

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Parasitologia

Ramayana Morais de Medeiros Brito

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA ATÍPICA DE *Toxoplasma gondii* LEVA AO  
COMPROMETIMENTO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES E INDUZ  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM MODELO MURINO**

Belo Horizonte

2022

Ramayana Morais de Medeiros Brito

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA ATÍPICA DE *Toxoplasma gondii* LEVA AO  
COMPROMETIMENTO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES E INDUZ  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM MODELO MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de Imunoparasitologia.

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientadores: Dra. Luísa Mourão Dias Magalhães  
Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto

Belo Horizonte

2022

043

Brito, Ramayana Morais de Medeiros.

Infecção experimental por cepa atípica de *Toxoplasma gondii* leva ao comprometimento de macrófagos residentes e induz alterações comportamentais em modelo murinho [manuscrito] / Ramayana Morais de Medeiros Brito. – 2022.

137 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara. Coorientadores: Dra. Luísa Mourão Dias Magalhães, Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Toxoplasma*. 3. Inflamação Neurogênica. 4. Células Mieloides. 5. Sintomas Comportamentais. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Magalhães, Luísa Mourão Dias. III. Andrade Neto, Valter Ferreira de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576.88/89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**TESE 338/2022/09**

**TÍTULO: "INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPAS ATÍPICAS DE TOXOPLASMA GONDII LEVA AO COMPROMETIMENTO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES E INDUZ ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM MODELO MURINO"**

**ALUNA: RAMAYANA MORAIS DE MEDEIROS BRITO**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e três de dezembro de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**Aline Sardinha da Silva**

NIAID/NIH

**Antônio Lucio Teixeira Junior**

Santa Casa BH

**Lais Cristina Gusmão Ferreira Palhares**

King's College London

**Soraya Torres Gaze**

IRR/FIOCRUZ

**Valter Ferreira de Andrade Neto** - Coorientador

UFRN

**Luísa Mourão Dias Magalhães** - Coorientadora

UFMG

**Ricardo Toshio Fujiwara** - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 23 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Toshio Fujiwara, Professor do Magistério Superior**, em 03/01/2023, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luísa Mourão Dias Magalhães, Usuário Externo**, em 09/01/2023, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Sardinha da Silva, Usuária Externa**, em 09/01/2023, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Valter Ferreira de Andrade Neto, Usuário Externo**, em 09/01/2023, às 12:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lais Cristina Gusmão Ferreira Palhares, Usuária Externa**, em 09/01/2023, às 12:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Lúcio Teixeira Junior, Usuário Externo**, em 09/01/2023, às 13:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraya Torres Gaze Jangola, Usuário Externo**, em 09/01/2023, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1963815** e o código CRC **81C44819**.

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos, do Departamento de Parasitologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e coorientação da Dra. Luísa Mourão Dias Magalhães e do Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade-Neto.

