

MARIANA MACIEL CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE
TOXOPLASMA GONDII ISOLADAS DE ANIMAIS NATURAL
E EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS E
DE AMOSTRAS CLÍNICAS**

BELO HORIZONTE, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG

Instituto de Ciências Biológicas – ICB

Pós-graduação em Parasitologia

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS DE
TOXOPLASMA GONDII ISOLADAS DE ANIMAIS NATURAL
E EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS E
DE AMOSTRAS CLÍNICAS**

Dissertação 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 Mestre.

Área de concentração: Protozoologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

MARIANA MACIEL CUNHA

BELO HORIZONTE, 2014

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).

*“Devemos colocar a tecnologia em uma
posição em que ela sirva aos nossos ideais,
em vez de competir com eles.”*

Philip Low

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família, cujo apoio foi fundamental para a conclusão deste percurso e aos meus animais de estimação por aumentarem minha qualidade de vida.

Agradeço à turma de mestrado de 2013, Lado B, que reuniu pessoas únicas que tive o imenso prazer de conhecer e conviver. Em especial, agradeço Adalberto e Dimitri pela companhia durante as jornadas noturnas ou esperando a volta da energia elétrica.

À toda a equipe do laboratório de Toxoplasmose pelo apoio e companheirismo desde à iniciação científica. Especialmente, agradeço à Júlia Gatti e Ana Carolina Carneiro pela colaboração neste trabalho e pela amizade construída. À Rosa, pelas suas ideias simples que solucionam os problemas mais improváveis. À Dali, cuja ajuda no auge dos experimentos foi muito importante. Ao meu orientador Prof Ricardo W. A. Vitor, o exemplo de pesquisador e de pessoa que vou guardar por toda a vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, pela qualidade, infraestrutura e apoio durante o mestrado. Em especial, agradeço às secretárias do programa, Sumara e Sibebe, pelo excelente trabalho e disponibilidade em ajudar, e à coordenadora do programa, Dra Érika Martins Braga.

Ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, na pessoa da Prof. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por terem cedido apoio financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de tabelas	x
Lista de quadros.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Biologia do <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2. Mecanismos de transmissão	3
1.3. A toxoplasmose em animais.....	6
1.3.1. Animais silvestres	6
1.3.2. Animais domésticos.....	8
1.4. A toxoplasmose em humanos.....	10
1.4.1. Imunocompetentes	11
1.4.2. Imunodeficientes.....	12
1.4.3. Toxoplasmose congênita.....	13
1.5. Caracterização molecular	14
1.5.1. Diversidade genética do <i>T. gondii</i>	14
1.5.2. Principais técnicas de genotipagem	16
1.5.3. Genotipagem de <i>T. gondii</i> por bioensaio e isolamento.....	19
1.5.4. Genotipagem de <i>T. gondii</i> a partir de amostras biológicas.....	22
2. Justificativa.....	24
3. Objetivos.....	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. Materiais e métodos.....	26
4.1. Camundongos experimentalmente infectados.....	26
4.1.1. Ensaio em camundongos.....	27
4.1.2. Extração de DNA de cérebro e pulmão de camundongos experimentalmente infectados.....	28
4.1.3. Genotipagem de <i>T. gondii</i> a partir de tecidos de camundongos experimentalmente infectados.....	29
4.2. Galinhas caipiras naturalmente infectadas	29
4.2.1. Extração de DNA de coração de galinhas.....	30
4.2.2. Genotipagem de <i>T. gondii</i> a partir de coração de galinhas	31
4.3. Sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita	31
4.3.1. Padronização do Multiplex multilocus nested PCR em sangue	

humano.....	32
4.3.2. Obtenção de amostras de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita	33
4.3.3. Extração de DNA de sangue humano	34
4.3.4. Genotipagem de <i>T. gondii</i> a partir de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita	35
4.4. Multiplex multilocus nested PCR.....	35
4.4.1. Multiplex PCR	36
4.4.2. Nested PCR.....	36
4.4.3. Digestão por enzimas de restrição	37
4.5. Análise de dados.....	38
5. Resultados.....	40
5.1. Camundongos experimentalmente infectados.....	40
5.1.1. Ensaio em camundongos.....	40
5.1.2. Amplificação por Mn PCR	40
5.1.3. Corte com enzimas de restrição	41
5.2. Galinhas caipiras naturalmente infectadas	43
5.3. Sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita	45
5.3.1. Padronização do multiplex multilocus nested PCR em sangue	45
5.3.2. Genotipagem de <i>T. gondii</i> a partir de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita	46
6. Discussão	49
6.1. Genotipagem de <i>T. gondii</i> a partir de animais experimentalmente infectados.....	49
6.2. Genotipagem de <i>T. gondii</i> a partir de animais naturalmente infectados	52
6.3. Genotipagem de <i>T. gondii</i> a partir de amostras clínicas.....	52
7. Conclusões	60
8. Referências bibliográficas.....	61
9. Anexos	69
Anexo 1: Certificado do Protocolo nº 128/2010 do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG).....	69
Anexo 2: parecer nº 0298/06 do Comitê de ética em pesquisa (COEP-UFMG)....	70
Anexo 3: PCR-RFPL a partir de DNA extraído de pulmão de camundongos experimentalmente infectados	71
Anexo 4: PCR-RFPL a partir de DNA extraído de coração de galinhas caipiras naturalmente infectadas	73
Anexo 5: PCR-RFPL a partir de DNA extraído de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita	77

RESUMO

A obtenção de isolados a partir de bioensaio em camundongos é a metodologia mais utilizada para a caracterização molecular de *Toxoplasma gondii*. A realização da genotipagem diretamente em amostras biológicas pode ser uma ferramenta útil e rápida, que permite a análise de um grande número de amostras. O objetivo deste trabalho foi realizar a genotipagem de *T. gondii* a partir de diferentes amostras biológicas utilizando a técnica de Multiplex multilocus nested PCR-RFLP (Mn-PCR-RFLP). Foram utilizados pulmão e cérebro de camundongos experimentalmente infectados com cinco isolados de *T. gondii*, 15 amostras de coração de galinhas caipiras naturalmente infectadas e 12 amostras de sangue humano de recém-nascidos com toxoplasmose congênita. Os genótipos obtidos foram identificados e comparados com os existentes no banco de dados ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). Em camundongos experimentalmente infectados, a genotipagem completa foi obtida a partir de DNA extraído de pulmão após sete dias de infecção. Em cérebro, não houve amplificação na maioria das amostras. A diferença observada entre as amplificações nos dois órgãos pode refletir a cinética de dispersão e multiplicação do parasito, além da capacidade patogênica dos diferentes isolados. Em galinhas caipiras naturalmente infectadas, foi possível realizar a genotipagem completa em duas amostras e parcial em 13 amostras. Os dois novos genótipos obtidos ainda não haviam sido descritos na literatura. Em sangue obtido de recém-nascidos com toxoplasmose congênita, foi possível realizar a genotipagem parcial de oito das 12 amostras analisadas.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, genotipagem, Mn-PCR-RFLP.

ABSTRACT

The isolation of *Toxoplasma gondii* by mouse bioassay is the most used method for molecular characterization of this parasite. Genotyping directly in biological samples can be a useful and fast tool, which allows the analysis of a large number of samples. The aim of this study was genotyping *T. gondii* from different biological samples using multiplex multilocus nested PCR-RFLP (Mn PCR-RFLP). Lung and brain of mice experimentally infected were used with five isolates of *T. gondii*, 15 heart samples from naturally infected free-range chickens as well as 12 human blood samples of newborns with congenital toxoplasmosis were used. The genotypes obtained were identified and compared with ToxoDB database (<http://toxodb.org/toxo/>). In experimentally infected mice, the complete genotype was obtained from DNA extracted from lungs after seven days of infection. In the brain, there was no amplification in most samples. The difference between the amplifications in the two organs may reflect the kinetics of dispersion and multiplication of the parasite and the pathogenic ability of different isolates. In naturally infected free-range chickens, it was possible to perform complete genotyping in two samples and partial genotyping in 13 samples. The two new genotypes obtained were not yet described in the literature. In blood from infants with congenital toxoplasmosis it was possible to perform partial genotyping of eight of the 12 samples analyzed.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, genotyping, Mn-PCR-RFLP.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da virulência dos isolados de <i>T. gondii</i> em camundongos BALB/c (segundo Carneiro et al. 2013).	26
Tabela 2: Amostras de coração de galinhas caipiras obtidas de diferentes regiões de Minas Gerais (segundo Brandão et al. 2006).	30
Tabela 3: Amostras de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita quantificadas por qPCR (segundo Costa et al. 2013).	34
Tabela 4: Marcadores em que ocorreu amplificação por Mn-PCR para amostras de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita quantificadas por qPCR.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Iniciadores e enzimas para a genotipagem por Multiplex multilocus nested PCR-RFLP (Mn-PCR-RFLP) (Su et al. 2010).....	39
Quadro 2: Amplificação de amostras de <i>T. gondii</i> a partir de tecidos de camundongos experimentalmente infectados.....	42
Quadro 3: Perfil genotípico das amostras de <i>T. gondii</i> a partir de tecidos de camundongos experimentalmente infectados.....	42
Quadro 4: Perfil genotípico de amostras de <i>T. gondii</i> a partir de DNA extraído de tecidos de galinhas naturalmente infectadas	44
Quadro 5: Diluição mínima de taquizoítos em que ocorreu amplificação por Mn-PCR em DNA extraído de sangue artificialmente contaminado com <i>T. gondii</i> (cepa RH).	46
Quadro 6: Perfil genotípico de amostras de <i>T. gondii</i> a partir de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
CETEA	Comitê de ética em experimentação animal
COEP	Comitê de ética em pesquisa
CTAB	Brometo de hexadecil trimetil amônio
dATP	2'- desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	2'- desoxicitosina-5'-trifosfato
dGTP	2'- desoxiguanosina-5'-trifosfato
dTTP	2'- desoxitimidina-5'-trifosfato
d.p.i	Dia (s) após a infecção
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
g	Aceleração da gravidade terrestre ($9,8\text{m/s}^2$)
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
i.p.	Intraperitoneal
MAT	Teste de aglutinação modificada
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mM	milimolar
Mn-PCR-RFLP	Multiplex multilocus nested PCR-RFLP
n-PCR	Nested PCR
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pb	Pares de bases
qPCR	Real time PCR

RFLP	Polimorfismo por tamanho do fragmento de restrição
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
TBE	Tris/ Borato/ EDTA
TE	Tampão Tris-base
TgCTBr	<i>Toxoplasma gondii</i> Congenital Toxoplasmosis from Brasil
μL	Microlitro

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii (Nicolle e Manceaux 1909) é considerado um dos patógenos mais bem sucedidos tanto em termos de número de hospedeiros quanto em porcentagem de animais infectados ao redor do mundo (Su et al. 2010). Ao longo de sua evolução, *T. gondii* desenvolveu uma ampla variedade de vias de transmissão, tendo como hospedeiros intermediários provavelmente todos os animais homeotérmicos e como hospedeiros definitivos os membros da família Felidae (Tenter et al. 2000). Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectada em fase crônica (Peng et al. 2011).

Pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidii, e à Sub-família Toxoplasmatinae (Levine 1988), este protozoário é a única espécie representante do gênero *Toxoplasma*. Os primeiros relatos de identificação do parasito foram realizados em 1908 na Tunísia por Nicolle & Manceaux em roedores silvestres africanos. Posteriormente, a espécie foi descrita com base na morfologia (Toxo = arco; Plasma = vida) e no hospedeiro em que foi encontrado (*Ctenodactylus gundi*) (Tenter et al. 2000, Dubey 2010).

1.1 BIOLOGIA DE TOXOPLASMA GONDII

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório de baixa especificidade, pois infecta provavelmente quaisquer animais homeotérmicos e vários tipos celulares (Dubey 2010).

Apesar de vários estudos terem sido realizados desde o início do século XX, somente na década de 1960 o ciclo biológico de *T. gondii* foi elucidado. Isto ocorreu após a

demonstração de estágios infecciosos do parasito nas fezes de felídeos que possibilitariam a transmissão a outros hospedeiros (Tenter et al. 2000, Dubey 2010).

Em seus hospedeiros, o parasito passa por duas fases de desenvolvimento assexuado: a de taquizoíto, de multiplicação rápida em diferentes tipos celulares; e a de bradizoíto, de multiplicação lenta, responsável pela formação de cistos teciduais. Nos hospedeiros definitivos ocorre a formação de oocistos que são liberados ainda não esporulados nas fezes (Tenter et al. 2000, Dubey 2004, Hill et al. 2004). A esporulação ocorre no ambiente em um prazo de um a cinco dias, dependendo das condições de temperatura e umidade. Oocistos esporulados contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (Dubey 2004, Hill et al. 2004).

Utilizando camundongos como modelo experimental, observou-se que, após a ingestão de oocistos pelo camundongo, os esporozoítos são excistados e passam pelos enterócitos e células caliciformes do epitélio intestinal até alcançarem a lâmina própria. A partir de então, os parasitos podem infectar todos os tipos celulares do hospedeiro, exceto hemácias, e passar por multiplicação celular e formação de taquizoítos. Estes se multiplicam assexuadamente de forma intensa nas células do hospedeiro (Dubey 2010, Hill et al. 2004). A taxa de invasão e multiplicação varia de acordo com a cepa do parasito e com a célula infectada. Devido à resposta imune e ao stress ambiental, os parasitos então se diferenciam em bradizoítos. Esta nova fase de desenvolvimento resulta no estágio encistado do parasito, através da formação de cistos teciduais (Tenter et al. 2000, Sibley 2008, Dubey 2010).

A resposta imune do hospedeiro não pode, no entanto, eliminar uma infecção já estabelecida, já que os cistos teciduais persistem por vários anos. Alguns podem se romper em algum momento da vida do hospedeiro e os bradizoítos liberados são, em

sua maioria, destruídos. Caso haja imunossupressão, a infecção pode ser reativada com a disseminação de bradizoítos e sua conversão em taquizoítos (Dubey 2004).

O ciclo de *T. gondii* pode ser mantido apenas entre os hospedeiros intermediários através de expansões clonais do parasito provenientes da ingestão de cistos teciduais de um hospedeiro infectado (Tenter et al. 2000, Robert-Gangneux e Dardé 2012).

1.2 MECANISMOS DE TRANSMISSÃO

Todas as formas evolutivas de *T. gondii* são infectantes tanto para hospedeiros definitivos quanto para intermediários. As formas mais frequentes de transmissão ocorrem de forma horizontal ou vertical (Figura 1). A forma horizontal ocorre pela via oral, geralmente por ingestão de oocistos infectantes presentes no ambiente ou ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais. Já a via vertical consiste na transmissão transplacentária de taquizoítos (Tenter et al. 2000).

A importância relativa das transmissões via cistos teciduais ou oocistos em uma dada população é desconhecida, exceto no caso de surtos com uma fonte bem definida de infecção. Até agora, apenas estudos sobre fatores de risco deram alguma indicação da via predominante de transmissão em uma dada população. A recente descoberta de uma proteína específica de esporozoítos capaz de produzir anticorpos diferenciados em infecções experimentais pode ajudar a elucidar esta questão (Hill et al. 2011).

O risco de transmissão associado à ingestão de carne varia entre os diferentes países de acordo com os hábitos alimentares locais e com a prevalência da doença entre os animais criados para consumo. Em um estudo multicêntrico na Europa, estimou-se que

o consumo de carne é responsável por 30 a 63% dos casos de infecção, enquanto o contato com o solo representou de 6 a 17% dos casos (Cook et al. 2000).

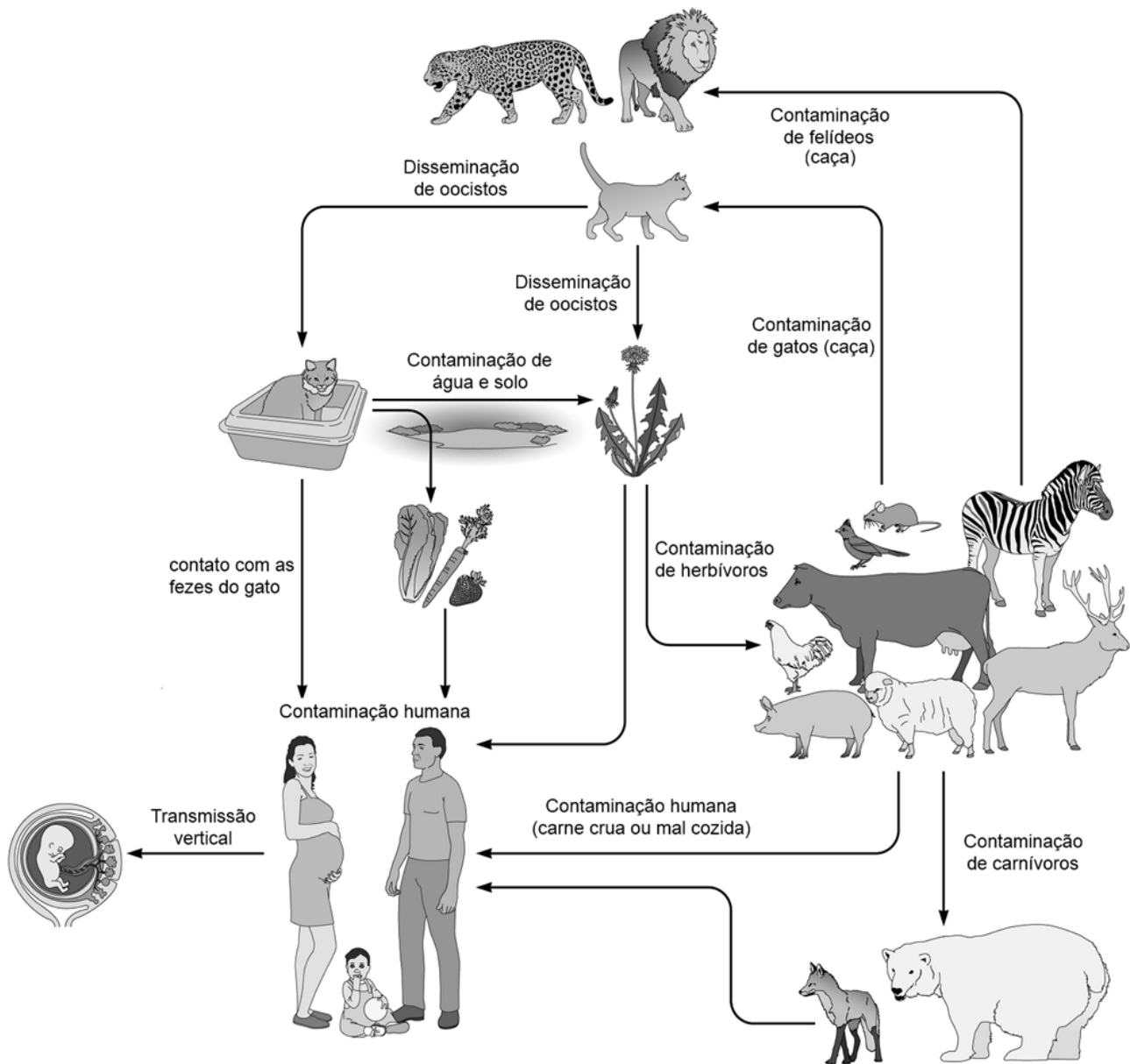


Figura 1: Principais mecanismos de transmissão de *T. gondii* (Robert-Gangneux e Dardé 2012 modificado).

