

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

GABRIELLA DE LIMA BESSA

**Disseminação tecidual de *Toxoplasma gondii* e resposta humoral após
reinfecção experimental com cepas atípicas obtidas de casos congênitos de
toxoplasmose humana em Minas Gerais**

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS

2017

GABRIELLA DE LIMA BESSA

**Disseminação tecidual de *Toxoplasma gondii* e resposta humoral após
reinfecção experimental com cepas atípicas obtidas de casos congênitos de
toxoplasmose humana em Minas Gerais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

Colaboração: Dr^a. Júlia Gatti Ladeia Costa

BELO HORIZONTE, MG

2017

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 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).

*À minha família, pelo carinho e
apoio incondicional.
À Jôsimar Dornelas Moreira,
pela força, amor e
companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as bênçãos recebidas, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, força para não desistir e proteção para me amparar. Além disso, agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que estão aqui citadas, todas muitíssimo especiais.

Aos meus pais, Divaine e Maria pelo amor, por tudo o que sou, por cada oração, por terem me proporcionado educação e gosto pelos estudos, e apesar das inúmeras dificuldades, por sempre me estimularem a continuar.

Aos meus queridos irmãos Daniele e Wagner por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões pessoais e profissionais e me ajudarem a superar todas as dificuldades.

Ao meu amor, Jôsimar, por perder noites de sono e fins de semana só para me ajudar, sempre me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais do que imagino. Devido a seu amor, incentivo, paciência e companheirismo, este mestrado pôde ser concretizado.

Ao meu orientador, Ricardo Wagner de Almeida Vitor, os maiores e mais sinceros agradecimentos. É uma imensa honra e orgulho tê-lo como orientador. Uma pessoa amiga, íntegra e humana, um professor e cientista brilhante, um exemplo a ser seguido. Obrigada pela orientação, paciência, dedicação e ensinamentos.

À minha grande amiga Daíze. Pelos anos de amizade, de várias histórias, risos, choros e momentos especiais. Amizade que o tempo e nem à distância conseguem atrapalhar! Obrigada por sempre estar ao meu lado, torcendo e vibrando por cada uma de minhas conquistas.

À Rosa pelo seu valioso apoio técnico, mas principalmente, por sua amizade, dedicação, conselhos, cuidado e pela transmissão de confiança e força, em todos os momentos. Com sua iluminada presença este trabalho tornou-se possível.

À querida amiga Júlia Gatti, pelo carinho, amizade e colaboração no planejamento, execução, análises dos resultados e sugestões feitas durante a revisão final deste trabalho. Por tudo, a minha enorme gratidão!

Aos amigos de laboratório Wagner, Ramon e Lorena com os quais compartilhei momentos de muito crescimento pessoal e científico, obrigada por toda ajuda!

Aos amigos que fiz durante o mestrado Agna, Eduardo, Letícia, Jamila, Jennifer e Raquel pelo companheirismo, cumplicidade e amizade compartilhados todo esse tempo.

Ao Departamento de Parasitologia, na pessoa de sua chefe Dr^a. Héliida Monteiro Andrade e ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa do coordenador Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e a todos os professores da Pós-Graduação.

As secretárias Sumara e Sibebe pela atenção, dedicação, carinho e pela competência no suporte de nossas necessidades acadêmicas.

RESUMO

O paradigma de que a infecção primária por *T. gondii* gera uma imunidade protetora esterilizante foi quebrado através de estudos de casos nos quais se observou reinfecção em gestantes imunocompetentes na fase crônica da toxoplasmose. Desde então, diversos modelos murinos têm comprovado que a imunoproteção contra infecção prévia por *T. gondii* pode ser violada após a reinfecção por cepas de diferentes genótipos. O presente estudo teve como objetivo avaliar os eventos de disseminação de *T. gondii* que ocorrem após a reinfecção de camundongos com cepas do parasito de genótipos distintos, através de bioensaio, PCR e análise da resposta imune humoral do hospedeiro. Os animais foram primoinfectados com a cepa TgCTBr5, classificada como não virulenta, e após 45 dias desafiados com as cepas virulentas TgCTBr9 ou EGS, obtidas de casos congênitos de toxoplasmose humana. Os animais foram sacrificados nas primeiras horas após o desafio (2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas pós-desafio) e 7, 14 e 30 dias pós-desafio. Nestes momentos, intestino, linfonodos mesentéricos, pulmão e cérebro foram coletados para realizar bioensaio e obtenção de amostras de DNA para PCR-RFLP. Estas duas técnicas foram usadas para distinguir as cepas de *T. gondii* em possíveis reinfecções. Amostras sanguíneas foram coletadas para a dosagem dos níveis de IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA pelo método de ELISA. Também foram avaliadas a mortalidade e morbidade através da curva de sobrevivência e perda de peso. Os animais reinfectedos sobreviveram e apresentaram morbidade reduzida após o desafio com as cepas virulentas. Foi observado um rápido, porém significativo aumento nos níveis de IgG1 anti-*T. gondii* no 7º e 14º dia pós-desafio com a cepa TgCTBr9 em relação ao grupo controle. Nos demais grupos, não houve alteração significativa nos níveis de anticorpos após o desafio. A cinética de disseminação das cepas virulentas TgCTBr9 e EGS em um animal portador de infecção crônica anterior foi distinta da cinética nos grupos primoinfectados, com a chegada precoce da cepa TgCTBr9 no intestino, pulmão e cérebro e da cepa EGS apenas no pulmão poucas horas após o desafio.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, reinfecção, imunidade humoral, genotipagem, PCR-RFLP

ABSTRACT

The paradigm that *Toxoplasma gondii* infection generate a sterilizing protective immune was broken by case studies in which reinfection was observed in immunocompetent pregnant women in chronic phase of toxoplasmosis. Since then, several murine models have been proven that immunoprotection against a previous *T. gondii* infection may be violated after reinfection with strains of different genotypes. The present study aimed to evaluate the events occurring after reinfection of mice by parasite strains of distinct genotypes, using bioassay, PCR and analysis of humoral immune response. Animals were first infected with the non-virulent TgCTBR5 strain and after 45 days these animals were challenged with the virulent TgCTBr9 or EGS strains, all of them isolated from human cases of congenital toxoplasmosis. The animals were sacrificed in the first hours after challenge (2, 4, 8, 12, 24 and 48 hours after challenge) and 7, 14 and 30 days after challenge. At these moments, bowel, mesenteric lymph nodes, lungs and brain were collected for bioassay analysis and to obtain DNA samples to PCR-RFLP. These two techniques were used to distinguish strains of *T. gondii* in possible process of reinfection. Blood samples were collected to measure the level of total IgG, IgG1, IgG2a, IgM and IgA by ELISA. Mortality and morbidity also were evaluated by survival curves and weight loss. The reinfected animals survived and presented reduced morbidity after challenge with the virulent strains. It was observed a fast and significant increase in levels of IgG1 anti-*T. gondii* at the 7th and 14th day after challenge, when compared to control group. In the other groups, there was no significant difference in the antibody levels after challenge. The dissemination of virulent strains in animals with previous chronic infection was different when compared to animals infected only with TgCTBr9 or EGS strains, with an early arrival of parasite in the gut, lung and brain (TgCTBr9 strain), and only in the lung (EGS strain) few hours after the challenge.

Key words: *Toxoplasma gondii*, reinfection, humoral immunity, genotyping, PCR-RFLP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental da infecção e reinfecção de camundongos BALB/c com <i>Toxoplasma gondii</i>	24
Figura 2: Sobrevivência e variação no peso corporal dos grupos experimentais.....	32
Figura 3: Determinação da melhor diluição do soro e conjugado para a realização do ELISA.....	34
Figura 4: Cinética de produção de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA no soro de camundongos BALB/c antes e após o desafio.....	36
Figura 5: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus L358 de <i>Toxoplasma gondii</i> com endonuclease de restrição HaeIII e NIAIII em DNA extraído do intestino, para verificar a reinfecção em camundongos BALB/c desafiados com a cepa TgCTBr9 (alelo I) aos 45 dias pós-infecção com a cepa TgCTBr5 (alelo III).....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genotipagem através de PCR-RFLP multilocus das cepas TgCTBr5, TgCTBr9 e EGS de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
Tabela 2: Descrição dos grupos experimentais e número de camundongos por grupo.....	22
Tabela 3: Diluições de soros e conjugados utilizados para padronização do ELISA na pesquisa de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em camundongos experimentalmente infectados.....	27
Tabela 4: Condições finais para a realização do ELISA na pesquisa de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em camundongos experimentalmente infectados.....	33
Tabela 5: PCR-RFLP de camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr5 de <i>T. gondii</i>	42
Tabela 6: PCR-RFLP de camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr9 de <i>T. gondii</i>	43
Tabela 7: PCR-RFLP de camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa EGS de <i>T. gondii</i>	44
Tabela 8: PCR-RFLP de camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa TgCTBr9 de <i>T. gondii</i>	45
Tabela 9: PCR-RFLP de camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa EGS de <i>T. gondii</i>	46
Tabela 10: Disseminação tecidual de <i>T. gondii</i> comparativa entre os grupos primoinfectados (TgCTBr5, TgCTBr9 e EGS) e desafiados (TgCTBr5+TgCTBr9 e TgCTBr5+EGS) nas horas/dias após infecção ou desafio.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

- CEBIO - Centro de Bioterismo
- DC - células dendríticas
- DNA - Ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic acid*)
- DPD - Dias pós-desafio
- DPI - Dias pós-infecção
- ELISA - Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)
- GPI - Glicosilfosfatidilinositol
- HIV - Vírus da Imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)
- HPD - Horas pós-desafio
- HPI - Horas pós-infecção
- IFN γ - Interferon gama
- IL – Interleucina
- iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
- ip - intraperitoneal
- MHC - Complexo de histocompatibilidade
- MyD88 - Fator de diferenciação mielóide 88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*)
- NK - células *natural killer*
- NO - *Nitric Oxide*
- PAMPs - Padrões moleculares associados à patógenos
- PBS - *Phosphate buffer solution*
- RFLP - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (*Restriction fragment length polymorphisms*)
- ROI – Intermediários reativos de oxigênio
- SST - Solução salina tamponada
- STAg - Antígeno solúvel de *T. gondii* (*soluble tachyzoite antigen*)
- TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
- TLRs - *Toll Like Receptors*
- TNF- α - *Tumor Necrosis Factor*

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2. Diversidade genética e virulência das cepas de <i>T. gondii</i>	3
1.3. Resposta imune na Toxoplasmose.....	5
1.3.1. Resposta imune celular	5
1.3.2. Imunidade Humoral	8
1.4. Reinfecção por <i>T. gondii</i>	11
1.4.1. Modelos experimentais de reinfecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.5. Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em diferentes órgãos nos modelos experimentais de toxoplasmose	16
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Camundongos	20
4.2. Cepas de <i>T. gondii</i>	20
4.3. Infecção Primária com a cepa avirulenta TgCTBr5	21
4.3.1. Desafio com as cepas virulentas TgCTBr9 ou EGS.....	22
4.4. Delineamento experimental.....	23
4.4. Critérios de mortalidade e morbidade	25
4.5. Bioensaio	25
4.6. Teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> ..	26
4.6.1. Antígeno de <i>T. gondii</i>	26
4.6.2. Padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos das classes IgA, IgM, IgG total e suas subclasses IgG1 e IgG2a anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	27
4.6.3. ELISA-IgG para confirmar a infecção de camundongos BALB/c pela cepa TgCTBr5 de <i>T. gondii</i> e de camundongos <i>Swiss</i> usados no bioensaio	28

4.7. Identificação molecular da reinfecção e disseminação do parasito através de PCR-RFLP.....	29
4.7.1 Extração de DNA de tecidos de camundongos experimentalmente infectados	29
4.7.2. Nested PCR-RFLP do Locus L358	29
4.8. Análise estatística	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Mortalidade e variação do peso corporal após o desafio.....	31
5.2. Padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i>	33
5.3. Anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> em camundongos BALB/c infectados e reinfetados experimentalmente	35
5.4. Disseminação tecidual de <i>T. gondii</i> e ocorrência de reinfecção.....	37
5.4.1. Detecção das cepas de <i>T. gondii</i> nos grupos primoinfectados e nos grupos desafiados, por PCR-RFLP	37
5.4.2. Detecção das cepas de <i>T. gondii</i> nos grupos primoinfectados e nos grupos desafiados, por meio do bioensaio.....	38
5.4.3. Comparação entre a disseminação das cepas de <i>T. gondii</i> nos grupos primoinfectados e grupos desafiados.....	40
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
Anexo 1	66
Anexo 2.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Família Sarcocystidae e à Subfamília Toxoplasmatinae, sendo a única espécie descrita do gênero *Toxoplasma* (Levine, 1988). Foi descoberto em 1908 simultaneamente por Nicolle & Manceaux em um roedor (*Ctenodactylus gundii*) na Tunísia e por Splendore em coelho (*Oryctolagus cuniculus*) no Brasil (Nicolle e Manceaux, 1908; Splendore, 1908).

T. gondii possui baixa especificidade e infecta praticamente todos os animais de sangue quente (aves e mamíferos), incluindo o homem. Está entre os patógenos mais bem sucedidos mundialmente, tanto em relação à variedade de hospedeiros quanto em porcentagem de animais infectados (Montoya e Liesenfeld, 2004; Su et al., 2010).

T. gondii possui um complexo ciclo de vida do tipo heteroxênico facultativo, apresentando uma fase sexuada nos seus hospedeiros definitivos, membros da Família Felidae (gatos domésticos e selvagens) e uma fase assexuada que ocorre nos hospedeiros definitivos e nos hospedeiros intermediários (seres humanos, outros mamíferos e aves). Três estágios estão envolvidos na transmissão da toxoplasmose: bradizoítos no interior de cistos teciduais presentes em um hospedeiro intermediário; oocistos contendo esporozoítos, presentes no meio ambiente e taquizoítos pela via congênita (Dubey, 1986).

Na fase sexuada, o parasito invade os enterócitos e se reproduz por merogonia com a formação de merozoítos que são liberados após o rompimento da célula hospedeira e, em seguida, invadem as células epiteliais adjacentes se diferenciando em gametas masculinos (microgametas) e em gametas femininos (macrogametas) que ao fecundarem dão origem aos oocistos que são liberados não esporulados nas fezes (Dubey, 2004). Estima-se que gatos infectados podem lançar mais de 100 milhões de oocistos nas fezes contaminando o solo e água (Jones e Dubey, 2010; Cenci-Goga et al., 2011). Em condições ideais de temperatura, umidade e oxigenação, os oocistos esporulam e se tornam infectantes. Cada oocisto esporulado de *T. gondii* contém no seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos. Estes podem permanecer viáveis por muitos meses no meio ambiente até serem acidentalmente ingeridos por humanos e animais (Montoya e Liesenfeld, 2004).

A fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários e definitivos e tem início com a ingestão de oocistos esporulados presentes na água ou alimentos mal lavados, ou também

pela ingestão de cistos nos tecidos (com bradizoítos) presentes na carne mal cozida ou crua de animais infectados. Após a ingestão, a parede externa dos oocistos ou cistos teciduais se rompe por degradação enzimática, ocorrendo liberação das formas infectantes (esporozoítos ou bradizoítos) com invasão das células do epitélio intestinal e se diferenciam em taquizoítos que são característicos da fase aguda da doença (Peng et al., 2011).

Os taquizoítos penetram ativamente em qualquer célula, exceto hemácias, com consequente formação do vacúolo parasitóforo onde se multiplicam assexuadamente de forma rápida e intensa através de endodiogenia até o rompimento das células infectadas, com a liberação de taquizoítos que invadem novas células. O parasito se dissemina no organismo por meio de taquizoítos livres ou intracelulares, na linfa ou no sangue, provocando um quadro clínico polissintomático, no qual sua gravidade dependerá da carga parasitária adquirida, da susceptibilidade do hospedeiro e do tipo de cepa do parasito (Tenter et al., 2000).

Estudos em modelo animal demonstraram que uma hora após a infecção oral já é possível encontrar o parasito no epitélio intestinal e na lâmina própria. Após 24 horas o linfonodo mesentérico apresenta-se parasitado e a disseminação sistêmica pode ser evidenciada pela presença do parasito no sangue, pulmão e fígado entre dois e quatro dias após a infecção. Essa etapa prossegue até o estabelecimento de uma resposta Th1 eficaz que induz a conversão de taquizoítos em bradizoítos (Dubey, 1997).

Os bradizoítos, presentes dentro de cistos teciduais também se multiplicam por endodiogenia, porém, muito lentamente caracterizando a fase crônica da infecção (Kravetz e Federman, 2005; Hill et al., 2005). Eles são encontrados principalmente no tecido nervoso e muscular, incluindo cérebro, retina, músculo cardíaco e esquelético, mas também podem se desenvolver em órgãos viscerais como fígado, rins e pulmão. Quando intactos não causam nenhum dano, persistindo por toda a vida do hospedeiro (Innes, 2010).

O mecanismo de permanência dos cistos nos tecidos não é muito bem esclarecido, entretanto, alguns podem se romper em algum momento da vida e os bradizoítos liberados são, em sua maioria, destruídos. Caso haja uma supressão do sistema imune do hospedeiro, ocorre a reativação da infecção com a disseminação de bradizoítos e sua conversão em taquizoítos (Dubey, 2004).

A infecção primária por *T. gondii* geralmente é assintomática. Sintomas inespecíficos e autolimitantes podem aparecer eventualmente em alguns pacientes, sendo a linfadenopatia a manifestação clínica mais comum nesses casos. A retinocoroidite é a lesão mais frequente, normalmente relacionada à manifestação tardia da doença congênita. Entretanto, evidências

entre a associação da toxoplasmose ocular com a fase aguda em casos adquiridos surgem cada vez mais (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Em pacientes imunossuprimidos (HIV positivos, transplantados ou com doenças autoimunes e em tratamento quimioterápico), a doença quase sempre é decorrente de uma reativação da infecção crônica latente. O quadro clínico desses pacientes se apresenta com comprometimento principalmente do Sistema Nervoso Central, com encefalite de graus variados. Casos graves podem causar toxoplasmose generalizada (Weiss e Dubey, 2009).

Além disso, *T. gondii* também pode ser transmitido a partir da mãe para o feto, resultando em aborto ou anormalidades fetais (Carlier et al., 2012; Adams Waldorf e McAdams, 2013). Em toxoplasmose congênita, a transmissão para o feto ocorre predominantemente em mulheres que adquirem a infecção primária durante gravidez (Carlier et al., 2012). Destacam-se entre os principais sintomas, a macro ou microcefalia, calcificações cerebrais e retardo mental, retinocoroidite, sintomas conhecidos como Tétrade de Sabin. De acordo com o período da gravidez em que a gestante se infecta, o risco da transmissão congênita aumenta, ao passo que a possibilidade da manifestação de sinais clínicos diminui com o decorrer da gestação (Montoya e Liesenfeld, 2004).

O controle e a prevenção da toxoplasmose se dão através de medidas de manejo sanitário, controle da população de gatos de rua, não consumo de carne mal passada, limpeza das caixas de areia de gatos domésticos com o descarte das fezes e das camas de areia de maneira adequada, uso de ração industrializada e água tratada na alimentação de seres humanos e animais. Por fim, a toxoplasmose congênita é prevenida através de exame pré-natal e do tratamento das gestantes em fase aguda de Toxoplasmose. Esses conjuntos de ações visam especialmente reduzir a exposição de mulheres em idade fértil e pacientes imunodeficientes (Bojar e Szymanska, 2010; Dabritz e Conrad, 2010).

1.2. Diversidade genética e virulência das cepas de *T. gondii*

Os primeiros estudos de genotipagem com cepas de *T. gondii* foram realizados na Europa e nos Estados Unidos, utilizando isoenzimas (Cristina et al., 1995) e amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD) (Guo e Johnson, 1996). Atualmente são avaliados microssatélites e polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) que levaram à descrição de uma estrutura populacional clonal com três linhagens principais, designados como tipos I, II e III (Howe e Sibley, 1995; Dardé, 2008).

A virulência destes isolados de *T. gondii* foi estudada em modelo murino, no qual foi mostrado que as cepas clonais do Tipo I são virulentas para camundongos, e a infecção com um único parasito resulta na morte dos animais, enquanto os Tipos II e III são menos virulentos resultando frequentemente em infecções crônicas (Howe e Sibley, 1995).

Através de estudos mais amplos, com maior diversidade de hospedeiros e utilização de um número maior de marcadores genéticos, novos genótipos de *T. gondii* foram descobertos, apresentando maiores níveis de variação e recombinação entre algumas populações de parasitos do que o descrito inicialmente. Estes “novos” genótipos foram denominados de genótipos atípicos (Dardé, 2008).

Estes genótipos atípicos, diferentes das cepas clonais, foram encontrados predominando na América Central e América do Sul, principalmente no Brasil (Su et al., 2012; Shwab et al., 2014). Estudos realizados com cepas de *T. gondii* isoladas no Brasil de pacientes HIV positivos com toxoplasmose cerebral (Ferreira et al., 2008), toxoplasmose ocular (Ferreira et al., 2010), e de recém-nascidos (Carneiro et al., 2013) demonstraram uma alta taxa de polimorfismo genético. Resultados semelhantes foram encontrados em isolados de suínos (Frazao-Teixeira et al., 2011), galinhas (Dubey et al., 2010; Soares et al., 2011), gatos (Pena et al., 2008) e animais silvestres (Pena et al., 2011). Acredita-se que os fatores que contribuem para essa enorme variabilidade genética das cepas de *T. gondii* sejam devido à ampla biodiversidade da fauna brasileira, inclusive de hospedeiros definitivos, a amplitude geográfica e as diferenças na rota de infecção (Ferreira et al., 2006).

Em relação ao curso clínico da Toxoplasmose, existem estudos demonstrando uma maior gravidade da doença na América do Sul quando comparado a outras regiões do mundo. A doença ocular é cinco vezes mais comum em crianças com toxoplasmose congênita identificada pelo rastreamento neonatal no Brasil do que em crianças identificadas por exames pré-natais ou neonatais na Europa. As cepas tipo I e atípicas parecem estar associadas a uma doença ocular mais grave, em comparação com as linhagens de tipo II, que predominam na Europa e na América do Norte (Gilbert, 2009). 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). Em relação à eficácia do tratamento da toxoplasmose na Europa e na América do Norte, pode não ser a mesma nos locais onde predominam as cepas atípicas e mais virulentas (Gilbert, 2009; Silva et al., 2017).

Apesar da alta variabilidade genética das cepas de *T. gondii* no Brasil, alguns genótipos de grande circulação nacional, isolados em diferentes hospedeiros foram propostos

como sendo linhagens clonais brasileiras, denominadas tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV. Estudos de virulência em camundongos demonstraram que BrI é altamente virulenta, BrIII avirulenta, BrII e BrIV de virulência intermediária (Pena et al., 2008; Dubey et al., 2012). Para esses autores, a população de *T. gondii* no Brasil é amplamente diversificada devido a constantes trocas genéticas no intestino de felídeos, gerando uma série de cepas recombinantes.

Os estudos de genotipagem existentes revelam informações essenciais sobre a diversidade global de *T. gondii* e sua estrutura populacional. No entanto, uma amostragem mais aprofundada de *T. gondii* na vida selvagem de áreas remotas que não são perturbadas pela civilização humana ainda é necessária para avaliar o efeito do assentamento humano sobre a diversidade desse parasito (Shwab et al., 2014). Por outro lado, a potencial transmissão à longa distância por mamíferos marinhos migratórios e aves é pouco compreendida sendo necessários mais estudos sobre estes animais para melhor compreender a sua contribuição para a evolução de *T. gondii* em escala global. Portanto, o conhecimento sobre a estrutura populacional de *T. gondii* é necessário para entender melhor a evolução deste parasito zoonótico amplamente difundido no mundo (Shwab et al., 2014).