**ICB-UFMG**

**Departamento de Parasitologia**

Laboratório de Imunobiologia e Controle  
de Parasitos

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Dra. Lilian Lacerda Bueno

Dra. Luísa Mourão Dias Magalhães

Me. Camila de Almeida Lopes

Me. Flaviane Vieira Santos

Me. Jorge Lucas Nascimento Souza

Laboratório de Toxoplasmose

Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

Rosálida Estevam Nazar Lopes

**Departamento de Farmacologia**

Laboratório de Neurofarmacologia

Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

Me. Maria Carolina Machado da Silva

**Departamento de Morfologia**

Laboratório de Neurobiologia

Dra. Aline Silva de Miranda

Dra. Heliana de Barros Fernandes

**DMP-UFRN**

Laboratório de Biologia da Malária e  
Toxoplasmose

Dr. Valter Ferreira de Andrade-Neto

Alexandre Lazoski Bastilho

**APOIO FINANCEIRO**

CAPES

CNPq

## ***Dedicatória***

*À minha “mãe-avó”, Irene Morais (In memoriam). Chegamos ao fim de uma trajetória que a senhora ajudou a construir. Desde minha infância, me incentivou a estudar e me ensinou o que podia, mesmo sabendo ler e escrever apenas o básico. Sempre preocupada com o futuro dos seus filhos, e com o dos seus netos. Comemorou comigo cada conquista que obtive na época da escola e início da minha graduação. A senhora foi, e continua sendo, meu maior exemplo de força; uma mulher que teve uma vida difícil, morou na zona rural; foi agricultora e costureira; perdeu uma filha recém-nascida. Mas, diante de todas as dificuldades impostas, sempre teve força para continuar e prover uma vida digna a seus filhos. Acolheu sua primeira neta, esta que redige essa singela homenagem. Me deu amor incondicional durante meus primeiros vinte anos de vida; se preocupou com meu bem-estar até em seus últimos momentos. Lembro, uma vez, quando eu era criança e voltávamos do sítio, me contou que um dia não estaria mais aqui e eu falei: “Não, a senhora vai viver por duzentos anos ao meu lado”. Talvez eu esteja sendo egoísta, mas bem queria que ainda estivesse aqui comigo. Em breve, serão quase dez anos sem te ter fisicamente ao meu lado; mas ainda consigo sentir sua presença, todos os dias. E, também, sei que está vendo esse momento e comemorando a conclusão dessa etapa, assim como sempre fez. Eu sou absurdamente agradecida pelo privilégio que foi viver vinte anos ao seu lado. Por ter me ensinado o que é certo e o errado; por ter construído meu caráter e mostrado que a educação sempre vem em primeiro lugar. Por sempre confiar em mim e acreditar na minha capacidade. A senhora é a razão por eu ter chegado até aqui e sempre será a força por trás de cada conquista.*

*Te amo incondicionalmente, até depois da eternidade.*

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus, que por muitas vezes me concedeu a força necessária para seguir em frente e ultrapassar todos os desafios;
- À toda minha família, em especial aos meus pais, minha irmã, meus avós e meus tios. Obrigada por nunca cortarem minhas asas e por todo apoio dado durante esses longos anos; por terem feito o possível e o impossível para garantir uma educação de qualidade e que eu sempre pudesse focar exclusivamente nos estudos;
- À minha tia Adriana e meu tio Auricélio, por todo o apoio e confiança depositados em mim; por me darem suporte durante todas as vezes que precisei e por sempre me incentivarem a seguir em frente;
- Ao meu orientador Ricardo Fujiwara, por ter aberto as portas do seu laboratório e comprado a ideia de trabalharmos com *Toxoplasma*. Obrigada por toda a confiança, apoio e investimento depositados na minha construção como pesquisadora. Para mim, é uma honra estar entre seus alunos.
- À minha coorientadora, Luisa Magalhães. Não tenho nem palavras para descrever o quanto sou agradecida por ter cruzado com seu caminho. Obrigada por todo o ensinamento, parceria, amizade e apoio durante esses quase três anos de doutorado. Não sei se eu teria chegado até aqui sem ter você ao meu lado.
- Ao meu coorientador Valter Andrade, e orientador de mestrado. Você estava por trás de todas as portas que se abriram para mim durante minha passagem pela pós-graduação. Sua presença foi peça chave na minha construção como parasitologista e cientista. Acreditou na minha capacidade até quando eu mesma não acreditava.
- À Lilian Bueno, que assim como Ricardo, me recebeu de braços abertos no laboratório; acompanhou de perto e contribuiu para a construção dessa tese e para minha formação como pesquisadora. Fico extremamente feliz em podermos dar continuidade à pesquisa juntas!
- A todos os membros do Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos, o qual tenho muito orgulho em fazer parte. Vocês formam uma equipe maravilhosa! Obrigada por todo apoio, amizade e momentos compartilhados.
- À Sara, Arthur, Alex e Dani. Dizem que durante a graduação é quando iremos conhecer pessoas que irão permanecer ao nosso lado pelo resto da vida, e vocês são meu exemplo

disso. Já são mais de dez anos de amizades e histórias compartilhadas; obrigada por permanecerem ao meu lado nos bons e maus momentos (e até nos meus surtos, rs). Não sei o que eu seria sem ter vocês ao meu lado.