No Brasil, milhões de animais destinados à alimentação são abatidos para o consumo humano por ano, sendo os suínos uma das fontes mais prováveis de infecção pela ingestão de carne (Dubey et al. 2012). Outra fonte importante de infecção por cistos teciduais é o consumo de galinhas caipiras. Estes animais, além de indicadores de contaminação do solo por oocistos, também podem ser uma fonte de infecção para felídeos e seres humanos (Dubey et al. 2003, Dubey et al. 2004, Dubey et al. 2010). Galinhas caipiras são frequentemente abatidas nas casas e as vísceras muitas vezes não são devidamente eliminadas (Dubey et al. 2012).

A contaminação ambiental por oocistos vem ganhando destaque como importante forma de transmissão da toxoplasmose. Um único felídeo pode liberar mais de 100 milhões de oocistos não esporulados (Dubey 2010). Solo e água contaminados podem agir como veículos de transmissão de oocistos para vegetais e frutas de consumo, mas há poucos dados que confirmem esta informação (Dubey 2004, Robert-Gangneux e Dardé 2012).

A possibilidade de transmissão e difusão do parasito associada à água possui um impacto epidemiológico mais importante do que se pensava, já que pode afetar um grande número de pessoas e possibilitar surtos da doença (Karanis et al. 2013). Oocistos podem permanecer viáveis por longos períodos na água, resistir a diferentes temperaturas, além de não serem facilmente destruídos por tratamentos químicos e físicos como a cloração e tratamento com ozônio (Robert-Gangneux e Dardé 2012). No Brasil, entre os anos de 2001 e 2002, foi registrado o maior surto de toxoplasmose do mundo, ocorrido no Município de Santa Isabel do Ivaí, Paraná, com 462 pessoas apresentando sorologia sugestiva de toxoplasmose. A investigação epidemiológica concluiu que a fonte de infecção foi um dos reservatórios de água da cidade contaminado por fezes de um gato infectado (de Moura et al. 2006).

A transmissão vertical é caracterizada pela capacidade dos taquizoítos atravessarem a placenta causando uma infecção congênita. A transmissão transplacentária tem sido responsabilizada pela ocorrência de abortos, natimortos, debilidade e mortalidade neonatal, tanto no homem como em outros animais (Tenter et al. 2000). Classicamente, infecções congênitas são resultantes de infecção primária materna durante a gestação. A placenta desempenha papel principal no processo, uma vez que é ao mesmo tempo uma barreira natural que se destina a proteger o feto e também um tecido alvo para a multiplicação do parasito (Abbasi et al. 2003). A barreira placentária é mais eficiente no início da gestação e conduz a passagem de parasitos em menos de 10% dos casos no primeiro trimestre. Ao longo da gestação, esta barreira torna-se mais permeável, permitindo a transmissão em cerca de 30% dos casos no segundo trimestre e de 60 a 70% no terceiro (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

1.3 A TOXOPLASMOSE EM ANIMAIS

A detecção da infecção crônica por *T. gondii* em animais baseia-se principalmente em testes sorológicos. Entretanto, inquéritos sorológicos por si só não fornecem informações sobre a prevalência de parasitos viáveis, uma vez que *T. gondii* já foi isolado a partir de animais soronegativos (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

1.3.1 ANIMAIS SILVESTRES

Os processos que promovem a infecção em populações silvestres são altamente complexos e envolvem a interação de características físicas, biológicas e ecológicas. Por exemplo, o clima quente e seco é desfavorável à sobrevivência do oocisto, o que está associado à baixa prevalência em regiões com estas características. Já em países de

clima tropical úmido a prevalência é alta. Quanto à dieta e ao comportamento alimentar dos hospedeiros, a prevalência é menor em herbívoros do que em onívoros ou carnívoros, devido à eficácia cumulativa do ciclo predador-presa de *T. gondii*, já que o carnivorismo permite que o ciclo se mantenha apenas entre hospedeiros intermediários (Tenter et al. 2000, Robert-Gangneux e Dardé 2012). É possível dizer que *T. gondii* é mais bem adaptado à transmissão por carnivorismo em felídeos e por oocistos nos demais hospedeiros (Dubey 2010, Sibley et al. 2009).

A soroprevalência em felídeos silvestres é geralmente alta, podendo chegar a 100% em alguns casos (Dubey 2010). A dieta e os hábitos comportamentais de felídeos silvestres tem grande efeito sobre transmissibilidade e a prevalência de *T. gondii* aos demais hospedeiros (Cañón-Franco et al. 2013).

No Brasil, alguns estudos recentes mostram a presença da infecção em uma variedade de animais silvestres. Truppel e colaboradores (2010) realizaram um estudo com capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), roedor usado para o consumo humano em muitas áreas da América do Sul. Utilizando teste de imunofluorescência indireta (RIFI) em 26 capivaras do sul do Brasil, foi observada a soropositividade em 61,5% delas. Cabral e colaboradores (2013) observaram a presença do parasito em morcegos do estado de São Paulo através de inóculo de tecidos destes animais em camundongos. Estes autores destacam a importância de insetos como transportadores mecânicos de oocistos, da contaminação pela água e solo, além da possibilidade de contaminação pela ingestão de sangue de um hospedeiro em fase aguda. Através de análise por PCR de tecidos de 40 felídeos silvestres do Rio Grande do Sul, Cañón-Franco e colaboradores (2013) verificaram positividade em 34,4% deles.

Podem-se destacar também os estudos recentes envolvendo animais aquáticos. Uma variedade de animais como lontras, golfinhos, focas e morsas tem sido relatada na literatura recente com prevalência de 47 até 100% (Dubey 2010). Estes animais servem como sentinelas da contaminação aquática por oocistos pelo escoamento de água doce no ecossistema marinho (Dubey et al. 2003, Robert-Gangneux e Dardé 2012). Um estudo realizado com botos amazônicos (*Inia geoffrensis*) mostrou a existência de anticorpos anti-*T.gondii* em 82 dos 95 botos estudados. A presença de onças na região em época de seca, na qual as águas estão baixas, e o clima tropical úmido são prováveis fatores associados à infecção dos botos (Santos et al. 2011).

1.3.2 ANIMAIS DOMÉSTICOS

Os gatos são os hospedeiros mais importantes na epidemiologia das infecções por *T. gondii* em humanos e animais (Pena et al. 2006). Em geral, os gatos domésticos possuem menor prevalência em relação aos silvestres pelas diferenças no estilo de vida destes animais, principalmente pelo hábito de caçar mais frequente nos felídeos silvestres (Dubey 2010). A soroprevalência também pode variar de acordo com a idade dos gatos, a dieta, o método de teste sorológico e localização geográfica (Pena et al. 2006). Sabe-se que a positividade aumenta com a idade do gato, indicando a transmissão pós-natal do *T. gondii* (Dubey 2010).

Os bradizoítos são altamente infectantes para gatos, culminando na liberação de milhões de oocistos após a ingestão. Por outro lado, oocistos possuem uma infectividade baixa para estes animais (Dubey 2010). A maioria dos gatos que eliminaram oocistos uma vez desenvolvem imunidade e não excretam repetidamente oocistos após um novo desafio (Pena et al. 2006).

Pinto e colaboradores (2009) analisaram o soro de 245 gatos domiciliados do Rio Grande do Sul, encontrando 37,9% de animais soropositivos por RIFI. Os autores ressaltam que estes animais, em algum momento da vida, foram fonte de contaminação ambiental, sendo que o acesso do animal à rua e a idade foram fatores considerados de risco. Pena e colaboradores (2006) determinaram a prevalência sorológica e parasitológica de *T. gondii* em 237 gatos de 15 municípios de São Paulo. Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 84 animais (35,4%) pelo teste de aglutinação modificada (MAT).

Em suínos, pesquisas sorológicas têm relatado uma distribuição mundial de *T. gondii*. A prevalência varia entre os suínos de mercado em sistemas de confinamento e os porcos caipiras ou orgânicos. A questão central que afeta a soroprevalência é a exposição de suínos aos oocistos e a roedores infectados, e não o sistema de gestão. Há um consenso geral de que a infecção em suínos não será impedida, a não ser que o contato com oocistos e roedores seja impedido (Dubey 2010).

A prevalência de anticorpos para *T. gondii* entre ovinos é geralmente maior que em outros herbívoros domésticos. Esta diferença deve estar relacionada à susceptibilidade das diferentes espécies à infecção (Dubey 2010). Nestes animais, a infecção não só resulta em significantes perdas econômicas, mas também tem implicações para saúde pública por constituírem uma fonte de infecção para o homem (Tenter et al. 2000). Além disso, a infecção por *T. gondii* é reconhecida como uma das principais causas de aborto em ovinos em vários países (Dubey 2010). Como o aborto é um evento fisiológico de grande importância do ponto de vista de crescimento do rebanho, a toxoplasmose deve ser considerada relevante para que este atinja níveis ótimos de produtividade (Cavalcante et al. 2007).

Em galinhas, prevalências sorológicas utilizando a técnica de MAT mostraram resultados variando entre 2 e 100% ao redor do mundo (Dubey 2010). Existem basicamente dois métodos de criação de galinhas, o chamado “free-range” (galinhas caipiras) e o de criação em gaiolas ou galpões (galinhas de granja). A principal diferença entre os dois grupos é que as galinhas criadas ao ar livre (free-range) podem ingerir alimentos que estão distribuídos no solo, enquanto as galinhas de granja são alimentadas quase exclusivamente com ração seca processada comercialmente (Zhu et al. 2008). Devido a esta possibilidade de contato e revolvimento do solo, galinhas caipiras estão mais expostas à contaminação pelo *T. gondii*. Sendo assim, a detecção da infecção nestes animais pode ser um bom indicador da contaminação do ambiente por oocistos (Dubey et al. 2003, Dubey et al. 2004, Dubey 2010). No Brasil, muitos estudos soroepidemiológicos de toxoplasmose em galinhas vêm sendo realizados. Englobando vários estados do país, a prevalência se manteve alta, variando entre 38% no Rio Grande do Sul e 66% no Amazonas, até o ano de 2010 (Dubey 2010). Clementino Andrade e colaboradores (2013) analisaram 43 amostras de sangue de galinhas caipiras do Estado do Rio Grande do Norte, encontrando 30 positivas pelo método imunoenzimático (ELISA). Ao analisar o soro de 50 galinhas oriundas do Arquipélago de Fernando de Noronha, Dubey e colaboradores (2010) obtiveram 84% de positividade. Em Minas Gerais, Brandão e colaboradores (2006) recolheram o soro de 28 galinhas caipiras e obtiveram 53,6% de positividade por RIFI.

1.4 A TOXOPLASMOSE EM HUMANOS

Geralmente, assume-se que 25 a 30% da população mundial está infectada por *T. gondii*, mas as prevalências variam muito entre os países e mesmo entre diferentes comunidades de uma mesma região (Tenter et al. 2000, Zhu et al. 2008, Dubey 2010).

A infecção por *T. gondii* em humanos é geralmente assintomática. Entretanto, a toxoplasmose é mais grave em indivíduos imunodeficientes e em casos de transmissão congênita. Mesmo entre esses indivíduos mais susceptíveis, existe uma grande variabilidade na gravidade da toxoplasmose (Howe et al. 1997).

Os fatores climáticos que afetam a sobrevivência de oocistos e, conseqüentemente, as taxas de infecção de animais de consumo desempenham um papel importante, assim como hábitos alimentares, econômicos, sociais ou culturais, a qualidade da água e a cobertura de saneamento básico. Prevalências mais elevadas são classicamente observadas em países tropicais com clima úmido e quente e as mais baixas em países áridos ou muito frios (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

Observa-se uma soroprevalência baixa (10 a 30%) na América do Norte, no Sudeste da Ásia, no norte da Europa e em alguns países africanos. Prevalência é moderada (30 a 50%) em países do centro e sul da Europa e alta na América Latina e nos países africanos tropicais (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

1.4.1 IMUNOCOMPETENTES

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção primária possui fase aguda de curta duração, caracterizada por febre, enfartamento dos gânglios linfáticos e fraqueza muscular. Normalmente, a infecção é controlada pelo sistema imune e raramente os pacientes necessitam de tratamento (Sibley et al. 2009, Robert-Gangneux e Dardé 2012). Na maioria dos casos, as infecções permanecem clinicamente não aparentes, mas alguns estudos relatam uma possível associação entre a soropositividade e doenças psiquiátricas atípicas em humanos (Sibley et al. 2009).

Sabe-se que uma grande fração dos pacientes com lesões oculares (toxoplasmose ocular) é resultante de uma infecção pós-natal adquirida (Sibley et al. 2009). A doença ocular geralmente resulta da ruptura de cistos teciduais e causam inflamação na retina. Na região sul do Brasil, foram descritos vários casos de toxoplasmose ocular grave em adultos saudáveis, muitos dos quais adquiriram a infecção pós-natal (Silveira et al. 2001). O tratamento da toxoplasmose ocular pode ser feito com corticóides e antibióticos, embora não erradiquem a infecção (Sibley et al. 2009).

1.4.2 IMUNODEFICIENTES

Em indivíduos imunodeficientes, os pacientes estão mais sujeitos ao risco de reagudização, seja por reativação através da ruptura de cistos teciduais, seja por uma possível reinfeção (Khan et al. 2005, Robert-Gangneux e Dardé 2012). O cérebro é o órgão mais comumente afetado nestes pacientes, seguido dos pulmões, olhos e coração. Em lesões ativas, numerosos taquizoítos são encontrados destruindo o tecido do hospedeiro (Dubey 2010).

Em pacientes com AIDS, a toxoplasmose pode causar encefalite, pneumonia, retinocoroidite, entre outros (Dubey 2010). A encefalite é a manifestação predominante, podendo causar dores de cabeça, letargia, perda de memória, demência, entre outros (Hill et al. 2004, Khan et al. 2005). Lindstrom e colaboradores (2006) mostraram que a reativação da infecção pelo *T. gondi* é responsável por quase um quarto dos distúrbios neurológicos em paciente com AIDS de Uganda. Após o surgimento da terapia antiretroviral, a incidência de encefalite em pacientes aidséticos com toxoplasmose tem diminuído (Jones et al. 2002).

Em indivíduos transplantados, a toxoplasmose aguda ou disseminada pode resultar tanto da reativação de uma infecção latente quanto da infecção por cistos presentes no órgão recebido. A toxoplasmose pulmonar ou disseminada ocorre com mais frequência nestes pacientes por desenvolverem uma rápida e progressiva infecção, além de uma massiva disseminação de parasitos (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

1.4.3 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A toxoplasmose congênita tem sido responsabilizada pela ocorrência de abortos, natimortos, debilidade e mortalidade neonatal. Os recém-nascidos podem apresentar sinais clássicos, que são hidrocefalia, microcefalia, calcificações cerebrais e retinocoroidite (Tenter et al. 2000, Zhou et al. 2011). Em cultura de trofoblastos de placenta humana, já foi observado que estas células são rapidamente infectadas pelo *T. gondii*, induzindo um aumento da apoptose. Estes graves danos à placenta podem causar perda do feto ou retardamento do crescimento intrauterino (Abbasi et al. 2003). No feto, a multiplicação do parasito induz focos de necrose e forte inflamação, levando a grandes alterações nos tecidos, principalmente no cérebro e olhos (Dubey 2010).

Em estudo realizado na Europa em 2007, foi observada uma prevalência de 3,3 por 10.000 nascidos vivos. Dos 272 casos ocorridos naquele ano, 11 resultaram na interrupção da gravidez devido à lesões cerebrais ou morte fetal e 87% dos nascidos vivos eram assintomáticos (Robert-Gangneux e Dardé 2012). Já na China, apesar da maioria dos nascidos vivos não apresentarem anormalidades ao nascimento, sem o tratamento muitos desenvolvem retinocoroidite e danos neurológicos ao longo da vida (Zhou et al, 2011). Nos EUA, observou-se que em 25 crianças não tratadas até o primeiro ano de vida, 72% desenvolveram novas lesões oculares durante um período

médio de acompanhamento de 5 a 7 anos (Phan et al. 2008). No Brasil, a situação parece semelhante. Em estudo realizado em Minas Gerais entre os anos de 2006 e 2007, observou-se um caso da doença para cada 770 nascidos vivos (1,3/1.000), sendo que 80% destes desenvolveram leões oculares em pelo menos um dos olhos, ainda que assintomáticos ao nascimento (Vasconcelos-Santos et al. 2009).

Sabe-se que a gravidade da infecção fetal está relacionada ao período gestacional em que a mãe foi infectada (Dubey 2004). Na maioria dos casos, o feto é exposto durante o último trimestre e os sintomas são leves ou a criança é assintomática. Neste período, o risco de transmissão é bastante elevado, porém apenas cerca de 10% das crianças nascem com sintomas clínicos detectáveis (Kaye 2011). Por outro lado, quando gestantes se infectam em idades gestacionais prematuras, o risco de transmissão transplacentária é baixo, mas, caso ocorra, as consequências para o desenvolvimento fetal são graves, podendo levar a anomalias ou aborto espontâneo do feto (Robert-Gangneux e Dardé 2012, Pinard et al. 2003, Kaye 2011).

1.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Tendo em vista a necessidade de conhecimento aprofundado sobre virulência, infectividade, susceptibilidade e outros aspectos biológicos e epidemiológicos do parasito, vários estudos buscam caracterizar *T. gondii* em nível molecular.

1.5.1 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *T. GONDII*

Apesar da presença de um ciclo sexuado e de uma distribuição mundial, a estrutura populacional de *T. gondii* foi descrita inicialmente como altamente clonal, exibindo uma baixa diversidade genética. Esta foi a conclusão dos estudos de genética de isolados da

Europa e dos Estados Unidos, que agruparam o parasito em três genótipos (I, II, e III) equivalentes à linhagens clonais, estáveis no tempo e no espaço. (Dardé et al. 1992, Howe e Sibley 1995, Ajzenberg et al. 2002, Su et al. 2006). Estes três genótipos são o possível resultado de cruzamentos genéticos naturais entre tipos parentais altamente semelhantes. A progênie teria se expandido, dando origem a uma população clonal nos últimos 10.000 anos (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

Há várias possíveis explicações para a existência de uma estrutura populacional clonal de *T. gondii* em estado selvagem. Primeiro, o ciclo sexual não é obrigatório para a transmissão, que também pode ocorrer pela ingestão de estágios intermediários através da alimentação carnívora ou onívora (Tenter et al. 2000, Sibley et al. 2009). Em segundo lugar, um único organismo haplóide pode se diferenciar para completar o ciclo de vida no felídeo. Como a coinfeção com múltiplas cepas é provavelmente um evento raro, felídeos normalmente liberariam oocistos contendo descendência geneticamente idêntica. Uma vez que uma complexidade genética limitada é estabelecida, ela seria passível de ser mantida (Sibley et al. 2009).

