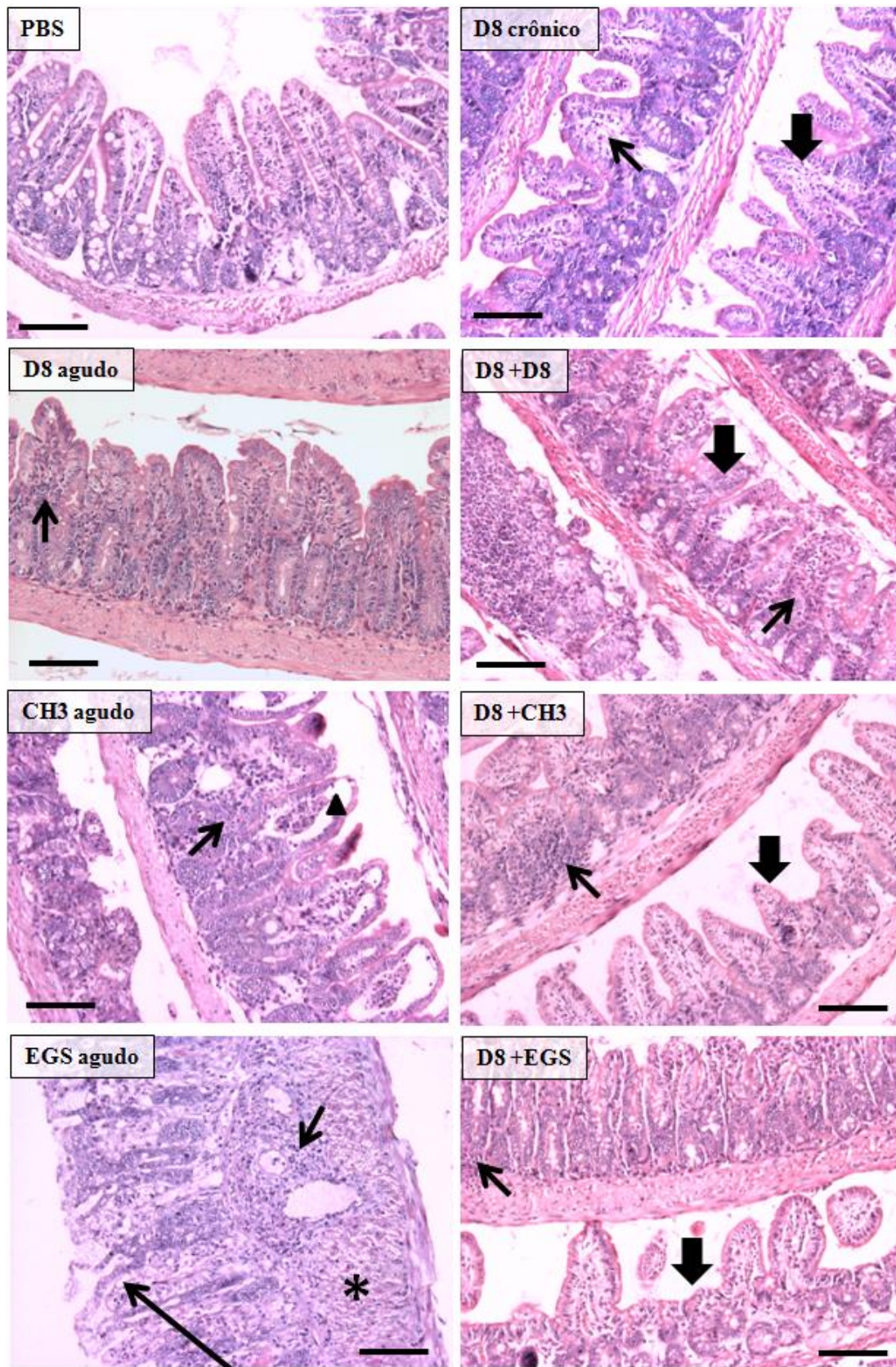


Figura 5: Alterações histológicas por *Toxoplasma gondii* no íleo de camundongos BALB/c desafiados e controle. D8 agudo e D8 crônico apresentam alterações patológicas discretas caracterizadas pelo aumento de celularidade da lamina própria e submucosa (setas finas curtas). Essa alteração foi discreta nos grupos D8+CH3 e D8+EGS e intensa nos grupos CH3 e EGS agudo. CH3 também

apresentou edema de vilosidades (cabeça de seta). D8 crônico, D8+CH3 e D8+EGS apresentaram encurtamento e fusão de vilosidades (setas largas). As alterações mais significativas foram observadas no íleo dos animais do grupo EGS agudo caracterizado por edema da submucosa (asterisco) e destruição de vilosidades (setas finas longas). Coloração H&E, Barra = 100 µm.

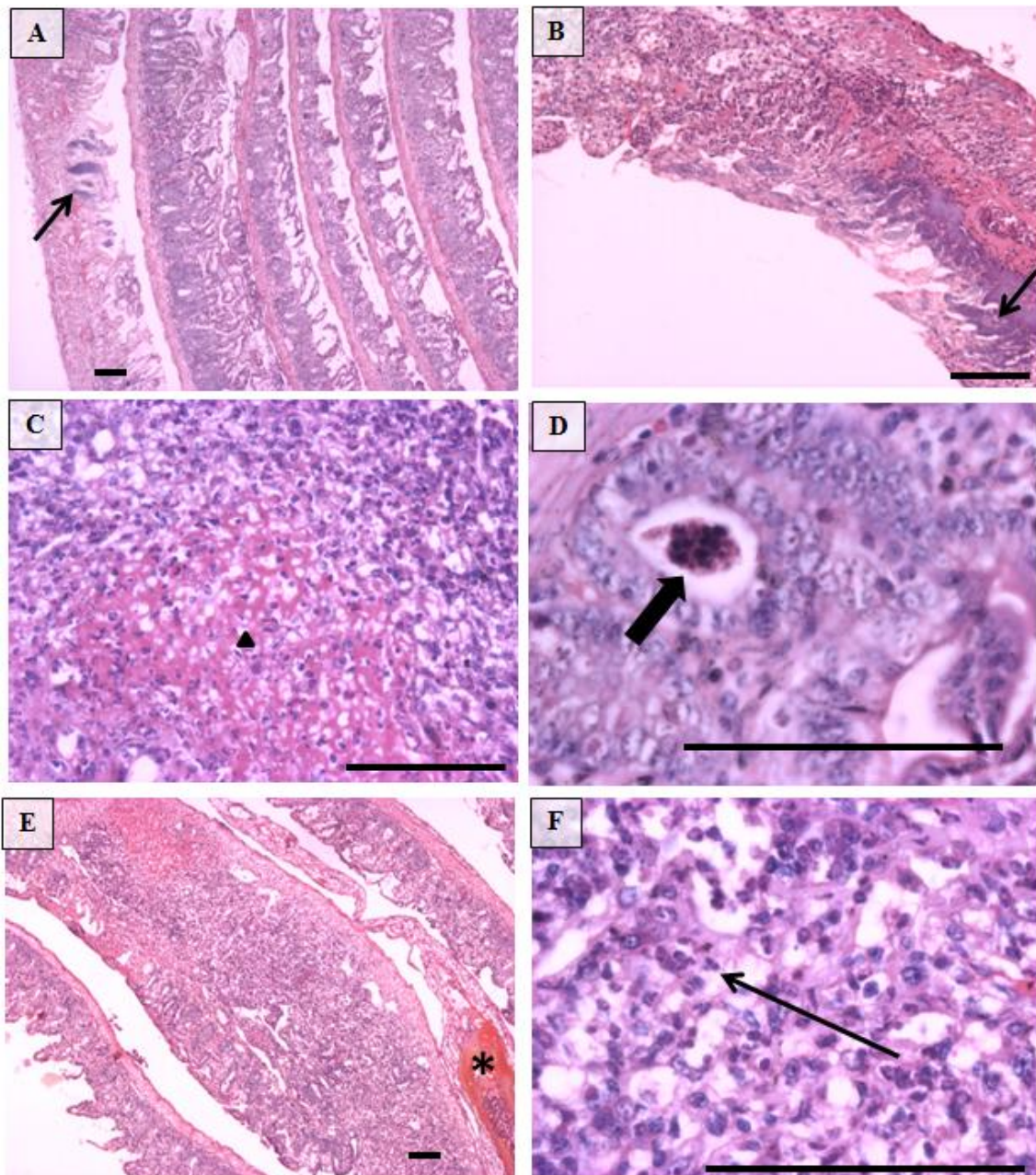


Figura 6: Alterações histológicas por *Toxoplasma gondii* no íleo de camundongos BALB/c do grupo EGS agudo. **A:** Extensão do acometimento do íleo. **B:** Calcificações distróficas (seta curta). **C:** Áreas com necrose de coagulação (cabeça de seta). **D:** Abscesso em cripta (seta longa). **E:** Hemorragia (asterisco). **F:** Infiltrado inflamatório predominantemente de polimorfonucleares (seta longa). Coloração H&E. Barra = 100µm.

PULMÕES

Todos os animais infectados, com exceção do grupo D8 agudo, apresentaram pneumonite intersticial com presença de infiltrado inflamatório peribrônquico e perivascular. O grupo D8 agudo apresentou-se sem alterações enquanto que a inflamação supracitada foi moderada no grupo D8 crônico. No grupo CH3 agudo também foram observados fenômenos vasculares como hiperemia. Tanto este grupo quanto o grupo desafiado D8+CH3 apresentaram aumento da celularidade dos septos com conseqüente espessamento focal (Figura 7). No caso do grupo EGS agudo também foi observada a ocorrência de aumento de celularidade com conseqüente espessamento focal de septos e hiperemia. Foi detectado um dano mais intenso no grupo D8+EGS do que no EGS agudo. Nos animais do grupo D8+EGS o espessamento dos septos resultou em atelectasia e congestão (Figura 7). O grupo D8+D8 apresentou infiltrado inflamatório peribrônquico e perivascular moderado assim como o grupo controle crônico D8 (Figura 7). Os animais do grupo PBS não apresentaram alterações histopatológicas.

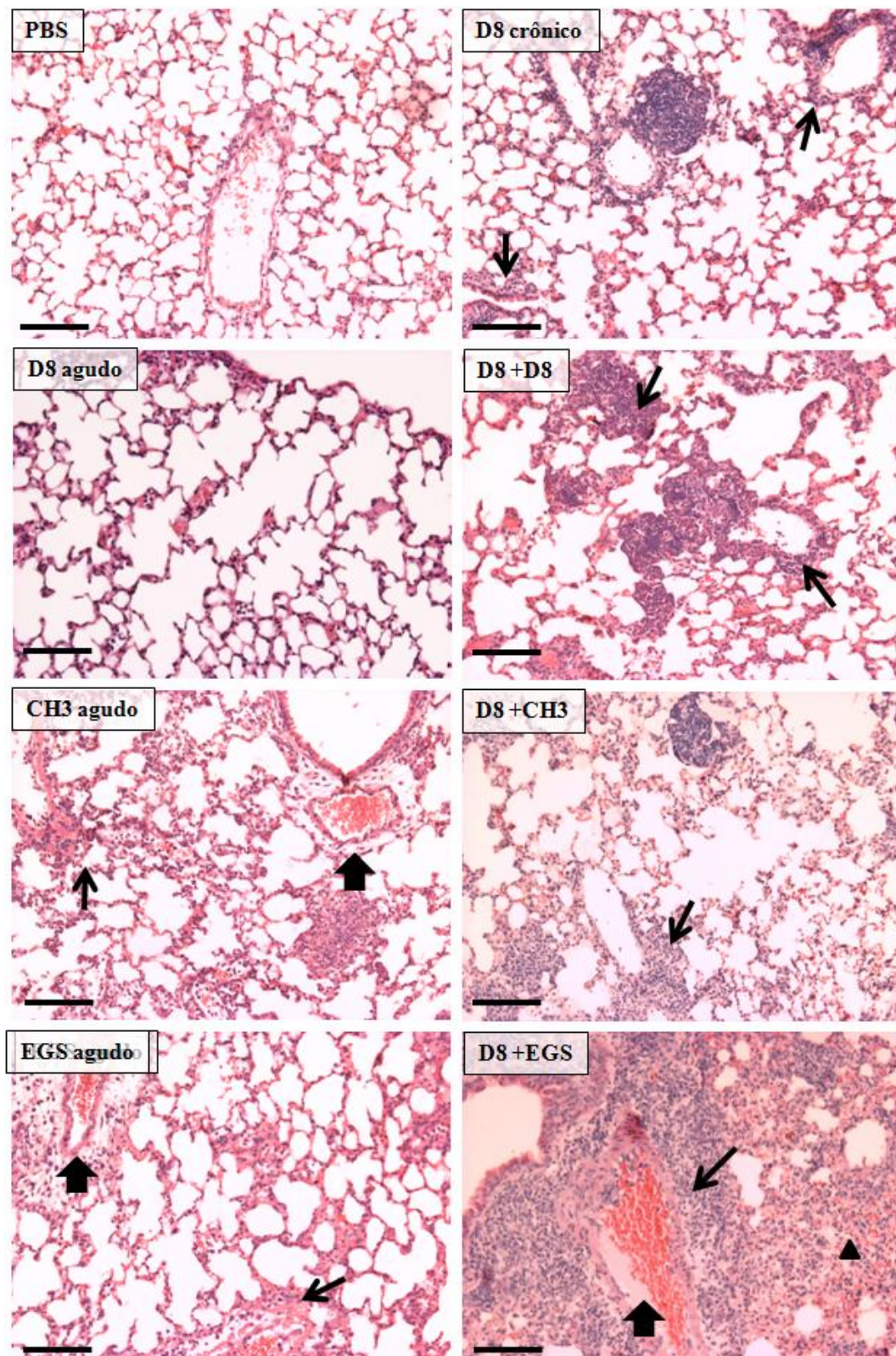


Figura 7: Alterações histológicas por *Toxoplasma gondii* nos pulmões de camundongos BALB/c desafiados e controle. Camundongos do grupo D8 agudo não tiveram alterações histológicas significativas assim como o controle não infectado (PBS). Todos os demais grupos (D8 crônico, D8+D8, CH3 agudo, D8+CH3, EGS agudo e D8+EGS) apresentaram infiltrados inflamatórios peribrônquicos e perivascularares (setas finas). Os grupos CH3 agudo, EGS agudo e D8+EGS apresentaram hiperemia (setas largas). D8+EGS também apresentou regiões de atalactasia (cabeça de seta). Coloração H&E. Barra = 100 μ m.

FÍGADO

Os animais do grupo controle (PBS) não apresentaram alterações hepáticas significativas. Todos os animais infectados apresentaram alterações no parênquima hepático. Percebe-se uma inflamação moderada e focal (periportal e perivascular) associada a eventos vasculares nos grupos crônicos, desafiados ou não (D8 crônico, D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8) e também no grupo CH3 agudo. No grupo EGS agudo observou-se uma inflamação intensa e difusa com hiperemia inclusive sinusoidal e consequente congestão do órgão. O grupo D8 agudo apresenta focos de inflamação associado à degeneração de hepatócitos com presença de raras células polimorfonucleares (Figura 8).

BAÇO

Todos os animais infectados apresentaram hiperplasia macroscópica do órgão. Foi observada reatividade com aumento dos folículos linfoides em todos os animais dos grupos crônicos desafiados ou não (D8 crônico, D8+CH3, D8+EGS e D8+D8) e também no grupo D8 agudo. Os grupos EGS e CH3 agudo apresentaram alteração na arquitetura habitual do baço, sendo que no grupo EGS ocorreu uma aparente deficiência no nódulo linfoide com depleção de linfócitos (Figura 9).