1.3. Resposta imune na Toxoplasmose

1.3.1. Resposta imune celular

Nosso conhecimento atual sobre a resposta imune na infecção por *T. gondii* veio em grande parte de infecções experimentais realizadas em camundongos, que contribuíram significativamente para a compreensão da resposta imune celular que é considerada o mais importante mecanismo de controle da infecção por *T. gondii* uma vez que este parasito desenvolve-se somente no interior de células nucleadas (Villarino e Schmidt, 2013; Gerlic e Masters, 2014; Yarovinsky, 2014).

Logo após o primeiro contato entre *T. gondii* e o hospedeiro, os monócitos, os neutrófilos e as células dendríticas (CDs) são recrutados imediatamente para o local da infecção. Uma das funções mais importante da resposta imune inata de *T. gondii* é a produção de interleucina 12 (IL-12), que estimula as células *natural killer* (NK) e células TCD4+ e TCD8+ a produzirem interferon-gama (IFN γ). IFN- γ é o principal mediador da resistência na toxoplasmose e promove vários mecanismos intracelulares para eliminar o parasito e inibir a sua replicação. Esta resposta imune Th1, definida principalmente pela produção de IL-12 e IFN- γ , é característica da infecção de muitos parasitos intracelulares, e camundongos

deficientes em IL-12 ou IFN- γ infectados experimentalmente com *T. gondii* morrem na fase aguda da infecção, demonstrando uma incapacidade de controlar a carga parasitária (Dupont et al., 2012).

A produção inata de IL-12 durante a toxoplasmose requer que o parasito seja primeiro detectado pelo hospedeiro. Receptores imunes inatos chamados *Toll Like Receptors* (TLRs) possuem um papel fundamental neste processo (Dupont et al., 2012). TLRs são uma família de receptores envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (Pifer e Yarovinsky, 2011). A sinalização intracelular de TLR envolve o recrutamento da molécula MyD88 usada pela maioria dos TLRs para retransmitir os sinais para dentro da célula hospedeira. Assim, camundongos deficientes na molécula MyD88, são susceptíveis a toxoplasmose aguda (Denkers, 2003; Blader e Saeij, 2009). Nas infecções por *T. gondii*, a ligação de TLR11 a profilina liberada pelo parasito, é fundamental para estimular a produção de IL-12. TLR7 e TLR9 estão envolvidos no reconhecimento de RNA e DNA de *T. gondii* respectivamente e TLR2 e TLR4 na localização do glicosilfosfatidilinositol (GPI) do parasito durante a infecção (Yarovinsky, 2014).

Diversos estudos têm apontado os neutrófilos, monócitos inflamatórios, macrófagos e CDs como as células primárias responsáveis pela produção de IL-12 *in vivo* (Dupont et al., 2012). Os neutrófilos de humanos e camundongos após a estimulação com *T. gondii*, produzem IL-12, TNF- α e várias quimiocinas (Denkers et al., 2004). Camundongos deficientes em receptor de quimiocina CXCR2, que é essencial para o recrutamento dos neutrófilos para o local da infecção, têm níveis mais elevados de parasitos no SNC (Dupont et al., 2012).

Os monócitos inflamatórios presentes na circulação deslocam-se para a lâmina própria onde expressam mecanismos efetores antimicrobianos que contribuem para o controle direto de *T. gondii*, além de também produzirem IL-1 em resposta a antígenos solúveis de toxoplasma, que atua sinergicamente com a IL-12 para promover a produção de IFN- γ (Dupont et al., 2012).

Os macrófagos infectados também são importante fonte de IL-12 nos momentos iniciais da infecção por *T. gondii* além de participarem ativamente na destruição dos parasitos através da fagocitose com liberação de enzimas lisossomais, intermediários reativos de oxigênio (ROI) e óxido nítrico (NO) (Gazzinelli et al., 1996). O óxido nítrico produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é microbicida, e age inibindo enzimas mitocondriais e nucleares essenciais ao parasito (Khan et al., 1997).

As CD4⁺ são as maiores produtoras de IL-12 na infecção por *T. gondii* polarizando a resposta adaptativa para o tipo Th1 (Denkers et al., 2004). A citocina IL-12 possui importância crucial na ativação das células NK que passam a produzir IFN- γ , o qual age sinergicamente com TNF- α , aumentando a atividade microbicida dos macrófagos pela produção de óxido nítrico (NO), permitindo uma ação tóxica contra o parasito. Além disso, induzem a proliferação de células TCD4⁺ tipo Th1 e TCD8⁺ citotóxicas que também produzem IFN- γ (Pifer e Yarovinsky, 2011). As células NK são a principal fonte de IFN- γ durante a fase aguda. Além disso, produzem IL-10 e podem promover as respostas imunes adaptativas. Assim, na ausência de células TCD4⁺, podem proporcionar ajuda à resposta das células TCD8⁺ aumentando da produção de IL-12 a partir de CD4⁺ (Gazzinelli et al., 1993; Dupont et al., 2012).

O IFN- γ é muito importante no desenvolvimento de resposta imune adaptativa, realizando numerosas atividades biológicas como: aumento da síntese de IL-12 pelos macrófagos expostos a produtos de taquizoítos, indução da expressão de receptores de IL-12 nas células T, ativação de macrófagos e células NK, indução de expressão de MHC tipo II e inibição da síntese de IL-4, uma importante citocina para diferenciação do fenótipo Th em fenótipo Th2 (Filisetti e Candolfi, 2004).

A exacerbação da resposta inflamatória é controlada por citocinas regulatórias como a IL-10 que age na supressão da resposta imune celular em humanos e camundongos (Lang et al., 2007). Sua função está relacionada à inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e TNF- α assim como inibição da secreção de moléculas efetoras como NO e ROI. A supressão da resposta imune realizada por IL-10 impede uma superinflamação que possivelmente levaria a morte do hospedeiro (Neyer et al., 1997).

Os macrófagos e as células dendríticas apresentam antígenos de *T. gondii* aos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ induzindo um fenótipo tipo Th1 pela secreção de IL-12 (Correa et al., 2007). As células T CD4⁺ são essenciais na resistência do hospedeiro durante a toxoplasmose, uma vez que o surgimento de toxoplasmose grave é concomitante com o declínio do número de células T em pacientes infectados com HIV e em modelos murinos imunossuprimidos (Dupont et al., 2012). A falta de células T CD4⁺ também está associada a maior susceptibilidade durante fase crônica da infecção, pois proporcionam várias funções reguladoras que são críticas na mediação da resistência à toxoplasmose. Durante os estágios iniciais da infecção, contribuem para respostas eficientes de células B e T CD8⁺, e a capacidade dessas células para controlar a infecção crônica pode ser atribuída à produção de IFN- γ (Dupont et al., 2012).

As células T CD8⁺ são especializadas em reconhecer e destruir células infectadas com organismos virais, bacterianos e parasitários e possui um papel crítico na resistência a infecção por *T. gondii* exercendo uma atividade citotóxica contra taquizoítos ou células infectadas com este parasito. Camundongos deficientes em células T CD8⁺ apresentam susceptibilidade aumentada à toxoplasmose, morrendo aproximadamente 50 dias após a infecção (Dupont et al., 2012). Além do mais, a transferência passiva de células T CD8⁺ de camundongos cronicamente infectados ou vacinados com uma cepa atenuada de *T. gondii* é o bastante para conferir resistência (Gigley et al., 2009). Estudos demonstraram que a ausência das células T CD8⁺, mas não de células T CD4⁺, acelera a mortalidade em camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*, comprovando a função desse tipo celular no controle do parasito durante a fase crônica da infecção (Gazzinelli et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992).

1.3.2. Imunidade Humoral

Reconhece-se há muito tempo que a infecção por *T. gondii* também induz uma imunidade humoral, através da produção de anticorpos que vão atuar em taquizoítos extracelulares liberados após o rompimento das células infectadas, limitando a multiplicação de *T. gondii* através da lise dos parasitos na presença do complemento. Os anticorpos podem também atuar pela opsonização facilitando a captura e destruição de *T. gondii* pelas células fagocíticas (Filisetti e Candolfi, 2004).

O papel fundamental dos anticorpos na resposta imune contra *T. gondii* é comprovado por estudos em camundongos deficientes em células B. Estes camundongos produzem IFN- γ normalmente, no entanto sucumbem à infecção dentro de 3 a 4 semanas após o desafio, associado a elevadas cargas parasitárias no cérebro (Kang et al., 2000). Este aumento na susceptibilidade deve-se provavelmente à falta de anticorpos, uma vez que a transferência passiva destes confere proteção aos camundongos deficientes em células B (Johnson et al., 2002).

Além de participarem no controle da infecção por *T. gondii*, os anticorpos são importantes no estabelecimento de diagnóstico sorológico sendo uma ferramenta eficaz para distinguir indivíduos infectados recentemente, daqueles que se encontram na fase crônica da infecção (Petersen, 2007; Serranti et al., 2011).

Os primeiros anticorpos produzidos na infecção por *T. gondii* são as imunoglobulinas M (IgM) aparecendo após 3 a 10 dias de infecção no soro, independente da cepa, do hospedeiro, sexo ou idade. Sua produção é correspondente com uma regulação positiva pelo

fator de crescimento da célula T e B, a IL-2 (Correa et al., 2007). Um declínio progressivo então ocorre durante os próximos meses até a negatificação. No entanto, verificou-se que uma parte da população de doentes (9-27%) exhibe uma resposta de anticorpos IgM persistente que permanece durante dois anos ou mais, principalmente em gestantes e pacientes com toxoplasmose adquirida envolvendo linfadenopatia (Del Bono et al., 1989; Gorgievski-Hrisoho et al., 1996; Villard et al., 2016). A reativação contínua de cistos bem como a geração de reação cruzada com hetero ou autoanticorpos são hipóteses que não podem ser descartadas nestes indivíduos (Correa et al., 2007). Devido a sua estrutura, as IgM são capazes de promover uma ótima aglutinação e possuem um elevado grau de citotoxicidade, além de serem as melhores ativadoras do sistema complemento e promoverem a inflamação. As proteínas de superfície do parasito são os principais antígenos alvo desta imunoglobulina (Filisetti e Candolfi, 2004).

A imunoglobulina A (IgA) é produzida logo após IgM e regularmente surge antes de IgG podendo persistir durante seis a sete meses, variando consideravelmente no grau e tempo de permanência em adultos e crianças infectadas congenitamente (Gorgievski-Hrisoho et al., 1996). Dificilmente são encontrados na fase crônica da infecção por *T. gondii* e diferentemente de IgG, não atravessa a barreira placentária. Esses dois fatores juntos fazem dos anticorpos IgA uma ferramenta valiosa para o diagnóstico da toxoplasmose aguda e congênita (Ferreira e Borges, 2002; Filisetti e Candolfi, 2004). Esta classe é regulada por IL-10, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e por citocinas da resposta Th3 (Defrance et al., 1992). Podem ser encontradas em duas formas: IgA no soro e IgA de mucosa localizada nas secreções de muco do aparelho digestivo e ambos os tipos estão presentes em humanos e animais (Filisetti e Candolfi, 2004). A mucosa intestinal é extensamente revestida com numerosas células B que se diferenciam em plasmócitos, as quais produzem anticorpos IgA. Além disso, a presença natural de TGF- β no intestino também contribui para a síntese de IgA. Acredita-se que esta imunoglobulina além de ser útil para o diagnóstico precoce também desempenha um papel na proteção contra reinfecção (Chardès e Bout, 1993).

As imunoglobulinas G (IgG) geralmente, aparecem uma a duas semanas após a infecção, alcançando títulos máximos em seis semanas, com declínio em alguns meses ou anos, permanecendo baixos e estáveis durante toda a vida do indivíduo infectado pelo *T. gondii* (Elsheikha, 2008; Talabani et al., 2010).

Estes anticorpos são constituídos por quatro subclasses que surgem em diferentes proporções durante a infecção por *T. gondii*. No homem estão presentes as subclasses IgG1,

IgG2, IgG3 e IgG4. Foi demonstrado que IgG1 é a primeira a aparecer no soro, ao passo que IgG2, IgG3 e IgG4 são encontrados em proporções variáveis. A síntese de IgG1 e IgG3 são estimuladas por IFN- γ e aumentada por IL-10 e TGF- β . IgG2 está ligado a elevação dos níveis de IL-2 e IL-6, enquanto que IgG4 é induzido por IL-4 e IL-13 (Correa et al., 2007).

Em um estudo realizado por Cañedo-Solares e colaboradores (2008) sobre sub classes de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em mãe/recém-nascidos foi demonstrado que IgG1 nas mães estava relacionada a problemas clínicos; IgG2 e IgG3 nos bebês foram marcadores de transmissão vertical, e IgG4 em mães ou crianças também foi associada a problemas clínicos, indicando portanto que as subclasses de IgG podem ser marcadores de infecção congênita ou sinais clínicos na toxoplasmose.

Souza-e-Silva e colaboradores (2013), em um estudo destinado a avaliar a associação entre sinais clínicos de toxoplasmose congênita e subclasses de IgG encontradas em recém nascidos, mostraram que a detecção de IgG2 e IgG4 anti-rMIC3 estava associada à presença de lesões retinocoroidais e calcificações intracranianas. Estes autores concluíram que as subclasses específicas de anticorpos IgG anti-*T. gondii* podem servir como biomarcadores de alterações neurológicas e oculares em recém-nascidos com toxoplasmose congênita.

O aumento nos níveis de IgG e o surgimento de anticorpos IgM e/ou IgA, indicam reinfeção que, no caso de gestantes imunocompetentes com infecção crônica por *T. gondii*, pode resultar na transmissão congênita (Gavinet et al., 1997; Elbez-Rubinstein et al., 2009; Valdes et al., 2010).

Em camundongos as subclasses encontradas são IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 no qual IgG2a e IgG2b são produzidos na fase aguda, principalmente pelo estímulo de IFN- γ enquanto que IgG1 é um marcador de fase crônica regulado por IL-4, IL-5 e IL-10 (Correa et al., 2007). Johnson e Sayles (2002) estudaram a resistência a infecção por *T. gondii* em camundongos deficientes em células T CD4+, os quais apresentaram os títulos de IgG2a reduzidos no soro. Estes camundongos desenvolveram maior quantidade de cistos cerebrais e sobreviveram por um tempo menor, comparados ao grupo controle, após a infecção com uma cepa virulenta por via oral. Eles associaram a expressão deficiente de células T CD4+ e níveis baixos de IgG2a, a maior susceptibilidade dos camundongos a infecção primária por *T. gondii*.

Classicamente, a detecção de anticorpos IgG, na ausência de IgM e IgA, indica toxoplasmose crônica. No entanto não permite estimar o tempo da infecção com precisão. Atualmente, a avidéz de anticorpos IgG em combinação com a análise de IgM, é a melhor ferramenta para determinar quando aconteceu a infecção (Beghetto et al., 2003). Em infecções

recentes, os anticorpos IgG específicos apresenta baixo poder de ligação após o contato primário com o antígeno, ou seja, baixa avidéz pelos antígenos específicos de *T. gondii*. Ao longo de semanas ou meses, esses anticorpos vão apresentando avidéz crescente, de modo que, nas infecções de mais longa duração, encontra-se um predomínio marcante de anticorpos de grande afinidade (Beghetto et al., 2003). Casos de toxoplasmose aguda em humanos podem ser diagnosticados usando IgM, e IgG de baixa avidéz além de IgA que identificam infecção recente (Decoster, 1996). No entanto, este método pode ser dificultado em alguns casos, uma vez que, alguns pacientes possuem anticorpos IgG de baixa avidéz persistentes durante muitos meses, não estimando com precisão o tempo de infecção (Beghetto et al., 2013).

Em conclusão, a determinação da resposta de anticorpos IgG de *T. gondii* e suas subclasses contribuem significativamente na compreensão da patogênese bem como no diagnóstico da toxoplasmose (Nascimento et al., 2015).

1.4. Reinfecção por *T. gondii*

Foi preconizado que a imunidade desenvolvida na infecção por *T. gondii* protege o hospedeiro em uma eventual reexposição ao parasito (Filisetti e Candolfi, 2004). Porém, com o aparecimento de casos de toxoplasmose congênita em mulheres imunocompetentes na fase crônica da infecção foi constatado que a imunidade adquirida na toxoplasmose não protege totalmente contra reinfecções especialmente se a cepa do parasito é não clonal (Silveira et al., 2003; Elbez-Rubinstein et al., 2009).

Um relato de aborto espontâneo devido à reinfecção por *T. gondii* em uma gestante com toxoplasmose crônica foi realizado por Fortier e colaboradores (1991). Exames sorológicos realizados na décima primeira semana de gestação revelaram níveis elevados IgG e IgA específicos anti-*T. gondii* além de retardo no crescimento fetal mostrado pelo ultrassom. Uma semana depois o feto foi abortado espontaneamente possivelmente devido à reinfecção pelo parasito.

Gavinet e colaboradores (1997) relataram transmissão congênita na qual a criança desenvolveu estrabismo divergente nove meses depois do nascimento e o exame oftalmológico revelou coriorretinite macular cicatrizada, com a perda da visão do lado direito. A reinfecção materna foi relacionada com a ingestão acidental de oocistos liberados por gatos jovens. Posteriormente, diversos casos clínicos com crianças apresentando toxoplasmose

congênita sintomática com retinocoroidite foram relatados (Hennequim et al., 1997; Dollfus et al., 1998; Silveira et al., 2003; Valdès et al., 2010)

Um caso de toxoplasmose congênita disseminada em recém-nascido do sexo masculino filho de mãe francesa imunocompetente com infecção crônica foi relato por Lebas e colaboradores (2004). O ultrassom realizado durante a gravidez revelou excesso de líquido amniótico, derrame pericárdico e dilatação do ventrículo direito fetal. Ao nascer a criança apresentou anormalidades cardíacas estruturais e batimento irregular do coração. Os autores concluíram que a triagem neonatal não deve ser descartada em recém-nascidos de mães imunocompetentes com infecção crônica por *T. gondii* devido a emergência do tratamento adequado do recém-nascido.

Elbez-Rubinstein e colaboradores (2009) relataram um caso na França de toxoplasmose congênita disseminada em recém-nascido de uma mãe imunocompetente e soropositiva para toxoplasmose alguns anos antes da concepção. A mãe relatou o consumo de carne de cavalo crua importada, durante a gravidez. A análise genética da cepa isolada do sangue periférico do recém-nascido revelou um genótipo atípico que é muito raro na França. Na América do Sul, cepas de *T. gondii* são mais diversas geneticamente, com diferentes genótipos descritos principalmente no Brasil. Como uma grande quantidade de carne de cavalo consumida na França é importada da América do Sul (Argentina, Uruguai e Brasil), é provável que a cepa infectante tivesse origem em um desses países, onde são descritos genótipos atípicos. Na França e em outros países da Europa a imunidade adquirida na infecção primária, normalmente, protege o organismo materno contra a reinfecção, pois, neste continente, predomina um genótipo de *T. gondii* (clonal tipo II) infectando humanos. No entanto, em outras áreas, como na América do Sul, onde a diversidade genética de *T. gondii* é maior, é provável que a reinfecção com genótipos diferentes ocorra com mais frequência. Os autores concluíram que casos de reinfecção com *T. gondii* envolvendo mulheres grávidas imunocompetentes apesar de serem raros na França e em outras partes da Europa, mostram que a presença de anticorpos IgG específicos residuais nem sempre é sinônimo de proteção contra uma nova infecção por *T. gondii*.

1.4.1. Modelos experimentais de reinfecção por *Toxoplasma gondii*

Vários modelos experimentais foram apresentados para investigar a ocorrência de reinfecção por *T. gondii*. Em um estudo realizado por De Roever-Bonnet (1969) foi demonstrado que hamsters cronicamente infectados com *T. gondii* e reinfectedos com

diferentes cepas durante a gestação transmitiram o parasito congenitamente. Dao e colaboradores (2001) demonstraram a reinfecção em camundongos OF1 infectados e desafiados pela via oral utilizando cepas de diferentes genótipos: a cepa Ned (tipo III), a cepa 76K (tipo II) e a cepa transfectada com β -galactosidase (derivada da cepa Prugnialud – Pru β gal). Os cistos da cepa Pru β gal quando corados apresentavam a cor azul, possibilitando a diferenciação entre as cepas de *T. gondii* presentes no mesmo cérebro. A reinfecção ocorreu apenas quando o desafio foi realizado com cepas de genótipos distintos Pru β Gal (tipo II)/Ned (tipo III), com a presença de cistos corados e não corados no cérebro dos animais. Portanto, a imunidade conferida na primoinfecção pode ser violada após reinfecção com uma cepa pertencente a outro genótipo clonal.

Por outro lado, Freyre e colaboradores (2006) avaliando a reinfecção por *T. gondii* em ratos *Wistar* primoinfectados com cepas clonais (tipo I) e desafiados com cepas pertencentes a diferentes genótipos observaram que a resposta imune desenvolvida após a infecção primária foi capaz de conferir proteção contra a reinfecção de três entre seis cepas clonais tipo II usadas no desafio. Já Dzitko e colaboradores (2006) utilizando camundongos BALB/c como modelo experimental demonstraram que a resposta imunológica provocada pela primoinfecção com uma cepa clonal tipo II em hospedeiros com sistema imunológico normal foi capaz de proteger os animais da mortalidade pós-desafio com dose letal de taquizoítos de uma cepa clonal tipo I, mas não protegeu contra a reinfecção.

Elbez-Rubinstein e colaboradores (2009), para testar a hipótese de reinfecção com cepas de genótipos atípicos, infectaram cronicamente camundongos com uma cepa clonal tipo II e desafiaram com uma cepa atípica pouco comum na Europa, mas presente na América do Sul, isolada do sangue periférico de um recém-nascido na França. Seis semanas após o desafio a reinfecção foi comprovada confirmando que a imunidade adquirida contra as cepas clonais europeias não protege contra a reinfecção por cepas atípicas da América do Sul.

Recentemente, Jensen e colaboradores (2015) estudaram a reinfecção em camundongos C57BL/6 desafiados com cepas atípicas da América do Sul um mês após a primoinfecção com uma cepa clonal tipo III. Foi observado que aproximadamente 50% dos animais cronicamente infectados sucumbiram a infecção secundária além de apresentarem perda de peso significativa e morbidade elevada. Além disso, a reinfecção foi comprovada pela presença, no cérebro, da cepa do desafio simultaneamente com a cepa utilizada na infecção primária. Segundo os autores essas evidências podem estar associadas com o genótipo não clonal de *T. gondii* na América do Sul e que supostamente a reinfecção contribui para a diversidade genética do parasito nessa região, simplesmente pelo fato de duas cepas estarem

presentes em uma única presa consumida pelo hospedeiro definitivo possibilitando recombinações genéticas e a expansão genômica de *T. gondii*.

Estudos sobre a reinfeção experimental em camundongos com cepas atípicas também foram realizados pelo nosso grupo. Brandão e colaboradores (2009) estudaram a reinfeção em camundongos BALB/c cronicamente infectados com a cepa D8 (avirulenta, genótipo ToxoDB#8 BrIII) e desafiados aos 45 dias e 180 dias após a infecção primária, com a cepa CH3 (virulência intermediária, genótipo ToxoDB#19) ou a cepa EGS (virulenta, genótipo ToxoDB #229). Foi realizada a PCR-RFLP de taquizoítos presentes no peritônio e bioensaio do cérebro dos camundongos sobreviventes. A reinfeção foi confirmada em 75% dos animais desafiados aos 45 dias com a cepa EGS, em 66,7% dos animais desafiados aos 180 dias com a cepa CH3 e em 100% dos animais desafiados com a cepa EGS. O aumento de IgA e IgG1 após 180 da primoinfecção com a cepa D8 (em relação aos 45 dias após a primoinfecção) pode estar associado a maior susceptibilidade a reinfeção observada aos 180 dias pós infecção com a cepa D8. Em 2011, Brandão e colaboradores publicaram os experimentos de desafio aos 45 dias após a infecção primária comparando camundongos BALB/c aos animais da linhagem susceptível C57BL/6. Os camundongos C57BL/6 apresentaram níveis mais baixos das citocinas IFN- γ e IL-10 em comparação aos BALB/c, concluindo que a ocorrência da reinfeção está relacionada não só ao genótipo da cepa, mas também à resposta imune do hospedeiro que é dependente do tempo de infecção e da linhagem de camundongo.