No entanto, o uso de novos marcadores moleculares no estudo de isolados do parasito obtidos na América do Sul tem demonstrado que *T. gondii* possui uma maior variabilidade genética do que aquela descrita anteriormente (Ferreira et al. 2006, Dubey et al. 2008, Ragozo et al. 2010, Frazão-Teixeira et al. 2011, Clementino et al. 2013). Essas cepas com genótipos atípicos também podem ser responsáveis por infecções graves ou letais em indivíduos imunocompetentes, podendo provocar pneumonia, miocardite, meningoencefalite, ou polimiosite (Robert-Gangneux e Dardé 2012). Os dados coletados por meio do Centro de Recursos do “Centre National de Référence de La Toxoplasmose” (Limoges, França) mostrou que entre as 10 infecções graves ou

letais que ocorreram entre 2007 e 2010 na França, 7 foram relacionadas aos genótipos atípicos adquiridos na Guiana Francesa (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

Ao calcular a extensão geográfica da diversidade alélica na América do Sul, estimou-se que essa divisão de genótipos ocorreu há cerca de 10^6 anos. Isso corresponde ao mesmo período de tempo da conexão entre os continentes pela formação do Istmo do Panamá, que teria permitido a migração do *T. gondii* entre os continentes juntamente com os felinos (Khan et al. 2007). No entanto, para o melhor esclarecimento da história evolutiva de *T. gondii*, em diferentes escalas de tempo, um número maior de amostras de diferentes continentes ainda é necessário. A expansão geográfica de genótipos idênticos em todos os continentes, tanto clonais como atípicos, pode ser facilitada pelas atividades humanas, tais como transportes e intercâmbios, assim como a migração de aves (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

A compreensão da diversidade genética de *T. gondii* é importante para avaliar a epidemiologia molecular do parasito, já que variações locais na estrutura genética são altamente relevantes para compreender características como a transmissão, imunogenicidade e patogênese (Sibley et al. 2009).

1.5.2 PRINCIPAIS TÉCNICAS S DE GENOTIPAGEM

A alta variabilidade genética do parasito observada na América do Sul vem sendo comprovada através de modernas técnicas de biologia molecular. Existem diferentes métodos para realizar a genotipagem de isolados de *T. gondii* com vantagens e desvantagens.

Os primeiros estudos de tipagem foram baseados na eletroforese de isoenzimas. A análise de 35 isolados de *T. gondii* por isoenzimas permitiu a identificação de cinco zimodemas (Dardé et al. 1992). Estas análises, entretanto, requerem um grande número de parasitos purificados, inviabilizando seu uso prático em rotina laboratorial (Sibley et al. 2009). Mais tarde, foram elaborados marcadores para microssatélite, segmentos de DNA curtos e repetitivos que tendem a ocorrer na região não codificante. O uso destes marcadores para a tipagem de *T. gondii* é sensível, confiável e passível de análises de alto rendimento (Dardé et al. 2004). No entanto, também são altamente polimórficos e podem ser influenciados pela contaminação do DNA do hospedeiro, o que constitui uma fonte significativa de variabilidade (Sibley et al. 2009).

O polimorfismo pelo tamanho do fragmento de restrição (RFLP) tem sido amplamente utilizado para a genotipagem de *T. gondii*. Este método detecta variações mínimas em um gene, sendo que uma única substituição de bases pode originar ou extinguir um sítio capaz de ser digerido pelas endonucleases de restrição (Singh 1997). Marcadores de RFLP passam por amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido de digestão com enzimas de restrição específicas e visualização em gel de eletroforese (Sibley et al. 2009). Howe e colaboradores, em 1997, desenvolveram um sistema de tipagem de *T. gondii* baseado na análise de restrição de fragmentos do gene SAG2, amplificado por nested PCR. Este método identifica genótipos de cepas das três linhagens clonais descritas anteriormente.

No entanto, existem limitações na genotipagem de cepas baseadas somente em um *locus* (Lehmann et al. 2000, Ajzenberg et al. 2005). A utilização de um único marcador genético limita o poder de distinção dos isolados de *T. gondii*, não sendo possível detectar recombinações ou alelos atípicos (Dardé 2004, Ajzenberg et al. 2005, Su et al.

2006). A utilização de uma tipagem genética multilocus é necessária para avaliar a real diversidade da população de *T. gondii*, encontrar fatores genéticos que podem influenciar na virulência do parasito, entender eventuais mecanismos de seleções genóticas de acordo com a espécie hospedeira ou tentar relacionar o genótipo do parasito às manifestações clínicas da toxoplasmose (Dardé 2004, Ferreira et al. 2006).

Tendo em vista a necessidade de desenvolver métodos mais sensíveis na detecção de polimorfismos genéticos entre os diferentes isolados de *T. gondii*, Su e colaboradores em 2006 desenvolveram um conjunto de marcadores para PCR-RFLP que fornecem maior resolução para a genotipagem de *T. gondii*, cada um deles capaz de distinguir os três alelos. Os produtos de PCR sofrem a ação de enzimas de restrição específicas e a visualização é feita por eletroforese em gel. Todos os genótipos encontrados desde então são depositados em um banco de dados digital denominado ToxoDB (www.toxodb.com) em que se encontram disponíveis publicamente dados do genoma, além das proteínas conhecidas (Kissinger et al. 2003). Atualmente, constam neste banco de dados 141 genótipos diferentes de *T. gondii*.

Um grande desafio da técnica de RFLP multilocus é que, muitas vezes, as amostras são limitadas, tanto em volume quanto em quantidade de DNA, particularmente a partir de amostras de casos clínicos. Para atenuar este problema, foi desenvolvido o “Multiplex multilocus nested PCR-RFLP” (Mn-PCR-RFLP), método que emprega 11 marcadores genéticos, incluindo SAG1, SAG2, SAG2-alt, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico (Su et al. 2010). Nesta técnica, os marcadores são pré-amplificados por PCR multiplex utilizando iniciadores externos numa única reação e os produtos são utilizados como molde para amplificar cada marcador individualmente por nested-PCR (Su et al. 2010).

O sequenciamento direto de regiões genômicas revela a diversidade genética completa, incluindo polimorfismos de um único nucleotídeo e pequenas inserções e deleções. Por isso, detecta geralmente muito maior diversidade genética do que outros métodos. Por exemplo, um elevado grau de polimorfismo foi observado no Locus GRA6 por sequenciamento, enquanto que a análise por PCR-RFLP detectou apenas os três grupos I, II e III (Sibley et al. 2009). Por outro lado, mesmo que os custos do sequenciamento caiam a um nível onde seja possível obter a sequência genômica de todos os isolados, todos seriam considerados únicos e, ainda assim, seriam necessários critérios que permitissem comparações a fim de classificar os isolados (Sibley et al. 2009).

A partir do uso deste conjunto de marcadores associados às técnicas mencionadas, em especial o PCR-RFLP, aplicados a isolados de diferentes hospedeiros em diferentes regiões geográficas, ficou definitivamente evidenciada a grande diversidade genética deste parasito na América do Sul. Destaque deve ser dado aos estudos realizados recentemente no Brasil a partir de amostras de animais de diferentes regiões. Já estudos com amostras clínicas obtidas de humanos ainda são escassos.

1.5.3 GENOTIPAGEM DE *T. GONDII* POR BIOENSAIO E ISOLAMENTO

Um dos métodos mais utilizados para obter DNA de *T. gondii* para realizar a genotipagem é o bioensaio em camundongos. Para isso, tecidos suspeitos para a presença do parasito são inoculados em camundongos, os quais são posteriormente monitorados para o acompanhamento do desenvolvimento da doença e soroconversão (Dubey 2010, Robert-Gangneux e Dardé 2012). Após a obtenção dos camundongos infectados a partir do tecido inoculado, é possível isolar o parasito (Dubey 2010, Dubey et al. 2010). Bioensaios com gatos são mais sensíveis, mas também mais caros. Este

ensaio consiste em alimentar o gato com amostras do tecido suspeito e, em seguida, examinar as fezes para verificar a liberação de oocistos de 3 a 14 dias após a inoculação (Dubey et al. 2010, Robert-Gangneux e Dardé 2012).

Amostras de *T. gondii* isoladas de galinhas caipiras tem sido utilizadas preferencialmente em estudos populacionais do parasito, uma vez que estes animais tem sido considerados marcadores de contaminação ambiental (Dubey et al. 2010). Vários trabalhos de genotipagem destes animais foram realizados no Brasil, mas a grande maioria utilizando apenas um *locus* (Dubey et al. 2002a; Dubey et al. 2003; Brandão et al. 2006). Em estudos recentes utilizando 11 marcadores genéticos, Dubey e colaboradores (2008) obtiveram 151 isolados de *T. gondii* em 11 estados brasileiros encontrando 58 genótipos. Clementino Andrade e colaboradores (2013) obtiveram 13 isolados de galinhas da região nordeste, que foram genotipadas utilizando 11 marcadores. Foi identificado apenas um genótipo, provavelmente devido a uma mesma fonte de infecção para galinhas de um mesmo criatório.

Pena e colaboradores em 2008, analisando amostras de DNA provenientes de 46 isolados de *T. gondii* obtidos de gatos de São Paulo, encontraram 20 genótipos distintos. Combinando estes dados com outros de genotipagem de isolados obtidos de galinhas, cães e gatos no Brasil, foi observado que quatro genótipos predominantes estavam presentes em diferentes hospedeiros e localidades. Estes foram, então, considerados como linhagens clonais comuns no Brasil, designadas BrI, BrII, BrIII e BrIV.

Ragozo e colaboradores (2008) realizaram a genotipagem de isolados de *T. gondii* obtidos de 16 ovinos, revelando a ocorrência dos genótipos BrI e BrIII, além de novos genótipos não descritos na literatura. Silva e colaboradores (2011) genotiparam 13 isolados obtidos de ovinos provenientes de frigoríficos brasileiros e dez genótipos

diferentes foram identificados, quatro destes únicos até então. Ragozo e colaboradores (2010) também obtiveram 12 isolados do parasito, revelando a ocorrência do genótipo BrI em quatro caprinos e novos genótipos não descritos na literatura, além de uma mistura de genótipos distintos em uma das amostras.

Com relação à genotipagem de isolados de suínos, Frazão-Teixeira e colaboradores (2011) obtiveram cinco isolados de *T. gondii* a partir de 35 amostras do Rio de Janeiro e quatro genótipos foram identificados. A análise de DNA multilocus mostrou que cada linhagem possuía uma combinação única de alelos ainda não descritos na América do Sul. Recentemente, isolamos *T. gondii* a partir de suínos abatidos para consumo humano no Estado do Rio Grande do Norte. Obtivemos cinco isolados, os quais apresentavam quatro genótipos diferentes, um deles já descrito para outros hospedeiros da mesma região (Clementino Andrade et al. 2013).

Em seres humanos, os estudos são menos abundantes pela dificuldade de obtenção de amostras. Em nosso laboratório, Carneiro e colaboradores (2013) realizaram a primeira descrição de isolados obtidos de amostras de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita no Brasil. Neste estudo, foram obtidos 27 isolados oriundos de pacientes de Minas Gerais e a genotipagem de 24 destes revelou 14 genótipos diferentes. Sete destes genótipos já haviam sido descritos anteriormente em animais, enquanto outros sete foram identificados pela primeira vez. Cerca de 29% pertenciam ao genótipo BrII. Este trabalho sugere a alta diversidade genética de *T. gondii* em humanos no Brasil.

1.5.4 GENOTIPAGEM DE *T. GONDII* A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A técnica do bioensaio para o isolamento de *T. gondii* fornece bons resultados, mas é bastante laboriosa e demorada, além de não ser bem adaptada a um grande número de amostras. Assim, métodos baseados em PCR foram desenvolvidos para detectar o DNA do parasito diretamente da amostra biológica de interesse. Estes métodos podem ser menos sensíveis do que os bioensaios, devido à distribuição não uniforme dos cistos nos tecidos e ao pequeno tamanho da amostra de tecido utilizado (geralmente de 50 mg de amostra, em comparação com 50 a 500g em bioensaios) (Robert-Gangneux e Dardé 2012).

Fuentes e colaboradores (2001) realizaram a caracterização genética diretamente de amostras clínicas de pacientes da Espanha utilizando o *locus* SAG2, eliminando o processo anterior de isolamento em camundongos ou cultura de células. Utilizando 24 amostras, a caracterização foi bem sucedida em 76,5 % dos casos. Cepas do tipo II foram as mais prevalentes em pacientes imunocomprometidos, com 52% dos casos, enquanto cepas do tipo I estavam presentes em 75% dos casos de infecção congênita. Também utilizando somente o marcador SAG2, Gallego e colaboradores (2006) realizaram a genotipagem de diferentes amostras biológicas, tanto amostras clínicas humanas quanto em tecidos de animais. Com a complementação entre as técnicas de bioensaio e genotipagem direta das amostras biológicas, foi possível realizar a genotipagem em 33 das 50 amostras analisadas, em que foi observada a predominância do tipo I (93%).

Fekkar e colaboradores (2011) realizaram o multiplex com cinco marcadores de microssatélite e obtiveram os genótipos de 13 amostras de fluido ocular de pacientes com toxoplasmose ocular na França, no qual foi observada a predominância do genótipo

tipo II (77%). Já no Brasil, Okay e colaboradores (2011) realizaram a genotipagem do parasito a partir de amostras de líquido amniótico de 75 gestantes do estado de São Paulo. Utilizando os marcadores SAG2, SAG3 e GRA6, obtiveram a frequência dos alelos I, II e III por Mn-PCR-RFLP em 70 delas. O alelo I ocorreu em apenas 1 amostra (1,3%) enquanto o alelo II apareceu em 71,1% (54 amostras) e o III em 6,6% (5 amostras).

Utilizando onze marcadores genéticos por RFLP, Ferreira e colaboradores em 2011 realizaram a genotipagem de 20 amostras clínicas humanas, entre elas sangue, líquido cérebro-espinhal e fluido amniótico. Foram encontrados três genótipos novos, todos não pertencentes aos arquétipos clonais I, II ou III. Um destes genótipos foi observado em 18 das 20 amostras.

2. JUSTIFICATIVA

Através da genotipagem é possível estabelecer uma relação entre o genótipo de *T. gondii* e as manifestações clínicas da toxoplasmose, além de possíveis associações com diversos potenciais biológicos da espécie, como a virulência, infectividade, crescimento, diferenciação e susceptibilidade a drogas e vacinas. Para que estas associações possam ser feitas, é necessário um número crescente de amostras caracterizadas molecularmente através de técnicas aplicáveis as mais variadas amostras, tanto de hospedeiros infectados naturalmente, quanto experimentalmente.

Em muitos casos, a quantidade de amostra disponível é limitada, assim como a quantidade de DNA do parasito nestas amostras. A técnica de Multiplex multilocus nested PCR-RFLP possui maior sensibilidade em relação ao PCR-RFLP convencional e, se aplicada diretamente nas amostras biológicas, pode fornecer resultados rápidos e com menor custo, além de poder ser mais bem adaptada a um grande número de amostras.

A genotipagem a partir de amostras clínicas é um desafio pela natureza crônica da infecção e ausência de parasitos circulantes. No entanto, quando em fase aguda, pequenas quantidades do parasito podem entrar na corrente sanguínea e, conseqüentemente, serem detectadas. A identificação do genótipo de *T. gondii* diretamente de amostras clínicas, como sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita, pode ser uma excelente ferramenta para auxiliar o diagnóstico da toxoplasmose e, assim, fornecer marcadores que definam o seu prognóstico, levando ao tratamento apropriado de pacientes com infecção por *T. gondii*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a genotipagem de *Toxoplasma gondii* a partir de diferentes amostras biológicas utilizando a técnica de Multiplex multilocus nested PCR-RFLP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar a técnica de Multiplex multilocus nested PCR-RFLP para a genotipagem de *T. gondii* a partir de pulmão e cérebro de camundongos experimentalmente infectados;
- Validar a técnica de Multiplex multilocus nested PCR-RFLP para a genotipagem de *T. gondii* a partir de coração de galinhas caipiras naturalmente infectadas;
- Validar a técnica de Multiplex multilocus nested PCR-RFLP para a genotipagem de *T. gondii* a partir de sangue humano de recém-nascidos com toxoplasmose congênita;
- Comparar o perfil genotípico de *T. gondii* presente nas diferentes amostras biológicas com genótipos já identificados no Brasil e no mundo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para este trabalho foram utilizadas diferentes amostras biológicas, dentre elas pulmão e cérebro de camundongos experimentalmente infectados, coração de galinhas caipiras naturalmente infectadas, assim como amostras de sangue humano de recém-nascidos com toxoplasmose congênita.

4.1. CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Para a realização do inóculo experimental de *T. gondii* em camundongos, a fim de realizar a genotipagem a partir de cérebro e pulmão destes animais, foram utilizados diferentes isolados de *T. gondii* oriundos de pacientes humanos com toxoplasmose congênita (Carneiro et al. 2013).

Foram selecionados cinco isolados denominados TgCTBr1, TgCTBr3, TgCTBr7, TgCTBr9 e TgCTBr23, mantidos criopreservados no Laboratório de Toxoplasmose da Universidade Federal de Minas Gerais. Destes, quatro são virulentos para camundongos e um (TgCTBr7) possui virulência intermediária (Tabela1).

Tabela 1: Classificação da virulência dos isolados de *T. gondii* em camundongos BALB/c (segundo Carneiro et al. 2013).

Isolados	10 ³ taq.	10 ² taq.	10 ¹ taq.	10 ⁰ taq.	Classificação
RH	5 ^a /5 ^b	5/5	5/5	5/5	Virulento
ME49	0/4	0/5	0/5	0/5	Avirulento
TgCTBr1	5/5	5/5	4/4	3/3	Virulento
TgCTBr3	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento
TgCTBr7	5/5	4/4	5/5	4/5	Virulência Intermediária
TgCTBr9	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento
TgCTBr23	5/5	5/5	5/5	5/5	Virulento

^a Número de camundongos fêmeas BALB/c que morreram.

^b número total de camundongos infectados para cada inóculo.

4.1.1. ENSAIO EM CAMUNDONGOS

Para a obtenção dos taquizoítos utilizados no inóculo experimental, os isolados criopreservados foram descongelados e inoculados em 2 a 3 camundongos Swiss pela via intraperitoneal. Após a morte natural destes animais, foi feita a lavagem do peritônio e/ou pesquisa de cistos cerebrais, com subsequente passagem do material infectante para um novo animal, seguido de tratamento com sulfadiazina na água de beber (500 mg/l, segundo Dubey 2010) durante dez dias para cronificar a infecção.

Cerca de 30 dias após a passagem e confirmação sorológica da infecção através de ELISA, os animais foram sacrificados e os cistos teciduais obtidos do cérebro destes animais foram inoculados em cinco a sete camundongos através de inóculo intraperitoneal. Após lavagem do peritônio, o material obtido foi centrifugado e ressuspenso em 2ml de solução salina tamponada estéril (PBS; pH 7,2) e filtrado em membrana de policarbonato. Os taquizoítos presentes no filtrado foram contados em câmara hematocitométrica e diluídos para a concentração de 10^4 taquizoítos/200 μ l em PBS pH 7,2.

Cada isolado foi inoculado em três camundongos, em uma dosagem de 10^4 taquizoítos por camundongo. Após sete dias de infecção, os camundongos foram sacrificados, pulmão e cérebro foram retirados e armazenados em tubos de microcentrífuga de 1,5mL. Este material foi estocado a -80°C até o momento da extração de DNA. Estes experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em experimentação Animal (CETEA-UFMG), certificados pelo protocolo nº 128/2010 (Anexo 1).