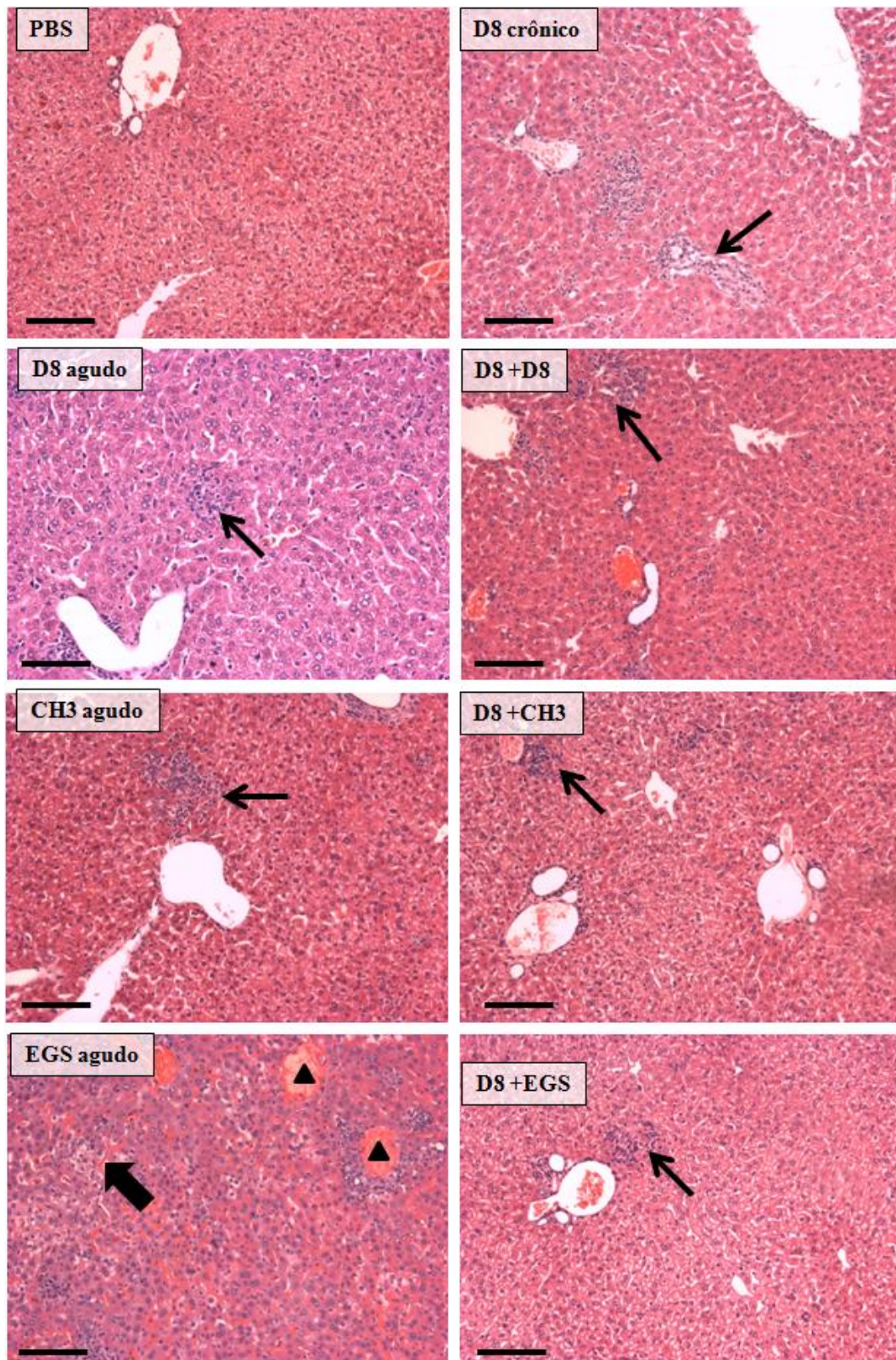


Figura 8: Alterações histológicas por *Toxoplasma gondii* no fígado de camundongos BALB/c desafiados e controle. Todos os grupos infectados (D8 agudo, D8 crônico, D8+D8, CH3 agudo, D8+CH3, EGS agudo, D8+EGS) apresentaram infiltrado inflamatório periportal e perivascular (setas finas). O grupo EGS agudo apresentou ainda hiperemia (cabeça de seta), inclusive sinusoidal (seta larga). Coloração H&E. Barra = 100µm.

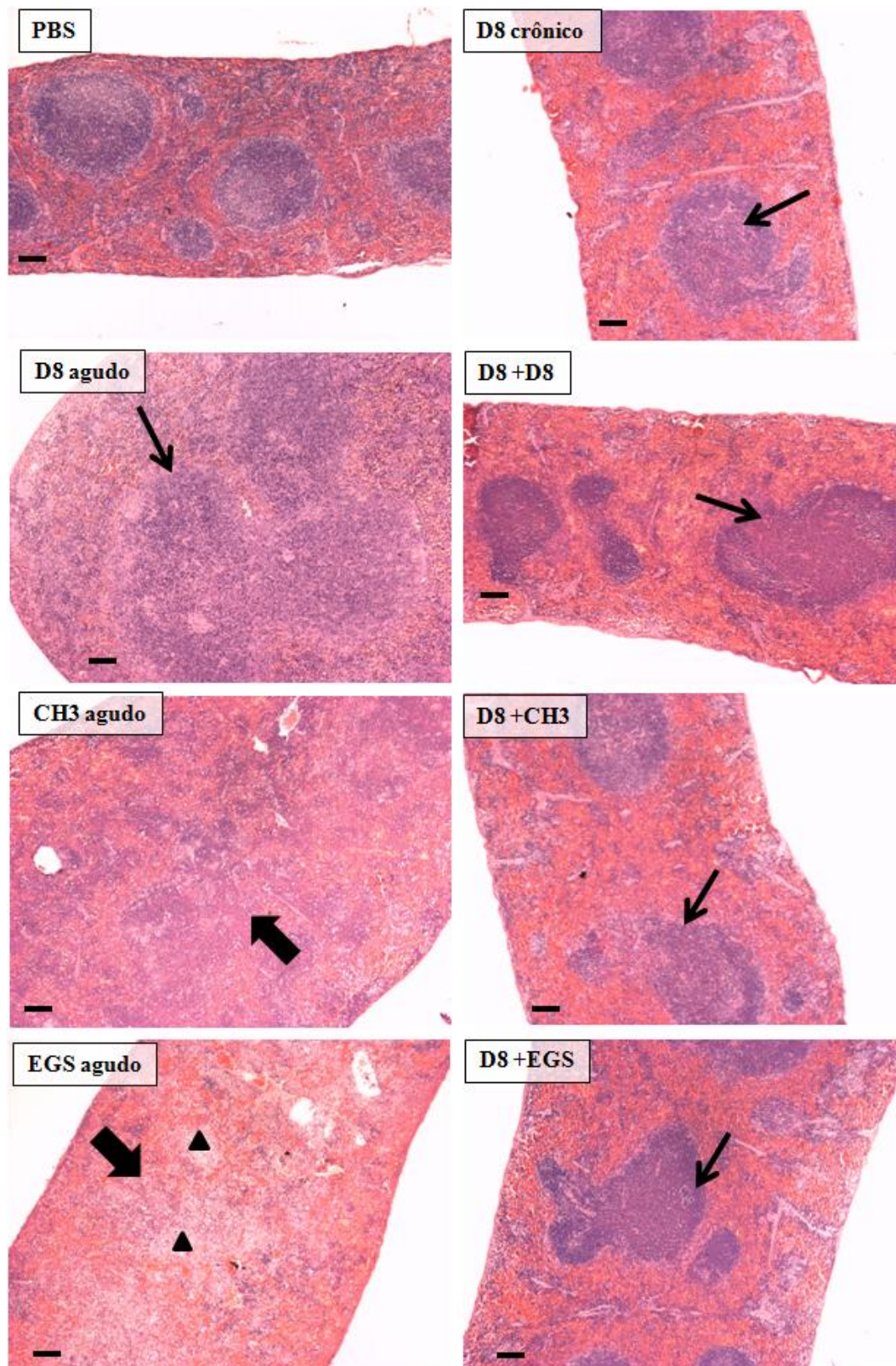


Figura 9: Alterações histológicas por *Toxoplasma gondii* no baço de camundongos BALB/c desafiados e controle. Observa-se reatividade com aumento dos folículos linfóides (setas finas) em todos os grupos infectados (D8 crônico, D8 agudo, D8+D8, CH3 agudo, D8+CH3, EGS agudo, D8+EGS). Os grupos CH3 e EGS agudo também apresentaram perda da arquitetura habitual dos folículos (seta larga). No grupo EGS agudo essa perda está associada com a depleção de linfócitos (cabeça de seta). Coloração H&E. Barra = 100µm.

CÉREBRO

Os animais não infectados (PBS) ou com infecção aguda independentemente da cepa (D8, EGS e CH3 agudo) não apresentaram alterações patológicas no cérebro. Foi observada ocorrência de meningite moderada, encefalite focal e vasculite nos grupos D8 crônico e D8+D8. D8 crônico apresentou ainda alguns focos de fenômenos alterativos necróticos relacionados com a inflamação (Figura 10). Os grupos D8+CH3 e D8+EGS apresentaram meningite e alguns poucos focos inflamatórios difusos pelo parênquima encefálico caracterizando uma meningoencefalite além de vasculite (Figura 10).

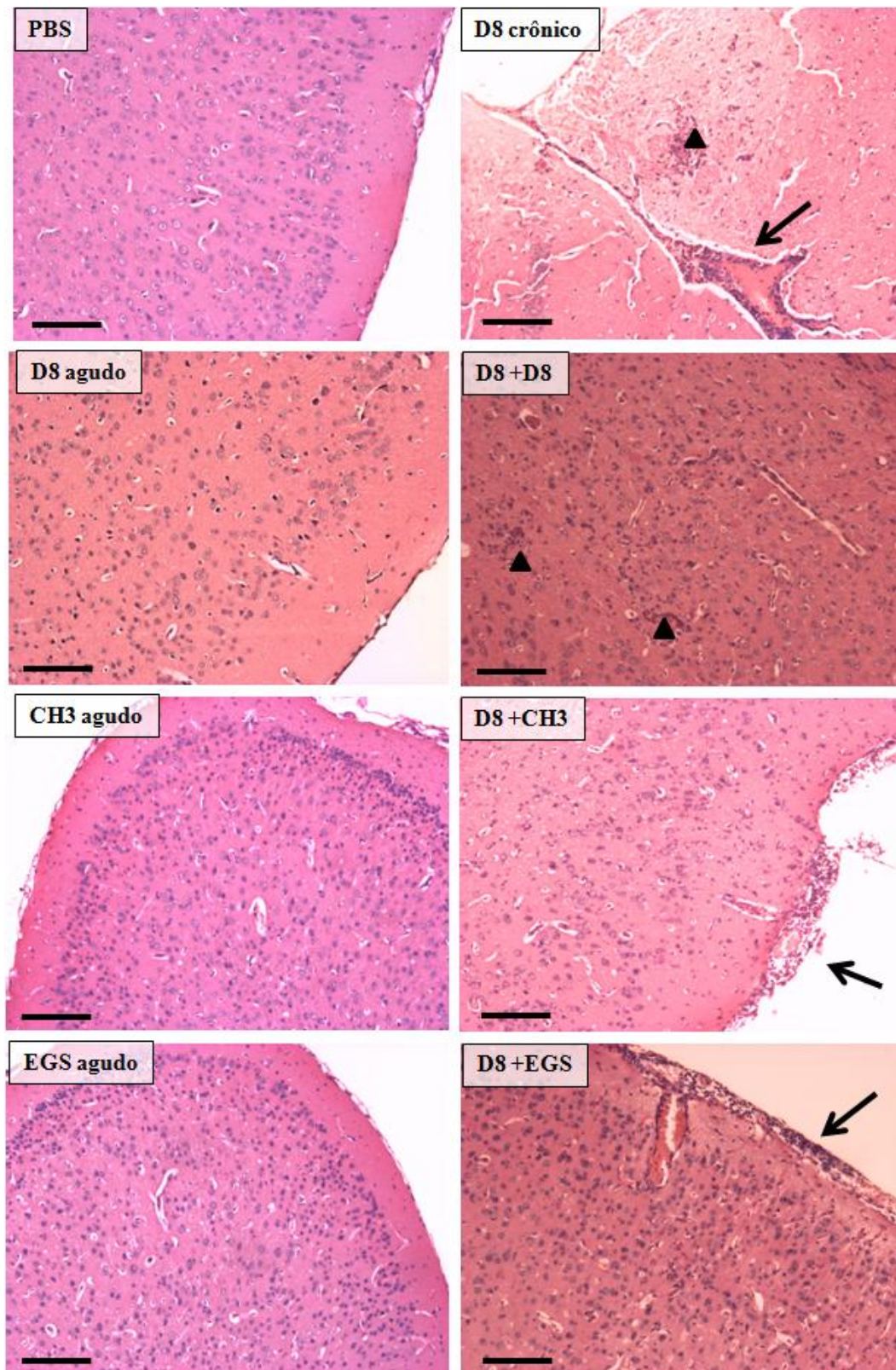


Figura 10: Alterações histológicas por *Toxoplasma gondii* no cérebro de camundongos BALB/c desafiados e controle. O cérebro dos camundongos dos grupos com infecção aguda (D8, CH3 e EGS agudo) não apresentaram alterações histológicas assim como os camundongos do grupo controle não infectado (PBS). Os grupos D8 crônico, D8+D8, D8+EGS e D8+CH3 apresentaram meningite (setas) e/ou lesões necróticas no parênquima cerebral (cabeça de seta). Coloração H&E. Barra = 100 μ m.

5.6. PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

5.6.1. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO INTESTINO

O grupo D8 crônico apresentou maior quantidade de IFN- γ no íleo em comparação ao controle não infectado (PBS). Observa-se também uma maior quantidade de IFN- γ nos grupos EGS agudo e CH3 agudo comparados ao grupo PBS. Por outro lado, a quantidade de IFN- γ presente no íleo dos animais 48 horas após o desafio (D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8) não foi diferente do grupo PBS ou D8 crônico. Por fim, o grupo D8 agudo também não apresentou diferença em relação ao PBS (Figura 11).

Em relação à citocina TNF- α houve uma produção estatisticamente superior pelo grupo EGS agudo em relação ao controle (PBS). Os grupos D8 crônico e D8+D8 também tiveram quantidades significativamente maiores que o grupo PBS. Não houve diferença entre a quantidade de TNF- α no intestino dos grupos desafiados (D8+EGS e D8+CH3) ou com infecção aguda (CH3 agudo e D8 agudo) e o controle não infectado. O grupo D8 agudo possui menor quantidade de TNF- α do que os grupos D8 crônico e D8+D8 (Figura 11).

Os grupos EGS e CH3 agudo apresentaram maior quantidade de IL-12 em relação ao controle não infectado (PBS). Da mesma maneira foi observado a maior quantidade desta citocina no grupo controle da infecção crônica (D8 crônico) em relação ao grupo PBS. O grupo D8 agudo, por sua vez, apresentou níveis de IL-12 no íleo inferiores aos grupos D8 crônico e D8+D8 não sendo diferente dos animais do grupo PBS (Figura 11).

O grupo EGS agudo apresentou também níveis aumentados das citocinas IL-6, IL-17 e IL-4 em relação ao grupo PBS. IL-17 e IL-4 neste grupo também foram significativamente superiores ao grupo desafiado D8+EGS (Figura 11).

Em relação à citocina imunomodulatória IL-10 foi observada diferença do grupo D8 crônico assim como dos grupos EGS e CH3 agudo em relação ao grupo PBS. O grupo D8 agudo, por sua vez, apresentou níveis de IL-10 inferiores aos de D8 crônico e D8+D8 (Figura 11). Não foram observados níveis aumentados dessa citocina no íleo dos animais desafiados D8+EGS, D8+CH3 ou D8+D8 (Figura 11).

A presença de TGF- β no homogenato de íleo dos animais, após 48 horas de infecção ou de desafio, foi pontual. Apenas alguns animais apresentaram níveis detectáveis dessa citocina pelo método utilizado, o que impossibilitou a realização de qualquer análise estatística.