Posteriormente, Silva e colaboradores (2012) verificaram a suscetibilidade de camundongos BALB/c imunossuprimidos pela ciclofosfamida e reinfectados por *T. gondii*. Foi demonstrado que o tratamento imunossupressor ocasionou leucopenia significativa, aumento da mortalidade e das taxas de reinfeção. Os autores concluíram que a imunossupressão pela ciclofosfamida provavelmente comprometeu a proteção previamente estabelecida pela infecção primária. Estes autores avaliaram também anticorpos anti-*T. gondii* no modelo de reinfeção. Os níveis de IgA apresentaram um aumento significativo no dia 30 pós-desafio em relação ao dia 0 quando primoinfectados com a cepa D8 e desafiados com a cepa EGS, ou primoinfectados com a cepa ME49 e desafiados com a cepa EGS ou CH3. Mais recentemente, Costa (2016) utilizou o modelo usado em nosso laboratório para avaliar detalhes da resposta imune celular, lesões histopatológicas e disseminação do parasito pelos tecidos após a reinfeção. Foi demonstrado que a infecção primária protegeu os animais do desafio contra as cepas letais e que a morbidade foi reduzida nos animais reinfectados, conforme demonstrado pelo acompanhamento do peso e pela análise histopatológica do intestino, pulmão, fígado, cérebro e baço que mostraram alterações patológicas minimizadas.

Nos animais desafiados não ocorreu um aumento de citocinas inflamatórias ou modulatórias no soro ou mesmo no local de infecção (intestino) em comparação aos animais apenas com infecção crônica. O padrão de disseminação do parasito se deu de forma distinta daquele que ocorre na primoinfecção. Foi observada a chegada precoce dos parasitos aos pulmões e atraso tanto na multiplicação destes no intestino quanto na chegada ao cérebro. As dificuldades observadas pela autora na determinação detalhada da disseminação do parasito após o desafio se deve, provavelmente, ao delineamento experimental adotado, onde os animais foram avaliados apenas com 48 horas, uma semana e duas semanas após o desafio. Torna-se necessário avaliar outros tempos além dos descritos por Costa (2016), principalmente entre os momentos iniciais após o desafio e 48 horas após o desafio.

Outros modelos experimentais além de camundongos e ratos também foram usados para estudar a reinfecção. Bresciani e colaboradores (2009) estudaram a transmissão transplacentária de *T. gondii* em cadelas prenhas reinfectadas com taquizoítos por via subcutânea e oralmente com oocistos da cepa P (Tipo III) de *T. gondii*. Todas as fêmeas reinfectadas abortaram ou apresentaram morte fetal, enquanto apenas uma apresentou um natimorto em uma ninhada de quatro filhotes. Por bioensaios em camundongos, *T. gondii* foi isolado de órgãos dos caninos adultos reinfectados e nos recém-nascidos. O parasito foi detectado por imunohistoquímica no cérebro de um recém-nascido e na medula espinhal de um natimorto, confirmando que *T. gondii* infecta fetos caninos, provocando abortos, mesmo em cadelas primoinfectadas.

Em 2011, Franco e colaboradores analisaram a ocorrência de transmissão congênita em *Calomys callosus* cronicamente infectadas com a cepa avirulenta ME49 (tipo II) e desafiadas com a cepa RH (tipo I) no primeiro dia de gestação. A detecção do parasito foi feita por imunohistoquímica, bioensaio da placenta e tecidos embrionários em camundongos e também por PCR que revelaram a presença de *T. gondii* apenas nos tecidos placentários, mas não nos tecidos fetais demonstrando neste caso que a infecção primária por *T. gondii* antes da prenhez desenvolveu uma imunidade eficaz a longo prazo que impediu a transmissão transplacentária para o feto. Posteriormente, Franco e colaboradores (2015) realizaram novos ensaios para verificar a transmissão vertical em fêmeas de *C. callosus* cronicamente infectadas com a cepa ME49 e reinfectadas com as cepas brasileiras TgChBrUD1 e TgChBrUD2 isoladas de galinhas em Uberlândia, Minas Gerais. A reinfecção promoveu a transmissão vertical tanto da cepa clonal tipo II quanto das cepas brasileiras de *T. gondii* demonstrando claramente que durante a gestação a proteção pode ser violada após a reinfecção, principalmente quando cepas não clonais estão envolvidas neste processo.

Recentemente, Santos e colaboradores (2016) avaliaram o potencial de transmissão congênita em ovinos da raça Santa Inês experimentalmente reinfectadas com *T. gondii*, em três estágios gestacionais (inicial, intermediário e final). A primoinfecção foi realizada por via oral com oocistos da cepa ME49 de *T. gondii* e o desafio ocorreu também por via oral, com oocistos da cepa VEG nas fêmeas gestantes cronicamente infectadas. O parasitismo tecidual por *T. gondii* foi investigado (histopatologia, imunohistoquímica, bioensaio em camundongos e PCR) em mães e cordeiros. Todos os ovinos geraram cordeiros sorologicamente positivos para *T. gondii*. Este resultado mostra que a imunidade adquirida na infecção primária não protegeu as ovelhas contra a reinfeccões por *T. gondii*. A reinfeccção experimental de *T. gondii* provocou alterações reprodutivas graves (alterações locomotoras, malformações, natimortos e deficiências) em crias de fêmeas Santa Inês primariamente infectadas em diferentes estágios da gestação. Portanto, a infecção congênita de *T. gondii* ocorre em ovelhas cronicamente infectadas antes da prenhez, com ou sem reinfeccção, durante os vários estágios da gestação.

1.5. Detecção de *Toxoplasma gondii* em diferentes órgãos nos modelos experimentais de toxoplasmose

Os diversos relatos presentes na literatura sobre a detecção de *T. gondii* em órgãos de modelos experimentais variaram de acordo com a espécie hospedeira, a cepa utilizada, o tamanho do inóculo e a via de infecção. Além disso, diferentes metodologias são utilizadas para monitorar a cinética do parasito (Djurkovic-Djakovic et al., 2012).

Estudos quantitativos pioneiros em camundongos infectados com cistos por via oral mostraram a presença de *T. gondii* no 4º dia nos linfonodos mesentéricos, no 5º dia nos pulmões e a partir do 6º dia no cérebro (Ito e Tsunoda, 1967; Ferguson e Hutchison, 1987).

Sumynen e colaboradores (1995) determinaram a cinética precoce da infecção por *T. gondii* em camundongos *Swiss*. Os animais foram inoculados oralmente com cistos de uma cepa avirulenta no dia zero (D0) que foram posteriormente sacrificados após 12, 24 e 36 h e a 2, 3, 7, 10, 14, 21, 30, 50 e 72 dias após infecção. *T. gondii* não foi detectado no sangue ou em quaisquer órgãos de camundongos às 12, 24 e 36 horas após infecção. *T. gondii* foi detectado pela primeira vez no 2º dia no baço, no 3º dia nas placas de Peyer, no 7º dia nos pulmões e fígado, e no 10º dia no cérebro.

Zenner e colaboradores (1998) estudaram por cultivo celular a cinética de disseminação do parasito em vários tecidos durante a fase aguda da toxoplasmose e demonstraram que, após infecção oral com 50 cistos da cepa Prugniaud, os primeiros órgãos

infectados foram linfonodo mesentérico, baço e pulmões no 3º dia após a inoculação. No 6º dia, as cargas parasitárias nestes órgãos aumentaram com a presença do parasito no cérebro. Os picos máximos de parasitos foram observados nos pulmões no 9º dia e no cérebro no 12º dia.

Djurkovic-Djakovic e colaboradores (2012) detectaram DNA (PCR em tempo real) da cepa RH (clonal Tipo I) em todos os órgãos estudados (inclusive cérebro), já com 24 horas de infecção. Ao utilizar a cepa ME49 (clonal Tipo II), o parasito foi detectado 3 dias após a infecção, com altas cargas no pulmão, seguido do cérebro, o qual apresentou as maiores cargas no 21º dia de infecção. Segundo Harker e colaboradores (2015) durante a infecção oral com cistos teciduais de *T. gondii* em modelos murinos, os parasitos são detectáveis no intestino delgado e linfonodos mesentéricos por PCR em dois dias após a infecção.

Durante a infecção aguda, *T. gondii* pode se disseminar rapidamente do local inicial da infecção através da corrente sanguínea e do sistema linfático por meio de mecanismos intracelulares e extracelulares permitindo que os parasitos alcancem tecidos secundários. O parasitismo de células migratórias do sistema imune é uma estratégia eficaz utilizada pelo parasito para facilitar a disseminação. Durante a infecção oral aguda, os taquizoítos migram através do epitélio intestinal para a lâmina própria, onde encontram neutrófilos, monócitos inflamatórios e células dentrídicas. Embora não esteja claro como os parasitos entram na circulação, *T. gondii* é encontrado no sangue predominantemente em monócitos pouco depois da infecção oral. Os monócitos infectados e os taquizoítos extracelulares se aderem e sofrem migração transendotelial no endotélio vascular. A rede vascular é um meio eficiente para a propagação do parasito aos tecidos distais, como o cérebro (Harker et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Toxoplasma gondii é um protozoário capaz de se multiplicar ativamente em uma grande variedade de espécies de vertebrados como aves, mamíferos marinhos e terrestres incluindo o homem. A infecção é geralmente assintomática entre os seres humanos e animais imunocompetentes, mas pode causar um alto nível de morbidade e mortalidade em indivíduos com imunidade comprometida. Além disso, *T. gondii* também pode ser transmitido da mãe para o feto, resultando em aborto ou anormalidades fetais. Foi estabelecido durante anos que a infecção primária por *T. gondii* conduz a uma imunidade que protege o hospedeiro primoinfectado de uma subsequente reexposição e impede a transmissão vertical durante a reinfeção em gestantes imunocompetentes infectadas com o parasito antes da concepção. Entretanto, após relatos de casos que identificaram a reinfeção natural em humanos e, posteriormente, através de estudos em modelos animais, foi visto que essa imunidade protetora pode ser violada após reexposição com cepas de diferentes genótipos. Em regiões de alta endemicidade como, por exemplo, no Brasil, aproximadamente 50 a 80% da população humana são soropositivas para toxoplasmose e exposições múltiplas ao parasito provavelmente ocorrem com grande frequência. Portanto, devido à diversidade genética das cepas brasileiras, as infecções secundárias ocorrem mais frequentemente com uma cepa geneticamente diferente da primoinfecção. Apesar da comprovação de reinfeção por *T. gondii* em humanos e modelos experimentais, ainda não existem trabalhos descrevendo a cinética de disseminação do parasito nas primeiras horas após o desafio com cepas de genótipos atípicos isoladas de pacientes humanos com toxoplasmose congênita. Estudos caracterizando a resposta imune humoral durante este processo ainda são escassos. Portanto, a compreensão desse fenômeno pode auxiliar na busca de novos métodos de prevenção da toxoplasmose, principalmente em gestantes na fase crônica da infecção.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar a reinfecção por *T. gondii* em camundongos BALB/c infectados cronicamente pela cepa não virulenta TgCTBr5 e desafiados com cepas virulentas de genótipos atípicos TgCTBr9 ou EGS, isoladas de casos clínicos de toxoplasmose congênita humana.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar mortalidade e variação no peso corporal nos hospedeiros após o desafio com as cepas virulentas de *T. gondii*.
- Caracterizar a resposta imune humoral através da cinética de produção de anticorpos IgM, IgA, IgG total e suas subclasses IgG1 e IgG2a, antes e após o desafio.
- Detectar a presença das cepas virulentas no intestino, linfonodos mesentéricos, pulmão e cérebro a fim de estabelecer a dinâmica de disseminação do parasito após o desafio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia ICB-UFMG para os experimentos de reinfecção. Camundongos *Swiss* fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas foram obtidos no CEBIO para manutenção das cepas de *T. gondii* e experimentos de bioensaio. Todos os camundongos receberam ração Nutrilab e água *ad libitum*.

A manutenção das três cepas de *T. gondii* foi feita por passagens consecutivas em camundongos *Swiss* fêmeas através do inóculo por via oral de cistos. Camundongos *Swiss* infectados pela via oral com cistos das cepas virulentas TgCTBr9 e EGS receberam, a partir de 2 a 3 dias após a infecção, tratamento com sulfadiazina (500 mg/l) via oral oferecida na água aos animais durante 5 a 10 dias (Dubey e Beattie, 1988) para cronificar a infecção e assim obter os cistos cerebrais que foram usados no desafio. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo número 348/2012 (Anexo 1).

4.2. Cepas de *T. gondii*

No presente trabalho foram utilizadas três cepas de *T. gondii* com genótipos atípicos e diferentes entre si (Carneiro et al., 2013; Silva et al., 2014) isoladas em Minas Gerais.

A cepa TgCTBr5 foi isolada de uma criança com toxoplasmose assintomática ao nascimento. Esta cepa é classificada como avirulenta de acordo com estudos de virulência que mostraram a sobrevivência de 100% dos animais quando infectados com 1.000 taquizoítos via intraperitoneal (i.p.) (Carneiro et al., 2013) ou com 10 cistos cerebrais por via oral (Pinheiro et al., 2015) resultando no estabelecimento de uma infecção crônica 30 dias após a inoculação. A cepa TgCTBr5 foi genotipada pelo nosso grupo através da técnica de PCR-RFLP utilizando 11 marcadores padronizados que foram descritos por Su e colaboradores (2006). Essa cepa foi identificada como pertencente ao genótipo ToxoDB #8 (Carneiro et al., 2013). Esse genótipo foi descrito por Pena e colaboradores (2008) como sendo um genótipo clonal brasileiro também denominado BrIII. Esse genótipo já foi previamente identificado a partir de animais domésticos e em diferentes regiões do país (Carneiro et al., 2013).

A cepa TgCTBr9 foi isolada de um recém nascido com toxoplasmose congênita, apresentando calcificações cerebrais e lesões oculares, falecendo aos 9 meses de vida. O estudo de virulência mostrou que a dose letal para 100% dos camundongos infectados é de 1 taquizoíto, e portanto, foi caracterizada como virulenta. A cepa TgCTBr9 pertence ao genótipo ToxoDB #11, também conhecido como tipo BrII (Carneiro et al., 2013). É um genótipo presente em várias regiões do Brasil e já foi previamente descrito em vários hospedeiros como ovelhas, frangos e gatos, mas o primeiro relato desse genótipo em humanos foi realizada por Carneiro e colaboradores (2013).

A cepa EGS foi obtida a partir do líquido amniótico de gestante que apresentou soroconversão para a toxoplasmose durante a gravidez, em Minas Gerais. Foi caracterizada como virulenta por possuir a dose letal para 100% dos animais infectados correspondente a 1 taquizoíto (Ferreira et al., 2001; Vidigal et al., 2002). Essa cepa apresentou um genótipo denominado #229 (Silva et al., 2014). Este foi o primeiro trabalho a identificar esse genótipo não tendo sido encontrado nenhum correspondente na literatura e banco de dados online ToxoDB até o momento. A genotipagem das cepas TgCTBr5, TgCTBr9 e EGS realizada por Carneiro e colaboradores (2013) e Silva e colaboradores (2014) está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Genotipagem através de PCR-RFLP multilocus das cepas TgCTBr5, TgCTBr9 e EGS de *Toxoplasma gondii*.

CEPAS	MARCADORES GENÉTICOS											
	SAG1	5'-3' SAG2	SAG2 alt	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	
TgCTBr5	*I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	
TgCTBr9	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	
EGS	I	I	II	III	III	II	I	I	I	II	I	

*Alelos clonais de tipo I, II e III

Adaptado de Carneiro et al., 2013; Silva et al., 2014

4.3. Infecção Primária com a cepa avirulenta TgCTBr5

Para realização da primoinfecção, cérebros de camundongos *Swiss* com aproximadamente três meses de infecção pela cepa TgCTBr5 foram macerados em tubos de hemólise e suspensos em 1ml de *phosphate buffer solution* (PBS) pH 7,2 estéril. Os cistos teciduais foram contados ao microscópio óptico, em duplicata, em 10µl da suspensão de cérebro entre lâmina e lamínula. Após a contagem realizou-se a diluição do material em PBS pH 7,2 estéril suficiente para se obter uma concentração de 10 cistos em 100 µL. Esse material foi inoculado nos camundongos BALB/c fêmeas pela via oral com o auxílio de

agulha de gavagem. A confirmação da primoinfecção nos animais experimentais foi realizada no 30º dia de infecção através da pesquisa de anticorpos IgG anti- *T. gondii* no soro pela técnica de ELISA.

Um grupo dos camundongos primoinfectados foram utilizados para o controle da infecção promovido pela cepa TgCTBr5 e foram denominados grupo TgCTBr5. Outro grupo de animais não foi infectado e nem desafiado. Esse grupo recebeu 100 µL de PBS estéril pH 7,2 por via oral no momento da infecção e/ou desafio e compuseram, portanto, o grupo controle não infectado, denominado grupo PBS (Tabela 2).

4.3.1. Desafio com as cepas virulentas TgCTBr9 ou EGS

Foram desafiados apenas os camundongos com infecção crônica confirmada pela presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* (ELISA) no 30º dia da primoinfecção. O desafio ocorreu pela via oral no 45º dia após a primoinfecção, com 10 cistos da cepa TgCTBr9 (grupo TgCTBr5+TgCTBr9) ou EGS (grupo TgCTBr5+EGS) (Tabela 2). Os cistos foram obtidos, quantificados e inoculados conforme descrição no item anterior.

Dois grupos de animais que não haviam sido primoinfectado pela cepa TgCTBr5, receberam no dia do desafio dos animais crônicos, um inóculo com 10 cistos da cepa TgCTBr9 (grupo TgCTBr9) ou EGS (grupo EGS). Estes grupos representam o controle da infecção promovida pelas cepas virulentas sem nenhuma infecção prévia (Tabela 2).

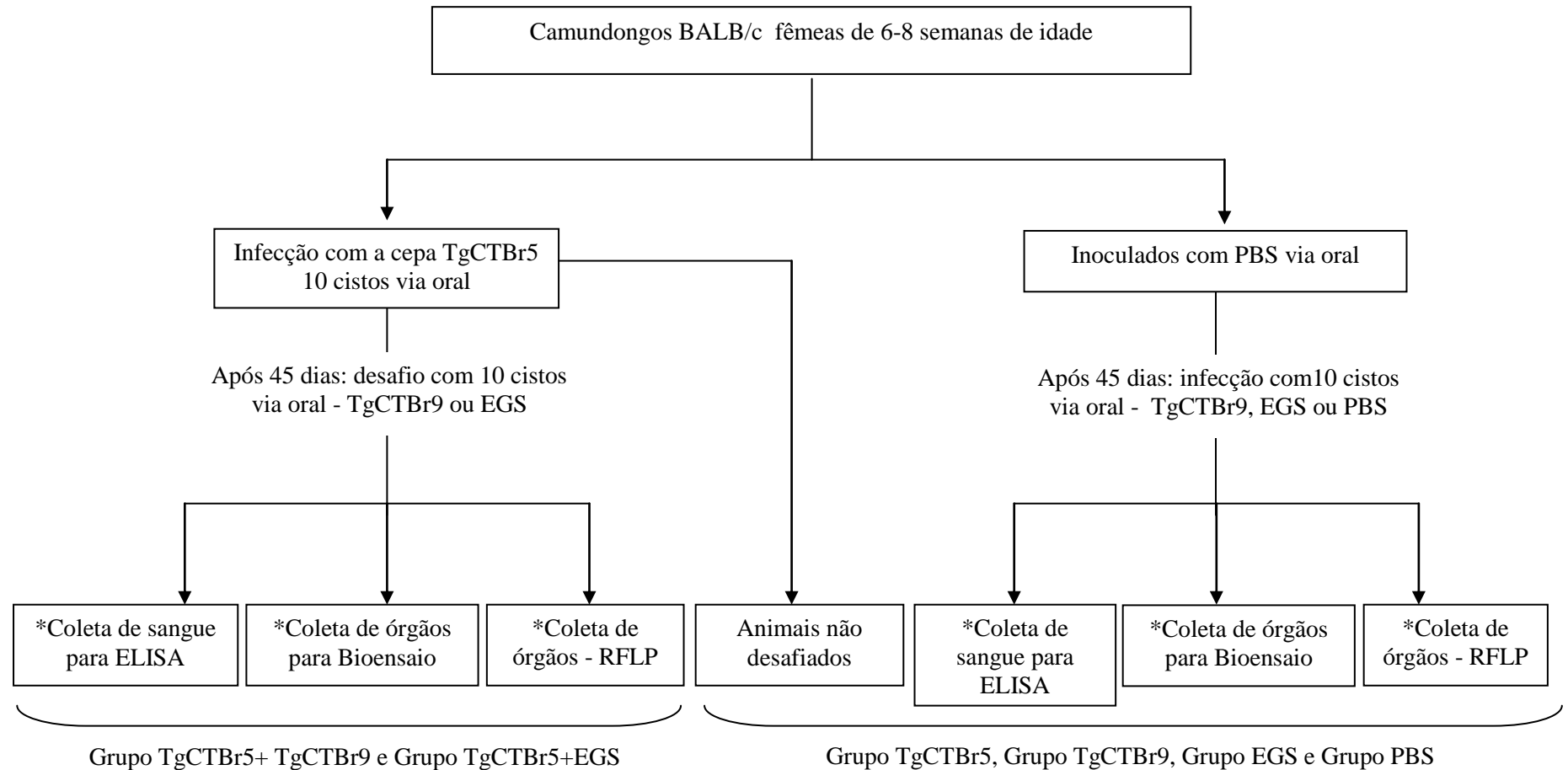
Tabela 2: Descrição dos grupos experimentais e número de camundongos por grupo.

Grupos Experimentais	
Grupo PBS (n = 9)	Animais não infectados e não desafiados.
Grupo TgCTBr5 (n = 27)	Animais infectados apenas com a cepa TgCTBr5.
Grupo TgCTBr9 (n = 21)	Animais sem infecção prévia, infectados apenas com a cepa TgCTBr9 no dia do desafio.
Grupo EGS (n = 21)	Animais sem infecção prévia, infectados apenas com a cepa EGS no dia do desafio.
Grupo TgCTBr5 + TgCTBr9 (n = 27)	Animais primoinfectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa TgCTBr9.
Grupo TgCTBr5 + EGS (n = 27)	Animais primoinfectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa EGS.

4.4. Delineamento experimental

Três camundongos BALB/c de cada grupo experimental foram sacrificados por deslocamento cervical com 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas e com 7, 14 e 30 dias pós-infecção ou desafio. Em cada um desses animais foram coletados: o sangue para ELISA (IgM, IgA, IgG total, IgG1 e IgG2a); e o intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro para o bioensaio e análises moleculares (PCR-RFLP). A mortalidade foi avaliada diariamente e a pesagem dos camundongos foi feita a cada dois dias durante 30 dias após o desafio em cinco camundongos de cada grupo, destinados especificamente para esta análise. Todos os grupos experimentais foram infectados concomitantemente de modo a minimizar as variáveis envolvidas na realização dos testes (Figura 1).

Figura 1: Delineamento experimental da infecção e reinfecção de camundongos BALB/c com *Toxoplasma gondii*



* Três animais foram sacrificados com 2, 4, 8, 12, 24, 48 HPI, 7, 14, 30 DPI e 2, 4, 8, 12, 24, 48 HPD, 7, 14, 30 DPD. Destes animais foram coletados: sangue (ELISA), intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro (para bioensaio e PCR-RFLP). HPI – Horas pós-infecção; DPI - Dias pós-infecção; HPD – Horas pós-desafio; DPD - Dias pós-desafio.