4.1.2. *EXTRAÇÃO DE DNA DE CÉREBRO E PULMÃO DE CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS*

Cérebro e pulmão estocados a -80°C foram submetidos à extração de DNA 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 regiões aleatórias equivalentes a $\frac{1}{4}$ do órgão (aproximadamente 150 mg de cérebro e 70 mg de pulmão). Cada fragmento foi colocado em um novo tubo de 1,5mL e 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 e 20 μL de proteinase K (20mg/mL). A suspensão permaneceu em banho Maria a 37°C overnight. Então, foram adicionados 3 μL de solução de RNase e feita a homogeneização por inversão do tubo com 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 vortex por 20 segundos, resfriamento no gelo por 5 minutos e centrifugação a 16.000g por 5 minutos. Em um novo tubo de 1.5mL, foram adicionados 600 μL de isopropanol e o sobrenadante obtido pela centrifugação da etapa anterior. Após homogeneização por inversão do tubo e centrifugação por 1,5 minutos a 16.000g, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o DNA extraído foi lavado duas vezes com etanol 70% (adição de 600 μL de etanol e centrifugação por um minuto descartando o sobrenadante). O tubo contendo o DNA extraído foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos e

reidratado com água ultrapura. Após 36 horas, foi feita a dosagem em espectrofotômetro (Nanodrop[®]) e as amostras foram armazenadas a 4°C para posterior amplificação.

4.1.3. GENOTIPAGEM DE *T. GONDII* A PARTIR DE TECIDOS DE CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

A caracterização genotípica dos isolados selecionados neste trabalho foi realizada por Carneiro e colaboradores (2013). No entanto, este procedimento foi feito utilizando taquizoítos purificados após bioensaio em camundongos. Para o trabalho atual, foi feita a genotipagem pela técnica de Multiplex multilocus nested PCR-RFLP (Mn-PCR-RFLP), de acordo com Su e colaboradores (2010), diretamente dos tecidos de camundongos após sete dias de inóculo experimental. A técnica de Mn-PCR-RFLP está detalhadamente descrita no tópico 4.4.

4.2. GALINHAS CAIPIRAS NATURALMENTE INFECTADAS

Para a caracterização molecular de *T. gondii* presente em animais naturalmente infectados, foram analisadas amostras de DNA total extraído de coração galinhas caipiras naturalmente infectadas.

Brandão e colaboradores (2006) realizaram coletas em diferentes localidades de Minas Gerais em que foram analisadas, dentre outros animais, galinhas caipiras abatidas para consumo humano. Em galinhas, foi feita a coleta de sangue para a realização de diagnóstico sorológico e de coração para diagnóstico molecular por PCR. A extração de DNA de coração de galinhas foi realizada, como descrito no tópico 4.2.1, e o material mantido desde então a -20°C no laboratório de Toxoplasmose da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para o presente trabalho, foram selecionadas 15 amostras de DNA extraído de coração de galinhas que possuíram PCR positiva para o *Locus SAG2* (Tabela 2).

Tabela 2: Amostras de coração de galinhas caipiras obtidas de diferentes regiões de Minas Gerais (Segundo Brandão et al. 2006).

Galinha	Localidade	Sorologia (RIFI)	PCR (SAG2)
G1	Mariana	< 1:16	Positivo
G2	Mariana	1:1024	Positivo
G3	Ponte Nova	< 1:16	Positivo
G4	Desterro de Entre Rios	1:64	Positivo
G5	Ponte Nova	1:256	Positivo
G6	Ponte Nova	1:64	Positivo
G7	Belo Horizonte	< 1:16	Positivo
G8	Belo Horizonte	< 1:16	Positivo
G9	Belo Horizonte	< 1:16	Positivo
G10	Belo Horizonte	< 1:16	Positivo
G11	Belo Horizonte	1:16	Positivo
G12	Pedro Leopoldo	1:1024	Positivo
G13	Pedro Leopoldo	1:256	Positivo
G14	Belo Horizonte	1:1024	Positivo
G15	Belo Horizonte	1:1024	Positivo

4.2.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE CORAÇÃO DE GALINHAS CAIPIRAS

A extração de DNA das amostras ocorreu de acordo com Aspinall et al (2002), com modificações. Resumidamente, 1g de coração de galinha moído em triturador de tecidos foi misturado ao tampão estéril CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM de EDTA, 2% (w / v) de brometo de hexadecil trimetil amônio) até um volume final de 20mL. A amostra foi então incubada a 70°C por 60 minutos, com agitação frequente por inversão. Um volume igual de clorofórmio foi então adicionado à amostra, misturados

por inversão e centrifugados a 4°C durante 10 minutos a 9300g. Ao sobrenadante foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol 100%. Após inverter e incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos, a amostra foi novamente centrifugada e o sedimento ressuspenso em 1mL de etanol 70%. A amostra foi então centrifugada a 20.000g por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e o sedimento depois de seco foi incubado a 4°C em 1mL de tampão TE (1mM Tris-HCl, pH8,0, 0,1M de EDTA). Posteriormente, o DNA extraído foi congelado para estocagem à -20°C.

4.2.2. GENOTIPAGEM DE *T. GONDII* A PARTIR DE CORAÇÃO DE GALINHAS

O DNA extraído de coração de galinhas e estocado -20°C foi submetido à técnica de Mn-PCR-RFLP, descrita detalhadamente no tópico 4.4.

Após descongelamento das amostras, foi realizada a amplificação por Mn PR e digestão por enzimas de restrição específicas. O resultado obtido após a digestão foi visualizado em gel de poliacrilamida a 5% e fotografado para posterior comparação com alelos de cepas clonais e não usuais, para a determinação do genótipo.

4.3 SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Para realizar a caracterização molecular de *T. gondii* a partir de amostras clínicas humanas, foram selecionadas amostras de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita do estado de Minas Gerais. Também foram preparadas amostras de sangue humano contaminadas artificialmente com taquizoítos de *T. gondii* para a padronização da técnica de Mn-PCR em sangue.

4.3.1 *PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MULTIPLEX MULTILOCUS NESTED
PCR EM SANGUE HUMANO*

A dificuldade na realização de técnicas moleculares em amostras de sangue tendo como alvo o *T. gondii* já é conhecida e descrita na literatura. A técnica de Mn-PCR-RFLP em sangue não possui sensibilidade bem estabelecida. Para a padronização do Mn PCR-RFLP em sangue, foram utilizadas amostras de DNA extraído de uma suspensão de taquizoítos em sangue de humano de um voluntário não infectado.

Taquizoítos da cepa RH (clonal do tipo I) foram coletados do lavado peritoneal de camundongos Swiss e em seguida contados em câmara hemocitométrica. A concentração foi ajustada para 10^5 taquizoítos/mL e realizadas diluições 1:10 sucessivas em sangue de doador humano normal (negativo para toxoplasmose). Foram utilizadas as diluições de 10^4 taquizoítos/mL, 10^3 taquizoítos/mL, 10^2 taquizoítos/mL, 10^1 taquizoítos/mL e 10^0 taquizoítos/mL de sangue. Para a extração de DNA das amostras foi utilizada a técnica de extração por fenol e clorofórmio, descrita no tópico 4.3.3. O DNA extraído foi ressuspenso em água ultra pura e mantido sob refrigeração a 4°C.

As diferentes diluições foram submetidas à amplificação por Multiplex multilocus nested PCR, a fim de validar a técnica proposta por Su e colaboradores em 2010 (Tópico 4.4). Os diferentes marcadores foram comparados quanto à quantidade mínima de taquizoítos em que ocorreu amplificação.

4.3.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Durante o período de novembro de 2006 a maio de 2007 ocorreu no estado de Minas Gerais o projeto multidisciplinar “TRIAGEM NEONATAL PARA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS” sob a coordenação da Dra. Gláucia Manzan Queiroz de Andrade da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Neste trabalho, através do sangue seco coletado para o “teste do pezinho” foi realizado um inquérito sorológico baseado na detecção de IgM específica para *T. gondii* em sangue coletado em papel filtro. Esta triagem, realizada pelo Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD/UFMG), abrangeu cerca de 95% dos nascidos vivos no Estado neste período.

Das 146.307 crianças avaliadas, 235 apresentaram resultado positivo ou duvidoso na pesquisa de IgM anti-*T. gondii*. Dentre as crianças com resultado positivo/duvidoso para IgM e que realizaram consulta médica e exames sorológicos confirmatórios, 190 tiveram o diagnóstico de toxoplasmose congênita confirmado. Outras 45 crianças tiveram o diagnóstico de toxoplasmose congênita descartado por apresentarem IgG anti-*T. gondii* negativa após 12 meses de vida (Vasconcelos-Santos et al. 2009).

Amostras de sangue periférico das crianças diagnosticadas com toxoplasmose congênita foram coletadas durante os testes confirmatórios, em que as crianças estavam com uma idade média de 55.8 ± 15.8 dias de vida. Costa e colaboradores em 2013 realizaram a quantificação do DNA de *T. gondii* nestas amostras através de qPCR, no qual foram detectadas 72 amostras positivas. Foram selecionadas para o presente trabalho, dentre estas 72 amostras, aquelas que apresentaram um ou mais taquizoítos por mL, o que

representa 12 amostras (Tabela 3). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa (COEP–UFMG), parecer nº 0298/06 (Anexo 2).

Tabela 3: Amostras de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita quantificadas por qPCR (segundo Costa et al. 2013).

Amostra	Parasitas/mL
*S1	20,53
S2	6,811
S3	6,14
S4	5,839
S5	4,605
S6	3,778
S7	3,557
S8	1,616
S9	1,353
S10	1,275
S11	1,115
S12	0,978

* S= sangue humano

4.3.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE HUMANO

As amostras clínicas de sangue humano se encontravam armazenadas a -20°C no laboratório de Toxoplasmose da UFMG. Após descongelamento, estas foram submetidas à extração de DNA pela técnica de fenol e clorofórmio utilizando técnica adaptada de Gomes e colaboradores (1998).

Foram utilizados 200µL de sangue bruto ao qual foram adicionados 100µL de fenol, homogeneizados por 2-3 minutos e centrifugados a 3000g por 5 minutos. O

sobrenadante foi coletado e adicionado o mesmo volume de clorofórmio. Este material foi homogeneizado e centrifugado novamente. Ao sobrenadante foram adicionados 2µL de glicogênio e acetato de sódio em volume correspondente a 10% do total. Foi então adicionado etanol absoluto na proporção de 2:1. A mistura foi colocada no gelo por 15 minutos e centrifugada a 16000g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA mantido à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, o DNA foi reidratado com 20µL de H₂O ultra pura, seguido do armazenamento a 4°C.

4.3.4 *GENOTIPAGEM DE T. GONDII A PARTIR DE SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA*

As 12 amostras de sangue utilizadas fazem parte de um grupo de amostras no qual foi realizado o bioensaio em camundongos na tentativa de isolar o parasito e, posteriormente, realizar a genotipagem utilizando taquizoítos purificados (Carneiro et al. 2013). No entanto, não foi possível realizar o isolamento em dez das doze amostras selecionadas neste estudo. Sendo assim, apenas duas das 12 amostras possuem genótipo conhecido, mas obtido por bioensaio e não diretamente da amostra biológica. Neste trabalho foi realizada a tentativa de genotipagem utilizando a técnica de Mn-PCR-RFLP, detalhada a seguir.

4.4 *MULTIPLEX MULTILOCUS NESTED PCR-RFLP*

O DNA extraído das amostras biológicas utilizadas neste trabalho (tecidos de camundongos, coração de galinhas e sangue humano) foi amplificado e digerido segundo a técnica de Multiplex multilocus nested PCR-RFLP (Su et al. 2010). Para

isso, foram realizadas várias etapas, a fim de aumentar o rendimento e a qualidade das amostras de DNA.

4.4.1 *MULTIPLEX PCR*

Para a reação inicial de multiplex PCR, todos os 11 iniciadores externos (Quadro 1) foram misturados em uma única solução, originando dois mix de iniciadores externos (forward e reverse). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo 2,5µL de Tampão 5X green (Promega), 25mM de MgCl₂, 2,5mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen), 5u/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega), 25µM de cada iniciador externo (Invitrogen) e 1,5µL de DNA extraído da amostra biológica. Para realizar a reação foi utilizado um termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus, com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos para a desnaturação; 55°C por 1 minuto para o anelamento e 72°C por 2 minutos para a extensão.

4.4.2 *NESTED PCR*

Para a segunda reação de PCR foram utilizados os iniciadores internos (Quadro 1) separadamente, tendo como DNA molde o produto da primeira reação.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL contendo 2,5µL de Tampão 5X green (Promega), 25mM de MgCl₂, 2,5mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen), 5u/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega), 10µM iniciador interno forward, 10µM iniciador interno reverse (Invitrogen) e 1,5µL do produto do Multiplex PCR. A reação foi feita em um termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus, com as seguintes etapas: desnaturação

inicial a 95°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos para a desnaturação; 60°C por 1 minuto para o anelamento e 72°C por 1,5 minutos para a extensão.

Após eletroforese, o produto desta segunda reação foi visualizado em gel de poliacrilamida a 5%, juntamente com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (Promega) em cuba vertical com solução de TBE (Tris base + Ácido bórico + EDTA). O gel foi fixado por 7 minutos em solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético, à temperatura ambiente e corado pelo nitrato de prata por 7 minutos, lavados em água destilada e adicionado em solução reveladora (NaOH + formaldeído). A visualização das bandas foi feita por transiluminação com luz branca. Os produtos que apresentaram as bandas esperadas (Quadro 1) sofreram digestão por enzimas de restrição, conforme descrito a seguir.

4.4.3 DIGESTÃO POR ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Os produtos amplificados foram digeridos utilizando as endonucleases de restrição apropriadas (New England Biolabs[®]) (Quadro 1) segundo Su e colaboradores (2010). A digestão ocorreu em um volume final de 20µL, contendo 3µL do produto da Nested PCR, 0,1µL de enzima e 1µL do tampão correspondente, seguido de incubação de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras foram purificadas por extração com igual volume de fenol/clorofórmio e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%. O gel foi corado pelo nitrato de prata como descrito anteriormente. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com marcador de peso molecular 100pb (Promega).

Os géis foram fotografados com máquina fotográfica digital sob luz branca. Como referência, foram utilizadas as cepas clonais do tipo I (RH e GT1); tipo II (ME49 e PTG) e tipo III (VEG e CTG), além das cepas atípicas portadoras de alelos não usuais MAS, TgCgCa1 e TgCatBr5 (Su et al. 2006).

4.5 ANÁLISE DE DADOS

Os genótipos obtidos a partir do corte com enzimas de restrição foram identificados e comparados com os existentes no banco de dados ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>).

Quadro 1: Iniciadores e enzimas para a genotipagem por Multiplex multilocus nested PCR-RFLP (Mn-PCR-RFLP) (Su et al. 2010 adaptado).

Marcador	Cromosomo	Iniciadores externos (Multiplex PCR)	Iniciadores Internos (Nested PCR)	Nested PCR (pb)	Enzimas de restrição	Referência
SAG 1	VIII	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau96I+HaeII (digestão dupla)	(Grigg et al. 2001)
5'-SAG2	VIII		F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	241	MboI	(Howe et al. 1997; Su et al. 2006)
3'-SAG2	VIII	F: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R: TCAAAGCGTGCAATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	221	HhaI	(Howe et al. 1997)
SAG2-alt	VIII	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTCGACCAGCGGGAGCAC	640	HinfI+TaqI (digestão dupla)	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
SAG 3	XII	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	225	Nci I	(Grigg et al. 2001)
BTUB	IX	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	BsiEI+TaqI (digestão dupla)	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
GRA6	X	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	MseI,	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
C22-8	Ib	F: TGATGCATCCATGCGTTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTTCGC	521	BsmAI+MboII (digestão dupla)	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
C29-2	III	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATAACAT	F: AGTTCTGCAGAGTGTTCGC R: TGTCTAGGAAAAGAGGCGC	446	HpyCH4IV+RsaI (digestão dupla)	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
L358	V	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTCCTCGAAGACAGG	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	HaeIII+NlaIII (digestão dupla)	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
PK1	VI	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	AvaI+RsaI (digestão dupla)	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
Apico	Plastídio	F: TGGTTTTAACCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	F: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTTCGAACCCTTGATA	640	AflIII+DdeI (digestão dupla)	(Su et al. 2006)

5. RESULTADOS

5.1 CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

5.1.1 ENSAIO EM CAMUNDONGOS

A infecção experimental de camundongos Swiss com isolados virulentos, utilizando um inóculo de 10^4 taquizoítos em um período de sete dias, foi capaz de estabelecer a infecção e obter número suficiente de parasitos para a realização da genotipagem a partir de tecidos. Nenhum dos animais foi a óbito antes do período de sete dias.

5.1.2 AMPLIFICAÇÃO POR MN-PCR

Dez dos 11 marcadores utilizados para a genotipagem de *T. gondii* foram amplificados com sucesso a partir de DNA extraído de pulmão de camundongos em todos os cinco isolados (Quadro 2). A utilização de 70mg de pulmão foi suficiente para uma extração eficiente, apresentando quantidade suficiente de DNA do parasito para a amplificação por PCR.

Em contrapartida, para DNA extraído de cérebro, o número de marcadores em que ocorreu amplificação variou de acordo com o isolado. Nos isolados TgCTBr7, TgCTBr9, TgCTBr23 não ocorreu amplificação para nenhum dos marcadores. No isolado TgCTBr1 ocorreu amplificação em apenas quatro marcadores e no isolado TgCTBr3 em nove (Quadro 2).

O marcador APICO não amplificou em nenhum tipo de tecido utilizado.

5.1.3 *CORTE COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO*

Para o corte com enzimas de restrição, foram selecionados os produtos de nested PCR obtidos a partir de DNA extraído de pulmão de camundongos. O corte foi realizado de forma satisfatória para os dez marcadores em que ocorreu amplificação.

O resultado da genotipagem realizada pode ser observado no quadro 3. Estes resultados condizem com os encontrados por Carneiro e colaboradores (2013) que realizaram a genotipagem destes isolados utilizando taquizoítos purificados do parasito obtidos após bioensaio. Os géis com os produtos do nested PCR digeridos com enzimas de restrição específicas estão apresentados no anexo 3.

Quadro 2: Amplificação de amostras de *T. gondii* a partir de tecidos de camundongos experimentalmente infectados.

Órgão	Cepas	MARCADORES GENÉTICOS											
		SAG1	5'SAG2	3'SAG2	SAG2-alt	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	APICO
Cérebro	TgCTBr1	— *	Amp **	—	Amp	Amp	Amp	—	—	—	—	—	—
	TgCTBr3	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	—	Amp	Amp	—	—
	TgCTBr7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	TgCTBr9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	TgCTBr23	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pulmão	TgCTBr1	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	—
	TgCTBr3	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	—
	TgCTBr7	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	—
	TgCTBr9	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	—
	TgCTBr23	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	Amp	—

* não houve amplificação para o marcador e tipo de tecido especificados.