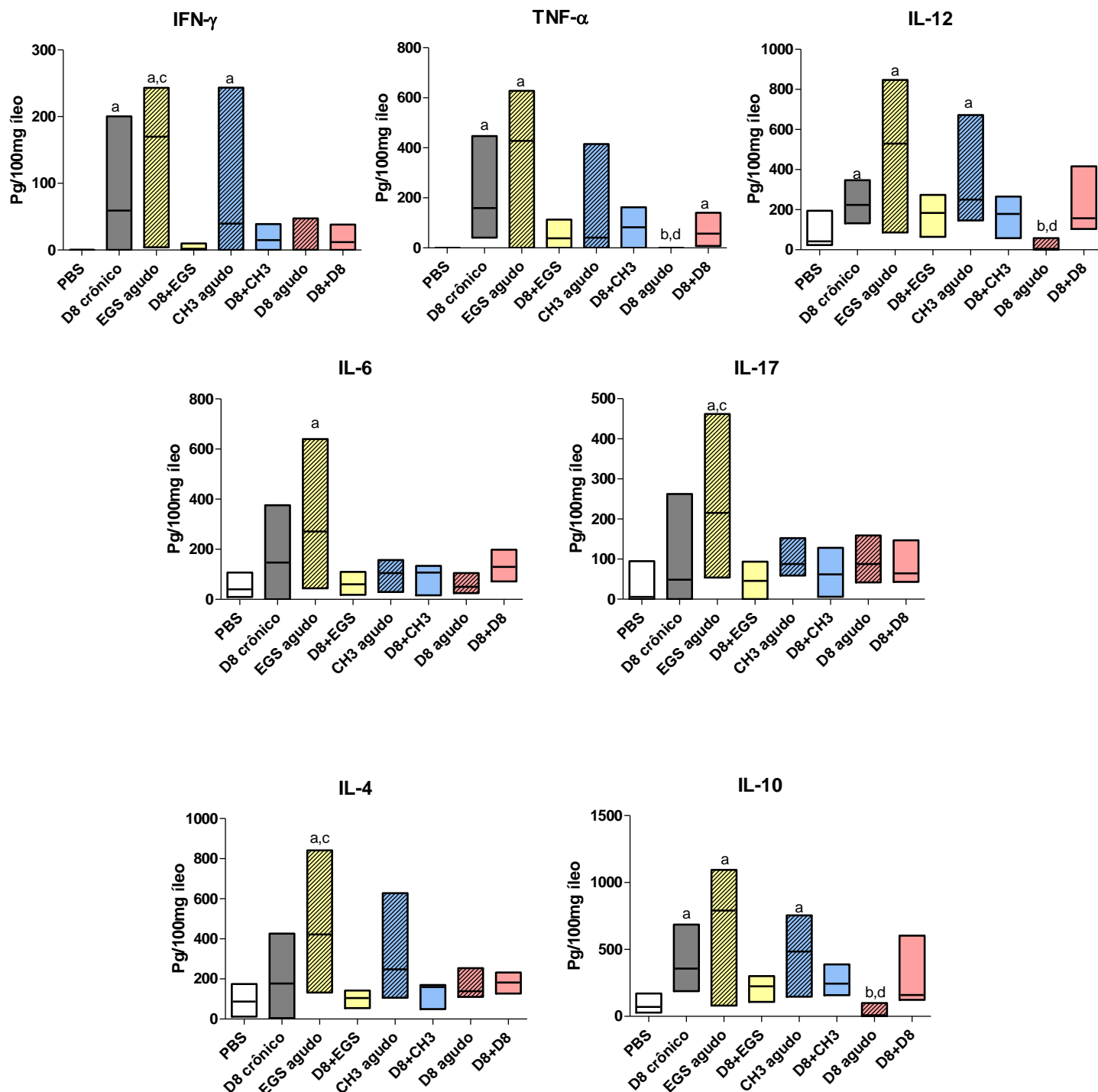


Figura 11: Quantificação das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-17, IL-4 e IL-10 no íleo de camundongos BALB/c 48 horas após a infecção ou desafio com *Toxoplasma gondii*. Os resultados estão apresentados como barras flutuantes abrangendo os valores individuais de cada camundongo (7 camundongos/grupo) do mínimo ao máximo. A linha que corta a barra representa a mediana da distribuição. Diferenças significativas estão evidenciadas por letras distintas ($p < 0,05$ teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's) **a = grupo selecionado apresenta diferença estatística em relação ao controle não infectado (PBS), **b** = grupo selecionado apresenta diferença estatística em relação ao controle crônico (D8 crônico), **c** = EGS agudo apresenta diferença estatística em relação ao grupo D8+EGS, **d** = D8 agudo apresenta diferença estatística em relação ao grupo D8+D8.**

5.6.2. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SISTÊMICAS

Foram pesquisadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17A e IL-10 no soro dos camundongos pela técnica de citometria de fluxo com beads marcadas com anticorpos anti-citocinas (Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit - BD® Biosciences, USA).

A citocina IL-2 não foi detectada em soro dos camundongos de nenhum dos grupos experimentais ou controle.

Quarenta e oito horas após o desafio foi demonstrado que nos grupos com infecção aguda (grupos EGS, CH3 e D8 agudo) a quantidade de IFN- γ é significativamente inferior ao grupo D8 crônico e aos grupos desafiados (D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8, respectivamente). Ao final de uma semana observamos níveis significativos de IFN- γ no soro dos animais recém-infectados: EGS agudo (mediana de 3585 pg/mL), CH3 agudo (mediana de 2025 pg/mL) e D8 agudo (mediana de 189 pg/mL). Essas quantidades são significativamente superiores às encontradas no controle não infectado (PBS), no controle da infecção crônica (D8 crônico) e nos grupos desafiados com cada uma das cepas acima citadas (D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8, respectivamente). Passadas duas semanas, os grupos EGS e CH3 agudo já sucumbiram à infecção e observa-se a permanência de níveis elevados de IFN- γ no grupo D8 agudo em relação ao controle não infectado. Após o desafio não se observou aumento significativo do IFN- γ nos grupos desafiados em relação ao grupo controle da infecção crônica em nenhum dos dias testados (Figura 12).

Ocorreu grande variação individual na quantificação das citocinas TNF- α , IL-6, IL-17 (Figura 12), IL-4 e IL-10 (Figura 13) entre os animais de um mesmo grupo.

Em relação à citocina TNF- α foram demonstrados níveis significativamente menores no soro dos animais com infecção aguda, independente da cepa (EGS, CH3 e D8 agudo),

em relação ao D8 crônico 48 horas após a infecção. O grupo EGS agudo apresentou ainda níveis inferiores desta citocina no soro em comparação ao grupo D8+EGS. O grupo controle com infecção crônica da cepa D8 apresentou níveis elevados de TNF- α em relação ao grupo PBS. Uma semana após o desafio observou-se quantidade significativa de TNF- α nos grupos EGS e CH3 agudo e D8+CH3 superiores ao controle não infectado (PBS). Após duas semanas os animais dos grupos D8 agudo e D8+EGS possuem maiores quantidades de TNF- α em relação ao PBS (Figura 12).

Níveis significativos de IL-6 foram observados predominantemente após uma semana de desafio com a cepa EGS (D8+EGS).

Os grupos D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8 apresentaram níveis elevados de IL-17 em relação ao controle não infectado (PBS) duas semanas após o desafio assim como observado para o grupo D8 crônico (Figura 12).

A citocina IL-4 foi detectada em níveis muito reduzidos em todos os grupos de forma geral. O grupo EGS agudo, com uma semana de infecção, apresentou quantidade inferior de IL-4 às encontradas nos grupos D8 crônico e D8+EGS (Figura 13).

Com relação à citocina modulatória IL-10 foi observada diferença nos níveis séricos nos grupos D8 crônico e D8+CH3 48 horas após o desafio em relação ao grupo PBS. Uma semana após a infecção, os camundongos do grupo CH3 agudo apresentaram níveis maiores de IL-10 em relação ao grupo controle PBS (Figura 13).

Um balanço das citocinas aumentadas e diminuídas em cada grupo tanto no intestino quanto no soro estão apresentados na Figura 14.

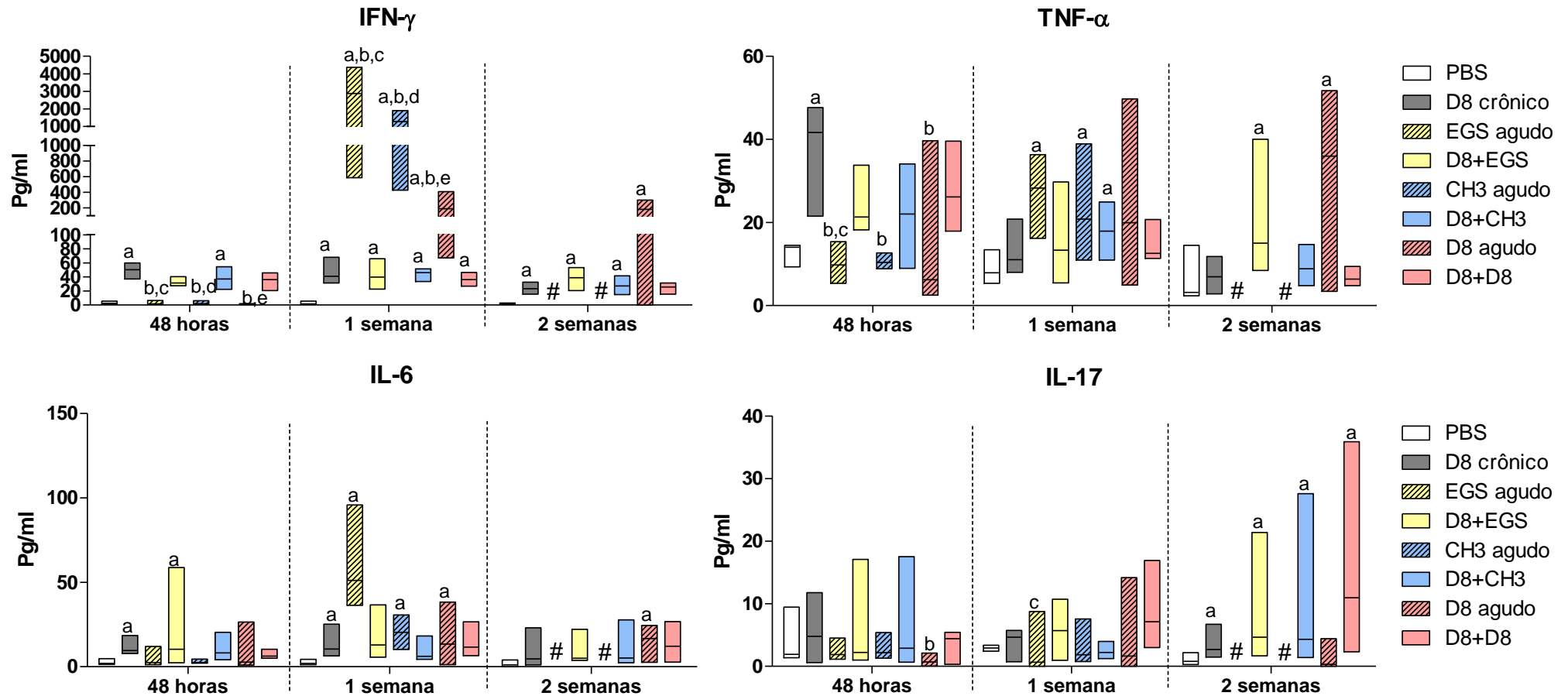


Figura 12: Cinética da concentração sistêmica das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-17. Concentração das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-17 no soro de camundongos BALB/c dos grupos controle e desafiados 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio com cepas de *Toxoplasma gondii*. Os resultados estão apresentados como barras flutuantes abrangendo todos os valores individuais de cada camundongo (7 camundongos/grupo) do mínimo ao máximo. A linha que corta a barra representa a mediana da distribuição. # Quantificação não realizada uma vez que os animais sucumbiram à infecção antes de duas semanas. Diferenças significativas estão evidenciadas por letras distintas ($p < 0,05$ teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's) a = grupo selecionado apresenta diferença estatística em relação ao controle não infectado (PBS), b = grupo selecionado apresenta diferença estatística em relação ao controle crônico (D8 crônico), c = EGS agudo apresenta diferença estatística em relação ao grupo D8+EGS, d = CH3 agudo apresenta diferença estatística em relação ao grupo D8+CH3, e = D8 agudo apresenta diferença estatística em relação ao grupo D8+D8.

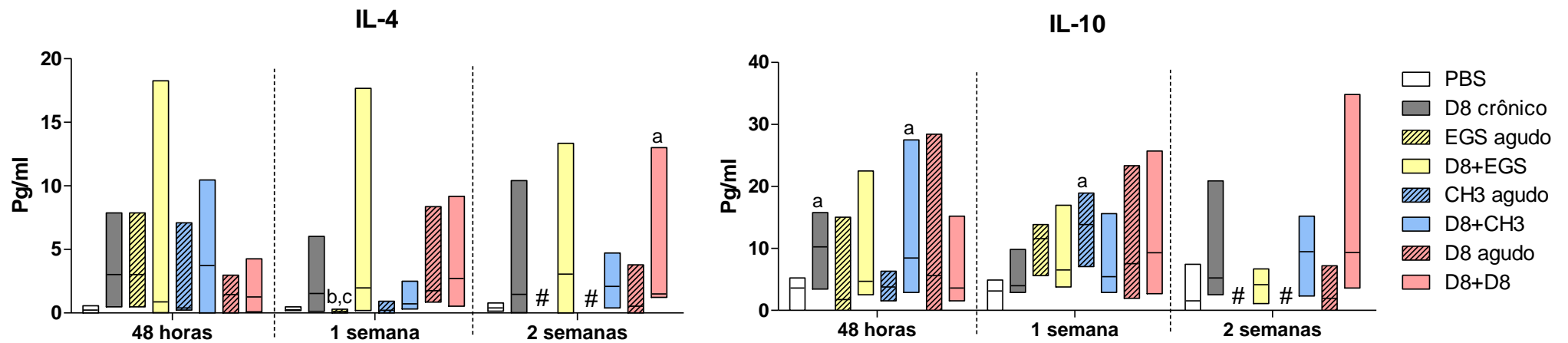


Figura 13: Cinética da concentração sistêmica das citocinas IL-4 e IL-10. Concentração das citocinas IL-4 e IL-10 no soro de camundongos BALB/c dos grupos controle e desafiados 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio com cepas de *Toxoplasma gondii*. Os resultados estão apresentados como barras flutuantes abrangendo todos os valores individuais de cada camundongo (7 camundongos/grupo) do mínimo ao máximo. A linha que corta a barra representa a mediana da distribuição. # Quantificação não realizada uma vez que os animais sucumbiram à infecção antes de duas semanas. Diferenças significativas estão evidenciadas por letras distintas ($p < 0,05$ teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's) **a** = grupo selecionado apresenta diferença estatística em relação ao controle não infectado (PBS), **b** = grupo selecionado apresenta diferença estatística em relação ao controle crônico (D8 crônico), **c** = EGS agudo apresenta diferença estatística em relação ao grupo D8+EGS.

D8 agudo	Intestino 48 horas	-	TNF- α \downarrow^a	IL-12 \downarrow^a	-	-	-	IL-10 \downarrow^a	
	Soro	48 horas	IFN- γ \downarrow^a	TNF- α \downarrow^a	nr	-	IL-17 \downarrow	-	
		1 semana	IFN- γ \uparrow^e	-	nr	IL-6 \uparrow	-	-	
		2 semanas	IFN- γ \uparrow	TNF- α \uparrow	nr	IL-6 \uparrow	-	-	
CH3 agudo	Intestino 48 horas	IFN- γ \uparrow	-	IL-12 \uparrow	-	-	-	IL-10 \uparrow	
	Soro	48 horas	IFN- γ \downarrow^a	TNF- α \downarrow^b	nr	-	-	-	
		1 semana	IFN- γ \uparrow^e	TNF- α \uparrow	nr	IL-6 \uparrow	-	-	IL-10 \uparrow
		2 semanas	†	†	†	†	†	†	†
EGS agudo	Intestino 48 horas	IFN- γ \uparrow	TNF- α \uparrow	IL-12 \uparrow	IL-6 \uparrow	IL-17 \uparrow^c	IL-4 \uparrow^c	IL-10 \uparrow	
	Soro	48 horas	IFN- γ \downarrow^a	TNF- α \downarrow^a	nr	-	-	-	-
		1 semana	IFN- γ \uparrow^e	TNF- α \uparrow	nr	IL-6 \uparrow	IL-17 \downarrow^d	IL-4 \downarrow^a	-
		2 semanas	†	†	†	†	†	†	†
D8 crônico	Intestino 48 horas	IFN- γ \uparrow	TNF- α \uparrow	IL-12 \uparrow	-	-	-	IL-10 \uparrow	
	Soro	48 horas	IFN- γ \uparrow	TNF- α \uparrow	nr	IL-6 \uparrow	-	-	IL-10 \uparrow
		1 semana	IFN- γ \uparrow	-	nr	IL-6 \uparrow	-	-	-
		2 semanas	IFN- γ \uparrow	-	nr	-	IL-17 \uparrow	-	-
D8+CH3	Intestino 48 horas	-	-	-	-	-	-	-	
	Soro	48 horas	IFN- γ \uparrow	-	nr	-	-	-	IL-10 \uparrow
		1 semana	IFN- γ \uparrow	TNF- α \uparrow	nr	-	-	-	-
		2 semanas	IFN- γ \uparrow	-	nr	-	IL-17 \uparrow	-	-
D8+EGS	Intestino 48 horas	-	-	-	-	-	-	-	
	Soro	48 horas	IFN- γ \uparrow	-	nr	IL-6 \uparrow	-	-	-
		1 semana	IFN- γ \uparrow	-	nr	-	-	-	-
		2 semanas	IFN- γ \uparrow	TNF- α \uparrow	nr	-	IL-17 \uparrow	-	-
D8+D8	Intestino 48 horas	-	TNF- α \uparrow	-	-	-	-	-	
	Soro	48 horas	IFN- γ \uparrow	-	nr	-	-	-	-
		1 semana	IFN- γ \uparrow	-	nr	-	-	-	-
		2 semanas	IFN- γ \uparrow	-	nr	-	IL-17 \uparrow	-	-

Figura 14: Análise de citocinas no intestino e no soro de camundongos BALB/c infectados e reinfetados com *Toxoplasma gondii*. Citocinas aumentadas (em vermelho) ou diminuídas (em azul) em relação ao grupo controle não infectado, PBS. As citocinas com níveis estatisticamente diferentes de outros grupos estão destacadas com letras sobrescritas (^a apresentou diferença significativa em comparação ao grupo D8 crônico e ao grupo desafiado correspondente. ^b apresentou diferença significativa em relação ao grupo D8 crônico. ^c apresentou diferença em relação aos grupos PBS e D8+EGS. ^d apresentou diferença significativa em comparação ao grupo D8+EGS. ^e apresentou diferença em relação aos grupos PBS, D8 crônico e desafiado correspondente). nr = não realizada (a citocina IL-12 não foi pesquisada no soro dos animais). † morte dos animais). – = sem diferença estatística.