- À Jéssica Mylla, minha amiga de infância e mãe do meu afilhado lindo. Nossa amizade, que muitos se perguntavam como poderia ser real por sermos duas pessoas absurdamente diferentes, se torna cada vez mais forte com o passar dos anos. Obrigada estar sempre ao meu lado durante esses últimos (quase) 25 anos!
- Ao “fofocão”: Brenna, Bela, Jully, Jorge, Bia Martins, Béa, e Mayara; sem vocês minha história de vida teria menos alegria; menos brilho. Obrigada pela força que cada uma me deu durante todo esse período.
- Ao professor Antônio Oliveira e a Maria Carolina, do Laboratório de Neurofarmacologia, pela parceria construída e todo o apoio fornecido;
- À professora Aline Miranda e Heliana Fernandes pela colaboração;
- Ao professor Ricardo Vitor por sua disponibilidade em colaborar com nosso projeto;
- À Rosa Nazar, por toda sua ajuda, conselhos e conversas! Por sua amizade e todo o apoio que me deu desde a primeira vez que apareci por aqui. Muito obrigada por tudo, serei eternamente grata!
- Ao professor Paulo Marcos da Matta Guedes; obrigada por todos os ensinamentos, conversas, por sua amizade e por me contaminar com seu entusiasmo e paixão pela parasitologia!
- À Janeusa Souto; por sua amizade e disposição para tirar minhas dúvidas; obrigada por todo apoio durante esse período, por ter contribuído de maneira ímpar para a construção do meu conhecimento em imunologia. Você é maravilhosa, Queen of Immunology.
- A Cássio Ricardo e Wallace Pitanga, por toda amizade e parceria durante esses anos. Vocês são phodas!
- À Suely Chavante, minha primeira orientadora, por ter proporcionado meu início na vida científica. Obrigada por ter me incentivado, e pelos puxões de orelha tão importantes na minha formação, obrigada por todos os ensinamentos e por sua amizade!
- Aos membros do Laboratório de Glicoconjugados Bioativos I, do departamento de Bioquímica da UFRN, onde iniciei essa jornada em 2012. Obrigada por compartilharem comigo aquele início de caminhada, vocês sempre serão meus GAGuinhos favoritos!

- Aos membros do Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose, onde desenvolvi meu mestrado; obrigada pela amizade e colaboração!
- À Jaqueline Hansen, por sua amizade, parceria, confiança, por toda ajuda que você já me deu. Obrigada por fazer parte da minha vida, você é a melhor amiga que alguém pode ter! Sou eternamente grata a você por tudo! Obrigada por aguentar meus surtos, problemas e desesperos. Obrigada, também, por compartilhar os melhores momentos que vivi aqui em BH. Obrigada por tudo!
- À Joel e Marcelo, pela amizade e toda a alegria que vocês trazem para meus dias! Amo vocês!
- A Alessandro Feitosa, que cruzou meu caminho há quase dez anos e acompanhou todo esse meu percurso. Você foi o responsável por me ensinar tanta coisa e me ajudar a amadurecer, me fez conhecer a vida e o significado de companheirismo e confiança. Mesmo com toda a distância, e apesar de todos os apesares, obrigada por permanecer ao meu lado. Obrigada por seu apoio incondicional, por acreditar na minha capacidade e por sempre me incentivar a ir em frente. Obrigada por ter cruzado meu caminho lá na Austrália e por existir na minha vida.
- Ao Departamento de Parasitologia e ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da UFMG e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho;
- Ao Presidente Lula, e à Presidenta Dilma, pelos anos de investimento no Ensino Superior; por incentivar a pesquisa e possibilitar o acesso à educação pública de qualidade a todos.
- À CAPES por fornecer a bolsa de Doutorado.

*A esperança, que não se vive na pura espera, mas na espera em que se atua e se produz conhecimento é um ingrediente indispensável à existência, algo maior que a vida mesma. Não há existência humana, portanto, história, sem esperança.*

*– Paulo Freire.*

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* apresenta uma estrutura populacional bastante diversa, havendo uma grande distribuição de cepas atípicas na América do Sul, principalmente no Brasil. O estabelecimento e manutenção da infecção crônica no hospedeiro depende da ativação da resposta imunológica, através da produção de IFN- $\gamma$ . Nesse contexto, esse trabalho buscou avaliar o impacto da infecção por cepa atípica de *T. gondii* sobre a resposta imunológica e suas populações celulares, e como o impacto da infecção cerebral contribui para possíveis alterações comportamentais em modelo experimental murino. Para a realização desse estudo, foram utilizados camundongos BALB/c machos infectados com 10 cistos teciduais da cepa clonal ME49 ou cepa atípica TgCkBrRN2 (CK2). Os camundongos foram submetidos à análise comportamental, imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica para avaliação das populações celulares no lavado broncoalveolar e cérebro; e detecção de fatores neurotróficos e citocinas inflamatórias no cérebro através de ELISA e CBA. A infecção crônica levou a depleção significativa de micróglia, seguida de grande infiltrado inflamatório e níveis elevados de citocinas inflamatórias, principalmente entre os camundongos infectados com a cepa atípica. Além da neuroinflamação estabelecida, a infecção pela cepa atípica induziu alterações nos níveis do fator de crescimento nervoso e de fractalquina em diferentes áreas do cérebro. O estabelecimento da neuroinflamação, caracterizada por níveis elevados de IFN- $\gamma$  se mostrou diretamente envolvida no desenvolvimento de comportamentos do tipo ansioso e depressivo nos camundongos infectados por CK2. Ao analisarmos as populações de células obtidas no lavado broncoalveolar, os camundongos infectados por *T. gondii* apresentaram redução significativa da população de macrófagos alveolares durante a fase aguda da infecção, sendo uma depleção mediada por apoptose; com a evolução da infecção crônica, observamos a substituição das células residentes por monócitos inflamatórios infiltrados. Além disso, Com base nos resultados obtidos, observa-se a capacidade da infecção por *T. gondii* em interferir na integridade das populações de macrófagos residentes, e estimular uma inflamação cerebral que se relaciona com o estabelecimento de alterações comportamentais.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*; neuroinflamação; células mieloides; alterações comportamentais