** amplificação satisfatória para o marcador e tecido especificados.

Quadro 3: Perfil genotípico das amostras de *T. gondii* a partir de tecidos de camundongos experimentalmente infectados

Cepas	MARCADORES GENÉTICOS											Genótipo (ToxoDB)**	
	SAG1	5'-3' SAG2	SAG2-alt	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico		
RH/GT1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	#10
ME49/PTG	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	#1
VEG/CTG	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	#2
TgCTBr 1	u-1	I	II	III	III	III	II	III	I	III	na*	na*	#206
TgCTBr 3	u-1	I	II	III	III	III	II	III	I	III	na	na	#206
TgCTBr 7	I	III	III	III	I	III	I	III	III	u-1	na	na	#67
TgCTBr 9	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	na	na	#11 (BrII)
TgCTBr 23	I	I	I	III	I	II	I	I	I	I	na	na	#41

* não amplificado

** segundo <http://toxodb.org/toxo/>

5.2 GALINHAS CAIPIRAS NATURALMENTE INFECTADAS

A partir de DNA extraído de coração de galinhas, foi possível realizar a amplificação de pelo menos dois marcadores em todas as amostras selecionadas (Quadro 4). Os marcadores L358 e SAG1 obtiveram o maior número de amostras amplificadas, nove cada.

Foi possível realizar a genotipagem completa de duas amostras, G5 e G12. Após comparação com genótipos presentes no banco de dados ToxoDB (toxodb.org/toxo/), foi verificado que ambos são únicos, ou seja, foram identificados pela primeira vez neste trabalho.

Não foi possível observar diversidade genética nas amostras G2, G4 e G6. Nas demais amostras a diversidade pode ser observada, mesmo na amostra G7 em que houve amplificação de apenas dois marcadores (Quadro 4).

Os géis com os produtos do nested PCR digeridos pelas enzimas de restrição específicas estão apresentados no anexo 4.

Quadro 4: Perfil genotípico de amostras de *T. gondii* a partir de DNA extraído de tecidos de galinhas naturalmente infectadas.

Amostra	MARCADORES GENÉTICOS											Genótipo (ToxoDB)	
	SAG1	5'-3' SAG2	SAG2- alt	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico		
RH/GT1 ¹	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	#10
ME49/PTG ¹	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	#1
VEG/CTG ¹	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	#2
TgCgCa1 ²	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	I	#66
MAS ²	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	I	#17
TgCatBr5 ²	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	I	#19
G1	na ³	I	na	III	na	II	na	na	na	na	na	na	
G2	na	I	na	na	na	na	na	I	na	na	na	na	
G3	I	na	na	na	III	na	na	na	na	na	na	I	
G4	na	na	na	III	na	III	na	na	na	na	na	na	
G5	I	I	II	III	III	III	I	I	III	III	I	I	Novo
G6	na	na	na	na	na	na	na	na	na	I	I	I	
G7	na	na	na	II	na	na	na	na	na	I	na	na	
G8	I	na	III	na	III	na	na	na	na	III	na	na	
G9	I	na	III	na	III	na	na	na	na	III	na	na	
G10	I	na	III	na	III	na	na	na	na	III	na	na	
G11	na	na	na	II	na	na	na	na	na	na	III	na	
G12	I	I	II	III	III	III	I	III	I	na	III	III	Novo
G13	u-1	I	II	na	III	III	II	na	I	na	na	na	
G14	I	I	na	na	na	na	na	III	na	na	na	III	
G15	I	I	na	III	III	III	I	na	I	na	na	na	

¹ genótipos clonais do tipo I (RH ou GT1), tipo II (ME49 ou PTG) e tipo III (VEG ou CTG);

² genótipos atípicos portadores de alelos não usuais;

³ não amplificado

5.3 *SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA*

5.3.1 *PADRONIZAÇÃO DO MULTIPLEX MULTILOCUS NESTED PCR EM SANGUE*

Para a padronização e verificação da sensibilidade da técnica em sangue, foram usadas diluições conhecidas de taquizoítos em sangue humano não infectado.

Através da amplificação de DNA extraído destas amostras, foi feita a validação da técnica posteriormente utilizada em sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita. Também foi verificado o valor mínimo de taquizoítos necessários para a amplificação em cada marcador (Quadro 5).

A técnica de extração por fenol e clorofórmio se mostrou eficiente por resultar em grande quantidade de DNA total e sem contaminantes, o que gerou géis de fácil visualização e baixa presença de bandas inespecíficas geradas por impurezas nas amostras.

Ocorreu amplificação em oito dos 11 marcadores testados em diferentes diluições (Quadro 5). SAG3 e L358 foram capazes de amplificar em amostras extraídas de uma diluição de apenas um taquizoíto por mL de sangue. Para os marcadores 5'SAG2, C22-8 e APICO não ocorreu amplificação em nenhuma diluição de taquizoítos.

Quadro 5: Diluição mínima de taquizoítos em que ocorreu amplificação por Mn-PCR em DNA extraído de sangue artificialmente contaminado com *T. gondii* (cepa RH).

Marcador	Diluição mínima para a amplificação por Mn-PCR (Taquizoítos/mL)
SAG 1	10^4
5'-SAG2	—*
3'-SAG2	10^2
SAG2-alt	10^4
SAG 3	10^0
BTUB	10^3
GRA6	10^2
C22-8	—
C29-2	10^3
L358	10^0
PK1	10^4
Apico	—

* não ocorreu amplificação em nenhuma das diluições testadas.

5.3.2 GENOTIPAGEM DE *T. GONDII* A PARTIR DE SANGUE DE RECÉM-NASCIDOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Ocorreu amplificação de DNA de *T. gondii* em oito das 12 amostras clínicas analisadas. Entretanto, o número de marcadores amplificados foi baixo, variando de um a cinco marcadores (Tabela 4).

O corte com enzimas de restrição específicas ocorreu satisfatoriamente, embora tenham sido observados casos em que a presença de produtos polimórficos não permitiu a classificação do alelo. Não foi possível realizar a genotipagem completa em nenhuma das amostras de sangue coletado de recém-nascidos com toxoplasmose congênita. A genotipagem parcial foi realizada em oito das 12 amostras utilizadas. Foi observada a presença do alelo do tipo III em todas as amostras, além da mistura de alelos dos tipos II e III nas amostras S5 e S8.

A classificação genotípica das amostras clínicas após o PCR-RFLP é apresentada na no quadro 6. Os géis com os produtos do n-PCR digeridos pelas enzimas de restrição específicas podem ser vistos no anexo 4.

Tabela 4: Marcadores em que ocorreu amplificação por Mn-PCR para amostras de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita quantificadas por qPCR.

Amostra	Parasitas/mL*	Marcador amplificado
S1	20,53	L358
S2	6,811	C22-8, C29-2, L358
S3	6,14	
S4	5,839	3'SAG2, SAG3
S5	4,605	SAG1, SAG3, C22-8, C29-2, L358
S6	3,778	
S7	3,557	
S8	1,616	3'SAG2, SAG3, GRA6, L358
S9	1,353	3'SAG2, SAG3
S10	1,275	SAG1, SAG3
S11	1,115	
S12	0,978	SAG1, SAG3, C29-2, L358

* Segundo Costa et al (2013)

Quadro 6: Perfil genotípico de amostras de *T. gondii* a partir de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita.

Amostra	MARCADORES GENÉTICOS										
	SAG1	3' SAG2	SAG2- alt	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico
RH/GT1¹	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ME49/PTG¹	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
VEG/CTG¹	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
TgCgCa1²	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I
MAS²	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I
TgCatBr5²	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I
S1	na ³	na	na	na	na	na	na	na	III	na	na
S2	na	na	na	na	na	na	III	III	inc ⁴	na	na
S3	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
S4	na	I ou III	na	III	na	na	na	na	na	na	na
S5	II ou III	na	na	II	na	na	III	III	III	na	na
S6	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
S7	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
S8	na	I ou III	na	II	na	III	na	na	III	na	na
S9	na	I ou III	na	III	na	na	na	na	na	na	na
S10	II ou III	I ou III	na	III	na	III	na	na	na	na	na
S11	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
S12	II ou III	na	na	II	na	na	na	inc	inc	na	na

¹ genótipos clonais do tipo I (RH ou GT1), tipo II (ME49 ou PTG) e tipo III (VEG ou CTG);

² genótipos atípicos portadores de alelos não usuais;

³ não amplificado.

⁴ corte inconclusivo.

6. DISCUSSÃO

6.1 GENOTIPAGEM DE *T. GONDII* A PARTIR DE CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Por serem hospedeiros naturais de *T. gondii*, camundongos *Mus musculus*, em suas diferentes linhagens, são comumente utilizados como modelo experimental de infecção, tanto pela via oral por cistos teciduais quanto intraperitoneal por taquizoítos (Lambert e Barragan 2010). Estes animais também têm sido utilizados no diagnóstico da toxoplasmose, por inoculação intraperitoneal ou subcutânea de amostras biológicas suspeitas de estarem contaminadas com o parasito (Dubey 2010).

A infecção i.p. de camundongos pelo *T. gondii* pode resultar em uma intensa multiplicação de taquizoítos no peritônio, gerando um quadro de ascite entre sete e 14 dias após o inóculo (Dubey 2010). A partir do exsudato peritoneal, taquizoítos podem ser purificados e utilizados na caracterização molecular do parasito (Carneiro et al. 2013, Clementino Andrade et al. 2013). Em algumas cepas, a multiplicação é mais lenta, o que torna mais difícil a obtenção de taquizoítos livres (Dubey 2010) e, muitas vezes, são necessárias várias passagens em camundongos a fim de obter número suficiente de parasitos. Sabe-se que passagens frequentes e sucessivas em camundongos podem modificar características biológicas das cepas, como alterar a virulência em camundongos (Dubey 2010).

Sabe-se que pulmão e cérebro são órgãos bastante afetados durante a infecção pelo *T. gondii*. Em camundongos, a morte ocorre geralmente por pneumonia e encefalite de sete a 14 dias após o inóculo de cepas virulentas (Dubey 2010). A visualização de taquizoítos no pulmão ou de cistos teciduais no cérebro é utilizada como critério de

confirmação da infecção em camundongos (Dubey et al. 2002a, Dubey et al. 2004, Pena et al. 2006, Frazão-Teixeira et al. 2011, Santos et al. 2011, Cabral et al. 2013, Carneiro et al. 2013). Tendo em vista o grande número de parasitos que podem estar presentes em cérebro e pulmão, estes se tornam uma alternativa para a obtenção do DNA de *T. gondii*, com vistas ao diagnóstico molecular do parasito. Dubey e colaboradores (2002a) extraíram DNA de pulmão de camundongos para fins de genotipagem de *T. gondii* nos animais que morreram em até quatro semanas de infecção, assim como Pena e colaboradores (2006), que também utilizaram DNA extraído do cérebro de animais que morreram após este período. Utilizando metodologia semelhante no presente trabalho, a genotipagem completa foi obtida a partir de pulmão de camundongos com apenas sete dias de infecção.

Foi possível realizar a genotipagem utilizando dez dos 11 marcadores descritos por Su e colaboradores (2010). A partir de dez marcadores, é possível realizar o depósito dos genótipos obtidos no banco de dados de *T. gondii*, ToxoDB (www.toxodb.org/toxo/). De acordo com Su e colaboradores (2006), a possibilidade de encontrar dois genótipos diferentes que compartilham os mesmos alelos em nove loci pode ser inferior a 5×10^{-5} . O marcador Apico não amplificou em nenhum dos isolados testados, provavelmente devido ao grande número de timina e adenina na sequência de seu iniciador, o que pode tornar o anelamento menos eficiente durante a PCR. Além disso, no caso do Multiplex PCR, ocorrem várias reações de amplificação simultaneamente, já que são utilizados 11 pares de iniciadores, aumentando a competição entre eles (Su 2013, comunicação pessoal). Para este marcador especificamente, a realização da primeira etapa da amplificação utilizando o iniciador externo separadamente em condições específicas, poderia possibilitar uma amplificação eficiente. Sendo assim, provavelmente é possível

realizar a genotipagem para os 11 marcadores utilizando DNA extraído de pulmão após sete dias de infecção.

Tendo em vista que as cepas brasileiras apresentam, em geral, virulência em camundongos (Dubey et al. 2004, Brandão et al. 2006, Dubey et al. 2010, Carneiro et al. 2013), com sete dias de infecção provavelmente é possível obter DNA de *T. gondii* a partir de pulmão de camundongos inoculados com amostras biológicas contendo o parasito. A técnica de Mn-PCR aumenta as chances de sucesso na amplificação, mesmo em casos de baixa carga parasitária. Isto aumenta a possibilidade de determinação dos genótipos por uma metodologia mais rápida e de menor custo, além do que, muitas vezes, os animais morrem antes da obtenção de taquizoítos suficientes no peritônio ou cistos no cérebro.

Enquanto em pulmão a amplificação por Mn-PCR foi satisfatória em todos os isolados, em cérebro alguns marcadores amplificaram apenas em dois isolados. A diferença observada entre as amplificações de genes de *T. gondii* nos dois órgãos em sete dias pode refletir a cinética de dispersão e multiplicação do parasito em camundongos. Wang e colaboradores (2013), utilizando um isolado de genótipo comum na China, observaram a presença de DNA do parasito no sangue, fígado e linfonodos após 4 d.p.i. No entanto, no cérebro, a detecção do DNA (em baixo número de cópias) só ocorreu no 7° d.p.i, havendo um aumento significativo no 14° d.p.i. Estes autores não avaliaram o parasitismo no pulmão, mas os resultados do presente trabalho indicam intensa multiplicação neste órgão durante os primeiros sete dias de infecção experimental.

Em cérebro, houve amplificação nos isolados TgCTBr1 e TgCTBr3, que possuem o mesmo genótipo, identificado como #206 (Carneiro et. 2013). Pode-se dizer que parasitos deste genótipo foram capazes de alcançar o cérebro e se multiplicar

intensamente neste órgão em um espaço de tempo menor (sete dias), quando comparado aos demais genótipos. Durante a infecção aguda, taquizoítos percorrem o hospedeiro por processos que envolvem inúmeras interações celulares e moleculares fortemente reguladas (Lambert e Barragan 2010). Análises *in vitro* sugerem que taquizoítos podem subverter células hospedeiras para se dispersarem. Foi observado que certos monócitos parasitados podem promover a entrada de parasitos no cérebro, além de poderem aumentar em até seis vezes a motilidade dos leucócitos parasitados (Tardieux e Menard 2008). Estas propriedades apoiam o conceito de que o transporte de taquizoítos em leucócitos migratórios contribui de forma significativa para a sua disseminação *in vivo*, em particular, para o cérebro. A eficiência deste transporte possivelmente varia de acordo com a cepa, o que poderia explicar a rápida colonização do cérebro pelos isolados do genótipo #206, que alcançaram e se multiplicaram mais rapidamente no cérebro em relação aos demais.

6.2 GENOTIPAGEM DE *T. GONDII* A PARTIR DE GALINHAS NATURALMENTE INFECTADAS

A infecção natural pelo *T. gondii* em animais, tanto silvestres quanto domésticos, ocorre ao redor do mundo e resulta de um grande sucesso adaptativo deste protozoário. Para tentar avaliar o nível de contaminação ambiental que favorece a disseminação de *T. gondii*, estudos envolvendo galinhas são frequentes, já que os resultados obtidos podem refletir os genótipos circulantes em determinada região (Dubey et al. 2003, Dubey et al. 2004, Dubey et al. 2010). Dentre os trabalhos de genotipagem já realizados nestes animais, grande parte utilizou bioensaio em camundongos e, em muitos deles, somente um marcador genético (Dubey et al. 2002a, Brandão et al. 2006, Dubey et al. 2008, Dubey et al. 2010, Clementino Andrade et al. 2013). O tecido normalmente utilizado

para bioensaio é o coração, tanto pela facilidade de obtenção quanto pela frequente presença de cistos neste local (Dubey et al. 2004). No entanto, tanto a carga parasitária como a não regularidade na distribuição dos cistos podem comprometer a realização da genotipagem.

Neste trabalho foi realizada a genotipagem diretamente de DNA extraído de coração de galinhas, utilizando 11 marcadores genéticos. Todas as amostras foram amplificadas por, pelo menos, dois marcadores genéticos, o que representa a eficiência da técnica de Mn-PCR. As duas amostras em que foi obtida a genotipagem completa eram de galinhas que possuíam resultados positivos na sorologia em diluições bastante altas (1:256 e 1:1024). No entanto, foi possível obter a amplificação em alguns marcadores mesmo em galinhas com sorologia menor que 1:16. Este resultado, aliado ao isolamento de *T. gondii* a partir de animais soronegativos em outros trabalhos (Dubey et al. 2002b, Brandão et al. 2006) indica possíveis problemas na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em galinhas pelos testes mais comuns (Dubey e Beattie 1988). O teste sorológico utilizado nas galinhas selecionadas para o presente trabalho foi o RIFI, no entanto, a técnica considerada mais eficiente em galinhas é a de aglutinação modificada (MAT), descrita por Dubey e Desmonts em 1987.

Outros fatores também podem interferir no número de marcadores amplificados pela Mn-PCR, dentre eles o método de extração realizado e o tipo e tempo de estocagem do DNA, já que podem prejudicar a qualidade da amostra. Podivinsky e colaboradores (2009) realizaram um estudo comparativo para verificar os fatores de estocagem que poderiam influenciar na estabilidade do DNA a ser utilizado em PCR. Os autores observaram que o processo de congelamento resulta na perda aparente de parte do DNA molde enquanto a estocagem a 4°C em fase aquosa promoveu maior estabilidade. A

maior estabilidade foi obtida de amostras liofilizadas em comparação às aquosas congeladas. O DNA extraído do coração de galinhas usadas no presente trabalho foi mantido a -20°C durante sete anos, o que pode ter influenciado a qualidade do DNA e interferido na amplificação por Mn-PCR. Apesar destas condições, os resultados obtidos neste trabalho foram parcialmente satisfatórios. Foi possível realizar a genotipagem completa ou parcial de todas as 15 amostras de galinhas analisadas, sendo completa em duas e parcial em 13 amostras. Poucos trabalhos de genotipagem por Mn-PCR a partir de tecidos de animais naturalmente infectados são encontrados na literatura. Recentemente, Cañón-Franco e colaboradores (2013) analisaram vários tecidos de 31 felídeos silvestres do Rio Grande do Sul positivos por PCR e obtiveram o genótipo parcial de oito amostras e genotipagem total de três amostras.

Ao analisar os resultados obtidos neste trabalho, foi observado que os dois genótipos completos detectados em galinhas ainda não haviam sido descritos na literatura, ou seja, possuem uma combinação única de alelos não identificada anteriormente. Estes resultados confirmam a alta diversidade genética das cepas de *T. gondii* circulantes no Brasil (Dubey et al. 2008, Ragozo et al. 2010, Frazão-Teixeira et al. 2011, Clementino et al. 2013). Não foi possível observar diversidade genética nas amostras G2, G4 e G6. No entanto, estas não podem ser consideradas clonais, já que um pequeno número de marcadores foram amplificados. Após o início da utilização de vários marcadores genéticos, poucos relatos de galinhas caipiras com genótipo clonal ocorreram no Brasil (Dubey et al. 2010). Por isso, um número mínimo suficiente de marcadores padronizados é necessário para identificar a diversidade genética.

6.3 GENOTIPAGEM DE *T. GONDII* A PARTIR DE AMOSTRAS CLÍNICAS HUMANAS

Com relação às amostras clínicas humanas, alguns trabalhos de genotipagem já foram realizados utilizando líquido amniótico, sangue, lavado bronquioalveolar, medula óssea, líquido cérebro-espinhal, entre outros (Howe et al. 1997; Ferreira et al. 2011; Okay et al. 2011). Dentre os diversos tipos de amostras, o sangue é o mais facilmente obtido, já que utiliza técnicas menos invasivas. No entanto, pelo fato de *T. gondii* ser um parasito tecidual, a presença do mesmo no sangue é pouco frequente. Para isso, seria necessário que o paciente estivesse em fase aguda da infecção e com alta parasitemia. Neste trabalho, a amostra clínica selecionada para a genotipagem foi o sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita.