5.7. PROTEÍNAS DE VIRULÊNCIA

A genotipagem das proteínas de virulência das cepas utilizadas neste trabalho de reinfeção através de PCR-RFLP revelou que as cepas D8, EGS e CH3 não apresentaram diferença com relação ao marcador GRA15, todas tiveram o genótipo I/III (Figura 15). Para o marcador ROP5 foi observado que a cepa EGS não se diferencia da cepa D8 utilizada na primoinfecção, ambas são tipo III. Já a cepa CH3 apresenta o mesmo padrão de bandas da cepa MAS, ou seja, atípico (u-1). Para o marcador ROP16 enquanto a cepa EGS apresentou genótipo tipo II, as cepas D8 e CH3 apresentaram o mesmo genótipo, (I). Finalmente, a cepa D8 apresenta ROP18 do tipo III, como revelado pela amplificação com os iniciadores de ROP18-UPS, enquanto as cepas EGS e CH3 possuem genótipo atípico (u-1) (Figura 15).

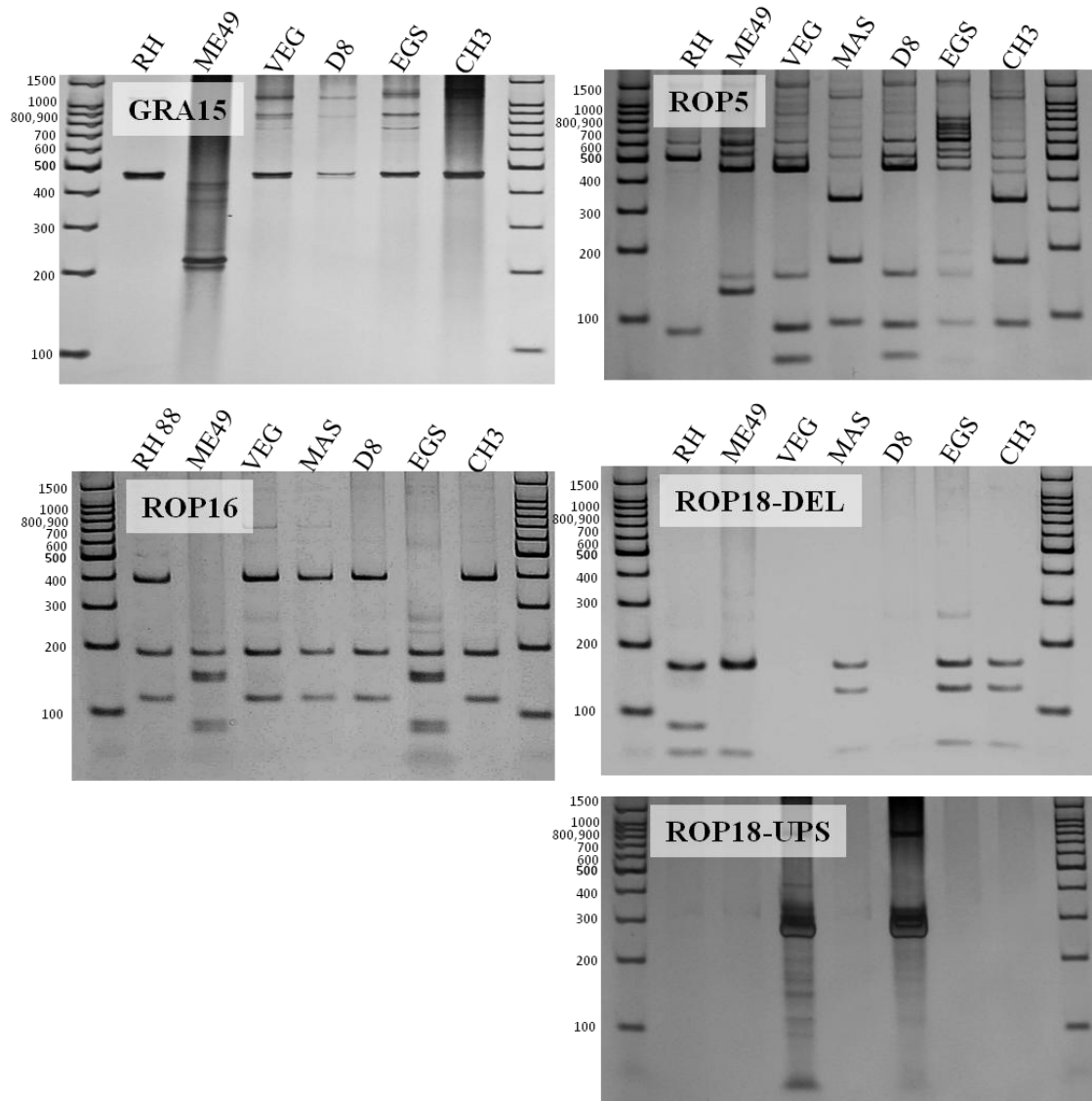


Figura 15: Padrão de RFLP para os genes GRA15, ROP5, ROP16 e ROP18 nas cepas D8, EGS e CH3 de *Toxoplasma gondii*. Os fragmentos de restrição obtidos com a digestão específica com as endonucleases de restrição para as cepas em estudo foram comparados com as cepas referência RH (tipo I), ME49 (tipo II), VEG (tipo III) e MAS (atípica – u1). O padrão de peso molecular está indicado à esquerda de cada gel em pares de base. A determinação dos alelos para ROP18 é baseado no padrão de dois géis separados, incluindo a amplificação de ROP18-UPS e os fragmentos obtidos com a digestão das bandas obtidas com a amplificação de ROP18-DEL (ScrFI+MfeI) (Segundo Dubey et al., 2014).

6. DISCUSSÃO

A literatura possui dados suficientes que comprovam a ocorrência de reinfecção por *T. gondii*. Este trabalho se propôs a investigar a disseminação do parasito nos tecidos do hospedeiro nas duas primeiras semanas após o desafio, momento correspondente à fase aguda da reinfecção. Além disso, pesquisamos quais são as consequências da reinfecção para o hospedeiro. Foi utilizado um modelo testado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisas (Brandão et al., 2009, Brandão et al., 2011, Silva et al., 2012). Esse modelo envolve cepas atípicas de genótipo comumente encontrados no Brasil (cepas D8 e CH3) e também uma cepa com genótipo único isolado de um caso de toxoplasmose congênita (EGS). Optou-se por utilizar a infecção pela via oral para mimetizar a infecção natural que ocorre nos hospedeiros intermediários.

A ausência de mortalidade observada nos grupos desafiados (D8+EGS e D8+CH3) foi completamente oposta àquela observada na infecção aguda com as cepas virulentas (EGS e CH3) em camundongos *naive*. A infecção primária com a cepa D8 portanto preveniu a morte dos animais desafiados. Provavelmente a sobrevivência dos animais desses grupos está relacionada com a redução dos danos teciduais observados nas análises histopatológicas. Resultados similares foram encontrados em outros modelos de reinfecção utilizando na infecção primária a cepa avirulenta ME49 (genótipo clonal tipo II), e o desafio realizado com cepas atípicas, tanto com cistos pela via oral (Silva et al., 2012) quanto com taquizoítos pela via intraperitoneal (i.p.) (Franco et al., 2015). Também foi observada sobrevivência ao desafio letal num modelo de reinfecção com cepas clonais (Dziko et al., 2006). Jensen e colaboradores (2015) utilizaram animais cronicamente infectados pela cepa CEP (genótipo clonal tipo III, 10^4 taquizoítos i.p.) e desafiados com 11 cepas atípicas distintas (5×10^4 taquizoítos i.p.). Os autores

observaram mortalidade quando o desafio foi realizado com cepas IRG (*Immunity Related GTPases*)-resistentes mas não com aquelas IRG-sensíveis. Quando as células hospedeiras são ativadas por IFN- γ as GTPases migram para a membrana do vacúolo parasitóforo causando a ruptura deste e consequente destruição dos parasitos. As cepas IRG resistentes são aquelas em que a ROP18 é capaz de fosforilar essas GTPases impedindo sua ligação ao vacúolo parasitóforo e consequentemente impedindo a morte do parasito. Ainda não se conhece o perfil de IRG (resistente ou sensível) das cepas usadas nesse estudo.

A perda de peso foi utilizada como parâmetro para demonstrar a morbidade da infecção ou reinfecção. Enquanto a infecção aguda com cepas virulentas causaram perda de peso rápida, significativa e irreversível, no grupo D8 agudo se iniciou somente a partir da segunda semana de infecção. Neste grupo a perda de peso foi inferior a 10% da mediana do peso inicial e em torno do 24º dia após a infecção os animais já apresentavam recuperação do peso corporal. O desafio, por sua vez, não interferiu no ganho de peso dos animais do grupo D8+EGS. No grupo D8+CH3 foi observado peso inferior ao controle não infectado ou D8 crônico pontualmente, porém ao final do experimento os camundongos apresentaram mediana do peso superior ao dia 0 e estatisticamente iguais aos controles. Os grupos desafiados também não apresentaram diferença significativa no número de cistos cerebrais em comparação ao grupo D8 crônico. Esses resultados em associação demonstram que o desafio com cepas virulentas, além de não causar mortalidade, causaram baixa morbidade nos animais cronicamente infectados que foram submetidos ao desafio.

Foram observadas diferenças significativas na identificação da ocorrência de reinfecção entre os quatro marcadores moleculares testados. Somente os grupos D8+EGS e D8+CH3 foram selecionados porque neles havia a possibilidade da ocorrência de

reinfeção, ou seja, para testar o poder de identificação da reinfeção de cada um dos marcadores. O pulmão foi o órgão escolhido por apresentar elevada carga parasitária descrita na literatura sendo, inclusive, um órgão de escolha para diversos estudos de genotipagem (Dubey et al., 2002). As amostras de DNA utilizadas nesse trabalho foram extraídas diretamente do tecido dos animais desafiados. Por isso, em termos de abundância, a amostra deve conter principalmente DNA de camundongos, seguido de DNA da cepa D8 e em menor quantidade DNA da cepa utilizada no desafio (EGS ou CH3).

Os marcadores *PK1*, *c22-8* e *C29-2* detectaram a presença da cepa EGS no pulmão dos animais do grupo D8+EGS somente duas semanas após o desafio, possivelmente quando os taquizoítos da cepa EGS haviam replicado suficientemente para serem detectados por essa técnica. Esses marcadores não detectaram a presença da cepa EGS, 48 horas ou uma semana após o desafio. Hill e Su (2012) realizaram um ensaio de competição para estudar a replicação do parasito e a virulência. Eles infectaram os animais com uma mistura de igual proporção de taquizoítos de cepa avirulenta e virulenta. Uma semana depois, após várias sequências de multiplicação dos parasitos, eles detectaram apenas a presença da cepa virulenta por RFLP do marcador SAG2, concluindo que essa cepa atingiu uma maior concentração no dia 7.

O marcador *L358* detectou a presença das cepas CH3 e EGS a partir de 48 horas até duas semanas após o desafio. Dessa forma, esse marcador foi selecionado para avaliar como o parasito se dissemina pelos tecidos dos camundongos durante a fase aguda da reinfeção por sua elevada capacidade de identificar os parasitos utilizados no desafio. Primeiramente, foi pesquisada a presença de DNA do parasito no sítio de infecção, ou seja, no intestino delgado uma vez que realizamos a infecção pela via oral. O íleo foi selecionado por ser o segmento do intestino delgado que apresenta maior

comprometimento nas infecções experimentais tanto com cepas clonais quanto com cepas atípicas (Liesenfeld et al., 1996; Pinheiro et al., 2015). O pulmão foi escolhido como um órgão indicador da disseminação sistêmica de *T. gondii*. Esse órgão sabidamente possui elevadas cargas parasitárias (Djurkovic-Djakovic et al., 2012). Por fim, a cepa utilizada no desafio foi pesquisada no cérebro, um órgão imunoprivilegiado.

Não foi identificada nenhuma das três cepas de *T. gondii* no íleo de camundongos após 48 horas de infecção aguda. Provavelmente a quantidade de DNA presente no intestino poucas horas após a infecção é muito pequena e, portanto não detectável pela técnica empregada. É necessário encontrar marcadores mais sensíveis que sejam também capazes de diferenciar as cepas de *T. gondii* para serem usados em estudos posteriores.

Já foi demonstrado que durante a infecção aguda, os taquizoítos de *T. gondii* se espalham do sítio de infecção no intestino para os tecidos mais distantes (Dubey et al., 1997). Uma semana após a infecção, foi observada a presença dos parasitos no intestino de todos os animais testados dos grupos EGS e CH3 agudo. No grupo EGS agudo, também foi detectada a presença dos parasitos nos pulmões de dois dos sete camundongos testados. Para o grupo CH3 agudo, cinco dos sete animais apresentaram DNA do parasito nos pulmões e dois deles também no cérebro. Para o grupo infectado com a cepa avirulenta, D8 agudo, o DNA do parasito foi detectado tanto no íleo quanto no pulmão de todos os animais testados uma semana após o desafio. Após duas semanas, os animais deste grupo apresentavam DNA da cepa D8 em todos os tecidos. De acordo com Dubey e colaboradores (1997), o padrão de disseminação do parasito em diferentes cepas clonais (ME49, VEG e GT1) e cepa atípica (P89) consiste primeiramente na penetração de enterócitos e células da lâmina própria cerca de duas horas após a infecção. Após a multiplicação do parasito observa-se parasitemia 24h após a infecção. Dentro de quatro dias o parasito invade os pulmões e outros órgãos. A

formação de cistos teciduais começa seis dias após a infecção e com 10 dias é possível identificar cistos teciduais no cérebro. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram a literatura porque demonstram a presença do parasito principalmente no íleo, seguido do pulmão e finalmente no cérebro nas infecções agudas com as cepas D8, EGS ou CH3.

Entretanto, quando nós testamos o grupo D8+CH3 a fim de identificar a disseminação da cepa CH3 num hospedeiro previamente infectado, nós detectamos a presença de CH3 no íleo somente após duas semanas do desafio em apenas 14,3% dos camundongos. No grupo D8+EGS nenhum camundongo apresentou DNA da cepa EGS no íleo. Durante uma primoinfecção oral com cistos de *T. gondii* foi demonstrado que a carga parasitária aumenta exponencialmente no intestino delgado após seis dias de infecção (Courret et al., 2006; Dubey et al., 2012). A rota de migração paracelular já foi demonstrada pelo acúmulo de taquizoítos nas junções das células epiteliais (Barragan et al., 2002). Neutrófilos parasitados também são capazes de migrar de dentro do lúmen intestinal assim como cruzar o epitélio intestinal facilitando a disseminação do parasito dentro e através do intestino (Coombes et al., 2013). Greeg e colaboradores (2013) demonstraram que o número de placas parasitárias nas vilosidades intestinais aumentam com o tempo e neutrófilos e monócitos acumulam-se próximos ao foco de infecção. Os autores ainda encontraram parasitos livre e viáveis no lúmen intestinal e sugerem que o crescimento e a expansão das placas parasitárias no epitélio intestinal devem ocorrer tanto por transmissão retrógrada do parasito pela lamina própria para a vilosidade adjacente quanto pela transferência do parasito pelo lúmen. Na análise histopatológica do íleo foi observado que diferentemente da ileíte grave encontrada nos grupos com infecção aguda pelas cepas virulentas (especialmente EGS), os grupos desafiados não apresentaram alterações significativas e se assemelham ao controle da infecção crônica.