Um grupo independente de cinco animais foi avaliado diariamente para mortalidade e pesado a intervalos de dois dias até o final do experimento.

4.4. Critérios de mortalidade e morbidade

Um grupo independente de cinco animais foi avaliado diariamente para a realização da curva de sobrevivência e morbidade por um período de 30 dias após infecção e/ou desafio. A curva de sobrevivência foi realizada a partir do registro diário da mortalidade de cada grupo experimental conforme Pinheiro e colaboradores (2015). A morbidade dos animais infectados foi avaliada através da pesagem em balança portátil digital para obtenção do peso corporal. Como controle do experimento, cinco camundongos não infectados e não desafiados também foram pesados da mesma forma. No dia do desafio, dia 0, o peso de cada animal foi considerado 100%. Nos outros dias foi calculada a porcentagem do peso em relação ao peso inicial no dia 0. A comparação entre os grupos se deu através da mediana da porcentagem do peso de cada animal em cada dia de experimento.

4.5. Bioensaio

O bioensaio dos grupos desafiados (TgCTBr5+TgCTBr9 e TgCTBr5+EGS) foi realizado para investigar a presença da cepa virulenta empregada no desafio (TgCTBr9 ou EGS) no intestino, linfonodos mesentéricos, pulmão e cérebro de acordo com Brandão e colaboradores (2009) sendo uma ferramenta complementar a PCR-RFLP para verificar a ocorrência de reinfecção. Fragmentos de intestino de três camundongos BALB/c, formando um pool, foram coletados a cada 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas pós-desafio (HPD) e 7, 14 e 30 dias pós-desafio (DPD), macerados em cadinhos e pistilos de porcelana estéreis e em seguida suspensos em 0,5mL de PBS pH7,2. Um camundongo *Swiss* foi inoculado intraperitonealmente com 1ml da suspensão de pool de intestino de três camundongos BALB/c. Fragmentos de linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro foram processados de forma semelhante ao descrito acima para intestino. A mortalidade destes camundongos *Swiss* foi acompanhada diariamente. A morte foi considerada, em princípio, consequência da presença da cepa utilizada para o desafio (cepa virulenta para camundongos) no material inoculado. Entretanto, é possível que o bioensaio com os órgãos coletados de camundongos BALB/c infectados apenas com a cepa TgCTBr5 (avirulenta para camundongos) resultem na morte dos camundongos *Swiss* por possuírem alta carga parasitária desta cepa usada na primoinfecção. Nesse caso, a morte desses animais seria consequência da alta dose infectante. Para auxiliar no esclarecimento da causa da morte, avaliamos o pulmão dos camundongos *Swiss* mortos naturalmente durante o bioensaio por PCR-RFLP. Um fragmento do pulmão foi

coletado e armazenado a -20° para posterior realização de PCR-RFLP para confirmar se a morte do animal realmente foi consequência da cepa virulenta (TgCTBr9 ou EGS). Utilizamos o pulmão por ser descrito na literatura como um órgão que apresenta elevada carga parasitária (Djurkovic-Djakovic et al., 2012). Camundongos sobreviventes foram sacrificados após 30 dias para pesquisa de anticorpos IgG (ELISA).

O bioensaio dos animais infectados apenas pelas cepas TgCTBr5, TgCTBr9 e EGS foi realizado do mesmo modo como descrito acima para os grupos desafiados, com o objetivo de verificar a presença e o padrão de disseminação tecidual de *T. gondii* nos órgãos de camundongos primoinfectados.

4.6. Teste imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

Todos os camundongos BALB/c dos grupos primoinfectados e desafiados foram sangrados antes do sacrifício por punção submandibular (Golde et al., 2005). Desta forma, foram avaliados três camundongos BALB/c de cada grupo experimental sacrificados com 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas e com 7, 14 e 30 dias pós-infecção ou pós-desafio. Em cada um desses animais foi coletado sangue que foi centrifugado e o soro estocado a -80°C até a realização da sorologia. Esses soros foram testados por ELISA para pesquisa de anticorpos IgA, IgM, IgG total e suas subclasses IgG1 e IgG2a anti- *T. gondii*, segundo Brandão e colaboradores (2009).

4.6.1. Antígeno de *T. gondii*

Para preparação do antígeno, taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram obtidos de camundongos *Swiss* previamente infectados pela via i.p. A cavidade peritoneal dos camundongos foi lavada com PBS pH 7,2 e o exsudato obtido foi lavado três vezes por centrifugação a $1400 \times g$ por 10 minutos em PBS pH 7,2. Alíquotas de 10^7 taquizoítos foram sonicadas em 5 ciclos de 40 hertz (em banho de gelo), durante 1 minuto e com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo. Após a sonicação o material foi centrifugado e estocado a -20°C até o momento do uso sendo denominada “*soluble tachyzoite antigen*” (STAg). A concentração de proteínas no STAg foi estimada segundo Lowry e colaboradores (1951).

4.6.2. Padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos das classes IgA, IgM, IgG total e suas subclasses IgG1 e IgG2a anti-*Toxoplasma gondii*

Antes da realização do ensaio nas amostras de soro a serem testadas, o método de ELISA foi padronizado. Nesta padronização, utilizamos a concentração fixa de 0,5ug de STAG/well de acordo com Brandão e colaboradores (2009). Realizamos então uma titulação em bloco onde testamos diferentes concentrações de soros controle positivos e negativos e de anticorpos secundários anti-IgG total, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgM ou anti-IgA de camundongo conjugados a peroxidase (Sigma-Aldrich®), avaliando em conjunto a melhor combinação de cada um para a identificação das diluições ótimas. Foram utilizados três soros controle positivos de camundongos com infecção experimental confirmada e quatro soros controle negativos.

As definições das diluições de soros e conjugados a serem usadas na padronização (descritas na Tabela 3) foram pré-definidas baseadas no trabalho realizado por Brandão e colaboradores (2009).

Tabela 3: Diluições de soros e conjugados utilizados para padronização do ELISA na pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em camundongos experimentalmente infectados.

Imunoglobulinas	Diluições do soro			Diluições do conjugado			
IgA	1/25	1/50	1/100	1/500	1/1.000	1/2.000	1/4.000
IgM	1/25	1/50	1/100	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/8.000
IgG total	1/25	1/50	1/100	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/6.000
IgG1	1/50	1/100	1/200	1/2.000	1/4.000	1/6.000	1/8.000
IgG2a	1/50	1/100	1/200	1/6.000	1/12.000	1/16.000	1/18.000

Os dados absolutos de absorvância a 490nm dos três soros controle positivos e dos quatro soros controle negativos usados na padronização foram transformados em médias. A razão entre a absorvância de soros positivos (P) e negativos (N) (razão P/N) foi calculada através da divisão das médias de absorvância dos soros positivos pelo valor médio de absorvância dos soros negativos (Rajasekariah et al., 2001). Foram considerados como ponto ótimo de padronização os valores de P/N mais elevados obtidos nas diferentes diluições.

Após o processo de padronização, no qual foram definidas as melhores diluições do soro e conjugado, a técnica de ELISA foi realizada nos soros dos camundongos a serem testados. Placas de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Sarstedt®) foram sensibilizadas overnight (4°C) com 50µl/well do antígeno diluído a 10µg/ml em tampão carbonato pH 9,6.

Em seguida a solução do antígeno foi desprezada e a placa lavada duas vezes com solução salina contendo Tween 20 a 0,05% (SST), secada por inversão em papel absorvente e bloqueada com PBS-Caseína 2% por 30 minutos a 37°C. Logo em seguida foi lavada duas vezes com SST, secada e adicionado 50µl dos soros diluídos em PBS-Tween 20 à 0,5% + Caseína 0,25% (PBS-T/Caseína 0,25%) de acordo com a concentração padronizada. Foram utilizados dois soros controle positivos e seis soros controle negativos. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C, lavadas duas vezes, e adicionado 50µl/well do conjugado marcado com peroxidase (diluído em PBS-T Caseína 0,25% conforme padronizado). Após 45 minutos de incubação à 37°C, as placas foram lavadas 4 vezes, secadas por inversão e o substrato (orto-fenilenodiamino + H₂O₂ em ácido cítrico) adicionado seguido da incubação por 20 minutos no escuro à 37°C. Para interromper a reação foram utilizados 25µl/well de H₂SO₄ 4N. A leitura automatizada foi realizada em leitor de microplacas da BIO RAD modelo 3550 e filtro de 490nm. Amostras com valores em absorbância maiores que o cut off foram consideradas positivas. O cut off foi calculado pela média da absorbância de seis soros negativos mais três desvios padrão, testados em cada placa.

4.6.3. ELISA-IgG para confirmar a infecção de camundongos BALB/c pela cepa TgCTBr5 de *T. gondii* e de camundongos *Swiss* usados no bioensaio

Para confirmar a soroconversão nos animais primoinfectados com a cepa TgCTBr5 foi utilizada a amostra de sangue coletada 30 dias pós inoculação, por punção submandibular, e os anticorpos IgG total anti-*T. gondii* foram dosados no soro pelo método de ELISA segundo Brandão e colaboradores (2009).

Os camundongos *Swiss* sobreviventes do bioensaio também foram sangrados aos 30º dia após inóculo por lancetamento da cauda, antes do sacrifício. O ELISA foi realizado em eluato de sangue em papel filtro para confirmação da presença de anticorpos anti- *T. gondii* através da dosagem de IgG. Três picotes de 0,5 mm de papel filtro com sangue seco foram eluídos por 30 minutos em 0,5 ml de PBS à temperatura ambiente resultando em uma diluição aproximada de 1:50 (Machado-Coelho et al., 1995). Foram incluídos em cada placa dois eluatos controle positivos e seis eluatos negativos, previamente testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). As placas foram incubadas a 37°C durante 45 minutos. A partir da adição do conjugado anti -IgG de camundongo, os procedimentos do ELISA foram idênticos ao descrito anteriormente.

4.7. Identificação molecular da reinfeção e disseminação do parasito através de PCR-RFLP

4.7.1 Extração de DNA de tecidos de camundongos experimentalmente infectados

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®), com modificações no protocolo do produto. Os órgãos estocados a -20°C foram descongelados em temperatura ambiente e em seguida macerados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos para tubos de microcentrífuga modelo Z359971-1EA (Sigma-Aldrich®). Ao tecido macerado foram adicionados 500 µL da solução de lise nucleica fornecida no kit, 100 µL EDTA 0,5 M e 10 µL de proteinase K (10mg/mL). A suspensão permaneceu a 55°C overnight. Foi adicionado 2 µL de RNase e feita a homogeneização por inversão do tubo seguida de incubação de 30 minutos a 37°C. Após manter as amostras a temperatura ambiente por cinco minutos, foi adicionado 200 µL de solução de precipitação de proteínas, seguida de homogeneização no vórtex por 20 segundos, resfriamento no freezer por 5 minutos e centrifugação a 16.000 x g por 5 minutos. O DNA presente no sobrenadante foi precipitado após transferência para um novo tubo contendo 600 µL de isopropanol. Em seguida o precipitado foi centrifugado por 1,5 minutos a 16.000 x g, o sobrenadante foi descartado e lavado duas vezes com etanol 70%. O tubo contendo o DNA extraído foi mantido na estufa à 37°C por 30 minutos, reidratado com água ultrapura para PCR (Phoneutria®) e armazenadas a 4°C para posterior amplificação.

4.7.2. *Nested* PCR-RFLP do *Locus* L358

Para verificar a presença de mais de uma cepa (diferentes genótipos) de *T. gondii* nos tecidos de um mesmo animal foi realizada a análise pela *Nested* PCR-RFLP segundo Costa (2016) utilizando o marcador L358 (Tabela 1), para o qual a cepa TgCTBr5 apresenta o alelo III e as cepas EGS ou TgCTBr9 apresentam o alelo I. A primeira amplificação contendo os iniciadores externos (forward: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC e reverse: GCAATTTCTCGAAGACAGG) foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo 2,5 µl de Tampão 5X green (Promega®), 25 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen®), 5 u/µl de *Taq* DNA polimerase (Promega®), 25 µM de cada iniciador externo e 1,5 µl de DNA molde extraído do amostra biológica. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em cada reação. A reação foi feita em um termociclador

Eppendorf Mastercycler Nexus, com as seguintes etapas: desnaturação a 95 °C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de: 94 °C por 30 segundos; 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos.

Em seguida, foi realizada a segunda amplificação utilizando o par de iniciadores internos (forward: 5'AGGAGGCGTAGCGCAAGT3' e reverse: 5'CCCTCTGGCTGCAGTGCT3') tendo como DNA molde o produto da primeira reação diluído 1:2. Esta nova reação foi realizada em um volume final de 25 µl, contendo 2,5 µl de Tampão 5X green (Promega), 25 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen[®]), 5 u/µl de *Taq* DNA polimerase (Promega[®]), 10 µM do iniciador interno forward, 10 µM do iniciador interno reverse e 1,5 µl do produto da primeira amplificação diluído 1:2. A *Nested* PCR seguiu as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 60°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos. Após eletroforese, o produto desta segunda reação foi visualizado em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata e fotografado.

As amostras que apresentaram os produtos esperados foram digeridos utilizando as endonucleases de restrição HaeIII e NlaIII segundo Su e colaboradores (2010). A digestão ocorreu em um volume final de 20 µl, contendo 3 µl do produto da *Nested* PCR, 1 µl do tampão CutSMART[™] (New England Biolabs[®]), 2µl de albumina de soro bovino (BSA) e 1 µl de cada endonuclease de restrição específica (New England Biolabs[®]) seguido da incubação em banho maria a 37° C, por três horas. Em seguida, as amostras foram purificadas por extração com igual volume de fenol/clorofórmio (1:1) e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%. Os géis foram corados com nitrato de prata e fotografados com máquina fotográfica digital sob luz branca. Os perfis de bandas resultantes (RFLP) foram comparados com os perfis de cepas TgCTBr5, TgCTBr9 e EGS individualmente cujo DNA foi obtido de taquizoítos recuperados do exudato peritoneal de camundongos *Swiss* previamente infectados.

4.8. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o *software GraphPad Prism* versão 5.00 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Diferenças entre os grupos na análise de variação de peso corporal e dosagem de anticorpos foram calculadas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's para realizar comparações entre pares de grupos selecionados. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Todos os camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr5 apresentaram ELISA positivo para anticorpos IgG total anti *T. gondii* 30 dias após a infecção, confirmando o sucesso da primoinfecção.

5.1. Mortalidade e variação do peso corporal após o desafio

Os camundongos BALB/c não infectados (grupo PBS), assim como aqueles infectados apenas pela cepa não virulenta TgCTBr5 (grupo TgCTBr5) apresentaram 100% de sobrevivência durante os trinta dias de acompanhamento. Os animais desafiados com a cepa TgCTBr9 (grupo TgCTBr5+TgCTBr9) e EGS (grupo TgCTBr5+EGS) também apresentaram 100% de sobrevivência. Todos os camundongos primoinfectados com a cepa TgCTBr9 (grupo TgCTBr9) morreram entre o 8° e 11° dia após a infecção enquanto que camundongos primoinfectados com a cepa EGS a mortalidade ocorreu entre o 10° e 11° dia após a infecção (Figura 2A).

Os animais dos grupos PBS, TgCTBr5 e TgCTBr5+EGS apresentaram um leve aumento do peso corporal ao longo dos 30 dias de acompanhamento. Por outro lado, entre o 26° e 30° após o desafio observou-se uma leve perda de peso, porém significativa, no grupo TgCTBr5+TgCTBr9 em comparação com o grupo TgCTBr5 (Figura 2B). Os animais dos grupos primoinfectados com as cepas virulentas EGS e TgCTBr9 apresentaram pouca alteração no peso corporal nos primeiros dias de infecção, mas a partir do 5° e 7° dia pós infecção apresentaram uma queda de peso brusca, com perda de aproximadamente 20% do peso corporal para o grupo EGS e de 15% para o grupo TgCTBr9 respectivamente (Figura 2B e Figura 2C). Estes camundongos apresentaram ainda sinais típicos da toxoplasmose experimental como pelo arrepiado, relutância em mover e arqueamento postural antes de morrerem.

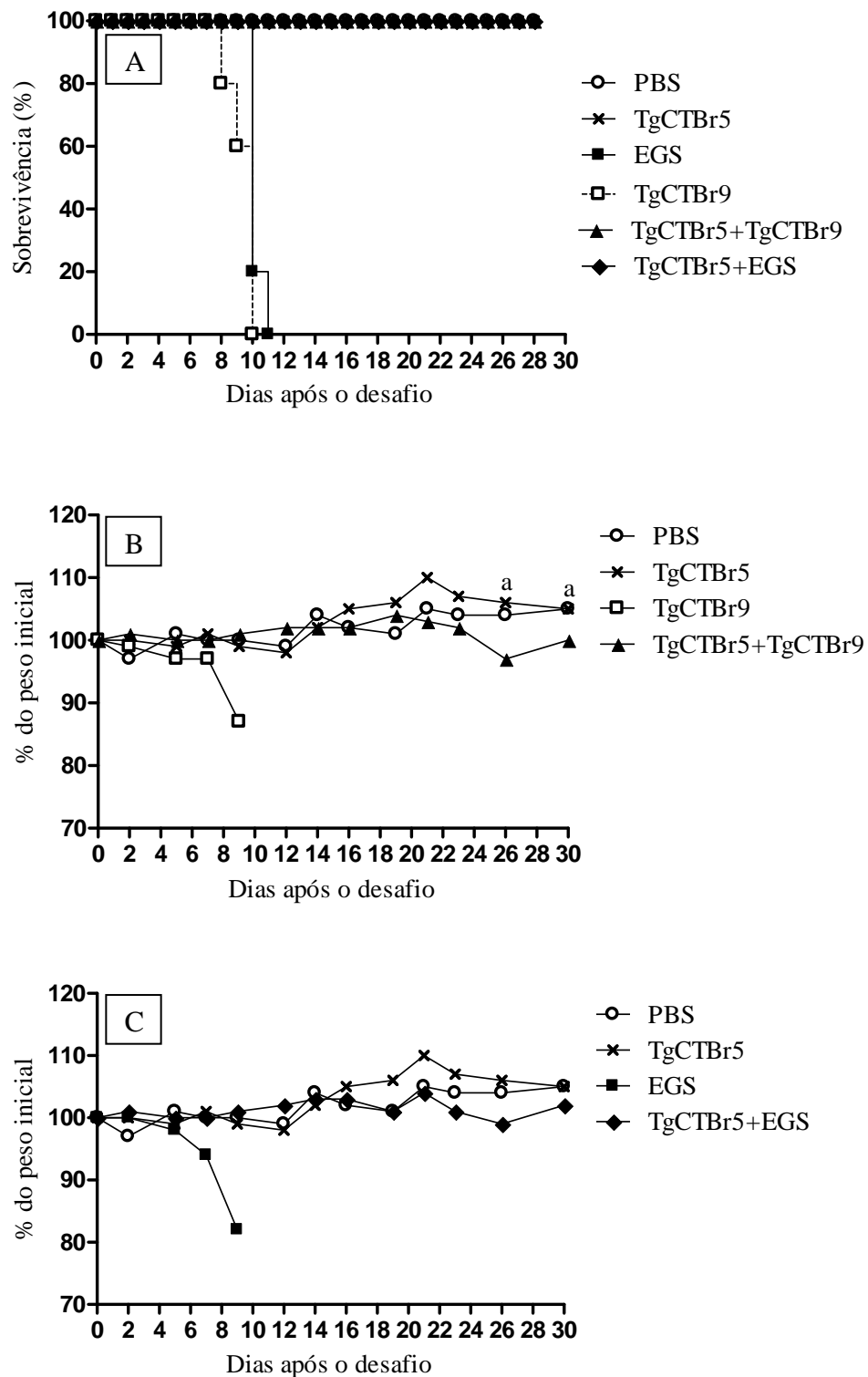


Figura 2: Sobrevivência e variação no peso corporal dos grupos experimentais. A) A mortalidade foi observada durante 30 dias após o desafio (5 animais/grupo). Os grupos PBS, TgCTBr5, TgCTBr5+ TgCTBr9 e TgCTBr5+EGS apresentaram 100% de sobrevivência e os grupos TgCTBr9 e EGS apresentaram 100% de mortalidade. B) Variação do peso corporal dos animais desafiados com a cepa TgCTBr9 e seus controles. C) Variação do peso corporal dos animais desafiados com a cepa EGS e seus controles. As medianas de cada grupo (5 animais/grupo) estão representadas nos dias em que foi realizada a pesagem. a = grupo TgCTBr5+TgCTBr9 é diferente do grupo controle TgCTBr5 ($P < 0.05$, teste Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's). Ver descrição dos grupos na Tabela 2.

5.2. Padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA anti-*T. gondii*

As diluições de soro e conjugado utilizados para o teste de ELISA foram padronizadas considerando o melhor valor de P/N, o qual consiste na razão entre o valor absoluto médio de absorbância de três soros positivos e o valor absoluto médio de absorbância de quatro soros negativos (Figura 3). As melhores diluições de soro e conjugado com maiores valores de P/N, capazes de distinguir as amostras positivas das negativas testadas foram:

- IgG total: soro 1:50 e conjugado 1:4.000 (P/N : 43,6)
- IgG1: soro 1:100 e conjugado 1:8.000 (P/N : 55,0)
- IgG2a: soro 1:100 e conjugado 1:16.000 (P/N : 18,7)
- IgM: soro 1:50 e conjugado 1:8.000 (P/N : 17,1)
- IgA: soro 1:50 e conjugado 1:4.000 (P/N : 23,7)

Para a pesquisa de anticorpos IgG1, IgG2a foram utilizadas as diluições descritas acima, as quais apresentaram os maiores valores P/N. Entretanto para a pesquisa de IgA, IgM e IgG, optamos em usar outras diluições, próximas aos maiores valores P/N identificados, conforme descrito na Tabela 4. As condições descritas acima para IgA (soro 1:50 e conjugado 1:4.000) apresentaram valor P/N discrepante daqueles observados para diluições próximas. Optamos então em usar o conjugado na diluição imediatamente anterior a esta (1:500). Utilizamos a mesma diluição de soro identificada previamente (1:50). Pelo mesmo motivo, optamos em realizar o ELISA IgM anti *T. gondii* utilizando o soro 1:50 e o conjugado diluído a 1:2.000. No caso de IgG total, optamos em utilizar a diluição do soro 1:100 (P/N: 41,3 – Figura 3) devido ao pequeno volume de soro disponível para realização de todos os testes.

Tabela 4: Condições finais para a realização do ELISA na pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em camundongos experimentalmente infectados.