Foi possível realizar a genotipagem parcial de oito das 12 amostras que possuíam de um a 20 parasitos por mL de sangue. Devido ao pequeno número de DNA do parasito presente nas amostras de sangue analisadas neste trabalho, os resultados obtidos podem ser considerados satisfatórios. Su e colaboradores (2010) consideram que é necessária a presença de pelo menos dez equivalentes do genoma para a amplificação dos marcadores padronizados para o Mn-PCR. É possível observar que apenas na amostra S1 havia carga parasitária mais elevada, com cerca de 20 taquizoítos/mL. No entanto, nesta mesma amostra ocorreu amplificação apenas do marcador L358. Já em outras amostras, com carga parasitária bem mais baixa, até cinco marcadores foram amplificados, como a amostra S12, com apenas um taquizoíto/mL, em que ocorreu amplificação de quatro marcadores. Deve-se considerar, então, que a qualidade da amostra também parece ser outro fator relevante.

Muitos são os fatores que podem influenciar na eficiência da amplificação além da simples presença do parasito na amostra. De acordo com Castro et al (2001) a grande

quantidade de células e de DNA humano poderiam interferir na eficiência do PCR. Os mesmos autores chamam a atenção para as porfirinas presentes em amostras que contenham sangue, como fator inibitório da *Taq* polimerase. Segundo Montoya et al. (2009), outra possível explicação para o baixo número de amplificação por PCR seria o pequeno volume da amostra analisada. Neste trabalho foram utilizados apenas 200µL de sangue para a extração, que pode não ter sido suficiente para conter a quantidade mínima de DNA alvo detectável.

No presente estudo, a extração de DNA ocorreu em amostras de sangue preservadas por congelamento desde sua coleta entre os anos de 2006 e 2007. Esta condição pode ter alterado a sensibilidade da técnica utilizada. Segundo Colombo e colaboradores (2005) e Mesquita e colaboradores (2010), é recomendável que as amostras sejam processadas rapidamente com o objetivo de prevenir a inibição da *Taq* polimerase. Por outro lado, o fato das amostras poderem ser armazenadas por longos períodos antes da realização da genotipagem é um fator favorável, desde que seja feito o armazenamento adequado, além da utilização de um método de extração eficiente.

O método de extração do DNA também pode interferir na sensibilidade da reação (Alfonso et al. 2009). No presente trabalho a extração foi realizada utilizando fenol e clorofórmio. Esta técnica é considerada uma das mais eficientes, principalmente em casos de baixa parasitemia (Gomes et al. 1998). Em um trabalho comparativo entre diferentes métodos de extração aplicados à amostras estocadas a -20°C durante 20-30 anos, Di Pietro e colaboradores (2011) observaram que a técnica de extração que utiliza fenol e clorofórmio é capaz de fornecer o DNA genômico mais puro e recomendam sua utilização em ensaios clínicos no qual as amostras podem ficar estocadas por um longo tempo até que possam ser feitas as análises.

O inóculo da amostra clínica em camundongos para a realização de isolamento por bioensaio também é utilizado para a genotipagem. Neste caso, dependendo do tamanho da amostragem, são necessários muitos animais para os bioensaios, além da necessidade de taquizoítos viáveis, capazes de infectar o animal. Já a genotipagem diretamente das amostras não necessita de parasitos vivos, já que somente fragmentos de DNA são suficientes para a amplificação por PCR. Isto permite também o armazenamento da amostra por longos períodos, já que nem sempre é possível utilizar as amostras imediatamente após a coleta, como é o ideal para o bioensaio em camundongos. Por outro lado, caso seja infectado, o camundongo pode fornecer grande número de taquizoítos que podem ser purificados, aumentando as chances de uma genotipagem completa com todos os marcadores necessários. Isto mostra que a genotipagem realizada diretamente de amostras clínicas pode atuar como complementação ao bioensaio ou substituição do mesmo, dependendo das condições disponíveis.

Durante a padronização da técnica de Mn-PCR utilizando sangue contaminado artificialmente com taquizoítos da cepa RH, foi possível observar uma variação na sensibilidade entre os diferentes marcadores. SAG3 e L358 obtiveram os melhores resultados, amplificando amostras com apenas um taquizoíto/mL. Esta eficiência foi observada também nas amostras clínicas, já que estes marcadores foram amplificados em um grande número de amostras, dentre elas a amostra S12, que possuía apenas 0,978 parasito/mL. Já os marcadores 5'SAG2 e Apico não amplificaram, tanto na padronização quanto nas amostras clínicas. O marcador SAG2 é considerado sensível também para amostras clínicas, sendo capaz de detectar menos de cinco parasitos em amostras que contém também DNA do hospedeiro (Howe et al. 1997). No entanto, a distinção completa dos três alelos é feita em duas etapas com a comparação de resultados das extremidades 5' e 3' (Howe et al. 1997, Su et al. 2010). Nas amostras de

sangue aqui analisadas, somente a sequência referente à extremidade 3' foi amplificada em algumas amostras. Desta maneira é possível distinguir o alelo do tipo II dos alelos I ou III. Fuentes e colaboradores (2001) realizaram a genotipagem de *T. gondii* utilizando este marcador em diferentes amostras biológicas de pacientes com Toxoplasmose e em 18% das amostras só foi possível amplificar a extremidade 3'. Já Lindstrom e colaboradores (2006) realizaram procedimento semelhante em sangue de pacientes com AIDS, em que três das 30 amostras amplificaram apenas a sequência referente à extremidade 5'. Estes resultados indicam que a necessidade de duas ampliações para a comparação de resultados de um único marcador podem comprometer a distinção completa entre os três alelos. Como alternativa, foi desenvolvido o marcador SAG2-alt, que realiza em apenas uma etapa a distinção completa entre os três alelos (Su et al. 2006). No entanto, no caso de cepas brasileiras, SAG2 e SAG2-alt muitas vezes não apresentam o mesmo alelo em um mesmo isolado, o que indica a necessidade do uso de ambos para a completa determinação do genótipo. Já o marcador Apico, discutido anteriormente, merece atenção especial durante a Mn-PCR, uma vez que apresentou problemas de amplificação em outras amostras aqui analisadas.

Neste trabalho, o alelo do tipo III foi observado em todas as amostras cuja genotipagem foi bem sucedida. A alta frequência deste alelo em muitos dos marcadores em amostras oriundas de pacientes humanos foi observada na literatura (Carneiro et al. 2013, Ferreira et al. 2011). Também foi possível observar nas amostras S5 e S8 a presença do alelo do tipo II. A utilização do PCR-RFLP multilocus foi capaz de revelar a diversidade genética do parasito em populações humanas do estado de Minas Gerais, assim como já foi observado em outros hospedeiros (Clementino Andrade et al. 2013, Pena et al. 2008, Dubey et al. 2008). No entanto, é necessário um número maior de marcadores amplificados e digeridos para que este tipo de análise possa ser feita com maior critério.

Para que a genotipagem de *T. gondii* seja considerada completa são necessários de 10 a 11 marcadores. Para obter este resultado, provavelmente seria necessária uma alta parasitemia, que só é possível em um paciente em fase aguda ou reagudização da infecção. Visto que *T. gondii* é um parasito tecidual, a obtenção do genótipo parcial na maioria das amostras mostra que a técnica do Mn PCR-RFLP, aliada à extração pela técnica de fenol e clorofórmio é eficiente e pode ser utilizada como ferramenta auxiliar ao biensaio em camundongos na genotipagem do parasito.

7. CONCLUSÕES

A partir da realização da genotipagem a partir de diferentes amostras biológicas de hospedeiros infectados pelo *T. gondii*, foi possível concluir que:

- A técnica de Mn PCR-RFLP é eficaz para a genotipagem de *T. gondii* a partir de tecidos de camundongos; coração de galinhas e sangue humano;
- A genotipagem completa de *T. gondii* pode ser realizada a partir de DNA extraído de pulmão de camundongos com sete dias de infecção experimental;
- A genotipagem completa de *T. gondii* pode ser realizada a partir de DNA extraído de coração de galinhas naturalmente infectadas;
- Foi realizada a genotipagem parcial de *T. gondii* a partir de sangue humano em amostras de pacientes com no mínimo um taquizoíto por mL de sangue;
- Há grande diversidade genética em amostras de *T. gondii* oriundas de galinhas naturalmente infectadas do estado de Minas Gerais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi M, Kowalewska-Grochowska K, Bahar MA, Kilani RT, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ 2003. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 188: 608–16.
- Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Dardé ML 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 32: 27–38.
- Ajzenberg D, Dumètre A, Dardé ML 2005. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 43: 1940-1943.
- Alfonso Y, Fraga J, Jiménez N, Fonseca C, Dorta-Contreras AJ, Cox R, Capo V, Bandeira F, Pomier O, Ginorio D 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. *Exp Parasitol* 122: 203-207.
- Aspinall TV, Marlee D, Hyde JE, Sims PFG 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought? *Int J Parasitol* 32: 1193–1199.
- Brandão GP, Ferreira AM, Melo MN, Vitor RWA 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. *Parasite* 13: 143-149.
- Cañón-Franco WA, Araújo FAP, López-Orozco N, Jardim MMA, Keid LB, Dalla-Rosaf C, Cabral AD, Pena HFJ, Gennari SM 2013. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: Molecular detection and genotypic characterization. *Vet Parasitol* 197: 462– 469.
- Carneiro AC, Andrade GM, Costa JG, Pinheiro BV, Vasconcelos-Santos DV, Ferreira AM, Su C, Januário JN, Vitor RW 2013. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 51: 3901-907.

- Castro FC, Castro MJBV, Cabral ACV, Filho GB, Vitor RWA, Lana AMA, Andrade GMQA 2001. A comparison between methods for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Rev Bras Ginecol Obstet* 23: 277-82.
- Cavalcante ACR, Ferreira AM, Melo M.N, Fux, B, Brandão GP, Vitor RWA 2007. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. *Small Rumin Res* 69:79-82.
- Clementino Andrade MM, Pinheiro BV, Cunha MM, Carneiro ACAV, Andrade Neto VF, Vitor RWA 2013. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. *Res Vet Sci* 94: 587-589.
- Colombo FA, Vidal JE, Oliveira ACPD, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL 2005. Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in AIDS Patients in Brazil: Importance of Molecular and Immunological Methods Using Peripheral Blood Samples. *J Clin Microbiol* 43: 5044-5047.
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *Br Med J* 15:142–147.
- Costa JGL, Carneiro ACAV, Tavares AT, Andrade GMQ, Vasconcelos-Santos DV, Januário JN, Menezes-Souza D, Fujiwara RT, Vitor RWA 2013. Real-Time PCR as a prognostic tool for human congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 51: 2766 –2768.
- Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J Parasitol* 78: 786–794.
- Dardé ML 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità* 40: 57-63.
- De Moura L, Bahia-Oliveira LMG, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RMT, Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garrett DO 2006. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis* 12: 326–329.

- Di Pietro F, Ortenzi F, Tilio M, Concetti F, Napolioni V 2011. Genomic DNA extraction from whole blood stored from 15- to 30-years at -20°C by rapid phenol-chloroform protocol: A useful tool for genetic epidemiology studies. *Mol Cell Probes* 25:44-48.
- Dubey JP, Desmonts G 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet J.* 19:337-339.
- Dubey JP, Beattie CP 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 220pp.
- Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AMA, Nishi SM, Shen SK, Kwok OCH, Hill DE, Thulliez P 2002a. 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, Gamble HR, Hill D, Sreekumar C, Romand S, Thulliez P 2002b. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *J Parasitol* 88:1234-1238.
- Dubey JP, Navarro IT, Graham DH, Dahl E, Freire RL, Prudencio LB, Sreekumar C, Vianna MC, Lehmann T 2003. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Vet Parasitol* 117: 229–234.
- Dubey JP, Levy MZ, Sreekumar C, Kwok OCH, Shen SK, Dahl E, Thulliez P, Lehman T 2004. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *J Parasitol* 90: 1015-1018.
- Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HFJ, Oliveira LN, Leifer CA, Gennari SM, Bahia Oliveira LMG, Su C 2008. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol* 157: 299–305.
- Dubey JP 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2nd ed. CRC Press, Maryland, 313pp.

- Dubey J P, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL 2012. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 139: 1375-1424.
- Fekkar A, Ajzenberg D, Bodaghi B, Touafek F, Le Hoang P, Delmas J, Roobert PY, Dardé ML, Mazier D, Paris L 2011. Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 Patients with ocular toxoplasmosis: predominance of type II in France. *J Clin Microbiol* 49: 1513–1517.
- 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.
- Ferreira IMR, Vidal JE, de Mattos CCB, de Mattos LC, Qu D, Su C, Pereira-Chiocola VL 2011. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in São Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol* 129: 190-195.
- Frazão-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, de Oliveira FCR 2011. Multilocus DNA sequencing of *toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Vet Parasitol* 175: 33-39.
- Fuentes I, Rubio JM, Ramirez C, Alvar J 2001. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J Clin Microbiol* 39: 1566–1570.
- Gallego C, Saavedra-Matiz C, Gómez-Marín JE 2006. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Trop* 97:161-167.
- Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SDJ, Galvão L M C, Chiari E 1998. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 88: 28–33.
- Hill D, Coss Cathleen, Dubey JP, Wroblewski K, Sautter M, Hosten T, Muñoz-Zanzi, Mui E, Withers Shawn, Boyer K, Hermes G, Coyne J, Jagdis F, Burnett A,

- McLeod Patrick, Morton H, Robinson D, McLeod R 2011. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 97: 328-337.
- Howe DK, Sibley LD 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172: 1561–1566.
- Howe DK, Honore S, Derouin F, Sibley LD 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35: 1411–1414.
- Jones JL, Sehgal M, Maguire JH 2002. Toxoplasmosis-associated deaths among human immunodeficiency virus-infected persons in the United States. *Clin Infect Dis* 34:1992-1998.
- Karanis P, Aldeyarbi HM, Mirhashemi ME Khalil KM 2013. The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. *Environ Sci Pollut Res Int* 20: 86-99.
- Kaye A 2011. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care* 25: 355–364.
- Khan A, Su C, German M, Storch GA, D. B. Clifford DB, Sibley LD 2005. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of Type I strains. *J Clin Microbiol* 43: 5881–5887.
- Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Dardé ML 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14872–14877.
- Kissinger JC, Gajria B, Li L, Pausen IT, Roos DS 2003. ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic Acids Res* 31: 234-6.
- Lambert H, Barragan A 2010. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* 12: 292–300.
- Levine ND 1988. The protozoan phylum apicomplexa. Boca Raton, Florida: CRC Press 2.

- Lehmann T, Blackston CR, Parmley SF, Remington JS, Dubey JP 2000. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *J Parasitol* 86: 960-971.
- Lindstrom I, Kaddu-Mulindwa DH, Kironde F, Lindh J 2006. Prevalence of latent and reactivated *Toxoplasma gondii* parasites in HIV-patients from Uganda. *Acta Trop* 100: 218–222.
- Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chioccola VL 2010. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers to determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Braz J Infect Dis* 14: 346-350.
- Montoya A, Miró G, Mateo M, Ramírez C, Fuentes I 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). *Vet Parasitol* 160:159-162.
- Okay T, Sousa M, Oliveira L, Yamamoto L, Del Negro G 2011. Predominance of *Toxoplasma gondii* RFLP-genotype II and high frequency of atypical genotypes in 74 amniotic fluid samples of Brazilian women. *Trop Med int Health* 16: 295-296.
- Pena HFJ, Soares RM, Amaku M, Dubey JP, Gennari SM 2006. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res Vet Sci* 81: 58-67
- Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol* 38: 561–569.
- Peng HJ, Chen XG & Lindsay DS 2011. A review: competence, compromise, and concomitance: reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *J Parasitol* 97: 620–628.
- Phan L, Kasza K, Jalbrzikowski J, Noble AG, Latkany P, Kuo A 2008. Longitudinal study of new eye lesions in children with toxoplasmosis who were not treated during the first year of life. *Am J Ophthalmol* 146:375–384.

- Pinardi JA, Leslie NS, Irvine PJ 2003. Maternal serologic screening for Toxoplasmosis. *J Midwifery Womens Health* 48: 308-316.
- Pinto LD, Araújo FAP, Stobb NS, Marques SMT 2009. Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clínicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil. *Cienc Rural* 39: 2464-2469.
- Podivinsky E, Love JL, van der Colff L, Samuel L 2009. Effect of storage regime on the stability of DNA used as a calibration standard for real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 394:132-134.
- Ragozo AMA, Pena HFJ, Yai LEO, Su C, Gennari SM 2010. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: Novel genotypes revealed. *Vet Parasitol* 170:307-312.
- Robert-Gangneux F, Darde ML 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol* 25:264–296.
- Santos PS, Albuquerque GR, da Silva V 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from central Amazon, Brazil. *Vet Parasitol* 183: 171–173.
- Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc* 364: 2749–2761
- Silva RC, Langoni H, Su C, Silva AV 2011. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. *Vet Parasitol* 175: 173-177.
- Silveira C, Belfort Jr R, Muccioli C, Abreu M T, Martins M C, Victora C, Nussenblatt R B, Holland GN 2001. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *Am J Ophthalmol* 131: 351–354.
- Singh B 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol* 27: 1135-1145.

- 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: 841-8.
- 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: 1-11.
- Tardieux I, Menard R 2008. Migration of Apicomplexa across biological barriers: the *Toxoplasma* and *Plasmodium* rides *Traffic* 9:627–635.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-58.
- Truppel JH, Reifur L, Montiani-Ferreira F, Lange RR, Vilani RGOC, Genari SM, Thomaz-Soccol V 2010. *Toxoplasma gondii* in Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) antibodies and DNA detected by IFAT and PCR. *Parasitol Res* 107:141–146
- Vasconcelos-Santos DV, Machado Azevedo DO, Campos WR, Orefice F, Queiroz-Andrade GM, Carellos EV, Romanelli RMC, Januário JN, Resende LM, Martins-Filho AO, Carneiro ACAV, Vitor RWA, Caiaffa WT 2009. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology* 116:2199–2205.
- Wang L, Chen H, Liu D, Huo X, Gao J, Song X, Xu X, Huang K, Liu W, Wang Y, Lu F, Lun ZR, Luo Q, Wang X, Shen J. 2013. Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from animals and humans in China. *PLoS One*.8:e53483.
- Zhou P, Chen Z, Li HL, Zheng H, He S, Lin RQ, Zhu XQ 2011. *Toxoplasma gondii* infection in humans in China. *Parasit Vectors* 4:165.
- Zhu J, Yin J, Xiao Y, Jiang N, Ankarlev J, Lindh J, Chen Q 2008. A seroepidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-range and caged chickens in northeast China. *Vet Parasitol* 158: 360–363.

9. ANEXOS

Anexo 1: Certificado do Protocolo nº 128/2010 do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG).



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 128/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Obtenção e caracterização de novos isolados de toxoplasma gondii**", que tem como responsável(is) **Ricardo Wagner de Almeida Vitor**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **25/ 08/2010**.