Os nossos resultados, combinados com o que é descrito na literatura sugerem que *T. gondii* utiliza mais de uma estratégia para se disseminar através do intestino e que, possivelmente, a transferência do parasito pelo lúmen deva estar interrompida ou prejudicada nos grupos desafiados. Esse fato resultaria numa menor taxa de multiplicação do parasito neste local. Estudos futuros demonstrando o aumento de IgA secretada no lúmen intestinal após a reinfecção e seu papel na regulação da replicação do parasito neste contexto devem ser realizados. Brandão e colaboradores (2009) encontraram IgA plasmático em camundongos infectados com a cepa D8, 45 e 180 dias após a infecção.

Surpreendentemente nos pulmões foi detectada a presença da cepa utilizada no desafio em 71,4% dos animais do grupo D8+EGS e em 100% dos animais do grupo D8+CH3, apenas 48 horas após o desafio. Foi demonstrado também que parasitos da cepa D8 permanecem presentes em todos os órgãos testados dos animais com infecção crônica recente (D8 crônico e grupos desafiados), sessenta dias após a infecção. A disseminação do parasito para outros órgãos pode ocorrer através do sangue, dos vasos linfáticos ou espoliação das células móveis do sistema imune e essas estratégias podem ser influenciadas pelo genótipo do parasito (Harker et al., 2015). Taquizoítos livres podem cruzar o epitélio e o endotélio e penetrar os tecidos. Entretanto, a espoliação das células móveis do sistema imune pode ser uma estratégia eficiente para o parasito evadir da resposta imune (Harker et al., 2015). Os pulmões são tipicamente descritos como sendo um órgão com elevada carga parasitária e sempre acometido nos primeiros dias de infecção. Parasitos já foram observados nos pulmões até três dias após a infecção oral (Zenner et al., 1998, Djurkovic-Djakovic et al., 2012). Boyle e colaboradores (2007) usando diferentes cepas transfectadas expressando luciferase, após infecção por gavagem, encontraram o sinal dominante no peito dos animais infectados seis dias após

a infecção. De alguma forma esse tecido parece ser permissivo para a replicação de *T. gondii* mesmo quando uma resposta imune já foi anteriormente ativada especificamente contra esse parasito. Franco e colaboradores (2015) desafiando animais cronicamente infectados com cepas virulentas encontraram apenas a cepa virulenta nos pulmões da maioria dos animais desafiados 19 dias após o desafio. Os autores encontraram esse mesmo perfil em outros órgãos sistêmicos como baço e fígado.

Pinheiro e colaboradores (2015) descreveram o fígado como sendo um dos órgãos mais acometidos por infecções orais com cepas atípicas do *T. gondii*. No presente estudo, todos os grupos experimentais apresentaram alterações patológicas sendo que no grupo EGS agudo elas foram mais significativas. A perda da arquitetura do baço dos animais infectados com cepas virulentas também foi descrita por Pinheiro e colaboradores (2015) com a infecção pela cepa atípica TgCTBR9. Alguns autores justificam esse achado como resultado da superprodução de IFN- γ (Gavrilescu e Denkers 2001), que foi demonstrada no soro dos animais desses grupos com uma semana de infecção. Zaretsky e colaboradores (2012), por outro lado, atribuem esse fenômeno à redução na expressão de proteínas responsáveis pela organização dessa arquitetura, como alpha e beta linfotoxinas.

No cérebro, não foi encontrado DNA das cepas utilizadas no desafio em nenhum momento analisado para os dois grupos desafiados (D8+EGS ou D8+CH3). Também não foram observadas alterações histopatológicas no cérebro dos grupos desafiados significativamente diferentes do controle D8 crônico. Nos estudos anteriores do nosso grupo foi possível identificar, após 30 dias do desafio, a presença da cepa EGS no cérebro dos camundongos do grupo D8+EGS, mas não a presença da cepa CH3 no cérebro dos animais do grupo D8+CH3 (Brandão et al., 2009), mesmo em animais imunossuprimidos (Silva et al., 2012). Esses autores utilizaram uma dose maior tanto na

infecção quanto no desafio (20 cistos teciduais) e a identificação da presença da cepa utilizada no desafio ocorreu através de bioensaio em camundongos. Somente quando o desafio foi realizado 180 dias após a infecção primária, o bioensaio permitiu a identificação da cepa CH3 em 67% dos camundongos do grupo D8+CH3 (Brandão et al., 2009). A resposta imune adquirida parece ser capaz de atrasar a entrada do parasito em órgãos imunoprivilegiados como o cérebro.

Os grupos com infecção aguda por cepas virulentas (EGS e CH3) apresentaram no intestino uma maior quantidade de IFN- γ e IL-12 acompanhados por uma maior quantidade de IL-10. Esses dois grupos apresentaram as alterações histopatológicas mais significativas no íleo. Concluímos que o aumento de IL-10 não foi suficiente para modular a resposta e prevenir os danos nocivos causados pelo parasito.

No soro, o aumento de IFN- γ nos grupos com infecção aguda, independente da cepa, ocorreu uma semana após o desafio. Esse aumento também foi acompanhado por um aumento de IL-6. Nesse momento foi demonstrado por PCR-RLPF que os parasitos já haviam se espalhado sistemicamente, o que explica os elevados níveis desta citocina quantificados no soro.

Os animais com infecção crônica, independente de serem desafiados (D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8) ou não (D8 crônico), possuem maior quantidade de IFN- γ no soro em relação ao controle não infectado. Porém não foi demonstrado, nem no intestino nem no soro, um aumento dos níveis desta citocina em relação ao controle D8 crônico. A quantidade de IFN- γ no soro de animais desafiados permaneceu estável, uma semana após o desafio. Os níveis sistêmicos elevados de IFN- γ em relação ao grupo PBS podem ser suficientes para que células TCD8+ citotóxicas eliminem células infectadas pelas cepas utilizadas no desafio. Esse mecanismo controlaria as taxas de replicação de *T.*

gondii e a conseqüente exacerbação da resposta imune desencadeada pela presença deste. O aumento de linfócitos TCD8⁺ no intestino foi observado por Benevides e colaboradores (2013) em animais sensibilizados com STAg e desafiados com *T. gondii*. Os autores sugerem que essa população celular esteja relacionada à proteção uma vez que a carga parasitária assim como os danos teciduais foram menores nos animais estimulados com STAg do que nos animais *naive*.

Observamos um aumento da citocina TNF- α em alguns grupos desafiados em relação ao controle: no intestino do grupo D8+D8 com 48 horas após a infecção, no soro de D8+CH3 uma semana após a infecção e também no soro de D8+EGS duas semanas após a infecção. Como esse aumento foi pontual não é possível afirmar que TNF- α estaria participando da proteção dos animais desafiados. Apesar da controvérsia da participação de IL-17 na patologia da toxoplasmose, no presente estudo, o aumento sérico de IL-17 duas semanas após o desafio nos grupos D8+EGS, D8+CH3 e D8+D8 não foi associado a alterações histológicas mais significativas. Possivelmente essa citocina participa nesse modelo do controle da carga parasitária após duas semanas de infecção. Tanto a citocina TNF- α quanto IL-10 nos grupos reinfetados não se mostraram aumentadas em relação ao controle da infecção crônica.

Diferentemente dos nossos resultados, Franco e colaboradores (2015) observaram níveis aumentados de citocinas inflamatórias (IFN- γ , TNF- α) e também IL-10 no soro dos animais reinfetados em comparação ao grupo de animais com infecção crônica que não foram desafiados. Entretanto, a primoinfecção realizada por Franco e colaboradores foi com a cepa clonal ME49 e o desafio foi através de inóculo intraperitoneal.

Apesar da clássica e potente ativação da resposta inflamatória do tipo I, o efeito imunomodulador de *T. gondii* vem sendo estudado por alguns grupos. Wagner e

colaboradores (2009) observaram que a infecção oral por oocistos de *T. gondii* previne a alergia tipo I em camundongos. Os autores identificaram uma porcentagem mais alta de células T regulatórias Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ nos esplenócitos e linfonodos mesentéricos na fase crônica da infecção pelo parasito. Em 2016, foi demonstrado pelo mesmo grupo que além da infecção com o parasito, o antígeno de oocisto lisado (OLA) também é capaz de reduzir o desenvolvimento de alergia (Wagner et al., 2016). Benevides e colaboradores sensibilizaram os camundongos susceptíveis C57BL/6 com STAg e os infectaram com uma dose letal de 100 cistos da cepa ME49. Os autores observaram redução dos níveis sistêmicos de IFN- γ e de RNA mensageiro de IFN- γ e TNF- α no intestino assim como redução de diversas células inflamatórias na lâmina própria (TCD4⁺, células NK, células dendríticas e monócitos) em comparação à infecção em animais *naive*. Como consequência foi observada a sobrevivência dos animais infectados. A análise por imunohistoquímica demonstrou também níveis reduzidos de IL-17 e iNOS (óxido nítrico sintetase indutível) no intestino.

Uma possível explicação para o nosso modelo seria que a primoinfecção desencadearia um maior número de células regulatórias, inclusive de memória, que durante a reinfecção se expandiriam prontamente impedindo inflamação nociva para o hospedeiro através de citocinas modulatórias. Entretanto, pelas técnicas e abordagens utilizadas no presente estudo não foi observado um aumento significativo de IL-10 ou TGF- β nos grupos desafiados que comprovasse essa hipótese.

Reis e colaboradores (1999) afirmam que após a injeção de STAg, ou mesmo de parasitos vivos no peritônio dos camundongos, as células dendríticas tornam-se não responsivas por cerca de uma semana, fenômeno conhecido como parálise. Quando os camundongos *knockout* para IL-10 foram infectados durante esse intervalo observou-se redução dos danos imunopatológicos intestinais e sobrevivência dos animais. Outra

hipótese para explicar o nosso modelo seria que a infecção prévia pela cepa D8 causaria uma parálise das células dendríticas intestinais mais duradoura, prevenindo os danos causados pelas cepas virulentas durante o desafio. Porém nesse caso, sem o controle da resposta imune na multiplicação do parasito, seria provável que as cepas utilizadas no desafio fossem rapidamente detectadas no tecido intestinal. Entretanto, os resultados do presente estudo demonstram o contrário: ausência ou presença em pequena proporção da cepa utilizada no desafio mesmo duas semanas após o desafio. É necessária a realização de estudos futuros para testar as hipóteses apresentadas.

Apesar da técnica de genotipagem através de PCR-RFLP ser ainda limitada na identificação da diversidade das proteínas de virulência, os resultados obtidos auxiliaram no entendimento do modelo em estudo. De acordo com a literatura, GRA15 do tipo I e do tipo III são proteínas truncadas e não funcionais que não são capazes, portanto, de ativar NF- κ B (Rosowsky et al., 2011). A consequência disso é que não ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias no início da infecção. As cepas D8, EGS e CH3 apresentaram GRA15 do tipo I/III.

Entretanto, a cepa EGS apresentou ROP16 do tipo II enquanto que as demais cepas apresentaram do tipo I. ROP16_{II} induz uma ativação apenas transitória das vias STAT3/6 e por isso é observada uma produção maciça de citocinas no início da infecção (Saeij et al., 2007). A cepa EGS estimulou uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-6, IL-17 no intestino 48 horas após a infecção, ou seja, no princípio da infecção. Provavelmente essa produção maciça de citocinas foi a causa da grave ileíte apresentada por esse grupo que se assemelha àquela causada por infecção oral com 100 cistos da cepa ME49 em camundongos susceptíveis C57/BL6 (Liesenfeld et al., 1996). Curiosamente nos pulmões dos animais do grupo D8+EGS as alterações inflamatórias foram mais intensas que aquelas apresentadas pelo

grupo EGS agudo. A presença da cepa EGS foi detectada nos pulmões do grupo EGS agudo com uma semana e no D8+EGS com 48 horas. Possivelmente, o maior tempo do parasito replicando nesse local resultou numa inflamação mais significativa observada na análise histológica realizada nove dias após a infecção. Nas cepas utilizadas nesse estudo parece que a importância da proteína ROP16 em relação à capacidade de induzir fenômenos inflamatórios é maior do que da proteína GRA15.

As cepas com genótipo clonal tipo III expressam baixos níveis de ROP18 e essa forma da proteína não é capaz de fosforilar IRG (Taylor et al., 2007). Sendo assim, as cepas que apresentam esse alelo da ROP18 apresentam virulência reduzida. A cepa D8 possui ROP18 do tipo III. As cepas EGS e CH3 possuem ROP18 do tipo u-1 assim como a cepa atípica MAS. Sabe-se pouco sobre esse tipo de ROP18, porém, de acordo com Shwab e colaboradores (2016), a mortalidade observada em cepas que apresentam a forma u-1 da ROP18 é de 80%, sendo esse alelo característico de cepas virulentas. Apesar da ROP5_{III} estar relacionada com virulência elevada este alelo foi detectado tanto na cepa EGS quanto na cepa D8.

De acordo com Shwab e colaboradores (2016) a análise combinada de ROP5 e ROP18 é altamente preditiva de virulência. A cepa D8 possui a combinação ROP5_{III}/ROP18_{III} e se agrupa com cepas que apresentam mortalidade média inferior a 20%. O presente estudo corrobora os resultados de desses autores uma vez que foi observado 10% de mortalidade quando a infecção foi realizada pela via oral com 10 cistos da cepa D8. O mesmo aconteceu quando analisamos a combinação da cepa CH3 (ROP5_{u-1}/ROP18_{u-1}) que possui mortalidade média de 90% de acordo os autores citados acima. Porém a combinação das proteínas da cepa EGS (ROP5_{III}/ROP18_{u-1}) é descrita pelos autores como apresentando uma mortalidade média de apenas 30%, diferente do observado em nosso estudo. Apesar da combinação de ROP5 e ROP18 ter sido implicada como um

excelente determinante da virulência de cepas de *T. gondii*, parece que a generalização não pode ser feita. Além do genótipo destas duas proteínas, também estão envolvidas as demais proteínas de virulência, assim como os níveis de expressão de cada uma delas que vão resultar em um fenótipo particular de cada cepa.

A genotipagem tradicional não aborda as diferenças entre as proteínas de virulência das cepas. Por isso, a análise dos alelos dessas proteínas pode auxiliar no entendimento da ocorrência de reinfecção com apenas algumas cepas de um mesmo genótipo (Freyre et al., 2004) .

7. CONCLUSÕES

A resposta imune adquirida pela infecção primária com uma cepa pouco virulenta de *T. gondii* não protege o hospedeiro contra a reinfecção com uma cepa virulenta. Entretanto, é capaz de prevenir o acesso e a reprodução do parasito em alguns órgãos.

Além disso, os danos teciduais decorrentes da imunopatologia da infecção são minimizados uma vez que não ocorre aumento de citocinas inflamatórias ou até mesmo modulatórias nos grupos reinfectados em comparação aos animais apenas com infecção crônica, nem no local de infecção ou sistemicamente. Conseqüentemente não ocorre a morte do hospedeiro. Dessa forma, um equilíbrio na relação parasito-hospedeiro é atingido, o que garante a permanência de ambos: hospedeiros naturais e parasitos de elevada virulência.

A análise combinada das proteínas ROP5 e ROP18 para a predição de virulência de *T. gondii* foi adequada em apenas duas das três cepas do parasito usadas nesse estudo indicando que esses marcadores não são necessariamente universais.

8. PERSPECTIVAS

Novos estudos de reinfecção por *T. gondii* avaliando o parasitismo tecidual deverão ser realizados antes de 48 horas após o desafio, na tentativa de identificar uma possível rápida passagem da segunda cepa do parasito no intestino antes da sua chegada ao pulmão.