Anticorpos	Soro	Conjugado
IgG total	1:100	1:4.000
IgG1	1:100	1:8.000
IgG2a	1:100	1:16.000
IgM	1:50	1:2.000
IgA	1:50	1:500

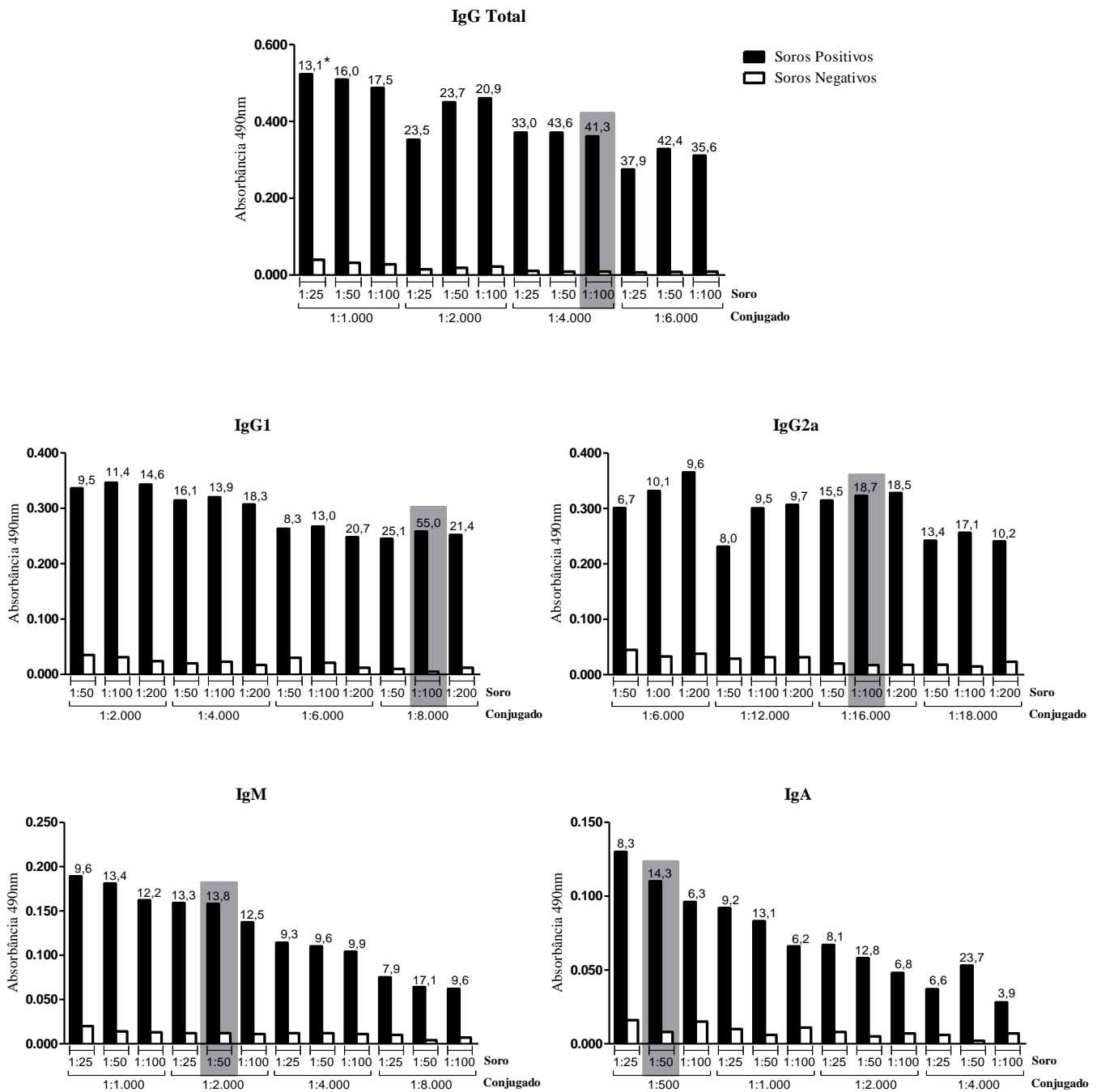


Figura 3: Determinação da melhor diluição do soro e conjugado para a realização do ELISA. *Os números acima das colunas representam a razão P/N (média da absorbância de três soros controles positivos, pela média de absorbância de quatro soros controles negativos) para cada imunoglobulina. Diluições marcadas em cinza foram utilizadas para a realização do ELISA na pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* em camundongos experimentalmente infectados.

5.3. Anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA anti-*T. gondii* em camundongos BALB/c infectados e reinfectados experimentalmente

Foi observado, tanto para IgG total como para IgG1, um aumento na produção destes anticorpos aos 30 dias pós-infecção (ou seja, 15 dias antes do desafio) (Figura 4). Para IgG2a e IgM ocorreu também uma elevação na produção de anticorpos aos 14 dias pós-infecção (ou seja, 31 dias antes do desafio). Ocorreu um retardo na produção de IgA em todos os animais, com ligeira elevação aos 45 dias pós-infecção (ou seja, no dia do desafio).

As amostras de soro coletadas nas primeiras horas subsequentes à infecção ou desafio (2, 4, 8, 12, 24 e 48 HPI/HPD) apresentaram valores de absorvância semelhantes entre si e não foram mostradas na Figura 4. Foram usados apenas os valores após 7, 14 e 30 DPI/DPD.

Para verificar se a reinfecção poderia alterar os níveis dos anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA, as amostras de soro dos camundongos infectados com a cepa TgCTBr5 e não desafiados (grupo TgCTBr5) e os animais cronicamente infectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa TgCTBr9 ou EGS (grupos TgCTBr5+ TgCTBr9 e TgCTBr5+EGS) foram comparados após o desafio. Os anticorpos IgG1 anti-*T. gondii* no 7º e 14º dia pós-desafio apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo TgCTBr5+ TgCTBr9 em relação ao grupo TgCTBr5 (Figura 4). Nos demais grupos, não houve alteração significativa nos níveis de anticorpos após o desafio.

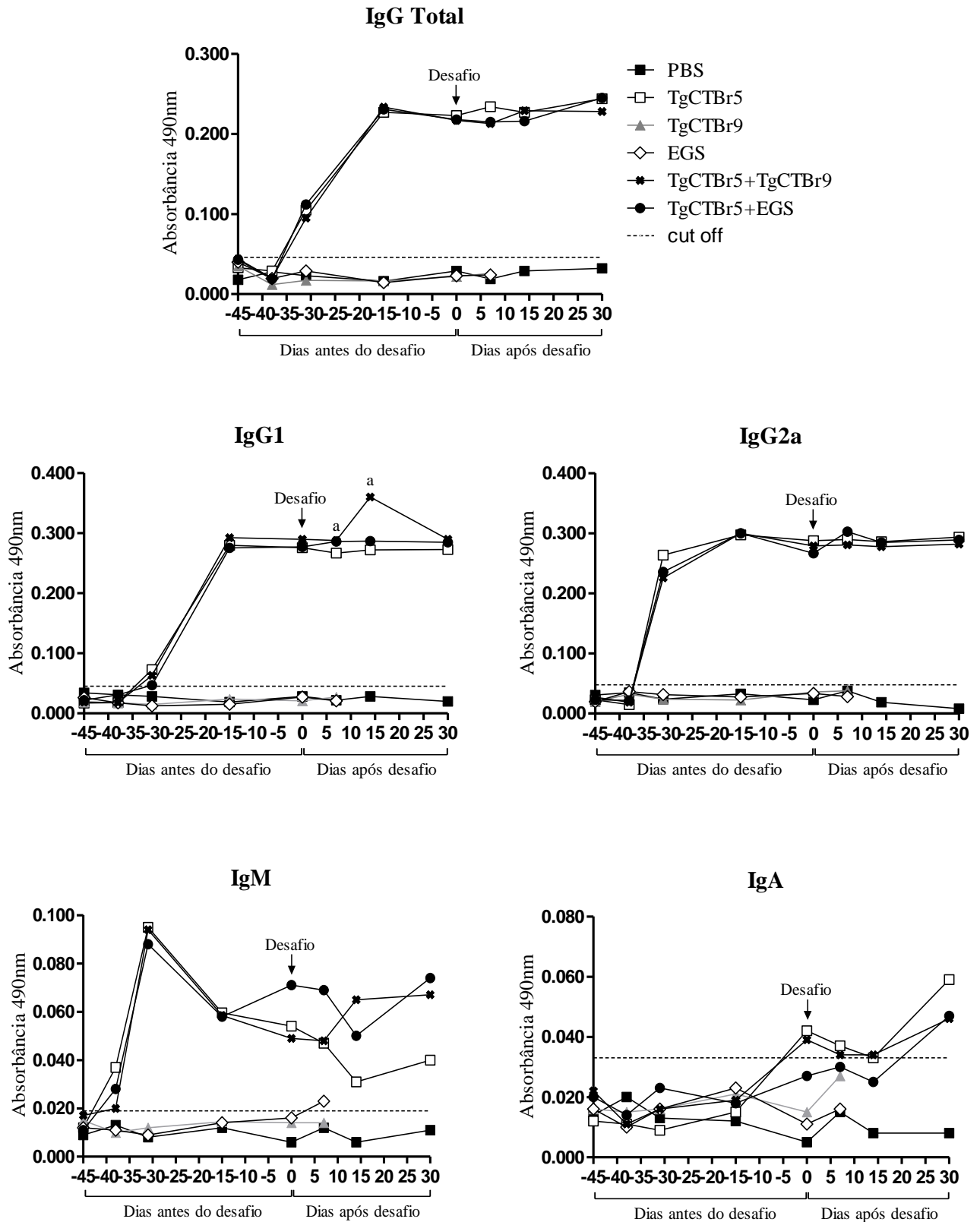


Figura 4: Cinética de produção de anticorpos anti-*T. gondii* IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA no soro de camundongos BALB/c antes e após o desafio. a = grupo TgCTBr5+TgCTBr9 é diferente estatisticamente do grupo TgCTBr5 (Teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$). A linha pontilhada indica o valor do cut off (IgA = 0,033; IgM = 0,019; IgG = 0,046; IgG1 = 0,045 e IgG2a = 0,048). Ver descrição dos grupos na Tabela 2.

5.4. Disseminação tecidual de *T. gondii* e ocorrência de reinfeção

Para identificar a presença e disseminação da cepa virulenta de *T. gondii* usada no desafio (cepa TgCTBr9 ou EGS) utilizamos dois métodos distintos: a) PCR-RFLP em DNA extraído dos órgãos de camundongos BALB/c primoinfectados e desafiados; b) bioensaio de fragmentos de órgãos dos camundongos BALB/c primoinfectados e desafiados.

5.4.1. Detecção das cepas de *T. gondii* nos grupos primoinfectados e nos grupos desafiados, por PCR-RFLP

A genotipagem de *T. gondii* nos órgãos coletados de três camundongos BALB/c para cada hora/dia por grupo, após a primoinfecção ou desafio, foi realizada pela PCR-RFLP. As amostras foram analisadas de acordo com os perfis de bandas encontradas após digestão e então comparadas com os perfis de cada cepa isoladamente.

A reinfeção foi confirmada quando a RFLP identificou os dois alelos do marcador L358 (alelo III para a cepa TgCTBr5 e alelo I para a cepa TgCTBr9 ou EGS) simultaneamente em um mesmo animal desafiado. A Figura 5 é representativa de PCR-RFLP do grupo TgCTBr5+TgCTBr9 onde os dois alelos foram identificados no intestino dos camundongos 1 e 2, eutanasiados 14 DPD, confirmando o sucesso da reinfeção.

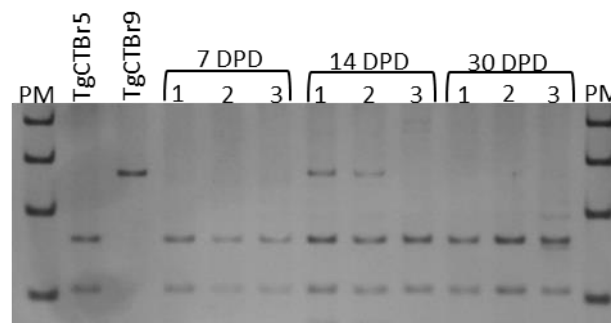


Figura 5: Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus L358 de *Toxoplasma gondii* com endonuclease de restrição HaeIII e NlaIII em DNA extraído do intestino, para verificar a reinfeção em camundongos BALB/c desafiados com a cepa TgCTBr9 (alelo I) aos 45 dias pós-infecção com a cepa TgCTBr5 (alelo III). PM = peso molecular (Promega 100pb). Camundongos 1 e 2 sacrificados aos 14 dias pós-desafio (DPD) apresentam infecção mista no intestino pelas cepas TgCTBr5 e TgCTBr9.

No grupo TgCTBr5 o DNA do parasito foi detectado no intestino com 2, 4, 12 e 24 HPI e com 7, 14 e 30 DPI. No linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro, o DNA da cepa TgCTBr5 estava presente apenas a partir do 7º dia após infecção (Tabela 5).

Para o grupo TgCTBr9 (Tabela 6) e para o grupo EGS (Tabela 7), o DNA do parasito foi detectado por PCR-RFLP somente 7 dias após a primoinfecção no intestino, linfonodo mesentérico e pulmão. Após duas semanas de infecção, a PCR não foi realizada, uma vez que os animais não sobreviveram devido à elevada virulência e 100% de mortalidade causada por estas cepas (Tabela 6 e Tabela 7).

Ao verificar a disseminação das cepas virulentas TgCTBr9 e EGS após o desafio em camundongos cronicamente infectados pela cepa TgCTBr5, foi observado um padrão distinto dos grupos agudos primoinfectados, com atraso da chegada do parasito em alguns órgãos como intestino e cérebro. No grupo TgCTBr5+TgCTBr9, o DNA da cepa virulenta usada no desafio (TgCTBr9) foi detectado primeiramente no linfonodo mesentérico a partir do 7º DPD (Tabela 8). No intestino a cepa TgCTBr9 foi encontrada somente no 14º DPD, e no 14º e 30º DPD no pulmão. No 30º DPD, o DNA da cepa TgCTBr9 foi detectado no cérebro (Tabela 8).

No grupo TgCTBr5+EGS, o DNA da cepa EGS foi detectado a partir do 7º DPD no linfonodo mesentérico e nos pulmões (Tabela 9). No 14º DPD, a cepa EGS foi detectada também no intestino e, no 14º e 30º DPD, no cérebro. Não foi realizada a RFLP no DNA extraído do linfonodo mesentérico coletado 24 horas após do desafio, pois a PCR foi negativa nesta amostra (Tabela 9).

A PCR de todos os animais do grupo PBS foi negativa. As imagens dos géis contendo os resultados individuais da digestão (RFLP) após PCR em DNA extraído de diferentes órgãos dos camundongos, por grupo e nas horas e dias coletados, encontram-se no Anexo 2, Figuras 1- 4.

5.4.2. Detecção das cepas de *T. gondii* nos grupos primoinfectados e nos grupos desafiados, por meio do bioensaio

Nos grupos primoinfectados com as cepas TgCTBr5, TgCTBr9 e EGS os critérios utilizados para investigar a presença do parasito por meio do bioensaio foram a presença de anticorpos anti-*T. gondii* pelo método de ELISA ou mortalidade dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro coletados com 2, 4, 8, 12, 24 e 48 HPI e 7, 14 e 30 DPI. Portanto, por se tratar de grupos infectados com uma

única cepa, o ELISA positivo ou a morte do animal do bioensaio indica a presença do parasito nestes órgãos.

No bioensaio de camundongos BALB/c do grupo TgCTBr5, os animais inoculados com o intestino e linfonodo mesentérico apresentaram 0% de mortalidade, enquanto um animal inoculado com pulmão e dois animais inoculados com o cérebro não sobreviveram. As três mortes ocorreram provavelmente pela alta dose infectante (elevado número de parasitos da cepa TgCTBr5) na amostra inoculada. Somente os camundongos *Swiss* inoculados com o homogeneizado do intestino de 14 DPI, do linfonodo mesentérico de 7 e 14 DPI, pulmão de 48 HPI e 7 DPI e cérebro de 7 DPI apresentaram anticorpos IgG anti-*T.gondii* detectados através do ELISA (Tabela 5).

No bioensaio de camundongos BALB/c do grupo TgCTBr9, os animais inoculados com o homogeneizado do intestino, linfonodo mesentérico e cérebro apresentaram 0% de mortalidade, enquanto apenas um animal inoculado com homogeneizado do pulmão de 7 DPI não sobreviveu (14% de mortalidade). O ELISA dos camundongos sobreviventes demonstrou a presença de anticorpos IgG anti-*T.gondii* apenas nos camundongos *Swiss* inoculados com o homogeneizado do cérebro de 7 DPI (Tabela 6).

No bioensaio do grupo EGS, apenas os animais inoculados com o homogeneizado do intestino apresentaram 0% de mortalidade (Tabela 7). Dois animais inoculados com o pool do linfonodo mesentérico de 24 HPI e 7 DPI, um animal inoculado com o pool do pulmão de 7 DPI e dois animais inoculados com o pool do cérebro de 24 HPI e 7 DPI não sobreviveram. Nenhum dos animais sobreviventes apresentaram anticorpos IgG anti-*T.gondii* pelo ELISA.

Para os grupos desafiados, o bioensaio foi avaliado pela presença de anticorpos anti-*T.gondii* pelo método de ELISA, pela mortalidade e também por PCR-RFLP em DNA extraído do pulmão dos camundongos *Swiss* do bioensaio que não sobreviveram após o inóculo dos órgãos. As imagens representativas dos géis contendo os resultados da digestão (RFLP) de pulmão dos animais do bioensaio encontram-se no Anexo 2 – Figura 5.

No bioensaio dos camundongos do grupo TgCTBr5+TgCTBr9 inoculados com o pool de intestino foi observada uma taxa de mortalidade de 55,5% (5/9 animais), inoculados com o pulmão 66,6% (6/9 animais) e inoculados com o cérebro, 44,4% (4/9 animais) de mortalidade (Tabela 8). No entanto, os camundongos inoculados com linfonodo mesentérico apresentaram 0% de mortalidade. Quando a provável cepa responsável pela morte foi investigada, a genotipagem dos parasitos encontrados no pulmão desses animais demonstrou infecções mistas correspondentes à presença das cepas TgCTBr5 e TgCTBr9 (alelos III e I simultaneamente), exceto nos animais inoculados com o pulmão de 24 HPD e cérebro de 24

HPD, os quais apresentaram somente a presença da cepa TgCTBr5 utilizada na primoinfecção (alelo III). Não foi observada a soroconversão dos camundongos *Swiss* sobreviventes inoculados com o homogeneizado do intestino de 48 HPD e linfonodo mesentérico de 2, 4, 8 HPD e 7, 14 e 30 DPD. Os resultados da interpretação final associando o resultado da PCR-RFLP dos animais do experimento de reinfecção com o bioensaio para confirmar a presença da cepa virulenta TgCTBr9 estão representados na última coluna da Tabela 8.

No bioensaio do grupo TgCTBr5+EGS, os camundongos inoculados com o pool de intestino e cérebro apresentaram mortalidade de 55,5% (5/9 animais). Quando inoculados com o pool do linfonodo mesentérico apresentaram mortalidade de 33,3% (3/9 animais) e quando inoculados com o pool do pulmão de 77,7% (7/9 animais).

Quando a provável cepa responsável pela morte foi investigada por PCR-RFLP, a genotipagem dos parasitos encontrados no pulmão dos animais do bioensaio demonstrou a presença da cepa utilizada no desafio somente nos camundongos inoculados com o intestino de 30 DPD, linfonodo mesentérico de 14 e 30 DPD, pulmão de 2, 12, 24 HPD e 14 DPD, e cérebro de 24 HPD e 30 DPD. Todos os camundongos sobreviventes ao final do bioensaio apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii* pelo ELISA. Os resultados individuais da interpretação final associando o resultado da PCR-RFLP dos animais do experimento de reinfecção com o bioensaio para confirmar a presença da cepa virulenta EGS, estão representados na última coluna da Tabela 9.

5.4.3. Comparação entre a disseminação das cepas de *T. gondii* nos grupos primoinfectados e grupos desafiados

A disseminação tecidual de *T. gondii* comparativa entre os grupos primoinfectados (TgCTBr5, TgCTBr9 e EGS) e desafiados (TgCTBr5+TgCTBr9 e TgCTBr5+EGS) nas horas/dias após infecção ou desafio está representada na Tabela 10. Esta tabela contém os resultados da interpretação final associando o resultado da PCR-RFLP e bioensaio.

A presença de *T. gondii* nos tecidos de camundongos BALB/c no grupo TgCTBr9 foi detectada a partir de 7 DPI no intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro. No grupo EGS foi detectada a partir de 24 HPI no linfonodo mesentérico e cérebro. Entretanto, nos animais do grupo TgCTBr5, foi demonstrada a presença de *T. gondii* a partir de 2 HPI no intestino, a partir de 48 HPI no pulmão, e a partir de 7 DPI no linfonodo mesentérico e no cérebro.

O padrão de disseminação tecidual da cepa TgCTBr9 utilizada na reinfecção dos animais cronicamente infectados pela cepa TgCTBr5 (grupo TgCTBr5+TgCTBr9), demonstrou a presença precoce da cepa virulenta no cérebro em apenas 2 HPD. Este é provavelmente um achado fortuito, uma vez que a presença da cepa TgCTBr9 somente foi detectada novamente no cérebro de animais desafiados após 48 HPD e 30 DPD. A partir de 4 HPD a cepa TgCTBr9 foi detectada no intestino e pulmão deste grupo. Por fim, foi detectada a partir dos 7 DPD no linfonodo mesentérico.

No grupo TgCTBr5+EGS, a presença da cepa virulenta EGS após o desafio foi identificada a partir de 2 HPD no pulmão. A partir de 24 HPD a cepa EGS foi identificada no cérebro e, a partir de 7 DPD, no linfonodo mesentérico. A cepa EGS somente foi detectada no intestino de camundongos desafiados a partir de 14 DPD (Tabela 10).

Tabela 5: PCR-RFLP de camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr5 de *T. gondii* (n = 3 camundongos para cada horas/dias após primoinfecção). O bioensaio foi avaliado pela presença de anticorpos anti-*T.gondii* pelo método de ELISA ou morte dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro coletados com 2, 4, 8, 12, 24, 48 horas pós infecção e 7, 14 e 30 dias pós infecção dos animais provenientes do experimento de primoinfecção.

Órgãos	Horas/dias após primoinfecção	Grupo TgCTBr5 (alelo III)		
		Primoinfecção	Bioensaio ^b	Interpretação final ^c
		PCR-RFLP ^a	ELISA ou morte	PCR-RFLP e/ou Bioensaio
Intestino	2 horas	2/3 ¹ (III)	-	+
	4 horas	1/3 (III)	-	+
	8 horas	-	-	-
	12 horas	1/3 (III)	-	+
	24 horas	1/3 (III)	-	+
	48 horas	-	-	-
	7 dias	3/3 (III)	-	+
	14 dias	3/3 (III)	+	+
	30 dias	3/3 (III)	-	+
Linfonodo mesentérico	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	-	-
	48 horas	-	-	-
	7 dias	3/3 (III)	+	+
	14 dias	3/3 (III)	+	+
	30 dias	2/3 (III)	-	+
Pulmão	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	-	-
	48 horas	-	+	+
	7 dias	3/3 (III)	+	+
	14 dias	3/3 (III)	-	+
	30 dias	3/3 (III)	†	+
Cérebro	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	-	-
	48 horas	-	-	-
	7 dias	2/3 (III)	+	+
	14 dias	3/3 (III)	†	+
	30 dias	3/3 (III)	†	+

+ ELISA positivo.

- PCR/ELISA negativo.

† Morte dos camundongos *Swiss* do bioensaio.

^aPCR-RFLP dos 3 camundongos BALB/c infectados com a cepa TgCTBr5 de *T. gondii*. ¹Total de amostras que apresentaram o perfil genotípico indicado entre parênteses/ Total de amostras submetidas à RFLP.

^bBioensaio dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro de três camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr5 de *T. gondii*.

^cInterpretação final associando o resultado da PCR-RFLP e bioensaio. O sinal positivo (+) indica presença e o sinal negativo (-) indica ausência da cepa utilizada na primoinfecção.

Tabela 6: PCR-RFLP de camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* (n = 3 camundongos para cada horas/dias após primoinfecção). O bioensaio foi avaliado pela presença de anticorpos anti-*T.gondii* pelo método de ELISA ou morte dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro coletados com 2, 4, 8, 12, 24, 48 horas pós infecção e 7 dias pós infecção dos animais provenientes do experimento de primoinfecção.