Este certificado expira-se em **25/ 08/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 128/2010**, related to the project entitled "**Characterization of new strains of toxoplasma gondii**", under the supervisors of **Ricardo Wagner de Almeida Vitor**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 25, 2010**.

This certificate expires in **August 25, 2015**.

Belo Horizonte, 27 de Agosto de 2010.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpg.ufmg.br

Anexo 2: parecer nº 0298/06 do Comitê de ética em pesquisa (COEP–UFMG).

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

Paracer nº. ETIC 0298/06

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

DECISÃO

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

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


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

Anexo 3: PCR-RFLP a partir de DNA extraído de pulmão de camundongos experimentalmente infectados.

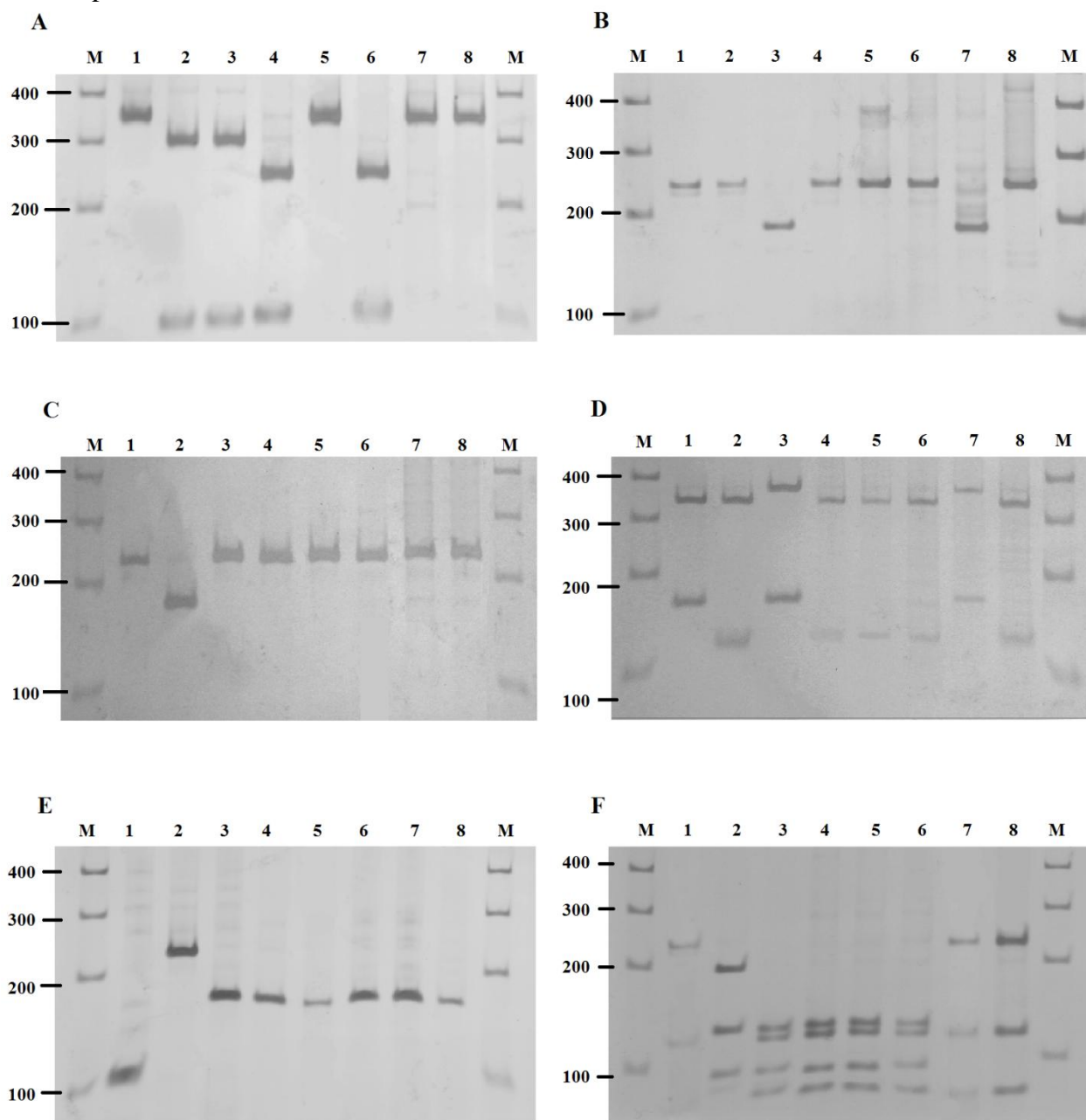


Figura 1. PCR-RFLP em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para a genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de pulmão de camundongos. M= marcador de peso molecular (Promega, 100pb); 1= controle positivo clonal do tipo I (RH ou GT1); 2= controle positivo clonal do tipo II (ME49 ou PTG); 3= controle positivo clonal do tipo III (VEG ou CTG); 4= TgCTBr1; 5= TgCTBr9; 6= TgCTBr3; 7= TgCTBr7; 8= TgCTBr23. **A:** Locus SAG1, endonucleases de restrição Sau96I e HaeII. **B:** Locus 5'SAG2, endonuclease de restrição MboI. **C:** Locus 3'SAG2, endonuclease de restrição HhaI. **D:** Locus SAG2-alt, endonucleases de restrição HinfI e TaqI. **E:** Locus SAG3, endonuclease de restrição NciI; **F:** Locus BTUB, endonucleases de restrição BsiEI e TaqI.

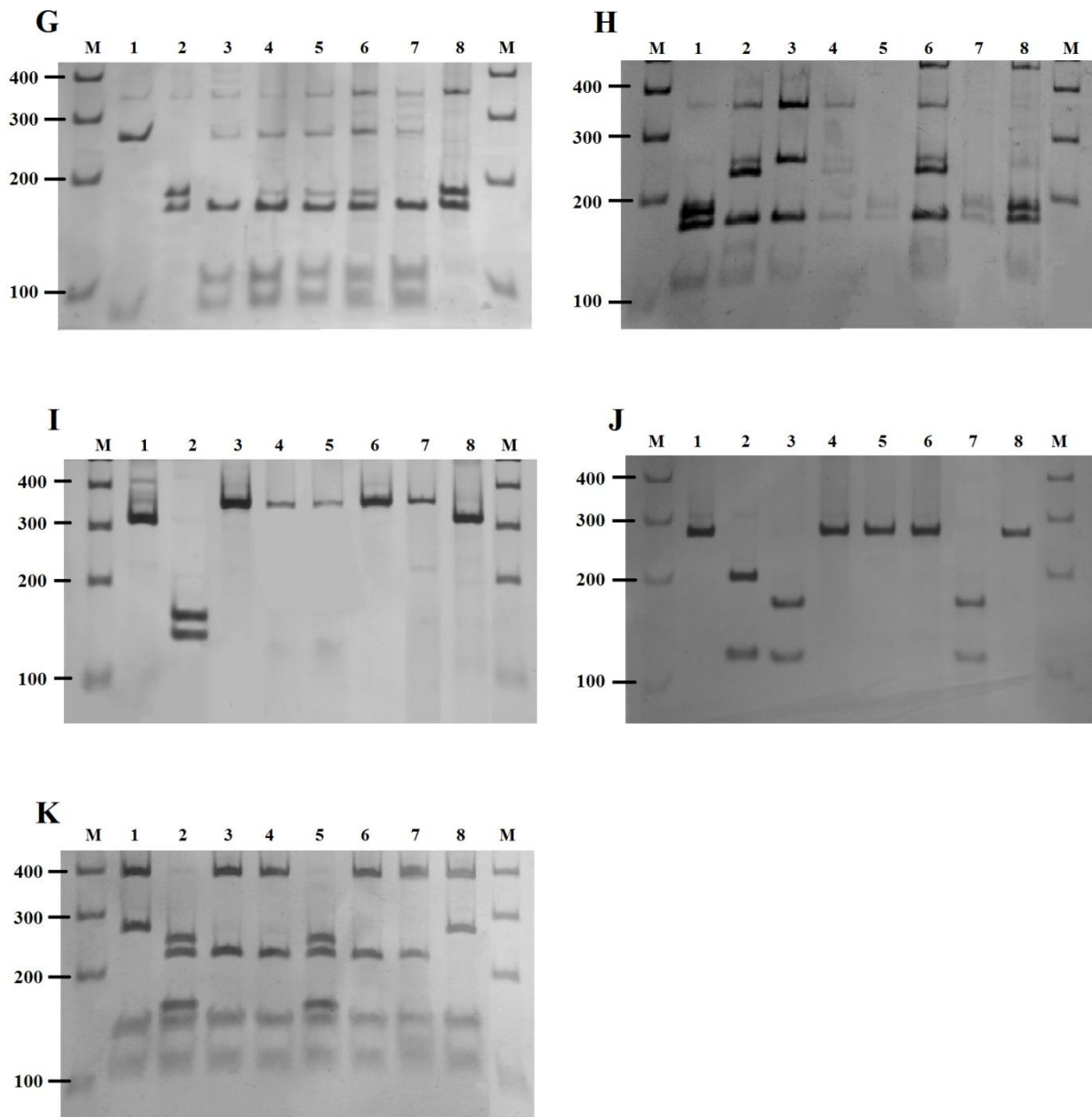


Figura 2. PCR-RFLP em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para a genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de pulmão de camundongos. M= marcador de peso molecular (Promega, 100pb); 1= controle positivo clonal do tipo I (RH ou GT1); 2= controle positivo clonal do tipo II (ME49 ou PTG); 3= controle positivo clonal do tipo III (VEG ou CTG); 4= TgCTBr1; 5= TgCTBr9; 6= TgCTBr3; 7= TgCTBr7; 8= TgCTBr23. **G:** *Locus* GRA6, endonuclease de restrição MseI. **H:** *Locus* C22-8, endonucleases de restrição BsmAI e MboII. **I:** *Locus* C29-2, endonucleases de restrição HpyCH4IV e RsaI. **J:** *Locus* L358, endonucleases de restrição HaeIII e NlaIII. **K:** *Locus* PK1, endonuclease de restrição AvaI e RsaI.

Anexo 4: PCR-RFLP a partir de DNA extraído de coração de galinhas caipiras naturalmente infectadas.

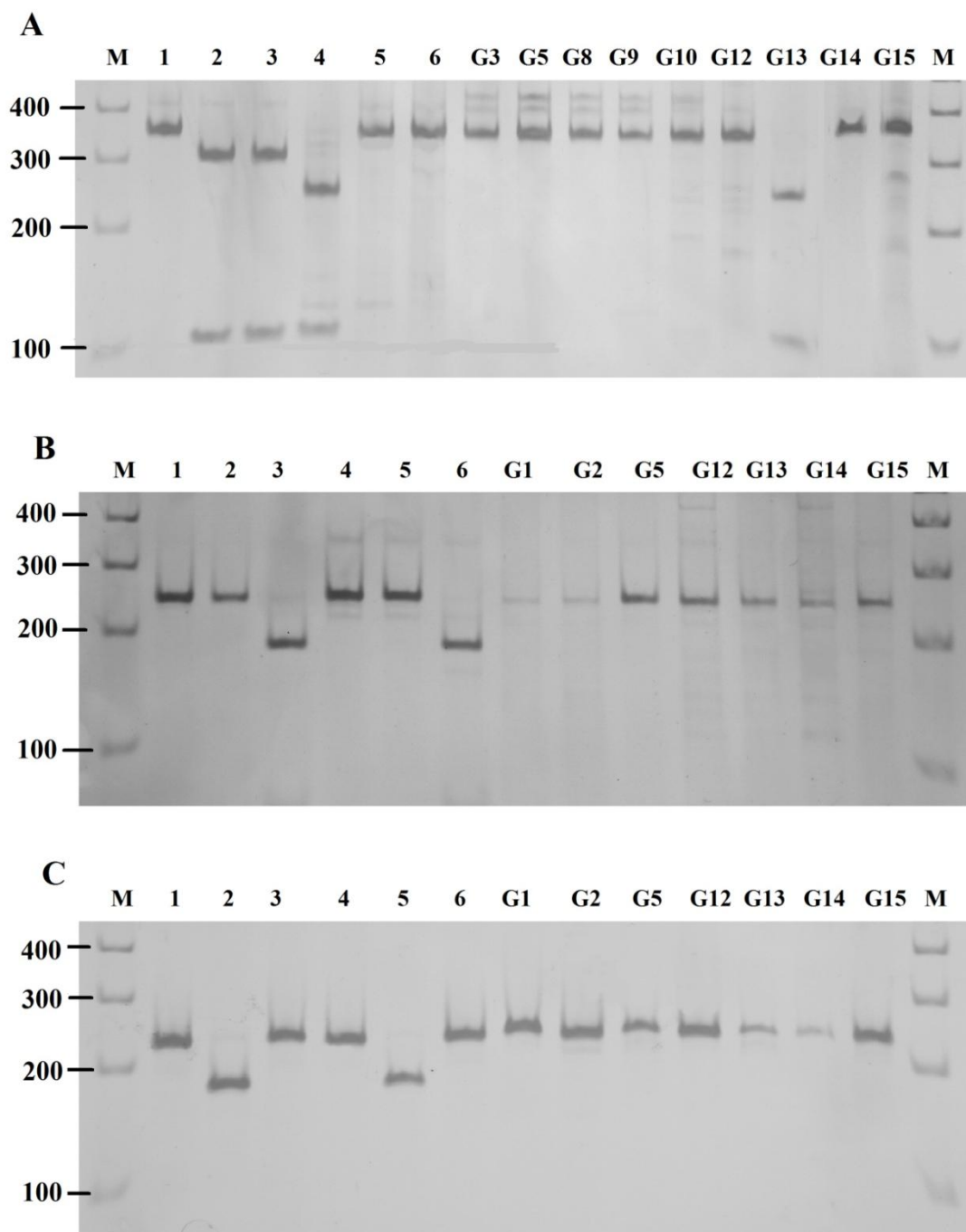


Figura 1. PCR-RFLP em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para a genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de coração de galinhas caipiras (G1 a G15). M= marcador de peso molecular (Promega, 100pb); 1 - 6= controles positivos de genótipos clonais e atípicos portadores de alelos não usuais: 1= tipo I (RH ou GT1), 2= tipo II (ME49 ou PTG); 3= tipo III (VEG ou CTG); 4= MAS; 5= TgCgCa1; 6= TgCatBr5. **A:** *Locus* SAG1, endonucleases de restrição Sau96I e HaeII. **B:** *Locus* 5'SAG2, endonuclease de restrição MboI. **C:** *Locus* 3'SAG2, endonuclease de restrição HhaI.

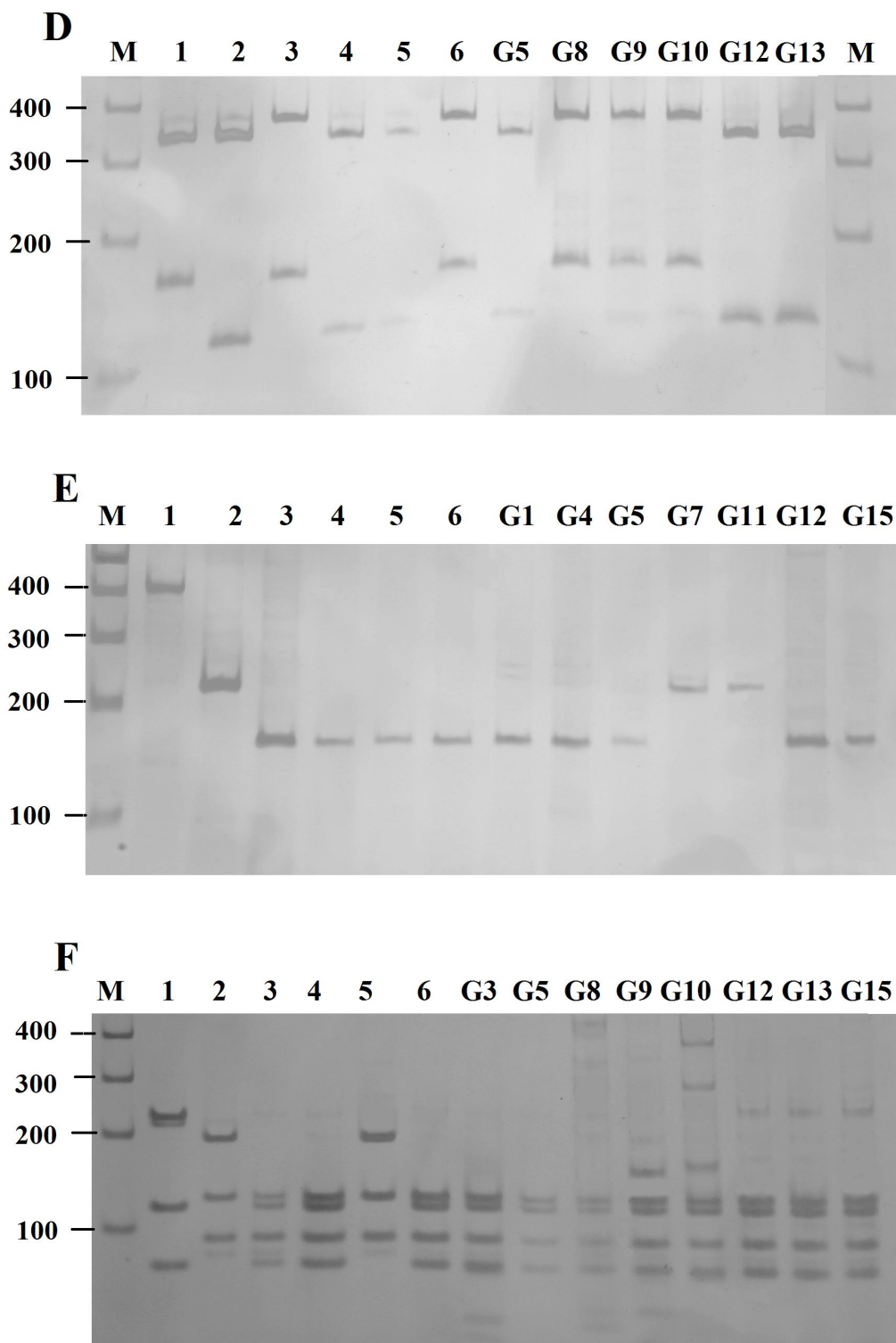


Figura 2. PCR-RFLP em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para a genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de coração de galinhas caipiras (G1 a G15). M= marcador de peso molecular (Promega, 100pb); 1 - 6= controles positivos de genótipos clonais e atípicos portadores de alelos não usuais: 1= tipo I (RH ou GT1), 2= tipo II (ME49 ou PTG); 3= tipo III (VEG ou CTG); 4= MAS; 5= TgCgCa1; 6= TgCatBr5. **D:** *Locus* SAG2-alt, endonucleases de restrição *Hinf*I e *Taq*I. **E:** *Locus* SAG3, endonuclease de restrição *Nci*I; **F:** *Locus* BTUB, endonucleases de restrição *Bsi*EI e *Taq*I.