Desenvolver o modelo de reinfecção a fim de identificar quais são os mecanismos que participam da proteção parcial do animal primoinfectado pode trazer novos *insights* no desenvolvimento de vacinas que previnam, por exemplo, a transmissão congênita de *T. gondii*. As populações de linfócitos CD4 e CD8 presentes no intestino assim como a resposta das células do linfonodo mesentérico frente ao estímulo com antígeno de *T. gondii* deverão ser estudados.

Também devem ser pesquisadas outras cepas brasileiras de genótipo atípico neste modelo de reinfecção, tendo em vista a capacidade de serem IRG resistentes ou sensíveis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick RS, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW 2012. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59: 429-493.

Aliberti J, Reis e Souza C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle G, Sher A 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 α + dendritic cells. *Nat Immunol* 1: 83-87.

Arantes RM, Nogueira AM 1997. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell Tissue Res* 290: 61-69.

Barragan A and Sibley D 2002. Transepithelial Migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med* 195: 1625-1633.

Behnke MS, Khan A, Wootton JC, Dubey JP, Tang K, Sibley LD 2011. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9631-9636.

Benevides L, Cardoso CR, Milanezi CM, Castro-Filice LS, Barenco PVC, Souza RO, Rodrigues RM, Mineo JR, Silva JS, Silva NM 2013. *Toxoplasma gondii* soluble tachyzoite antigen triggers protective mechanisms against fatal intestinal pathology in oral infection of C57BL/6 mice. *PLoS ONE* 8(9): e75138. doi:10.1371/journal.pone.0075138

- Blader IJ, Saeij JP 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *Apmis* 117: 458-476.
- Bonametti AM, Passos JN, Da Silva EMK, Bortoliero AL 1997. Surto de Toxoplasmose Aguda Transmitida através da Ingestão de Carne Crua de Gado Ovino. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 21-25.
- Boyle JP, Saeij JPJ, Boothroyd J 2007. *Toxoplasma gondii*: Inconsistent dissemination patterns following oral infection in mice. *Exp Parasitol* 116: 302-305.
- Brandão GP, Ferreira AM, Melo MN, Vitor RWA 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. *Parasite*, 13: 143-149.
- Brandão GP, Melo MN, Gazzinelli RT, Caetano BC, Ferreira AM, Silva LA, Vitor, RWA 2009. Experimental reinfection of BALV/c mice with different recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: involvement of IFN- γ and IL-10. *Mem Inst Oswaldo cruz* 104: 241-245.
- Brandão GP, Melo MN, Caetano BC, Carneiro CM, Silva LA, Vitor RWA 2011. Susceptibilidade to re-infection in C57BL/6 mice with recombinant strains of *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 128: 433-437.
- Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard LC, Kasper LH 2006. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell Microbiol* 8: 535-544.
- Carneiro ACAV, Andrade GMQ, Januário JN, Carellos EVM, Vasconcelos-Santos D, Costa JGL, Pinheiro BV, Ferreira AM, Vitor RWA 2013. Genetic

- characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 51: 901-907.
- Cenci-Goga BT, Rossitto PV, Sechi P, McCrindle CME, Cullor JS 2011. *Toxoplasma* in Animals, Food, and Humans: An Old Parasite of New Concern. *Foodborne Pathog Dis* 8: 751-762.
- Coombes JL, Charsar BA, Han SJ, Halkias J, Chan SW, Koshy AA, Striepen B, Robey EA 2013. Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E1913–E1922.
- Correa D, Cañedo-Solares I, Ortíz-Alegría LB, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP 2007. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol* 29: 651-660.
- Cortez VS, Cervantes-Barragan L, Song C, Gilfillan S, Mc Donald KG, Tussiwand R, Edelson BT, Murakami Y, Murphy KM, Newberry RD, Sibley D, Colonna M 2014. CRTAM controls residency of gut CD4+CD8+ T cells in the steady state and maintenance of gut CD4+ Th17 during parasitic infection. *J Exp Med* 211: 623-633.
- Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni-Gâtel D, Tardieux I 2006. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107: 309-316.
- Dao A, Fortier B, Soete M, Plenat F, Dubremetz JF 2001. Successful reinfection of chronically infected mice by a different *Toxoplasma gondii* genotype. *Int J Parasitol* 31: 63-65.

- Dardé ML 2008. *Toxoplasma gondii* “new” genotypes and virulence. *Parasite* 15: 366-371.
- Denkers EY, Gazzinelli RT 1998. Regulation and function of T cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 11: 569-588.
- Denkers EY, Butcher BA, Bennouna S 2004. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol* 34: 411-421.
- Djurković-Djaković O, Djokić V, Vujanić M, Zivković T, Bobić B, Nikolić A, Slavić K, Klun I, Ivović V 2012. Kinetics of parasite burdens in blood and tissues during murine toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 131: 372-376.
- Dubey JP, Miller NL, Frankel JK 1970. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 132: 636–662.
- Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OC, Blixt JA. 1997. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* 83: 870–882.
- Dubey, J.P., Graham, D.H., Blackston, C.R., Lehmann, T., Gennari, S.M., Ragozo, A.M.A., Nishi, S.M., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., Hill, D.E., Thulliez, P., 2002. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo Brazil: unexpected findings. *Int J Parasitol* 32: 99–105.
- Dubey JP; Su C 2009, Population biology of *Toxoplasma gondii*: what’s out and where did they come from. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 190-195.
- Dubey JP, Ferreira LR, Martins J, McLeod R. 2012. Oral oocyst-induced mouse of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different

- genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitology* 139: 1-13.
- Dubey JP, Why KV, Verma SK, Choudhary S, Kwok OCH, Khan A, Behinke MS, Sibley LD, Ferreira LR, Olibeira S, Weaver M, Stewart R, Su C 2014. Genotyping *Toxoplasma gondii* from wildlife in Pennsylvania and identification of natural recombinants virulent to mice. *Vet Parasitol* 200: 74-84.
- Dziko K, Staczek P, Gatkowska J, Dlugonska H 2006. *Toxoplasma gondii*: Serological recognition of reinfection. *Exp Parasitol* 112: 134-137.
- Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P 2009. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection and review. *J Infect Dis* 199: 280-285.
- El-Nawawi FA, Tawfik MA, Shaapan RM 2008. Methods for Inactivation of *Toxoplasma gondii* Cysts in Meat and Tissues of Experimentally Infected Sheep. *Foodborne Pathog Dis* 5: 687- 690.
- Fentress SJ, Behnke MS, Dunay IR, Mashayekhi M, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, Taylor GA, Turk BE, Lichti CF, Townsend R, Qiu W, Hiu R, Beatty WL, Sibley D 2010. Phosphorylation of immunity-related GTPases by *Toxoplasma gondii*- secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. *Cell Host Microbe* 16: 484-495.
- Ferreira AM, Martins MS, Vitor RW 2001. Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brasil. *Parasite* 8: 99-105.

- Ferreira AM, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 6:22-31.
- Filisetti D and Candolfi E 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità* 40: 71-80.
- Fortier B, Pinto-Sousa MI, Ajana F 1991. *Toxoplasma gondii*: 2 cases of recontamination in immune patients. *Press Med* 20: 2109.
- Franco PS, Silva DAO, Costa IN, Gomes AO, Silva ALN, Pena JDO, Mineo JR, Ferro EAV 2011. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. *Placenta* 32: 116-120.
- Franco PS, da Silva NM, de Freitas Barbosa B, de Oliveira Gomes A, Ietta F, Shwab EK, Su C, Mineo JR, Ferro EA 2015. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. *Front Microbiol* 6 - 181.
- Freyre A, Falcón J, Mendez J, Correa O, Morgades D, Rodríguez A 2004. An investigation of sterile immunity against toxoplasmosis in rats. *Exp Parasitol* 107: 14–19.
- Fux B, Rodrigues CV, Portela RW, Silva NM, Su C, Sibley S, Vitor RWA, Gazzinelli RT 2003. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 71: 6392-6401.

- Gaddi PJ, Yap GS 2007. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol Cell Biol* 85: 155-159.
- Gavinet MF, Robert F, Frition G, Delouvrier E, Hennequin C, Maurin JR, Tourt-Schaefer C, Dupoy-Camet J 1997. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J Clin Microbiol* 35: 1276-1267.
- Gavrilescu, L.C., Denkers, E.Y., 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 167, 902–909.
- Gazzinelli RT, Yuhui X, Hieny S, Cheever A, Sher A 1992. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 149: 175-180.
- Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A 1993. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci* 90: 6115-6119.
- Gazzinelli RT, Amichay D, Scharon-Kersten T, Grunvald E, Faber JM, Sher A 1996. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219: 127-140.
- Greig B, Taylor BC, John B, Tait-Wojno ED, Girgis NM, Miller N, Wagage S, Roos DS, Hunter CA 2013. Replication and distribution of *Toxoplasma gondii* in the small intestine after oral infection with tissue cysts. *Infect Immun* 81: 1635-1643.

- Guiton R, Vasseur V, Charron S, Arias MT, Van Langendonck N, Buzoni-Gatel D, Ryffel B, Dimier-Poisson I 2010. Interleukin 17 Receptor Signaling Is Deleterious during *Toxoplasma gondii* Infection in susceptible BL6 Mice. *J Infect Dis* 202: 427-435.
- Harker KS, Ueno N, Lodoen MB 2015. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol* 37: 141-149.
- Hennequin C, Dureau P, Nguyen L, Thulliez P, Gagelin B, Dufier JL 1997. Congenital toxoplasmosis acquired from an immune woman. *Pediatr Infect Dis J* 16: 75-77.
- Hill D, Sreekumar C, Dubey JP 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev* 6: 41-62.
- Hill D, Su C 2012. High tissue burden of *Toxoplasma gondii* is the hallmark of acute virulence in mice. *Vet parasitol* 187: 36-43.
- Howe DK, Sibley LD 1995. *Toxoplasma gondii* comprises 3 clonal lineages – correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172:1561-1566.
- Jensen KDC, Camejo A, Melo MB, Cordeiro C, Julien L, Grotenbreg GM, Frickel E, Ploegh HL, Young L, Saeij JPJ. 2015. *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact *ROP5/ROP18* allelic combination. *mBio* 6(2):e02280-14.
- Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Shwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, Moretto M, Khan IA 2005. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect immun* 73: 617-621.

- Khan IA, Schwartzman JD, Matsuura T, Kasper LH 1997. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12955-12960.
- Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo LV, Belfort Jr R, Vitor RWA, Sibley D 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 12: 942-949.
- Khan A, Taylor S, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD 2009. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. *PLoS Genet* 5(3): e1000404. doi:10.1371/journal.pgen.1000404
- Kim K, Weiss LM 2008. Toxoplasma: the next 100 years. *Microb infect* 10: 978-984.
- Kravetz JD, Federman DG 2005. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med* 118: 212-216.
- Lebas F, Ducrocq S, Muciqnat V, Paris L, Mérgier P, Baudon JJ, Gold F 2004. Congenital toxoplasmosis; a new case of infection during pregnancy in a previously immunized and immunocompetent woman. *Arch Pediatr* 11: 926-928.
- Levine ND 1988. The protozoan phylum apicomplexa. Boca Raton, Flórida: CRC Press
- 2
- Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y 1996. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 184: 597-607.

- Liesenfeld O 2002. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: A new model of inflammatory bowel disease? *J Infect Dis* 185: S96–S101.
- Machado Coelho GLL, Vitor RWA, Chiari CA, Antunes CMF 1995. Validity of serology for American Trypanosomiasis with eluates from filter paper. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 50-64.
- Melo MB, Jensen KDC, Saeij JPJ 2011. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol* 27: 487-495.
- Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965-1976.
- Mordue DG, Monroy F, Regina ML, Dinarello CA, Sibley LD 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol* 167: 4574-4584.
- Muñoz M, Heimesaat MM, Danker K, Struck D, Lohmann U, Plickert R, Bereswill S, Fischer A, Dunay R, Wolk K, Loddenkemper C, Krell HW, Libert C, Lund RL, Frey O, Hölscher C, Iwakura Y, Ghilardi N, Ouyang W, Kamradt T, Sabat R, Liesenfeld O 2009. Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17 2009. *J Exp Med* 206: 3047-359.
- Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM 2011. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev* 240: 269-285.
- Negrão-Corrêa D, Souza DG, Pinho V, Barsante MM, Souza AL, Teixeira MM 2004. Platelet-Activating Factor Receptor Deficiency Delays Elimination of Adult Worms but Reduces Fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-Infected Mice. *Infect Immun* 72: 1135-1142.

- Nicolle C, Manceaux L 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. C R Acad Sci 148: 369.
- Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Sehy D, Stumhofer JS, Hunter CA 2010. IL-6 promotes NK production of IL-17 during toxoplasmosis. *J Immunol* 15: 1776-1783.
- Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 38: 561-69.
- Pifer R, Yarovinsky F 2011. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends Parasitol* 27: 388-393.
- Pinheiro BV, Noviello ML, Cunha MM, Tavares AT, Carneiro ACV, Arantes RM, Vitor RW 2015. Pathological changes in acute experimental toxoplasmosis with *Toxoplasma gondii* strains obtained from human cases of congenital disease. *Exp Parasitol* 156: 87-94.
- Reese ML, Zeiner GM, Saeij JP, Boothroyd JC, Boyle JP 2011. Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. *PNAS* 108: 9625-9630.
- Reis e Sousa C, Yap G, Schulz O, Rogers N, Schito M, Aliberti J, Hieny S, Sher A 1999. Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity* 11: 637-647.
- Rosowsky EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, Jesen KDC, Saeij JP 2011. Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J Exp Med* 208: 195-212.

- Saeij JPI, Boyle JP, Coller S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET, Ajioka JW, Boothroyd JC 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in Toxoplasmosis. *Science* 314: 1780-1783.
- Saeij JPI, coller S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC 2007. *Toxoplasma* co-opts host genes expression by infection of a polymorfhic kinase homologue. *Nature* 445: 324-327.
- Shwab EK, Zhu X, Majundar D, Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C 2014. Geographical patterns os *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multicocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitol* 141: 456-461.
- Shwab EK, Jiang T, Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C 2016. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 46: 141-146.
- Silva LA, Brandão GP, Pinheiro BV, Vitor RWA 2012. Immunosupression with cyclophosphamide favors reinfection with recombinant *Toxoplasma gondii* strains. *Parasite* 19: 249-257.
- Silva LA, Andrade RO, Carneiro ACAV, Vitor RWA (2014) Overlapping *Toxoplasma gondii* Genotypes Circulating in Domestic Animals and Humans in Southeastern Brazil. *PLoS ONE* 9(2): e90237.
- Silveira C, Ferreira R, Muccioli, Nussenblatt R, Belfort R Jr 2003. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. *Am J Ophthalmol* 136: 370-371.

- Splendore A 1908. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 3: 109-112.
- Su C, Zhang X, Dubey JP 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 36: 841-848.
- Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137(1): 1-11.
- Subauste CS, Koniaris AH, Remington JS 1991. Murine CD8⁺ cytotoxic T Lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J Immunol* 147: 3955-3959.
- Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K, Beatty WL, Hajj HEL, Jerome M, Behnke Ms, White M, Wootton JC, Sibley LD 2007. Secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science* 314: 1776 – 1780.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-1258.
- Valdès V, Legagneur H, Watrin V, Paris L, Hascoet JM 2010. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *Arch Pediatr* 18: 761-763.
- Vidigal PV, Santos DV, Castro FC, Couto JC, Vitor RWA, Brasileiro Filho G 2002. Prenatal toxoplasmosis diagnosis from amniotic fluid by PCR. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 1-6.

- Wagner A, Förster-Waldl E, Garner-Spitzer E, Schabussova I, Kundi M, Pollak A, Scheiner O, Joachim A, Wiedermann U 2009. Immunoregulation by *Toxoplasma gondii* infection prevents allergic immune responses in mice. *Int J Parasitol* 39: 465-472.
- Wagner A, Schabussova I, Drinic M, Akgün J, Loupal G, Kundi M, Joachim A, Wiedermann U 2016. Oocyst-derived extract of *Toxoplasma gondii* serves as potent immunomodulator in a mouse model of birch pollen allergy. *PLoS One* 11: e0155081.
- Yap GS, Shaw MH, Ling Y, Sher A 2006. Genetic analysis of host resistance to intracellular pathogens: lessons from studies of *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect* 8: 1117-1118.
- Yarovinsky F 2014. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol* 14:109-121.
- Zaretsky AG, Silver JS, Siwicky M, Durham A, Ware CF, Hunter CA 2012. Infection with *Toxoplasma gondii* alters limphotoxin expression associated with changes in splenic architecture. *Infect immun* 80: 3602-3610.
- Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF 1998. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol* 90: 86-94.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 348 / 2012, relativo ao projeto intitulado “Avaliação da resposta imunológica celular para *Toxoplasma gondii* em um modelo de reinfecção em camundongos BALB/c com cepas recombinantes”, que tem como responsável RICARDO WAGNER DE ALMEIDA VITOR, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 06/12/2012. Este certificado espira-se em 06/12/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 348 / 2012, related to the Project entitled “Evaluation of *Toxoplasma gondii* cellular immune response in a BALB/c mice reinfection model with recombinant strains”, under the supervision of RICARDO WAGNER DE ALMEIDA VITOR, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 06/12/2012. This certificate expires in 06/12/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 06/12/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2 - RESULTADOS INDIVIDUAIS DA PADRONIZAÇÃO DO MARCADOR POR MULTIPLEX-NESTED PCR DOS GRUPOS D8+EGS E D8+CH3

Tabela 2A: Resultados individuais dos sete animais de cada dia experimental para cada marcador molecular testado do grupo D8+EGS.