Órgãos	Horas/dias após primoinfecção	Grupo TgCTBr9 (alelo I)		
		Primoinfecção	Bioensaio ^b	Interpretação final ^c
		PCR-RFLP ^a	ELISA ou morte	PCR-RFLP e/ou Bioensaio
Intestino	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	-	-
	48 horas	-	-	-
	7 dias	3/3 ¹ (I)	-	+
Linfonodo mesentérico	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	-	-
	48 horas	-	-	-
	7 dias	3/3 (I)	-	+
Pulmão	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	-	-
	48 horas	-	-	-
	7 dias	3/3 (I)	†	+
Cérebro	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	-	-
	48 horas	-	-	-
	7 dias	-	+	+

+ ELISA positivo.

- PCR/ELISA negativo.

† Morte dos camundongos *Swiss* do bioensaio.

^aPCR-RFLP dos 3 camundongos BALB/c infectados com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii*. ¹Total de amostras que apresentaram o perfil genotípico indicado entre parênteses/ Total de amostras submetidas à RFLP.

^bBioensaio dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro de três camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii*.

^cInterpretação final associando o resultado da PCR-RFLP e bioensaio. O sinal positivo (+) indica presença e o sinal negativo (-) indica ausência da cepa utilizada na primoinfecção.

Tabela 7: PCR-RFLP de camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa EGS de *T. gondii* (n= 3 camundongos para cada horas/dias após primoinfecção). O bioensaio foi avaliado pela presença de anticorpos anti-*T.gondii* pelo método de ELISA ou morte dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro coletados com 2, 4, 8, 12, 24, 48 horas pós infecção e 7 dias pós infecção dos animais provenientes do experimento de primoinfecção.

Órgãos	Horas/dias após primoinfecção	Grupo EGS (alelo I)		
		Primoinfecção	Bioensaio ^b	Interpretação final ^c
		PCR-RFLP ^a	ELISA ou morte	PCR-RFLP e/ou Bioensaio
Intestino	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	-	-
	48 horas	-	-	-
	7 dias	3/3 ¹ (I)	-	+
Linfonodo mesentérico	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	†	+
	48 horas	-	-	-
	7 dias	3/3 (I)	†	+
Pulmão	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	-	-
	48 horas	-	-	-
	7 dias	3/3 (I)	†	+
Cérebro	2 horas	-	-	-
	4 horas	-	-	-
	8 horas	-	-	-
	12 horas	-	-	-
	24 horas	-	†	+
	48 horas	-	-	-
	7 dias	-	†	+

- PCR/ELISA negativo.

† Morte dos camundongos *Swiss* do bioensaio.

^aPCR-RFLP dos 3 camundongos BALB/c infectados com a cepa EGS de *T. gondii*. ¹Total de amostras que apresentaram o perfil genotípico indicado entre parênteses/ Total de amostras submetidas à RFLP.

^bBioensaio dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro de três camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa EGS de *T. gondii*.

^cInterpretação final associando o resultado da PCR-RFLP e bioensaio. O sinal positivo (+) indica presença e o sinal negativo (-) indica ausência da cepa utilizada na primoinfecção.

Tabela 8: PCR-RFLP de camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* (n = 3 camundongos para cada horas/dias pós-desafio). O bioensaio foi avaliado pela presença de anticorpos anti-*T.gondii* pelo método de ELISA, morte dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro coletados com 2, 4, 8, 12, 24, 48 horas pós-desafio e 7, 14 e 30 dias pós-desafio. O bioensaio também foi avaliado através da PCR-RFLP no pulmão dos camundongos *Swiss* mortos durante o bioensaio para confirmar se a morte foi consequência da cepa virulenta usada no desafio.

Órgãos	Horas/dias pós-desafio	Grupo TgCTBr5+TgCTBr9 (alelos III+I)			
		Reinfecção	Bioensaio ^b		Interpretação final ^d (presença da cepa usada no desafio)
		PCR-RFLP ^a	ELISA ou morte	PCR-RFLP ^c	PCR-RFLP ^a e/ou Bioensaio
Intestino	2 horas	3/3 ¹ (III)	+	nr	-
	4 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	8 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	12 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	24 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	48 horas	3/3 (III)	-	nr	-
	7 dias	3/3 (III)	†	III+I	+
	14 dias	2/3 (III+I) - 1/3 (III)	+	nr	+
	30 dias	3/3 (III)	†	III+I	+
Linfonodo mesentérico	2 horas	3/3 (III)	-	nr	-
	4 horas	3/3 (III)	-	nr	-
	8 horas	3/3 (III)	-	nr	-
	12 horas	2/3 (III)	+	nr	-
	24 horas	1/3 (III)	+	nr	-
	48 horas	2/3 (III)	+	nr	-
	7 dias	1/3 (III+I)	-	nr	+
	14 dias	1/3 (I) - 1/3 (III)	-	nr	+
	30 dias	1/3 (I)	-	nr	+
Pulmão	2 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	4 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	8 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	12 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	24 horas	3/3 (III)	†	III	-
	48 horas	2/3 (III)	†	III+I	+
	7 dias	3/3 (III)	+	nr	-
	14 dias	1/3 (I) - 2/3 (III)	†	III+I	+
	30 dias	1/3 (III+I) - 2/3 (III)	+	nr	+
Cérebro	2 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	4 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	8 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	12 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	24 horas	3/3 (III)	†	III	-
	48 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	7 dias	3/3 (III)	+	nr	-
	14 dias	3/3 (III)	+	nr	-
	30 dias	1/3 (III+I) - 2/3 (III)	†	III+I	+

+ ELISA positivo; - ELISA negativo

† Morte do camundongo *Swiss* usado no bioensaio.

^aPCR-RFLP dos 3 camundongos BALB/c cronicamente infectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii*: alelo III indica presença da cepa TgCTBr5; alelo I indica presença da cepa TgCTBr9; alelos III+I indica a presença simultânea das cepas TgCTBr5 e TgCTBr9. ¹Total de amostras que apresentaram o perfil genotípico indicado entre parênteses/Total de amostras submetidas à RFLP.

^bBioensaio dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro de três camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii*.

^cPCR-RFLP no pulmão dos camundongos *Swiss* que morreram durante o bioensaio

^dInterpretação final associando o resultado da PCR-RFLP dos animais do experimento de reinfecção e bioensaio. O sinal positivo (+) indica a presença e o sinal negativo (-) indica a ausência da cepa do desafio.

nr = a PCR-RFLP não foi realizada, animais do bioensaio sobreviveram.

Tabela 9: PCR-RFLP de camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa EGS de *T. gondii* (n = 3 camundongos para cada horas/dias pós-desafio). O bioensaio foi avaliado pela presença de anticorpos anti-*T. gondii* pelo método de ELISA, morte dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro coletados com 2, 4, 8, 12, 24, 48 horas pós-desafio e 7, 14 e 30 dias pós-desafio. O bioensaio também foi avaliado através da PCR-RFLP no pulmão dos camundongos *Swiss* mortos durante o bioensaio para confirmar se a morte foi consequência da cepa virulenta usada no desafio.

Órgãos	Horas/dias pós-desafio	Grupo TgCTBr5+EGS (alelos III+I)			
		Reinfecção	Bioensaio ^b		Interpretação final ^d (presença da cepa usada no desafio)
		PCR-RFLP ^a	ELISA ou morte	PCR-RFLP ^c	PCR-RFLP ^a e/ou Bioensaio
Intestino	2 horas	2/3 ¹ (III)	+	nr	-
	4 horas	3/3 (III)	†	III	-
	8 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	12 horas	3/3 (III)	†	III	-
	24 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	48 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	7 dias	3/3 (III)	†	III	-
	14 dias	2/3 (III+I) - 1/3 (III)	†	III	+
	30 dias	3/3 (III)	†	III+I	+
Linfonodo mesentérico	2 horas	2/3 (III)	+	nr	-
	4 horas	2/3 (III)	+	nr	-
	8 horas	2/3 (III)	+	nr	-
	12 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	24 horas	-	+	nr	-
	48 horas	2/3 (III)	†	III	-
	7 dias	3/3 (I)	+	nr	+
	14 dias	3/3 (I)	†	I	+
	30 dias	3/3 (I)	†	I	+
Pulmão	2 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	4 horas	3/3 (III)	†	III	-
	8 horas	3/3 (III)	†	III	-
	12 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	24 horas	3/3 (III)	†	III +I	+
	48 horas	3/3 (III)	†	III	-
	7 dias	1/3 (III+I) - 2/3 (III)	+	nr	+
	14 dias	2/3 (I)- 1/3 (III+I)	†	III+I	+
	30 dias	2/3 (III+I)	+	nr	+
Cérebro	2 horas	3/3 (III)	†	III	-
	4 horas	3/3 (III)	†	III	-
	8 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	12 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	24 horas	3/3 (III)	†	III+I	+
	48 horas	3/3 (III)	+	nr	-
	7 dias	3/3 (III)	+	nr	-
	14 dias	1/3 (III+I) - 2/3 (III)	†	III	+
	30 dias	2/3 (III+I) - 1/3 (III)	†	I	+

+ ELISA positivo; - PCR negativa

† Morte do camundongo *Swiss* usado no bioensaio.

^aPCR-RFLP dos 3 camundongos BALB/c cronicamente infectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa EGS de *T. gondii*: alelo III indica presença da cepa TgCTBr5; alelo I indica presença da cepa EGS; alelos III+I indica a presença simultânea das cepas TgCTBr5 e EGS. ¹Total de amostras que apresentaram o perfil genotípico indicado entre parênteses/Total de amostras submetidas à RFLP.

^bBioensaio dos camundongos *Swiss* inoculados com o pool do intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro de três camundongos BALB/c primoinfectados com a cepa TgCTBr5 e desafiados com a cepa EGS de *T. gondii*.

^cPCR-RFLP no pulmão dos camundongos *Swiss* que morreram durante o bioensaio.

^dInterpretação final associando o resultado da PCR-RFLP dos animais do experimento de reinfecção e bioensaio, o sinal positivo (+) indica a presença e o sinal negativo (-) indica a ausência da cepa do desafio.

nr = a PCR-RFLP não foi realizada, animais do bioensaio sobreviveram.

Tabela 10: Disseminação tecidual de *T. gondii* comparativa entre os grupos primoinfectados (TgCTBr5, TgCTBr9 e EGS) e desafiados (TgCTBr5+TgCTBr9 e TgCTBr5+EGS) nas horas/dias após primoinfecção ou desafio.

Órgãos	Horas/ dias após primoinfecção ou desafio	TgCTBr5	TgCTBr9	TgCTBr5+TgCTBr9	EGS	TgCTBr5+EGS
Intestino	2 horas	III ^c	- ^a	-	-	-
	4 horas	III	-	III+I ^d	-	-
	8 horas	-	-	III+I	-	-
	12 horas	III	-	-	-	-
	24 horas	III	-	III+I	-	-
	48 horas	-	-	-	-	-
	7 dias	III	I ^b	III+I	I	-
	14 dias	III	nr	III+I	nr	III+I
	30 dias	III	nr	III+I	nr	III+I
Linfonodo mesentérico	2 horas	-	-	-	-	-
	4 horas	-	-	-	-	-
	8 horas	-	-	-	-	-
	12 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	I	-
	48 horas	-	-	-	-	-
	7 dias	III	I	III+I	I	III+I
	14 dias	III	nr	III+I	nr	III+I
	30 dias	III	nr	III+I	nr	III+I
Pulmão	2 horas	-	-	-	-	III+I
	4 horas	-	-	III+I	-	-
	8 horas	-	-	III+I	-	-
	12 horas	-	-	III+I	-	III+I
	24 horas	-	-	-	-	III+I
	48 horas	III	-	III+I	-	-
	7 dias	III	I	-	I	III+I
	14 dias	III	nr	III+I	nr	III+I
	30 dias	III	nr	III+I	nr	III+I
Cérebro	2 horas	-	-	III+I	-	-
	4 horas	-	-	-	-	-
	8 horas	-	-	-	-	-
	12 horas	-	-	-	-	-
	24 horas	-	-	-	I	III+I
	48 horas	-	-	III+I	-	-
	7 dias	III	I	-	I	-
	14 dias	III	nr	-	nr	III+I
	30 dias	III	nr	III+I	nr	III+I

a - A cepa utilizada na primoinfecção ou desafio não foi encontrada.

b - alelo I corresponde a cepa TgCTBr9 ou EGS.

c - alelo III corresponde a cepa TgCTBr5.

d - presença dos alelos III e I correspondem ao sucesso da reinfecção.

nr - não realizado pois não houve camundongos sobreviventes.

6. DISCUSSÃO

Acreditava-se que a infecção primária com *T. gondii* gerava uma imunidade protetora que impedia a reinfecção do hospedeiro (Filisetti e Candolfi, 2004). No entanto, casos de toxoplasmose congênita em mulheres imunocompetentes cronicamente infectadas foram relatados, sugerindo a possibilidade de reinfecção em humanos (Silveira et al., 2003, Elbez-Rubinstein et al., 2009). Assim, diversos autores utilizando modelos murinos tem evidenciado que a imunidade adquirida na toxoplasmose não protege totalmente o hospedeiro após reexposição ao parasito especialmente se a cepa de *T. gondii* é não clonal (Elbez-Rubinstein et al., 2009; Brandão et al., 2009; Jensen et al., 2015; Franco et al., 2015; Costa, 2016). No entanto, não há informações disponíveis sobre a reinfecção de hospedeiros experimentais com cepas brasileiras de *T. gondii* isoladas de casos de toxoplasmose congênita e nem sobre a disseminação do parasito em diferentes órgãos nas primeiras horas ou dias após o desafio, momentos correspondentes à fase aguda da infecção.

É bem conhecido que a suscetibilidade a infecção por *T. gondii* está relacionado com o *background* genético dos camundongos, a cepa do parasito, a via de inoculação e o nível de infecção (Zenner et al., 1998). O presente trabalho é o primeiro a utilizar cepas isoladas exclusivamente de humanos, particularmente do sangue periférico de recém-nascidos (TgCTBr5 e TgCTBr9) e do líquido amniótico de gestante (EGS). A fim de mimetizar a infecção que ocorre naturalmente nos hospedeiros intermediários, optamos por realizar a primoinfecção e o desafio por meio da inoculação de cistos teciduais pela via oral. Como modelo experimental, foram utilizados camundongos da linhagem isogênica BALB/c por serem susceptíveis a reinfecção com diferentes cepas de *T. gondii*, evidenciado anteriormente pelo nosso grupo (Brandão et al., 2009, Brandão et al., 2011, Silva et al., 2012, Costa, 2016).

Os animais primoinfectados pela cepa TgCTBr5 (grupo TgCTBr5) apresentaram 100% de sobrevivência. O mesmo resultado foi demonstrado previamente pelo nosso grupo (Carneiro et al., 2013, Pinheiro et al., 2015) onde camundongos BALB/c infectados i.p. com diferentes doses de taquizoítos ou por via oral com 10 cistos teciduais da cepa TgCTBr5 sobreviveram 30 dias após a inoculação.

Todos os animais cronicamente infectados com a cepa avirulenta TgCTBr5 sobreviveram após o desafio com a cepa virulenta TgCTBr9 ou EGS. O oposto foi observado nos animais sem infecção prévia com a cepa TgCTBr5, com mortalidade de 100% dos camundongos após inoculação com as cepas virulentas TgCTBr9 e EGS. Corroborando com nossos resultados, um estudo realizado por Brandão e colaboradores (2009) demonstrou que o

desafio com as cepas virulentas EGS ou CH3 não conduziu à morte dos animais 45 dias após a primoinfecção com a cepa D8. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva e colaboradores (2012) utilizando no desafio as mesmas cepas do estudo anterior em animais cronicamente infectados pela cepa avirulenta ME49. Mais recentemente, em um estudo realizado por Franco e colaboradores (2015) foi observado que todos os animais cronicamente infectados com a cepa ME49 sobreviveram após reinfecção com taquizoítos das cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2, ambas de genótipo atípico. Desta forma, nossos resultados sugerem que a primoinfecção com a cepa TgCTBr5 foi capaz de induzir uma resposta imune eficiente protegendo os animais da morte causada pelas cepas virulentas, possibilitando, assim, o estudo da reinfecção.

Quando a morbidade foi analisada após a primoinfecção ou desafio, foi observado que os animais dos grupos TgCTBr5 e TgCTBr5+EGS apresentaram um leve aumento do peso ao longo dos 30 dias de acompanhamento. Por outro lado, a reinfecção interferiu no ganho de peso dos animais do grupo TgCTBr5+TgCTBr9 entre o 26º e 30º após o desafio. Já os animais dos grupos EGS e TgCTBr9, sem nenhuma infecção prévia, apresentaram uma queda de peso brusca com sinais típicos da toxoplasmose experimental antes de morrerem. Resultados semelhantes foram demonstrados por Costa (2016) onde camundongos cronicamente infectados pela cepa D8 apresentaram baixa morbidade após o desafio com a cepa virulenta EGS ou CH3, enquanto a infecção aguda com cepas virulentas causaram perda de peso rápida, significativa e irreversível.

A resposta imune celular foi recentemente avaliada pelo nosso grupo no modelo murino de reinfecção por *T. gondii* (Costa, 2016). Foi observado que em animais desafiados não ocorre um aumento significativo de citocinas inflamatórias ou modulatórias no soro ou mesmo no local de infecção (intestino) em comparação aos animais apenas com infecção crônica. No presente estudo, avaliamos a produção de anticorpos em diferentes momentos da primoinfecção e da reinfecção. Sobre a produção de anticorpos nos momentos iniciais da primoinfecção com a cepa TgCTBr5, observou-se uma elevação rápida de IgG2a e de IgM, seguido de IgG1 e, mais tardiamente, de IgA.

O rápido desenvolvimento de uma resposta adaptativa Th1, associado à intensa produção de IFN- γ nos dias iniciais da primoinfecção (Costa, 2016), provavelmente está associado à elevação rápida dos níveis de anticorpos IgG2a observados neste estudo (14 dias de primoinfecção). Por outro lado, IgG1, que é descrito como um marcador de fase crônica e regulado por IL-4, IL-5 e IL-10 (Correa et al., 2007), somente atingiu níveis significativos na 4ª semana de primoinfecção com a cepa TgCTBr5.

IgA tem sido descrita como um anticorpo importante no controle de reinfecções. Em nosso modelo, os resultados de RFLP e bioensaio, discutidos a seguir, mostram que a reinfecção ocorreu em vários animais, apesar de não ter ocorrido a morte causada pela cepa usada no desafio. O sucesso da reinfecção pode também estar associado aos baixos níveis de IgA observados no dia do desafio, o que pode estar relacionado também com uma possível baixa de IL-10, observada em animais reinfecados em modelo semelhante ao usado no presente trabalho (Costa, 2016), uma vez que a produção de IgA é aumentada por estímulo desta citocina (Defrance et al., 1992).

A imunidade humoral exerce um papel fundamental na resistência à infecção secundária por *T. gondii*. Geralmente, durante uma reinfecção é observado o aumento nos níveis de IgG e o surgimento de anticorpos IgM e/ou IgA (Gavinet et al., 1997; Elbez-Rubinstein et al., 2009). Em nosso estudo, a produção de anticorpos IgG total, IgG2a, IgM e IgA não mostrou alterações significativas após a reinfecção. No entanto, os animais do grupo TgCTBr5+TgCTBr9 apresentaram um rápido, porém significativo aumento nos níveis de IgG1 anti-*T. gondii* no 7º e 14º dia pós-desafio em relação ao grupo TgCTBr5, sugerindo o estabelecimento após a reinfecção de uma resposta imune do tipo Th2. O perfil imunológico do tipo Th2 é caracterizado pela produção de citocinas anti-inflamatórias e anticorpos IgG1 que é um marcador da fase crônica (Fiorentino et al., 1989; Correa et al., 2007). Curiosamente, o grupo TgCTBr5+TgCTBr9 foi o que apresentou perda de peso significativa após o desafio.

A produção de anticorpos IgM, IgA, IgG total, IgG1 e IgG2a por ELISA após reinfecção em camundongos BALB/c com cepas atípicas de *T. gondii* foi estudado por Silva e colaboradores (2012), os quais demonstraram níveis significativamente mais elevados de IgA, 30 dias após reinfecção em relação ao dia 0, quando primoinfectados com a cepa D8 e desafiados com a cepa EGS, ou primoinfectados com a cepa ME49 e desafiados com a cepa EGS ou CH3. Franco e colaboradores (2015) avaliaram o perfil da resposta imune humoral pela mensuração de anticorpos IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) em fêmeas grávidas de *C. callosus* cronicamente infectadas com a cepa ME49 e reinfecadas com as cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2. Foi observado que as fêmeas reinfecadas com a cepa TgChBrUD1 apresentaram menor razão entre os níveis de IgG2a e IgG1, sugerindo o estabelecimento de uma resposta imune humoral do tipo Th2 após a reinfecção, o que foi relacionado com os melhores resultados gestacionais, isto é, menor taxa de fetos reabsorvidos. Por outro lado, as fêmeas reinfecadas com a cepa TgChBrUD2 apresentaram níveis mais elevados de anticorpos IgG2a, sugerindo predominância da resposta Th1 relacionado com

maior número de animais com perda fetal e maior taxa de reabsorção fetal. Nossos resultados, analisados junto aos de Franco e colaboradores (2015), sugerem uma variabilidade na produção das diferentes subclasses de IgG, dependendo da cepa de *T. gondii* envolvida na reinfecção.

A dinâmica de disseminação tecidual de *T. gondii* varia entre a cepa do parasito, espécie do hospedeiro, via de inoculação. Vários métodos já foram descritos para monitorar a disseminação tecidual de *T. gondii* em animais experimentais, incluindo técnicas tradicionais como cultivo celular de órgãos parasitados (Zenner et al., 1998) e PCR em tempo real (Djurkovic-Djakovic et al., 2012). Neste trabalho, utilizamos a associação de testes como bioensaio, ELISA e PCR-RFLP para monitorar a disseminação de *T. gondii* em um modelo de reinfecção.

No bioensaio de camundongos primoinfectados dos grupos TgCTBr5, TgCTBr9 e EGS, por se tratar de animais infectados com uma única cepa, o ELISA positivo ou a morte do animal foram os parâmetros utilizados para indicar a presença do parasito nos diferentes órgãos avaliados.

Para identificar a presença e disseminação da cepa virulenta de *T. gondii* usada no desafio (cepa TgCTBr9 ou EGS) utilizamos a PCR-RFLP do marcador L358 (Costa, 2016) em DNA extraído dos órgãos de camundongos BALB/c primoinfectados e desafiados e o bioensaio de fragmentos de órgãos dos camundongos BALB/c primoinfectados e desafiados conforme descrito por Brandão e colaboradores (2009) com modificações. A disseminação tecidual de *T. gondii* foi então demonstrada neste trabalho através da associação dos resultados obtidos da PCR-RFLP em DNA extraído dos órgãos de camundongos BALB/c primoinfectados e desafiados, com os resultados do bioensaio. Estes resultados estão sumarizados na Tabela 10.

A infecção natural por *T. gondii* ocorre através da ingestão oral de cistos teciduais que se rompem no intestino delgado, liberando bradizoítos que invadem a lâmina própria, antes de se disseminarem pelo hospedeiro. Vários estudos indicam que o principal sítio de replicação do parasito está no íleo (Greeg et al., 2013). Os resultados do intestino aqui obtidos mostraram uma disseminação precoce da cepa avirulenta TgCTBr5 detectada a partir de 2 horas pós-infecção, em comparação com as cepas virulentas TgCTBr9 e EGS detectadas a partir do 7º dia pós-infecção. Trabalhos descritos na literatura estão condizentes com os nossos resultados, como o estudo realizado por Dubey (1997) demonstrando que os parasitos podem ser encontrados dentro das células epiteliais intestinais, principalmente o íleo, tão cedo como 1 hora após a inoculação oral e, logo após, invadem a lâmina própria. Por outro lado,

Costa (2016) após a inoculação oral de cistos teciduais das cepas EGS e CH3 em camundongos BALB/c, observou a presença dos parasitos no intestino somente uma semana após a infecção.