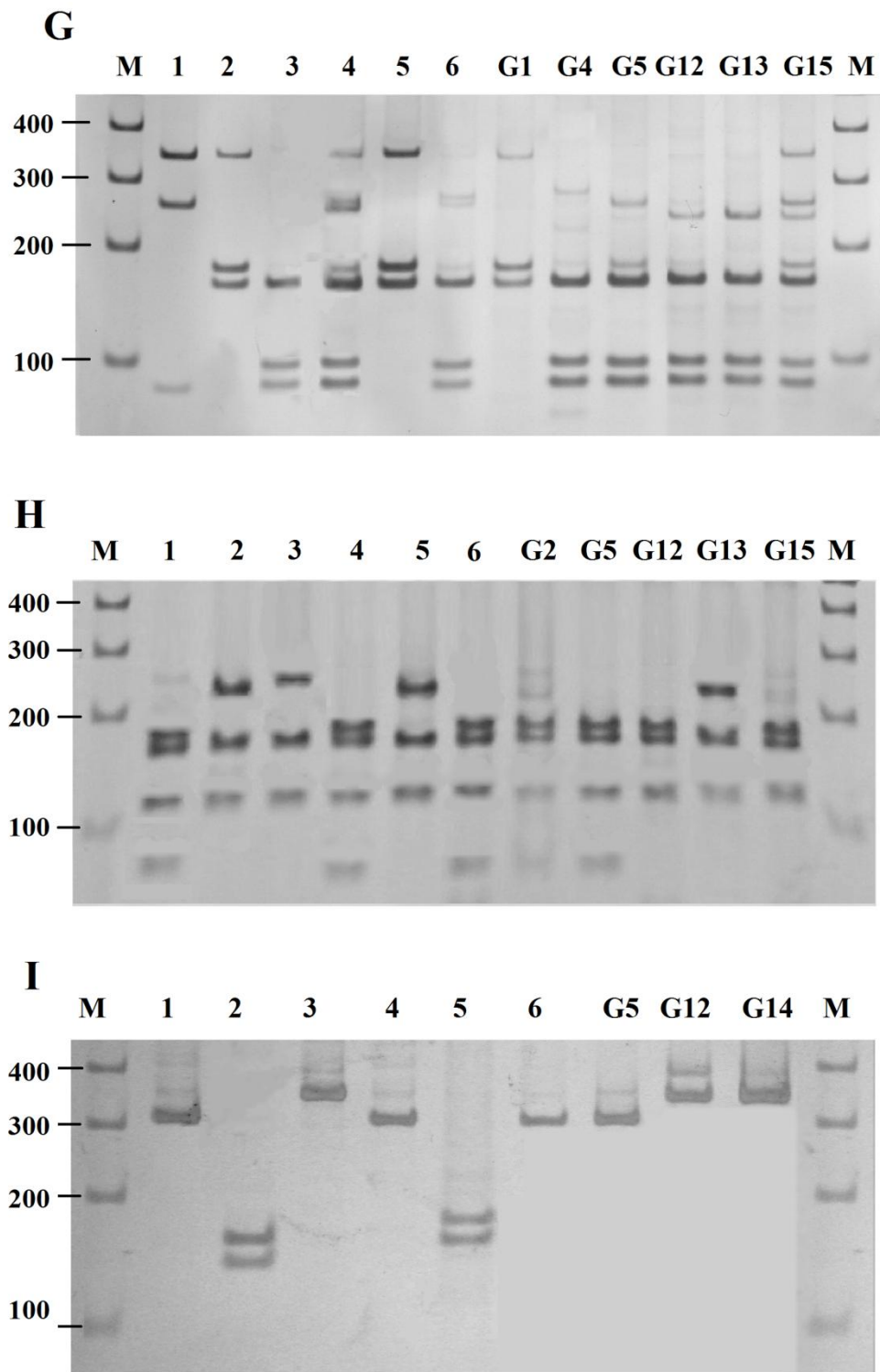


Figura 3. PCR-RFLP em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para a genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de coração de galinhas caipiras (G1 a G15). M= marcador de peso molecular (Promega, 100pb); 1 - 6= controles positivos de genótipos clonais e atípicos portadores de alelos não usuais: 1= tipo I (RH ou GT1), 2= tipo II (ME49 ou PTG); 3= tipo III (VEG ou CTG); 4= MAS; 5= TgCgCa1; 6= TgCatBr5. **G:** *Locus* GRA6, endonuclease de restrição MseI. **H:** *Locus* C22-8, endonucleases de restrição BsmAI e MboII. **I:** *Locus* C29-2, endonucleases de restrição HpyCH4IV e RsaI.

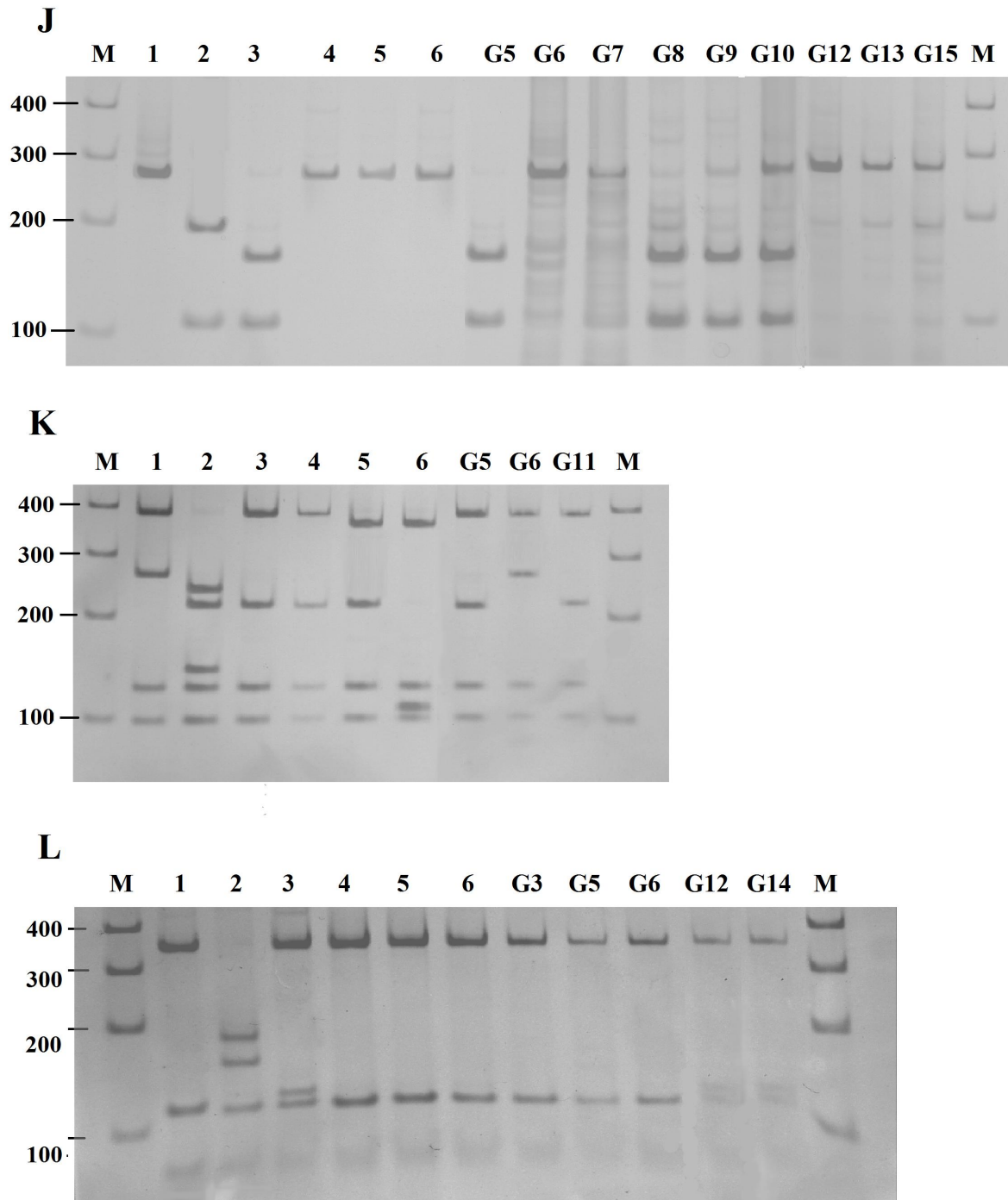


Figura 4. PCR-RFLP em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para a genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de coração de galinhas caipiras (G1 a G15). M= marcador de peso molecular (Promega, 100pb); 1 - 6= controles positivos de genótipos clonais e atípicos portadores de alelos não usuais: 1= tipo I (RH ou GT1), 2= tipo II (ME49 ou PTG); 3= tipo III (VEG ou CTG); 4= MAS; 5= TgCgCa1; 6= TgCatBr5. **J:** *Locus* L358, endonucleases de restrição HaeIII e NlaIII. **K:** *Locus* PK1, endonucleases de restrição AvaI e RsaI. **L:** *Locus* APICO, endonucleases de restrição AflII e DdeI.

Anexo 5: PCR-RFLP a partir de DNA extraído de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita.

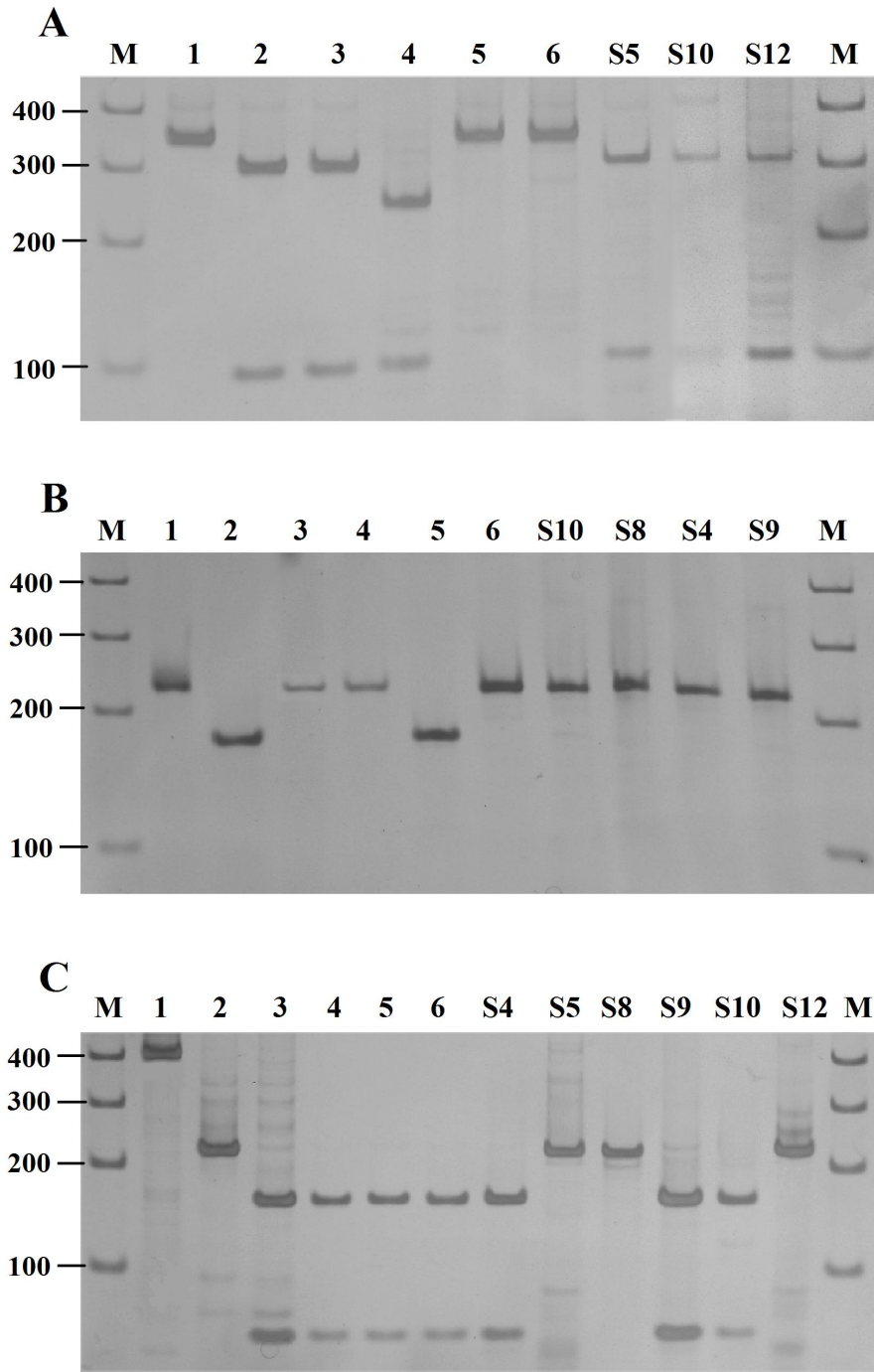


Figura 1. PCR-RFLP em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para a genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita (S1 a S12). M= marcador de peso molecular (Promega, 100pb); 1 - 6= controles positivos de genótipos clonais e atípicos portadores de alelos não usuais: 1= tipo I (RH ou GT1), 2= tipo II (ME49 ou PTG); 3= tipo III (VEG ou CTG); 4= MAS; 5= TgCgCa1; 6= TgCatBr5. **A:** *Locus* SAG1, endonucleases de restrição Sau96I e HaeII. **B:** *Locus* 3'SAG2, endonuclease de restrição HhaI. **C:** *Locus* SAG3, endonuclease de restrição NciI;

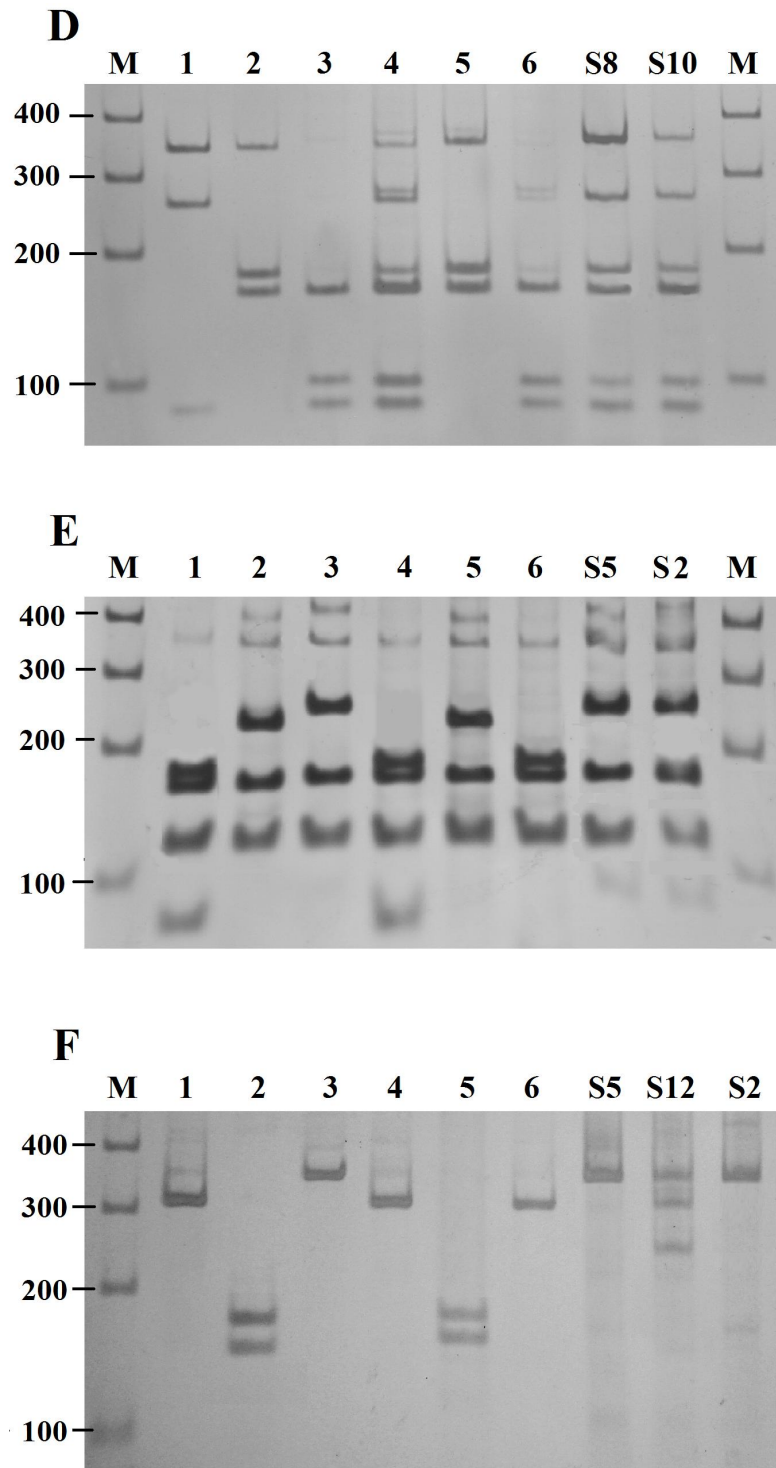


Figura 2. PCR-RFLP em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para a genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita (S1 a S12). M= marcador de peso molecular (Promega, 100pb); 1 - 6= controles positivos de genótipos clonais e atípicos portadores de alelos não usuais: 1= tipo I (RH ou GT1), 2= tipo II (ME49 ou PTG); 3= tipo III (VEG ou CTG); 4= MAS; 5= TgCgCa1; 6= TgCatBr5. **D:** *Locus* GRA6, endonuclease de restrição MseI. **E:** *Locus* C22-8, endonucleases de restrição BsmAI e MboII. **F:** *Locus* C29-2, endonucleases de restrição HpyCH4IV e RsaI.

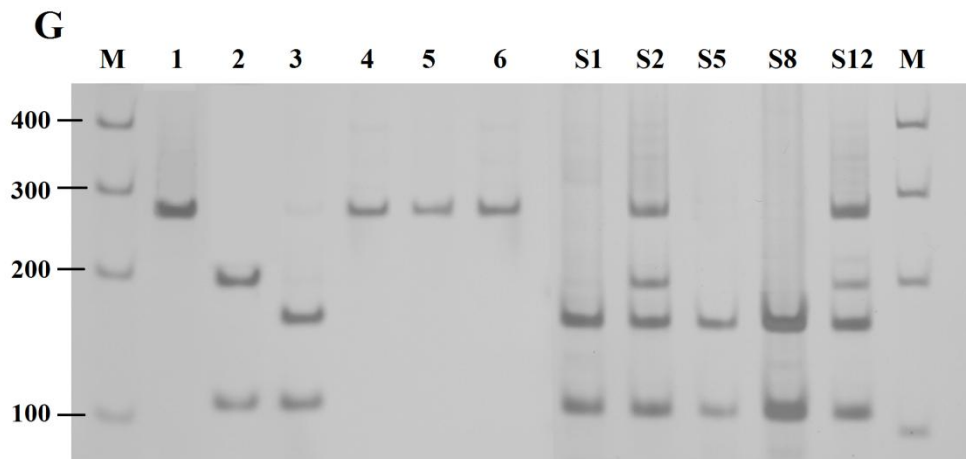


Figura 3. PCR-RFLP em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, para a genotipagem de *T. gondii* a partir de DNA extraído de sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita (S1 a S12). M= marcador de peso molecular (Promega, 100pb); 1 - 6= controles positivos de genótipos clonais e atípicos portadores de alelos não usuais: 1= tipo I (RH ou GT1), 2= tipo II (ME49 ou PTG); 3= tipo III (VEG ou CTG); 4= MAS; 5= TgCgCa1; 6= TgCatBr5. **G:** *Locus* L358, endonucleases de restrição HaeIII e NlaIII.