	Animais	L358	PK1	c22-8	c29-2
48 horas	1	III/I	III	II	III
	2	III/I	III	II	III
	3	III/I	III	II	III
	4	III	NR	II	NR
	5	III	NR	II	NR
	6	III/I	III	II	III
	7	III/I	III	II	III
1 semana	1	III/I	III	II	III
	2	III/I	III	II	III
	3	III/I	III	II	III
	4	III/I	III	II	III
	5	III/I	NR	NR	III
	6	III/I	III	II	III
	7	III/I	III	II	III
2 semanas	1	III/I	III	II	NR
	2	III/I	III/II	II	III/I
	3	III/I	III	II	III
	4	III/I	III/II	II/I	III/I
	5	III/I	III	II	III
	6	III/I	III	II/I	III
	7	III/I	III	II	III

NR: PCR não realizada. Não foram obtidas bandas adequadas à digestão por RFLP

PADRONIZAÇÃO DE MARCADOR - PULMÃO
D8 + EGS

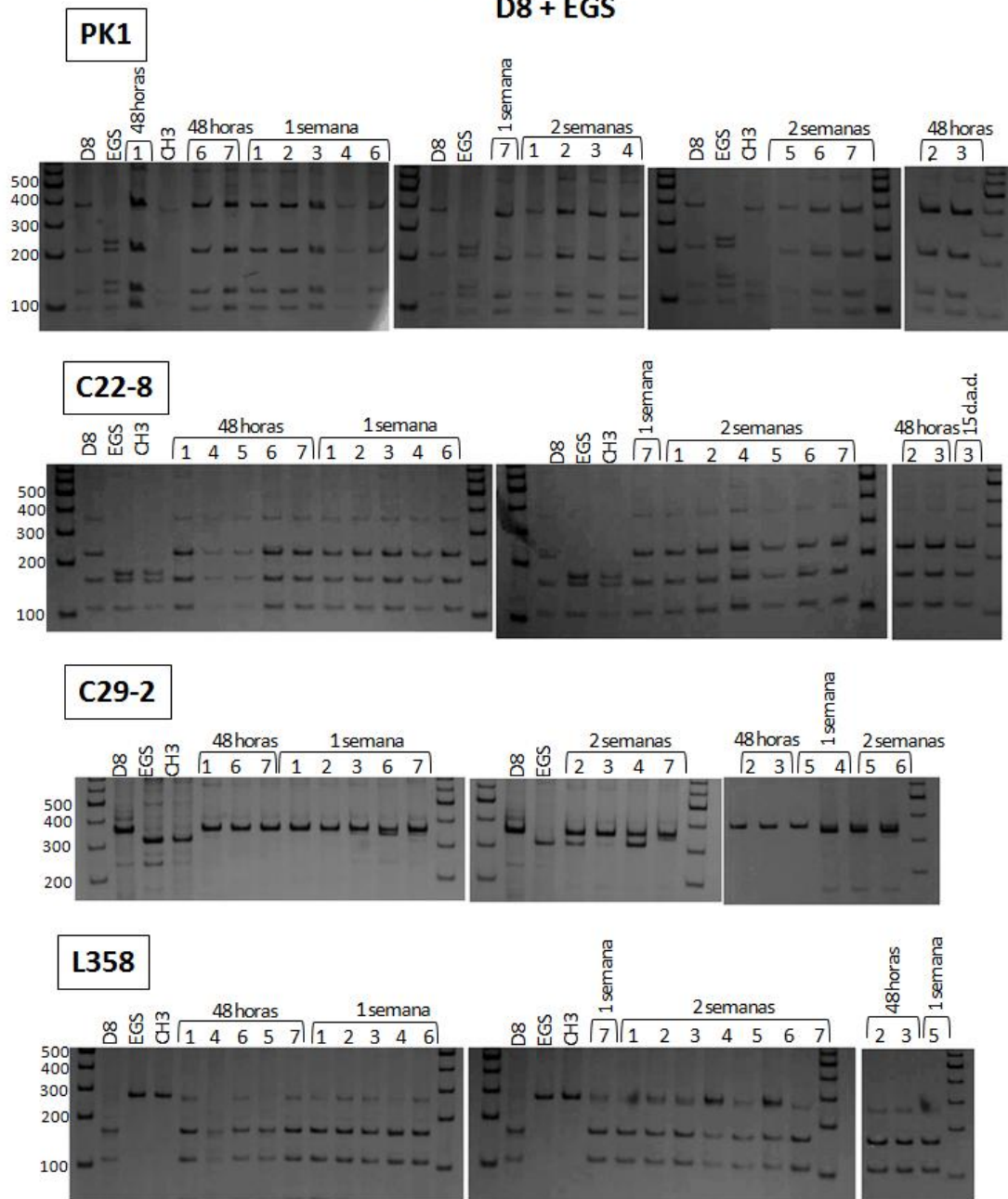


Figura 2A: Imagem dos géis da digestão com endonucleases específicas para cada marcador do grupo D8+EGS.

Tabela 2B: Resultados individuais dos sete animais de cada dia experimental para cada marcador molecular testado do grupo D8+CH3.

	Animais	L358	PK1	c22-8	c29-2
48 horas	1	III/I	III	II	III
	2	III/I	III	II	III
	3	III/I	III	II	III
	4	NR	NR	NR	NR
	5	III/I	III	II	III
	6	III/I	III	II	III
	7	III/I	III	II	III
1 semana	1	III/I	III	II	III
	2	III/I	III	II	III/I
	3	III/I	III	II	III
	4	III/I	III	II	III
	5	III/I	III	II	III
	6	III/I	III	II	III
	7	III/I	III	II	III
2 semanas	1	III/I	III	II	III/I
	2	III/I	NR	II/I	NR
	3	III/I	III	II	III/I
	4	III/I	III	II	III/I
	5	III/I	III	II	NR
	6	III/I	III	II	III
	7	III/I	III	II	III/I

NR: PCR não realizada. Não foram obtidas bandas adequadas à digestão por RFLP

PADRONIZAÇÃO DE MARCADOR - PULMÃO D8 + CH3

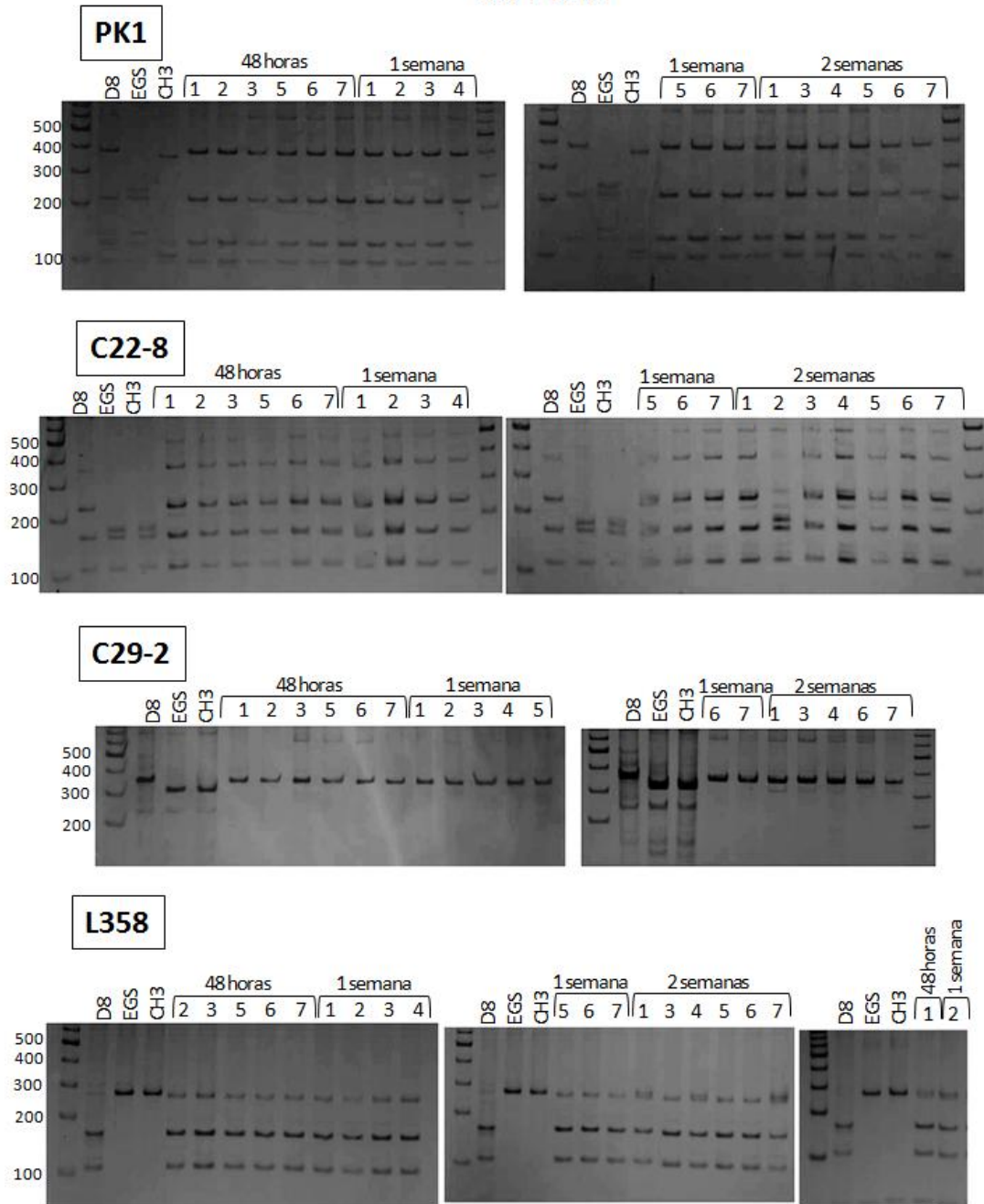


Figura 2B: Imagem dos géis da digestão com endonucleases específicas para cada marcador do grupo D8+CH3.

ANEXO 3 - RESULTADOS INDIVIDUAIS DA *NESTED* PCR**Tabela 3A:** Resultados individuais de PCR-RFLP do marcador L358 no intestino dos sete animais de cada grupo experimental.

	Animais	Ni	D8 crônico	D8 agudo	EGS agudo	D8 + EGS	CH3 agudo	D8 + CH3
48 horas	1	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	2	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	3	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	4	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	5	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	6	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	7	neg	III	neg	neg	III	neg	III
1 semana	1	neg	III	neg	I	III	I	III
	2	neg	III	neg	I	III	I	III
	3	neg	III	neg	I	III	I	III
	4	neg	III	neg	I	III	I	III
	5	neg	III	neg	I	III	I	III
	6	neg	III	neg	I	III	I	III
	7	neg	III	neg	I	III	I	III
2 semanas	1	NR	III	III	NR	III	NR	III
	2	NR	III	III	NR	III	NR	III+I
	3	NR	III	III	NR	III	NR	III
	4	neg	III	III	NR	III	NR	III
	5	neg	III	III	NR	III	NR	III
	6	neg	III	III	NR	III	NR	III
	7	neg	III	III	NR	III	NR	III

*neg = PCR negativa, amostra não submetida à digestão por RFLP

NR: PCR não realizada, camundongos não sobreviveram

INTESTINO - L358

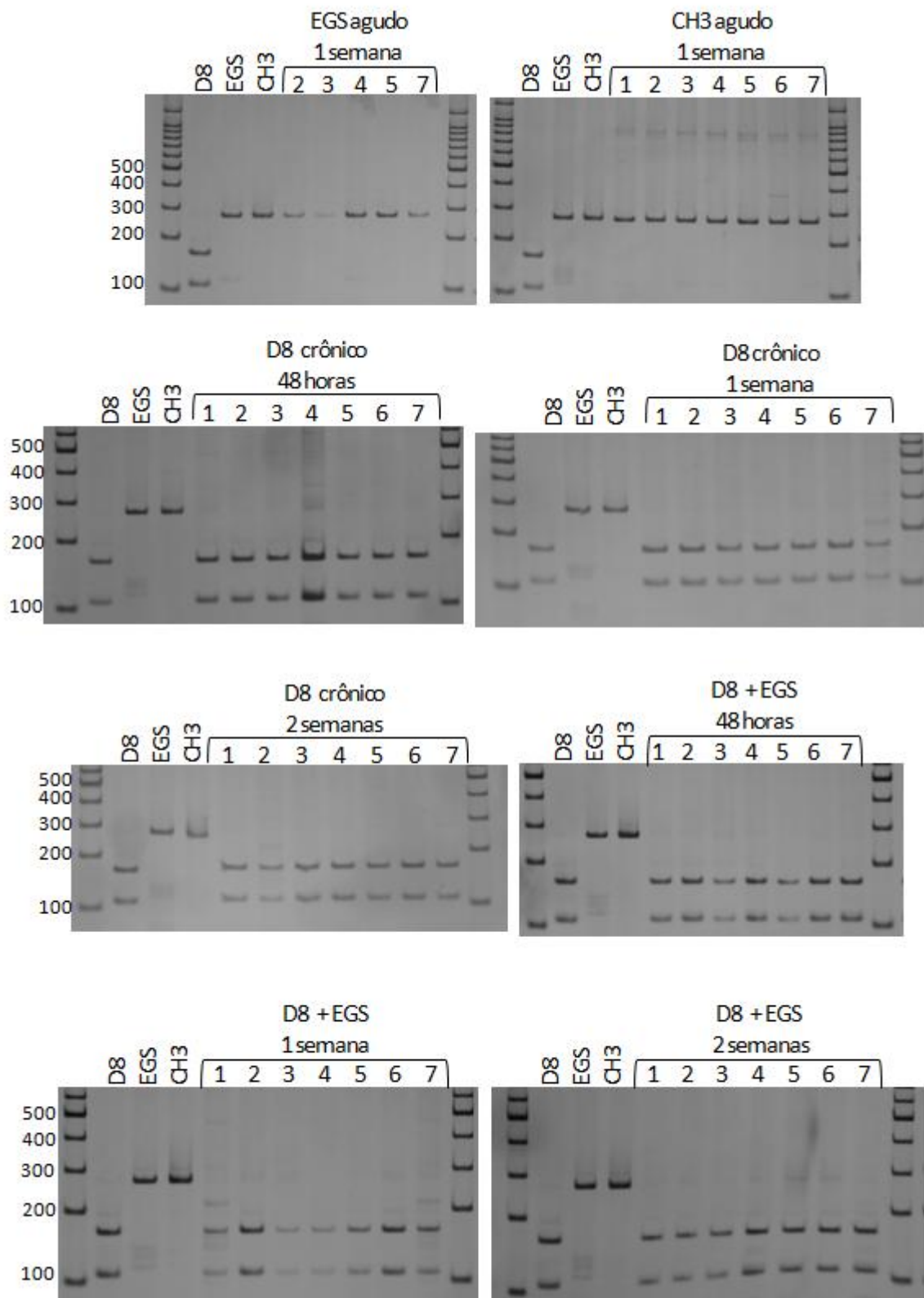


Figura 3A: Imagem dos géis resultantes da digestão do marcador L358 com HaeIII e NlaIII do produto da PCR com DNA extraído de intestino.