Nos grupos reinfectedos foi observado uma diferença na disseminação das cepas virulentas após o desafio, com a presença precoce da cepa TgCTBr9 no intestino a partir de 4 horas pós-desafio e presença tardia da cepa EGS detectada a partir de 14 e 30 dias pós-desafio. Este resultado é inédito e, portanto, sugerimos que estudos posteriores devem ser conduzidos para verificar se o mesmo tipo de evento ocorre com diferentes cepas virulentas de genótipo atípico, isoladas no Brasil.

A infecção aguda por *T. gondii* resulta em linfadenopatia e colonização parasitária dos gânglios linfáticos (Harker et al., 2015). No linfonodo mesentérico a presença da cepa EGS foi detectada a partir de 24 horas pós-infecção, enquanto o DNA da cepa TgCTBr5 e TgCTBr9 foi detectado a partir do 7º dia pós-infecção. Quando nós testamos a disseminação das cepas virulentas TgCTBr9 e EGS no linfonodo mesentérico de um hospedeiro previamente infectado com a cepa TgCTBr5, nós detectamos no grupo TgCTBr5+TgCTBr9 e no grupo TgCTBr5+EGS a presença das cepas virulentas a partir do 7º dia após o desafio. Segundo Luu e Coombes (2015) o *T. gondii* chega aos linfonodos mesentéricos nos primeiros dias após a infecção oral, iniciando uma resposta imune vigorosa. Os parasitos podem ser transportados para o nódulo linfático por células dendríticas que migram do intestino ou podem chegar livremente na linfa. No estudo realizado por Dubey (1997) foi demonstrado a chegada de uma cepa clonal de *T. gondii* nos linfonodos mesentéricos 24 horas após inoculação oral. Ito e colaboradores (1967) mostraram que em camundongos infectados pela via i.p. com a cepa RH, clonal do tipo I, os linfonodos mesentéricos estavam parasitados no 4º dia após infecção. Segundo Harker e colaboradores (2015) taquizoítos de cepas clonais do tipo I colonizam o linfonodo mesentérico mais eficazmente do que os parasitos clonais do tipo II, quando inoculados em camundongos como parasitos extracelulares. Os estudos presentes na literatura sobre a disseminação de *T. gondii* no linfonodo mesentérico foram realizados apenas com cepas clonais. A disseminação com cepas de genótipo atípico no linfonodo mesentérico não havia sido relatada até o momento.

Os resultados da disseminação tecidual de *T. gondii* no pulmão dos grupos primoinfectados demonstraram a presença da cepa TgCTBr5 a partir de 48 horas pós-infecção e das cepas TgCTBr9 e EGS a partir do 7º dia após-infecção. No entanto, no grupo reinfectedo TgCTBr5+EGS, o DNA da cepa utilizada no desafio foi encontrado no pulmão a partir de 2 horas pós-desafio e no grupo TgCTBr5+TgCTBr9 foi encontrado a partir de 4

horas pós-desafio. Portanto, nossos resultados demonstraram que o pulmão foi o órgão mais parasitado após a reinfecção. Segundo Djurkovic-Djakovic e colaboradores (2012), o pulmão é o principal órgão a ser fortemente parasitado na infecção com qualquer genótipo de *T. gondii*. Provavelmente, por ser um órgão altamente vascularizado é rapidamente infectado (Zenner et al., 1998). Em um estudo anterior do nosso grupo realizado por Costa (2016) utilizando camundongos BALB/c cronicamente infectados com a cepa avirulenta D8 e posteriormente reinfetados com as cepas virulentas EGS ou CH3, foi demonstrado a presença no pulmão da cepa utilizada no desafio em 71,4% dos animais do grupo D8+EGS e em 100% dos animais do grupo D8+CH3, apenas 48 horas após o desafio.

No cérebro, os nossos resultados demonstraram a presença precoce da cepa EGS 24 horas pós-infecção. No entanto, as cepas TgCTBr5 e TgCTBr9 foram detectadas somente a partir do 7º dia pós-infecção. Nos grupos reinfetados, a presença da cepa virulenta utilizada no desafio do grupo TgCTBr5+TgCTBr9 foi detectada a partir de 2 horas pós-desafio e no grupo TgCTBr5+EGS a partir de 24 horas pós-desafio. Evidências atuais sugerem que *T. gondii* pode penetrar no cérebro através de leucócitos infectados ou como parasitos livres. Também foi demonstrado que os taquizoítos podem infectar diretamente as células endoteliais microvasculares cerebrais, e parasitos extracelulares podem infectar e transmigrar através do endotélio vascular, indicando a possibilidade de uma via extracelular de infecção ou transmigração (Lambert et al., 2011; Harker et al., 2014). No estudo realizado por Djurkovic-Djakovic e colaboradores (2012) foi observada detecção precoce do DNA do parasito no cérebro, mostrando a passagem de *T. gondii* através da barreira hematoencefálica 24 horas após infecção com taquizoítos de cepa RH (clonal Tipo I) e no prazo de 3 dias após a infecção com cistos de uma cepa clonal do Tipo II. De acordo com Harker e colaboradores (2015) em camundongos cronicamente infectados, os focos parasitários são predominantemente encontrados nos lobos frontal e parietal, e localizados em torno da microvasculatura, sugerindo que a infecção ocorre através da corrente sanguínea e barreira hematoencefálica. De modo geral, essas evidências explicariam a detecção precoce da cepa EGS no cérebro 24 horas pós-infecção. Da mesma forma explicaria no cérebro, a detecção precoce da cepa usada no desafio em apenas 2 horas pós-desafio no grupo TgCTBr5+TgCTBr9, e 24 horas pós-desafio no grupo TgCTBr5+EGS. No entanto, outros trabalhos também relatam um atraso de alguns dias da chegada do parasito no cérebro. Dubey (1997) demonstrou que após a infecção de camundongos com bradizoítos da cepa VEG (clonal tipo III), os parasitos foram detectados no cérebro no 6º dia após infecção, nos pulmões a partir do 7º dia de infecção e posteriormente em outros órgãos.

Um perfil misto correspondente à presença da cepa TgCTBr5 usada na primoinfecção simultaneamente com a cepa TgCTBr9 ou EGS usada no desafio, foi observado na maioria das amostras. Entretanto, em alguns animais desafiados a PCR-RFLP identificou apenas a presença da cepa utilizada no desafio. Esse mesmo perfil foi encontrado por Franco e colaboradores (2015) após o desafio com cepas virulentas em animais cronicamente infectados com uma cepa avirulenta, no qual foi demonstrado apenas o DNA da cepa utilizada na reinfecção nos pulmões, baço, fígado e placentas dos animais reinfecados. Para os autores esses resultados não excluem a possibilidade da presença das outras cepas analisadas em cada grupo, uma vez que a baixa concentração de DNA do parasito pode não ser detectada pela PCR.

O bioensaio se mostrou uma eficiente técnica para detecção da cepa virulenta após o desafio, enriquecendo o ensaio molecular. No entanto, algumas vezes os resultados foram contraditórios. Em algumas amostras foi demonstrada a presença da cepa utilizada no desafio pela PCR-RFLP, porém a presença desta não foi demonstrada pelo bioensaio. O contrário também foi observado onde a PCR-RFLP do DNA extraído dos órgãos de camundongos BALB/c desafiados não foi sensível o suficiente em identificar a cepa utilizada na reinfecção. No entanto, quando a presença da segunda cepa foi investigada nos animais do bioensaio, a cepa virulenta foi detectada.

Por mais que tenham sido uniformizadas as regiões dos órgãos utilizados em cada técnica, os fragmentos utilizados para os ensaios moleculares e para o bioensaio não foram os mesmos. Consequentemente as cargas parasitárias presentes em cada fragmento usado também podem ter sido desiguais. Portanto, a diferente detecção de parasitos pelas duas técnicas empregadas, gerando resultados aparentemente contraditórios, pode ser justificada pela utilização de diferentes fragmentos de tecidos do mesmo animal.

Apesar de vários estudos demonstrarem a disseminação tecidual de *T. gondii*, este trabalho foi o primeiro a verificar a presença precoce de parasitos no intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro após a reinfecção em um hospedeiro imunocompetente cronicamente infectado. Estes dados são importantes para entender melhor a patogênese da toxoplasmose além de fornecerem novos *insights* sobre eventos que ocorrem nos momentos iniciais após infecção.

No presente estudo foram identificadas algumas limitações. Os soros utilizados para mensuração por ELISA dos anticorpos anti-*T. gondii* IgG total, IgG1, IgG2a, IgM e IgA dos camundongos BALB/c antes e pós-desafio são dos mesmos animais sacrificados para a coleta de órgãos nos diferentes tempos analisados, ou seja, não foram coletados sistematicamente

dos mesmos camundongos, acompanhados durante todo o curso da primoinfecção e reinfecção. Outra limitação foi o pequeno número de animais (n=3) o que dificultou a realização da análise estatística. Para verificar se os resultados apresentados são realmente consistentes, sugerimos que, em novos estudos, a dosagem de anticorpos anti-*T. gondii* IgG, IgG1, IgG2a, IgM e IgA seja realizada em um grupo com um número maior de camundongos destinados exclusivamente para este fim, de forma que as coletas de soros nos diferentes tempos sejam feitas nos mesmos animais.

A ferramenta molecular utilizada neste estudo para verificar a disseminação tecidual após primoinfecção ou desafio com cepas de *T. gondii* foi a PCR-RFLP. É um método confiável e adequado para este fim, muito utilizado em nosso grupo de trabalho para estudos de infecção por *T. gondii*. No entanto, apresenta a desvantagem de não ser quantitativo sendo utilizada apenas para demonstrar a presença do tipo genético do parasito.

Em relação ao uso do marcador L358 por PCR-RFLP para detectar o parasito nos tecidos, deve ser considerado que ele foi proposto originariamente para diferenciar genótipos de *T. gondii* (Su et al., 2006) e não para diagnóstico. Este marcador foi proposto inicialmente por Costa (2016) para diferenciar baixas concentrações de duas cepas de genótipos distintos. Entretanto sua eficácia em detectar baixas concentrações de parasitos ainda precisa ser confirmada.

7. CONCLUSÕES

- Animais cronicamente infectados por uma cepa avirulenta de *T. gondii* de genótipo atípico sobreviveram e apresentaram morbidade reduzida após o desafio com cepas atípicas altamente virulentas.
- A resposta imune humoral adquirida no modelo experimental proposto é insuficiente para impedir a reinfeção.
- Anticorpos IgG2a são produzidos mais precocemente durante a primoinfecção com cepa avirulenta de *T. gondii* sugerindo uma resposta do tipo Th1.
- A elevação dos níveis de anticorpos IgG1 após o desafio com a cepa TgCTBr9 sugere o estabelecimento de uma resposta imune do tipo Th2.
- A cinética de disseminação da cepa virulenta TgCTBr9 em camundongos portadores de infecção crônica anterior foi distinta da cinética no grupo primoinfectado apenas com a cepa TgCTBr9, com a chegada precoce do parasito no intestino, pulmão e cérebro poucas horas após o desafio.
- A cinética de disseminação da cepa virulenta EGS em camundongos portadores de infecção crônica anterior foi distinta da cinética no grupo primoinfectado apenas com a cepa EGS, com a chegada precoce do parasito no pulmão poucas horas após o desafio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams-Waldorf KM, McAdams RM 2013. Influence of infection during pregnancy on fetal development. *Reproduction* 146: R151-R162.
- Beghetto E, Buffolano W, Spadoni A, Del Pezzo M, Di Cristina M 2003. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J Clin Microbiol* 41: 5414–8.
- Blader IJ, Saeij JP 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *Apmis* 117: 458-476.
- Bojar I, Szymanska J 2010. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii* state of the art. *Ann Agric Environ Med* 17: 209-214.
- Brandão GP, Melo MN, Caetano BC, Carneiro CM, Silva LA, Vitor RWA 2011. Susceptibilidade to re-infecção em C57BL/6 mice with recombinant strains of *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 128: 433-437.
- Brandão GP, Melo MN, Gazzinelli RT, Caetano BC, Ferreira AM, Silva LA, Vitor RWA 2009. Experimental reinfection of BALB/c mice with different recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: involvement of IFN- γ and IL-10. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 241-245.
- Bresciani KD, Costa AJ, Toniollo GH, Luvizzoto MC, Kanamura CT, Moraes FR, Perri SH, Gennari SM 2009. Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines. *Parasitol Res.* 104: 1213-7.
- Cañedo-Solares I, Galván-Ramírez ML, Luna-Pastén H, Pérez LRR, Ortiz-Alegría L B, Rico-Torres CP, Vela-Amieva M, Pérez-Andrade M, Figueroa-Damián R, Correa D 2008. Congenital Toxoplasmosis Specific IgG Subclasses In Mother/Newborn Pairs. *Pediatr Infect Dis J* 27: 469 - 474.
- Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F 2012. Congenital parasitic infections: a review. *Acta Trop* 121: 55-70.
- Carneiro ACAV, Andrade GM, Costa JG, Pinheiro BV, Vasconcelos-Santos DV, Ferreira AD, Su C, Januário JN, Vitor RW 2013. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 51: 3901-3907.
- Cenci-Goga BT, Rossitto PV, Sechi P, McCrindle CM, Cullor JS 2011. *Toxoplasma* in Animals, Food, and Humans: An Old Parasite of New Concern. *Foodborne Pathog Dis* 8: 751-762.
- Chardés T, Bout D 1993. Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res Immunol* 144: 57-60.

Correa D, Cañedo-solares I, Ortiz-alegría LB, Caballero-ortega H, Torres CP 2007. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol* 29: 651-660.

Costa, JGL. *Toxoplasma gondii*: disseminação de parasitos, histopatologia e resposta imune celular em um modelo experimental agudo de reinfecção com cepas atípicas. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais. UFMG, 2016.

Cristina N, Dardé ML, Boudin C, Tavernier G, Pestre-Alexandre M, Ambroise-Thomas PA 1995. DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains, combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. *Parasitol Res* 81: 32-37.

Dabritz HA, Conrad PA 2010. Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. *Zoonoses Public Health* 57: 34-52.

Dao A, Fortier B, Soete M, Plenat F, Dubremetz JF 2001. Successful reinfection of chronically infected mice by a different *Toxoplasma gondii* genotype. *Int J Parasitol* 31: 63-65.

Dardé ML 2008. *Toxoplasma gondii* “new” genotypes and virulence. *Parasite* 15: 366-371.
De Roever-Bonnet H 1969. Congenital toxoplasma infections in mice and hamsters infected with avirulent and virulent strains. *Trop Geogr Med* 21: 443-450.

Decoster A 1996. Detection of IgA anti-P30 (SAG1) antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. *Curr Top Microbio Immunol* 219: 199-207.

Defrance T, Vanbervliet B, Brière F, Durand I, Rousset F, Banchereau J 1992. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naïve human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 175: 671-82.

Del Bono V, Canessa A, Bruzzi P, Fiorelli MA, Terragna A 1989. Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol* 27: 2133-5.

Denkers EY 2003. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 39: 193-203.

Denkers EY, Butcher BA, Bennouna S 2004. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol* 34: 411-421.

Djurković-Djaković O, Djokić V, Vujanić M, Zivković T, Bobić B, Nikolić A, Slavić K, Klun I, Ivoić V 2012. Kinetics of parasite burdens in blood and tissues during murine toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 131: 372-376.

Dollfus H, Dureau P, Hennequin C, Uteza Y, Bron A, Dufier JL 1998. Congenital *toxoplasma* chorioretinitis transmitted by preconceptionally immune women. *Br J Ophthalmol* 82: 1444-1445.

Dubey JP 1986. Toxoplasmosis in cats. *Feline Prac* 16: 12-26.

- Dubey JP 1997. Bradyzoite-Induced Murine Toxoplasmosis: Stage Conversion, Pathogenesis, and Tissue Cyst Formation in Mice Fed Bradyzoites of Different Strains of *Toxoplasma gondii*. *J Euk Microbiol* 44: 592-602.
- Dubey JP 2004. Toxoplasmosis a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 126: 57-72.
- Dubey JP, Beattie CP 1988. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, Florida. CRC Press.
- Dubey JP, 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.
- Dubey JP, Rajendran C, Costa DG, Ferreira LR, Kwok OC, Qu D, Su C, Marvulo MF, Alves LC, Mota RA, Silva JC 2010. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. *J Parasitol* 96: 709-712.
- Dupont CD, Christian DA, Hunter CA 2012. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol* 34: 793-813.
- Dzitko K, Staczek P, Gatkowska J, Dlugonska H 2006. *Toxoplasma gondii*: Serological recognition of reinfection. *Exp Parasitol* 112: 134-137.
- Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P 2009. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection and review. *J Infect Dis* 199: 280-285.
- Elsheikha HM 2008. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. *Public Health* 122: 335-353.
- Ferguson DJ, Hutchison WM 1987. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol Res* 73: 483-491.
- Ferreira AM, Martins MS, Vitor RW 2001. Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brasil. *Parasite* 8: 99-105.
- Ferreira AM, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 6:22-31.
- Ferreira IM, Vidal JE, Costa-silva TA, Meira, C. S, Hiramoto RM, Oliveira AC, Pereira-Chiocola VL 2008. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol* 118: 221-227.
- Ferreira IMR, Brandão De Mattos CC, Ferreira AIC, Frederico FB, Almeida JR GC, Mattos LC, Pereira-Chiocola VL 2010. Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii*

provenientes de pacientes com toxoplasmose ocular residentes em São Jose do Rio Preto, São Paulo, BR. *Rev Saúde* 4:1.

Ferreira MS, Borges AS 2002. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients. *Men Inst Oswaldo Cruz* 97: 443-457.

Filisetti D, Candolfi E 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità* 40: 71-80.

Fiorentino BF, Bond MW, Mosmann TR 1989. Two types of mouse t helper cell. IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-2095.

Fortier B, Pinto-Sousa MI, Ajana F 1991. *Toxoplasma gondii*: 2 cases of recontamination in immune patients. *Press Med* 20: 2109.

Franco OS, Silva NM, Freitas B, Oliveira GA, Ietta F, Shwab EK, Su C, Mineo JR, Ferro EA 2015. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. *Front Microbiol* 6: 181.

Franco PS, Silva DA, Costa IN, Gomes AO, Silva AL, Pena JD, Mineo JR, Ferro EA 2011. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. *Placenta* 32: 116-120.

Frazao-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, De Oliveira FC 2011. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Vet Parasitol* 175: 33-39.

Freyre A, Falcon J, Mendez J, Rodriguez A, Correa L, Gonzalez M 2006. *Toxoplasma gondii*: partial cross-protection among several strains of the parasite against congenital transmission in a rat model. *Exp Parasitol* 112:8-12.

Gavinet MF, Robert F, Firtion G, Delouvrier E, Hennequin C, Maurin JR, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J 1997. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J Clin Microbiol* 35: 1276-1277.

Gazzinelli RT, Amichay D, Scharon-Kersten T, Grunvald E, Faber JM, Sher A 1996. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol* 219: 127-140.

Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A 1991. Synergistic role CD4+ and CD8+ t lymphocytes in INF-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 146: 286-292.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A 1993. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci* 90: 6115-6119.

- Gazzinelli RT, Yuhui X, Hieny S, Cheever A, Sher A 1992. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 149: 175-180.
- Gerlic M, Masters SL 2014. A healthy appetite for *Toxoplasma* at the cellular level. *Immunol Cell Biol* 92: 813-814.
- Gigley JP, Fox BA, Bzik DJ 2009. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii* develops primarily by local Th1 host immune responses in the absence of parasite replication. *J Immunol* 182:1069-1078.
- Gilbert R 2009. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 305-311.
- Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL 2005. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Animal* 34: 39-43.
- Gorgievski-Hrisoho M, Germann D, Matter L 1996. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 34: 1506-1511.
- Gregg B, Taylor BC, John B, Tait-Wojno ED, Girgis NM, Miller N, Wagage Sb, Roos DS, Hunter CA 2013. Replication and Distribution of *Toxoplasma gondii* in the Small Intestine after Oral Infection with Tissue Cysts. *Infect Immun* 81:1635-1643.
- Guo ZG, Johnson AM 1996. DNA polymorphisms associated with murine virulence of *Toxoplasma gondii* identified by RAPD-PCR. *Curr Top Microbiol Immunol* 219: 17-26.
- Harker KS, Jivan E, McWhorter FY, Liu WF, Lodoen MB 2014. Shear forces enhance *Toxoplasma gondii* tachyzoite motility on vascular endothelium. *MBio* 5: e01111-e01113.
- Harker KS, Ueno N, Lodoen MB 2015. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol* 37: 141-149.
- Hennequin C, Dureau P, Nguyen L, Thulliez P, Gagelin B, Dufier JL 1997. Congenital toxoplasmosis acquired from an immune woman. *Pediatr Infect Dis J* 16:75-77.
- Hill D, Sreekumar C, Dubey JP 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev* 6: 41-62.
- Howe DK, Sibley LD 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172: 1561-1566.
- Innes EA 2010. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health* 57: 1-7.
- Ito S, Tsunoda K 1967. Distribution of *Toxoplasma gondii*, Beverley strain, in infected mice as determined by the fluorescent antibody technique and the histopathology of toxoplasmosis. *Natl Inst Anim Health Q* 8: 81-91.

- Jensen KDC, Camejo A, Melo MB, Cordeiro C, Julien L, Grotenbreg GM, Frickel E, Ploegh HL, Young L, Saeij JPJ 2015. *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. *mBio* 6: e02280-14.
- Johnson LL, Sayles PC 2002. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect Immun* 70:185-191.
- Jones JL, Dubey JP 2010. Waterborne Toxoplasmosis—Recent Developments. *Exp Parasitol* 124: 10-25.
- Kang H, Remington JS, Suzuki Y 2000. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 164: 2629-2634
- Khan IA, Schwartzman JD, Matsuura T, Kasper LH 1997. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12955-12960.
- Kravetz JD, Federman DG 2005. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med* 118: 212-216.
- Lambert H, Dellacasa-Lindberg I, Barragan A 2011. Migratory responses of leukocytes infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect* 13: 96–102.
- Lang C, Grob U, Lüder GK 2007. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 100: 191-203.
- Lebas F, Ducrocq S, Mucignat V, Paris L, Mérgier P, Baudon JJ, Gold F 2004. Congenital toxoplasmosis; a new case of infection during pregnancy in a previously immunized and immunocompetent woman. *Arch Pediatr* 11: 926-928.
- Levine ND 1988. The protozoan phylum apicomplexa. Boca Raton, Flórida: CRC Press Vol. 2
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.
- Luu L, Coombes JL 2015. Dynamic two-photon imaging of the immune response to *Toxoplasma gondii* infection. *Parasite Immunol* 37: 118-126.
- Machado-Coelho GLL, Vitor RWA, Chiari CA, Antunes CMF 1995. Validity of serology for American Trypanosomiasis with eluates from filter paper. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 50-64.
- Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965-1976.
- Nascimento FS, Suzuki LA, Branco N, Franco RMB, Andrade PD, Costa SCB, Pedro MN, Rossi CL 2015. *Toxoplasma*-specific IgG subclass antibody response in cerebrospinal fluid samples from patients with cerebral Toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 57: 439-442.