INTESTINO - L358

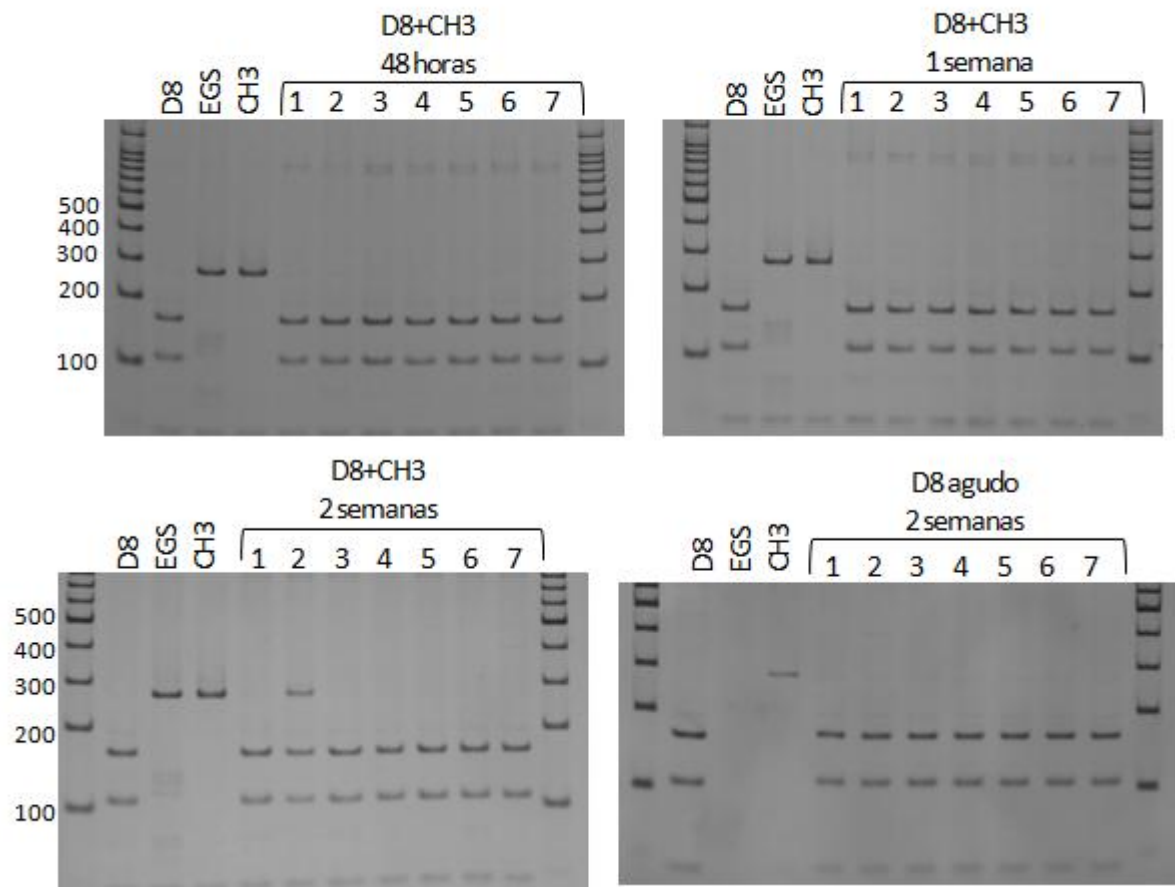


Figura 3A: Imagem dos géis resultantes da digestão do marcador L358 com HaeIII e NlaIII do produto da PCR com DNA extraído de intestino.

Tabela 3B: Resultados individuais de PCR-RFLP do marcador L358 no pulmão dos sete animais de cada grupo experimental.

Animais		Ni	D8 crônico	D8 agudo	EGS agudo	D8 + EGS	CH3 agudo	D8 + CH3
48 horas	1	neg	III	neg	neg	III+I	neg	III+I
	2	neg	III	neg	neg	III+I	neg	III+I
	3	neg	III	neg	neg	III+I	neg	III+I
	4	neg	III	neg	neg	III	neg	NR*
	5	neg	NR	neg	neg	III	neg	III+I
	6	neg	III	neg	neg	III+I	neg	III+I
	7	neg	III	neg	neg	III+I	neg	III+I
1 semana	1	neg	III	III	neg	III+I	I	III+I
	2	neg	III	III	I	III+I	I	III+I
	3	neg	III	III	neg	III+I	neg	III+I
	4	neg	III	III	neg	III+I	I	III+I
	5	neg	III	III	I	III+I	neg	III+I
	6	neg	III	III	neg	III+I	I	III+I
	7	neg	III	III	neg	III+I	I	III+I
2 semanas	1	neg	III	III	NR	III+I	NR	III+I
	2	neg	III	III	NR	III+I	NR	III+I
	3	neg	III	III	NR	III+I	NR	III+I
	4	neg	III	III	NR	III+I	NR	III+I
	5	neg	III	III	NR	III+I	NR	III+I
	6	neg	III	III	NR	III+I	NR	III+I
	7	neg	III	III	NR	III+I	NR	III+I

*neg = PCR negativa, amostra não submetida à digestão por RFLP

NR: PCR não realizada, camundongos não sobreviveram

PULMÃO - L358

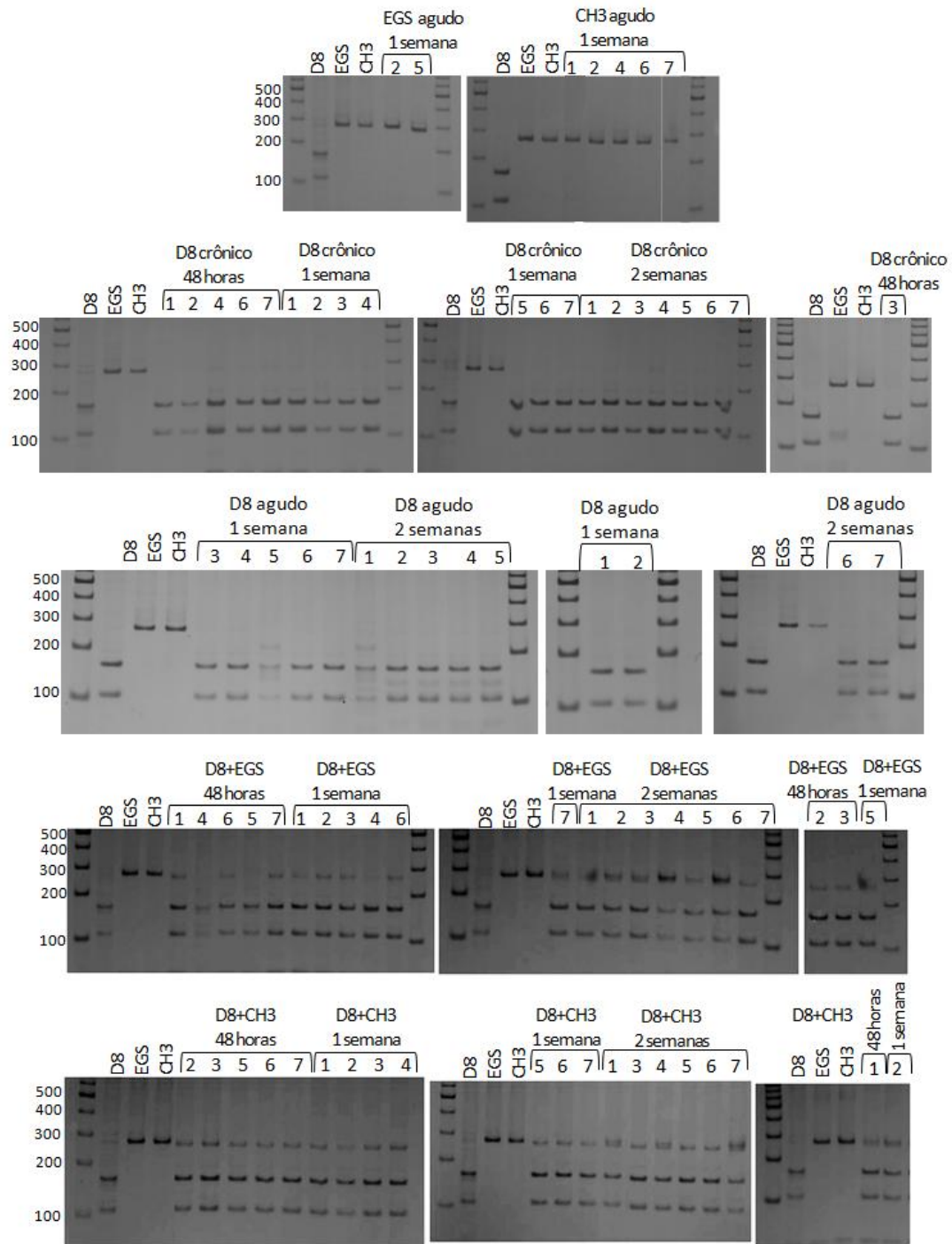


Figura 3B: Imagem dos géis resultantes da digestão do marcador L358 com HaeIII e NiaIII do produto da PCR com DNA extraído de pulmão.

Tabela 3C: Resultados individuais de PCR-RFLP do marcador L358 no cérebro dos sete animais de cada grupo experimental.

Animais		Ni	D8 crônico	D8 agudo	Ni+ EGS	D8 + EGS	NI + CH3	D8 + CH3
48 horas	1	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	2	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	3	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	4	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	5	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	6	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	7	neg	III	neg	neg	III	neg	III
1 semana	1	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	2	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	3	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	4	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	5	neg	III	neg	neg	III	neg	III
	6	neg	III	neg	neg	III	I	III
	7	neg	III	neg	neg	III	I	III
2 semanas	1	neg	III	III	NR	III	NR	III
	2	neg	III	III	NR	III	NR	III
	3	neg	III	III	NR	III	NR	III
	4	neg	III	III	NR	III	NR	III
	5	neg	III	III	NR	III	NR	III
	6	neg	III	III	NR	III	NR	III
	7	neg	III	III	NR	III	NR	III

*neg = PCR negativa, amostra não submetida à digestão por RFLP

NR: PCR não realizada, camundongos não sobreviveram

CÉREBRO - L358

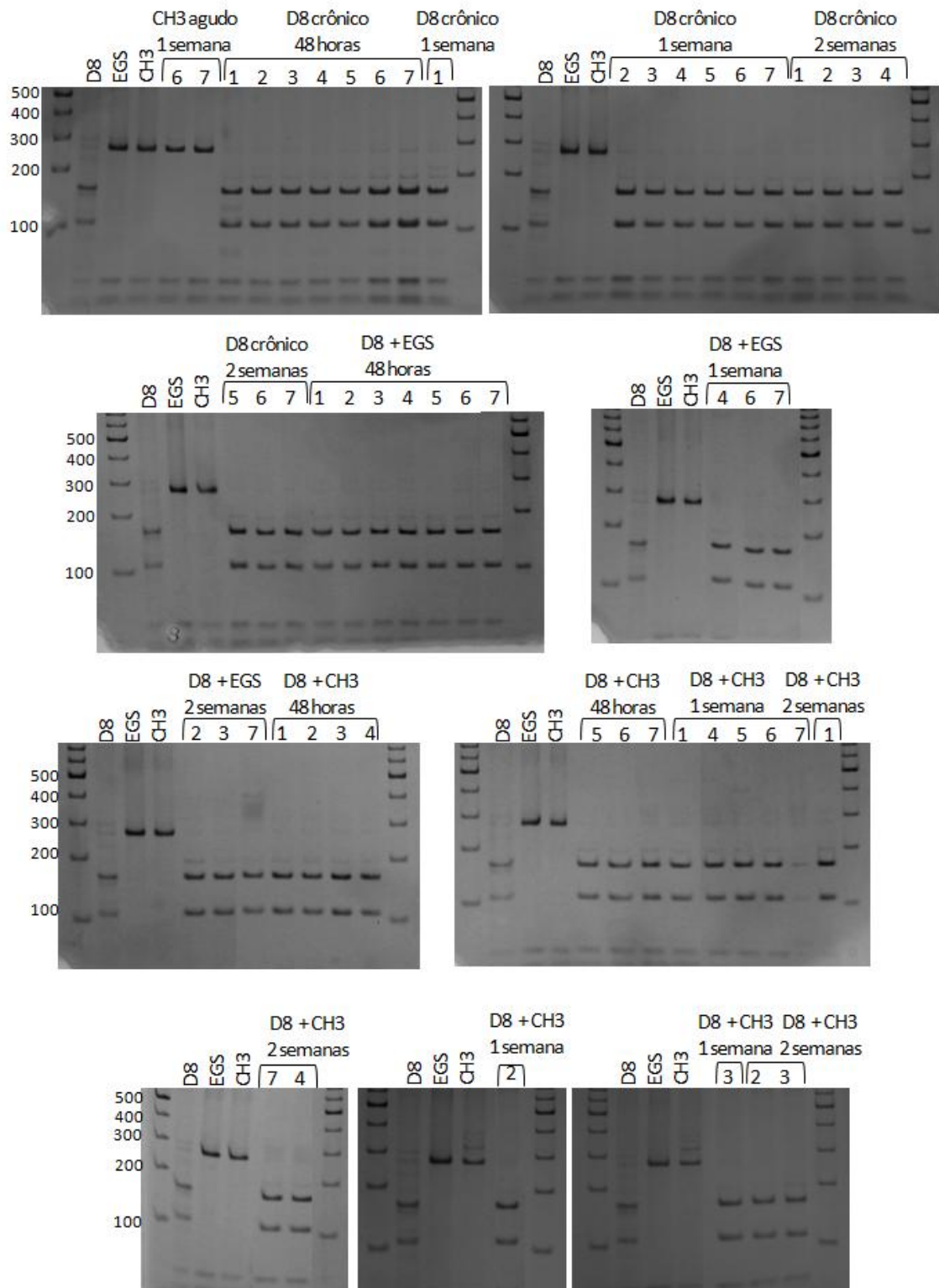


Figura 3C: Imagem dos géis resultantes da digestão do marcador L358 com HaeIII e NlaIII do produto da PCR com DNA extraído de cérebro.

CÉREBRO - L358

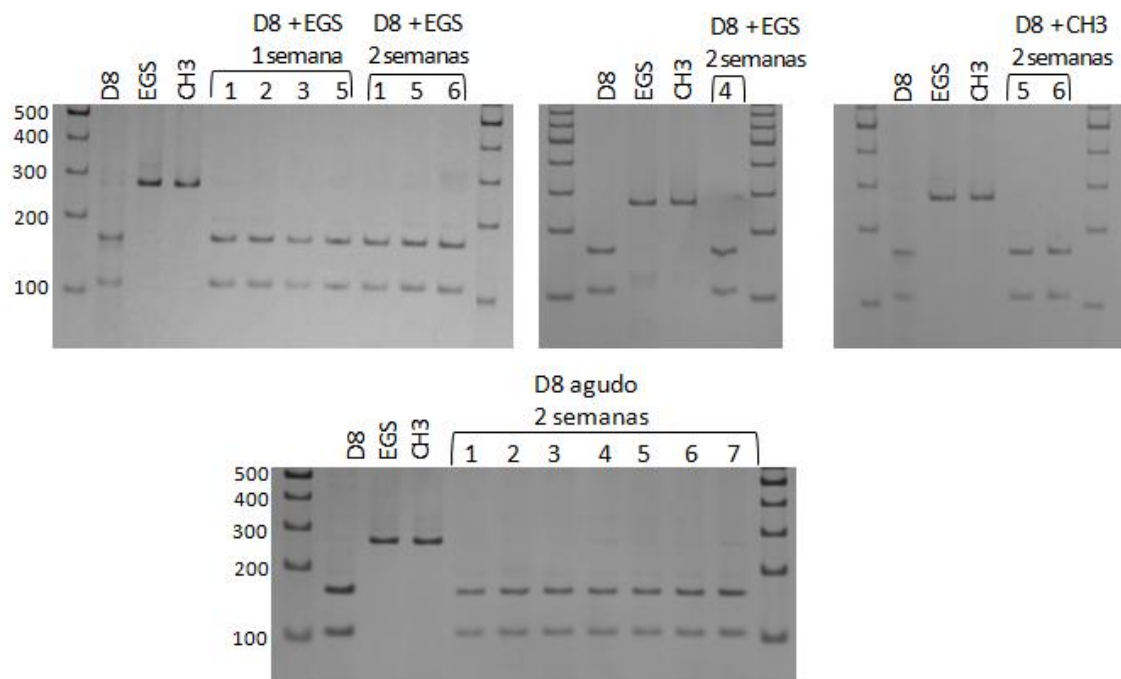


Figura 3C: Imagem dos géis resultantes da digestão do marcador L358 com HaeIII e NlaIII do produto da PCR com DNA extraído de cérebro.