- Neyer LE, Grünig G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA 1997. Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 65: 1675-1682.
- Nguyen TD, Bigaignon G, Van Broeck J, Vercammen M, Nguyen TN, Delmee M, Turneer M, Wolf SF, Coutelier JP 1998. Acute and chronic phases of *Toxoplasma gondii* infection in mice modulate the host immune responses. *Infect Immun* 66: 2991-2995.
- Nicolle C, Manceaux L 1908. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisme voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 148: 763-766.
- Pena HF, Marvulo MF, Horta MC, Silva MA, Silva JC, Siqueira DB, Lima PA, Vitaliano SN, Gennari SM 2011. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Vet Parasitol* 175: 377-381.
- Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii*. *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.
- Petersen E 2007. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 12: 214-223.
- Pifer R, Yarovinsky F 2011. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends Parasitol* 27: 388-393.
- Pinheiro BV, Noviello ML, Cunha MM, Tavares AT, Carneiro ACV, Arantes RM, Vitor RW 2015. Pathological changes in acute experimental toxoplasmosis with *Toxoplasma gondii* strains obtained from human cases of congenital disease. *Exp Parasitol* 156: 87-94.
- Rajasekariah GHR, Ryan JR, Hiller RS, Yi LP, Stiteler JM, Cui L, Smithymam AM, Martin SK 2001. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J Immunol Methods* 252: 105-119.
- Robert-Gangneux F, Dardé ML 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 25: 264-296.
- Santos TR, Faria GdSM, Guerreiro BM, Dal Pietro NHPdS, Lopes WDZ, da Silva HM, Garcia JL, Luvizotto MC, Bresciani KD, Costa AJ 2016. Congenital Toxoplasmosis in Chronically Infected and Subsequently Challenged Ewes. *PLoS ONE* 11: e0165124.
- Serranti D, Buonsenso D, Valentini P 2011. Congenital toxoplasmosis treatment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15: 193-198.
- Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141: 453-461.

- Silva LA, Andrade RO, Carneiro ACAV, Vitor RWA 2014. Overlapping *Toxoplasma gondii* Genotypes circulating in domestic animals and humans in southeastern Brazil. *Plos One* 9: 1–7.
- Silva LA, Brandão GP, Pinheiro BV, Vitor RW 2012. Immunosuppression with cyclophosphamide favors reinfection with recombinant *Toxoplasma gondii* strains. *Parasite* 19: 249-57.
- Silva LA, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC, Vitor RWA 2017. Genetic Polymorphisms and Phenotypic Profiles of Sulfadiazine-Resistant and Sensitive *Toxoplasma gondii* Isolates Obtained from Newborns with Congenital Toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. *PLoS One* 12: e0170689.
- Silveira C, Ferreira R, Muccioli C, Nussenblatt R, Belfort RJr 2003. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. *Am J Ophthalmol* 136: 370-371.
- Soares RM, Silveira LH, Da Silva AV, Ragozo A, Galli S, Lopes EG, Gennari SM, De Jesus Pena HF 2011. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. *Vet Parasitol* 178: 29-34.
- Souza-e-Silva, Vasconcelos-Santos DV, de Andrade GQ, Carellos EV, de Castro Romanelli RM, de Resende LM, Januário JN, Carneiro M, Carneiro ACAV, Vitor RWA 2013. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis J* 32: 13-6.
- Splendore A 1908. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 3: 109-112.
- Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Darde ML, Zhuf XQ, Ajiokag JW, Rosenthal BM, Dubeyh JP, Sibley LD 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprisesix major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 5844-5849.
- 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.
- 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.
- Sumyuen MH, Garin YJE, Derouin E 1995. Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. *J Parasitol* 81: 327-329.
- Talabani H, Mergey T, Yera H, Delair E, Brezin AP, Langsley G, Dupouy-Camet J 2010. Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review. *Parasite* 17: 177-182.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-1258.

Valdès V, Legagneur H, Watrin V, Paris L, Hascoet JM 2010. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *Archives de Pédiatrie* 18:761-763

Vidigal PV, Santos DV, Castro FC, Couto JC, Vitor RWA, Brasileiro-Filho G 2002. Prenatal toxoplasmosis diagnosis from amniotic fluid by PCR. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 1-6.

Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, Paris L, Pelloux H, Villena I, Candolfi E 2016. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 84: 22-23.

Villarino N, Schmidt NW 2013. CD8 T Cell Responses to and Intracellular Parasites. *Curr Immunol Rev* 9: 169-178.

Weiss LM, Dubey JP 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 39: 895-901.

Yarovinsky F 2014. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol* 14: 109-121.

Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF 1998. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol* 90: 86-94.

Anexo 1: Certificado do comitê de ética**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

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

CERTIFICATE

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

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 06/12/2012.

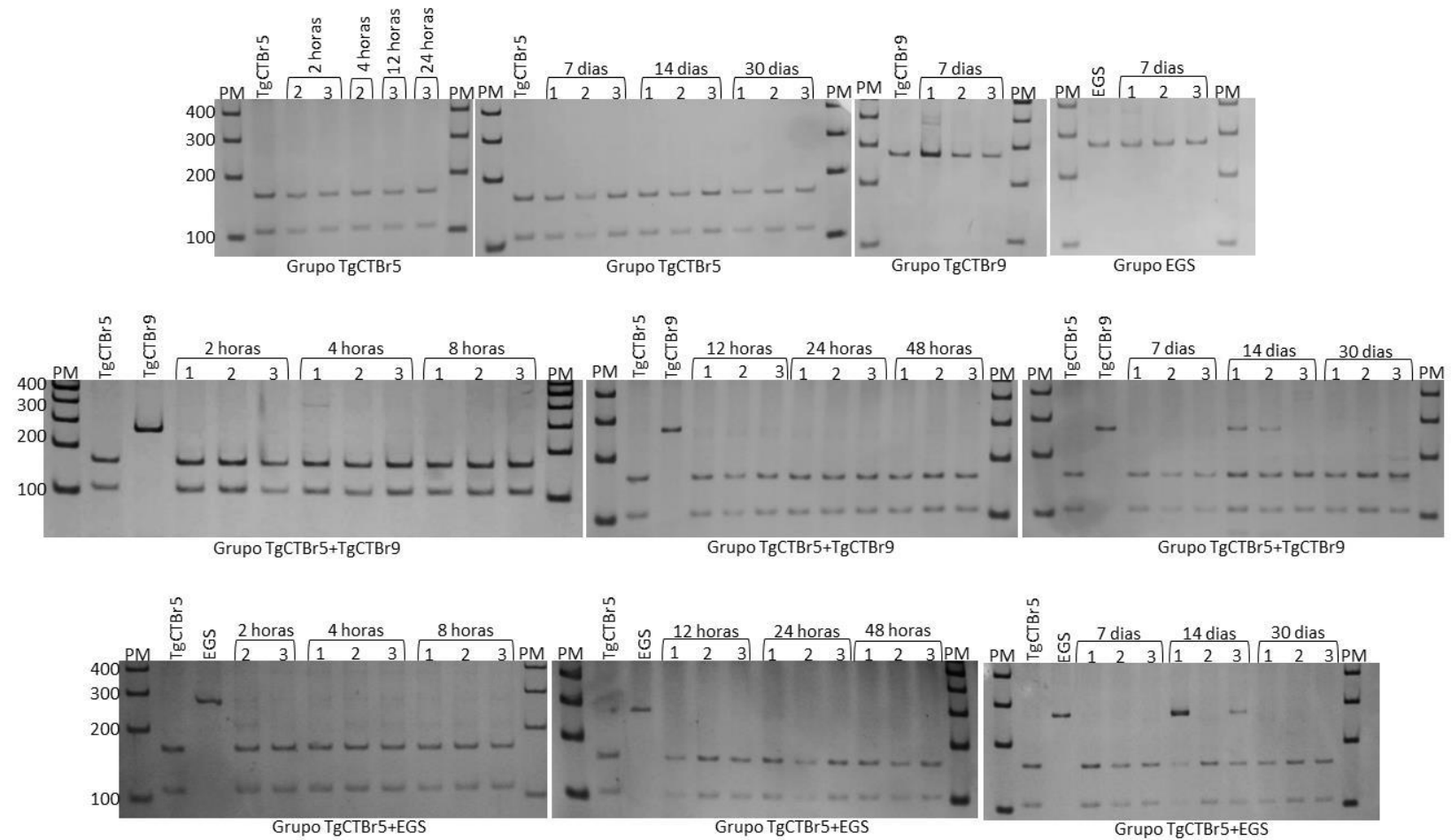
Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

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

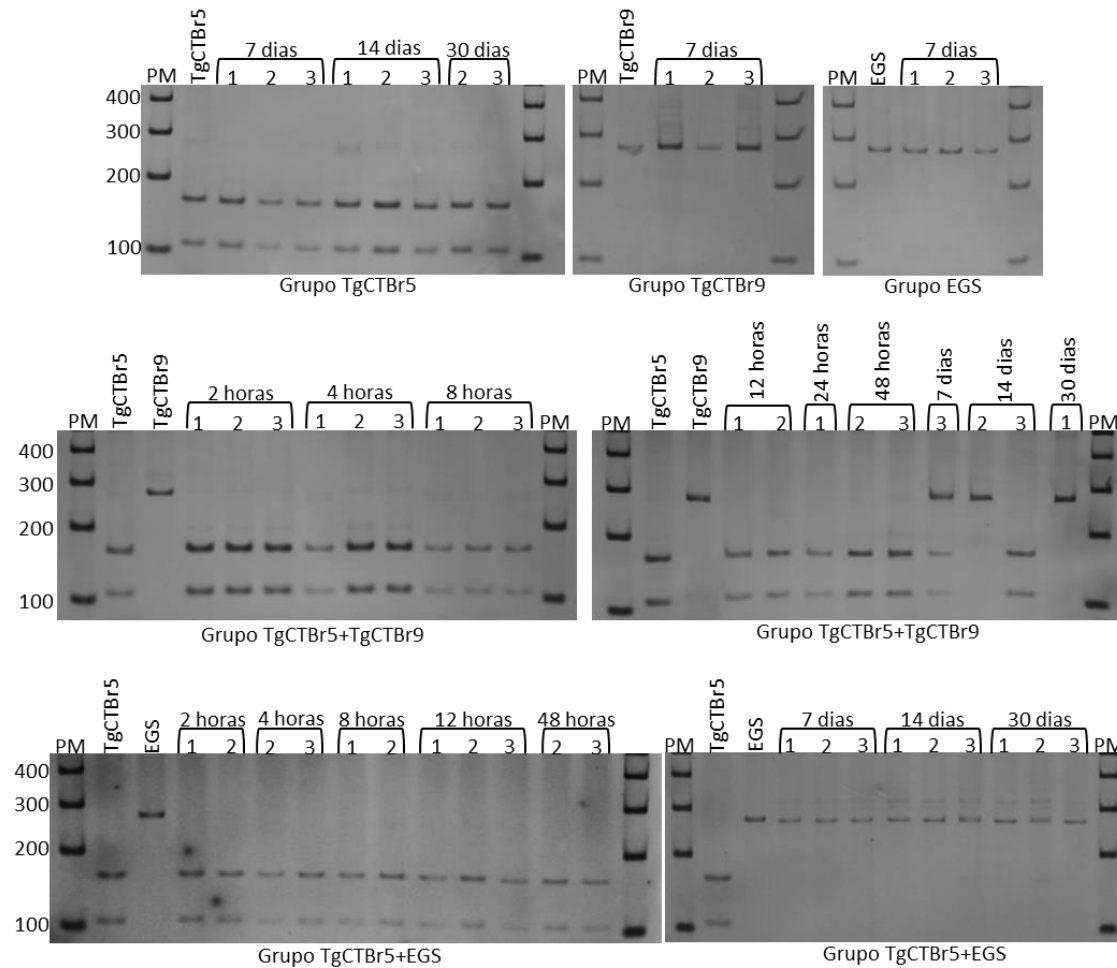
Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

INTESTINO



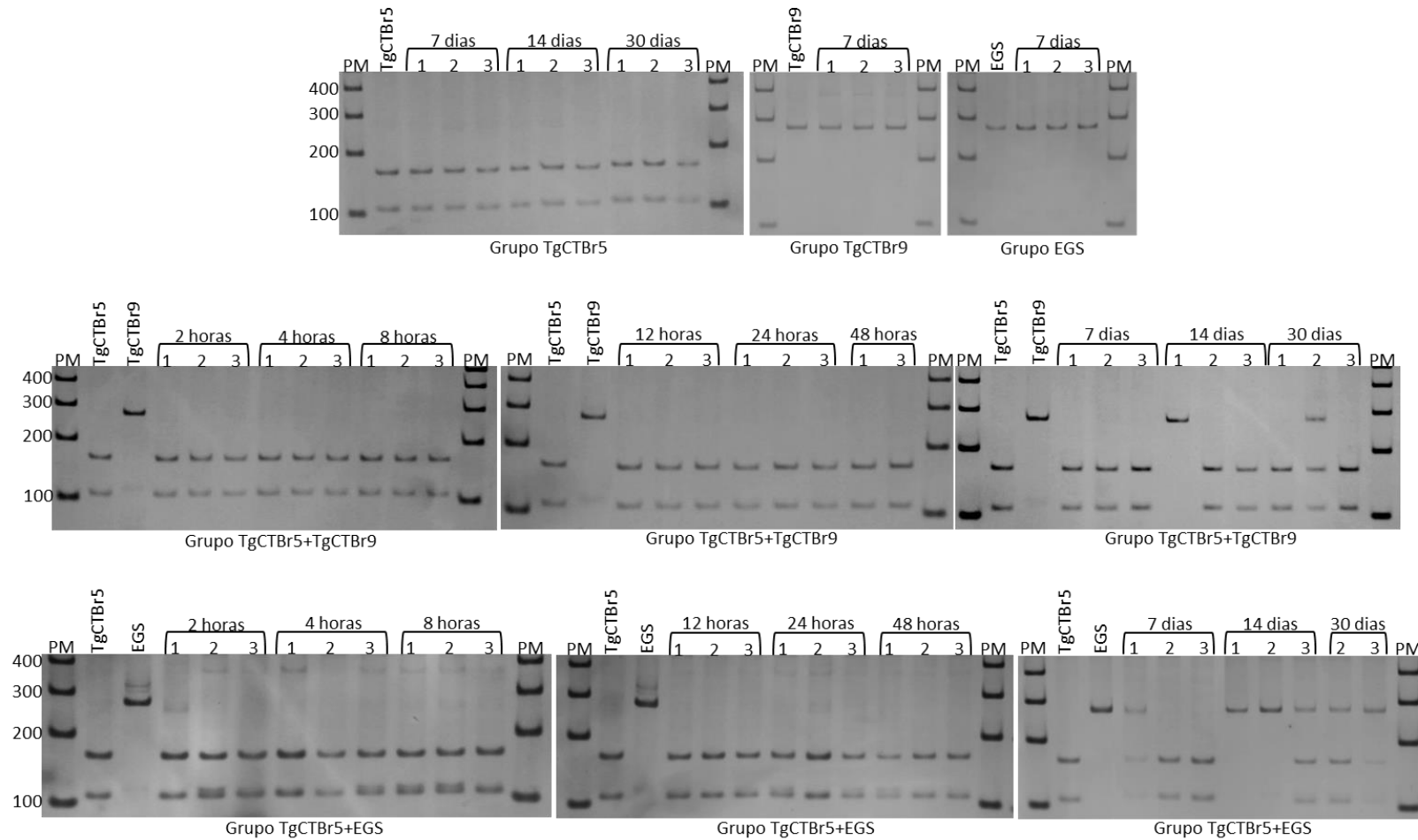
Anexo 2 - Figura 1: Imagem dos géis resultantes da digestão do marcador L358 com HaeIII e NlaIII do produto da PCR com DNA extraído de intestino. 1, 2 e 3 representam os três animais sacrificados para extração de DNA.

LINFONODO MESENTÉRICO



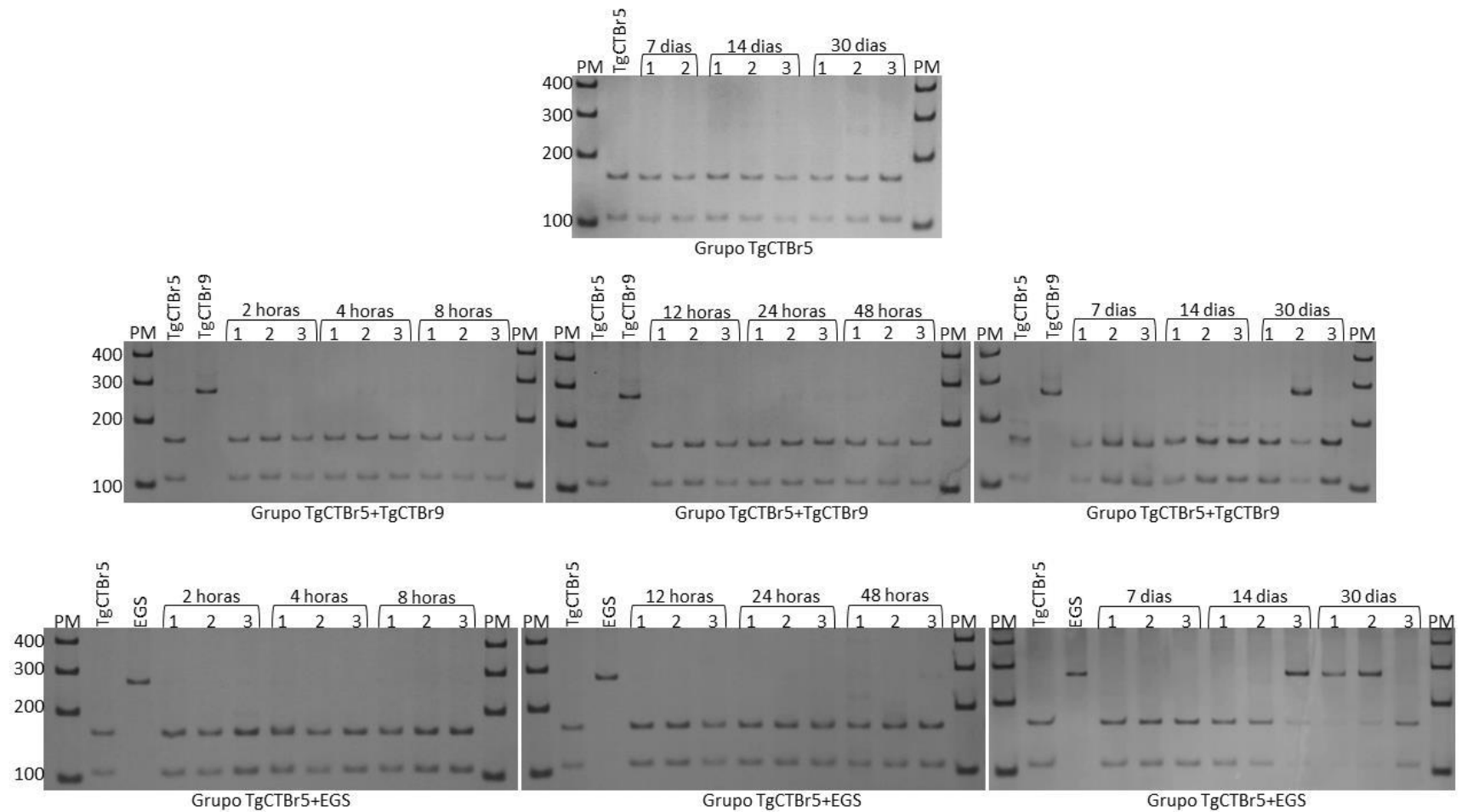
Anexo 2 - Figura 2: Imagem dos géis resultantes da digestão do marcador L358 com HaeIII e NlaIII do produto da PCR com DNA extraído do linfonodo mesentérico. 1, 2 e 3 representam os três animais sacrificados para extração de DNA.

PULMÃO



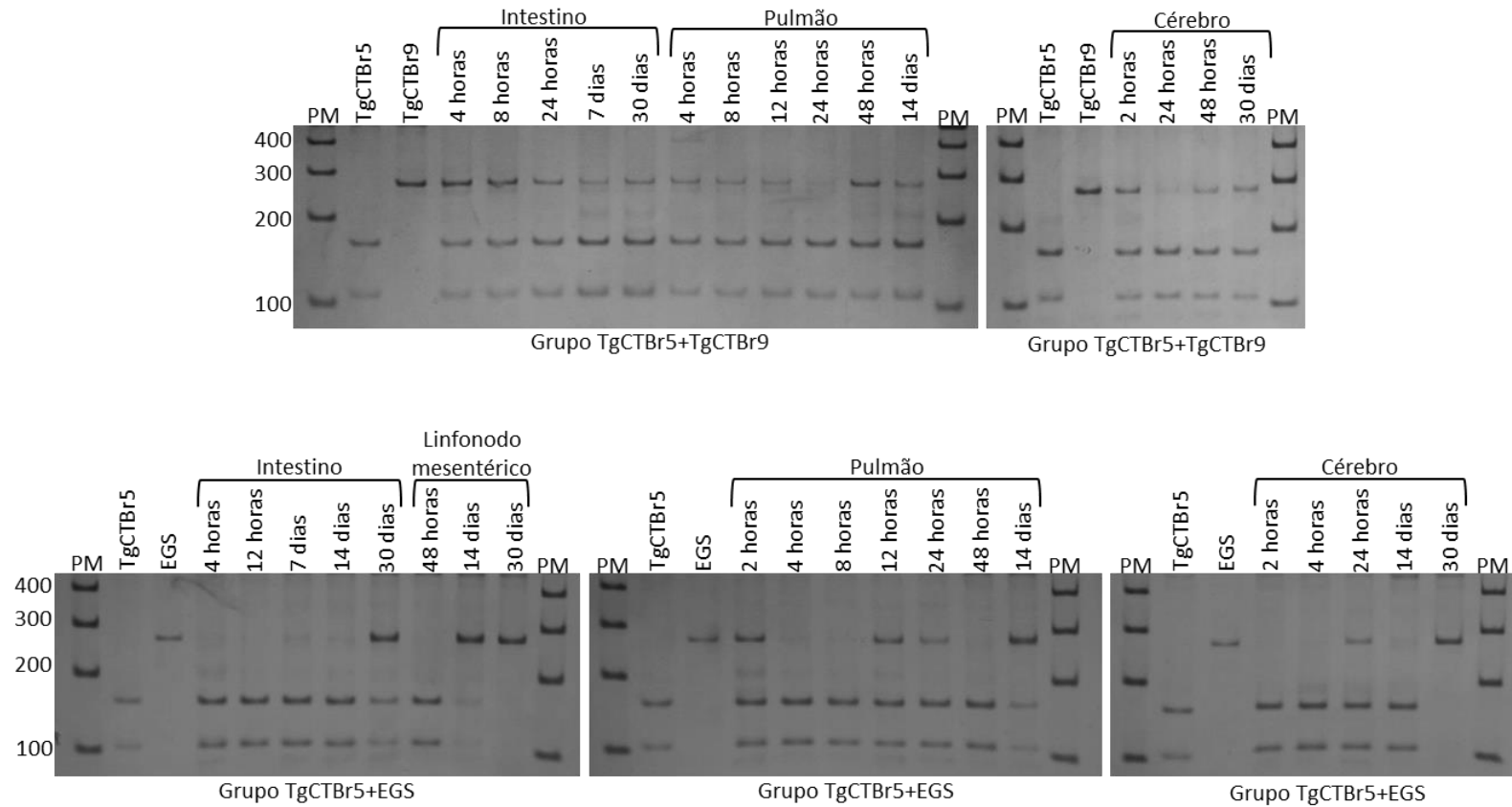
Anexo 2 - Figura 3: Imagem dos géis resultantes da digestão do marcador L358 com HaeIII e NlaIII do produto da PCR com DNA extraído do pulmão. 1, 2 e 3 representam os três animais sacrificados para extração de DNA.

CÉREBRO



Anexo 2 - Figura 4: Imagem dos géis resultantes da digestão do marcador L358 com HaeIII e NlaIII do produto da PCR com DNA extraído do cérebro. 1, 2 e 3 representam os três animais sacrificados para extração de DNA.

PULMÃO – BIOENSAIO



Anexo 2 - Figura 5: Imagem dos géis resultantes da digestão do marcador L358 com HaeIII e NlaIII do produto da PCR com DNA extraído do pulmão dos animais do bioensaio inoculados com o intestino, linfonodo mesentérico, pulmão e cérebro provenientes dos camundongos BALB/c desafiados do experimento de reinfeccção (TgCTBr5+TgCTBr9 e TgCTBr5+EGS).