## ABSTRACT

The protozoan *Toxoplasma gondii* exhibit a great diverse population structure, with high distribution of atypical strains in South America, mainly in Brazil. The establishment of the immune response, with the production of IFN- $\gamma$ , is detrimental to control *T. gondii* infection and to maintain the chronic stage. In this context, the work presented here sought to investigate the impact of *T. gondii* atypical strain infection over the immune response and immune cell, and how the cerebral infection contributes to possible behavioral alterations in experimental murine model. Firstly, BALB/c male mice were infected with ten tissue cysts of clonal ME49 or atypical TgCkBrRN2 (CK2) *T. gondii* strains, *per gavage*. Mice were submitted to behavior analysis, to determine possible behavioral changes induced by infection; afterwards, bronchoalveolar and brain populations of immune cells and the level of local inflammation and neurotrophic factors were determined by ELISA and CBA. The results showed that during chronic brain infection, it was found a dramatic decrease in the microglia population, followed by intense inflammatory infiltrate and high levels of inflammatory cytokines; besides the neuroinflammation observed, the infection caused by the atypical strain also contributed to changes in the nerve growth factor and fractalkine levels in different areas of the brain. In addition, it was also observed that chronic infection by *T. gondii* atypical strain induced anxiety- and depression-like behaviors. After analysing the cell population obtained in the bronchoalveolar lavage fluid, it was found that *T. gondii* infected mice displayed marked depletion of alveolar macrophages by apoptosis during acute stage of infection; this depletion was followed by replacement of alveolar macrophages by inflammatory monocytes that infiltrated from the periphery. Based on the results presents here, it is clear the ability of *T. gondii* to interfere in the resident macrophages population integrity, which can be observed in different host tissues; as well as stimulate a sustained cerebral inflammation that is related to the establishment of behavioral alterations.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; neuroinflammation; myeloid cells; behavioural changes

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquematisação do ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	23
<b>Figura 2:</b> Panorama da distribuição de genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i> no mundo. ....	25
<b>Figura 3:</b> Origem e desenvolvimento de células mieloides residentes e circulantes. ....	37
<b>Figura 4:</b> Desenho da infecção experimental por <i>T. gondii</i> .....	46
<b>Figura 5:</b> Esquematisação do campo aberto em arena circular. ....	47
<b>Figura 6:</b> Esquematisação do teste de reconhecimento de objetos .....	48
<b>Figura 7:</b> Esquematisação do labirinto em cruz elevado.....	49
<b>Figura 8:</b> Esquematisação do teste de nado forçado. ....	50
<b>Figura 9.</b> Quantificação do número de cistos no cérebro e dosagem de anticorpos IgG específicos anti- <i>T. gondii</i> .....	56
<b>Figura 10.</b> Estratégia de análise das populações de células imunológicas nos cérebros dos camundongos. ....	57
<b>Figura 11.</b> Análise das populações de células imunológicas presentes no cérebro de camundongos com infecção crônica por <i>T. gondii</i> .....	59
<b>Figura 12.</b> Determinação dos níveis de citocinas no cérebro dos camundongos infectados com <i>T. gondii</i> .....	61
<b>Figura 13.</b> A carga de cistos de <i>T. gondii</i> no cérebro contribui para a depleção da micróglia e para a produção de ifn- $\gamma$ no cérebro .....	62
<b>Figura 14.</b> Infecção com cepa atípica de <i>T. gondii</i> induz redução nos níveis de NGF no córtex pré-frontal e no estriado de camundongos com infecção crônica .....	63
<b>Figura 15.</b> Infecção crônica por <i>T. gondii</i> mantém níveis elevados de inflamação em diferentes áreas do cérebro .....	65
<b>Figura 16:</b> A cepa ME49 de <i>T. gondii</i> é capaz de induzir déficit de memória, identificado pelo teste de reconhecimento de objetos, nos camundongos com infecção crônica .....	66
<b>Figura 18.</b> Comportamento do tipo ansioso observado nos camundongos infectados com CK2 é confirmado com o teste do labirinto em cruz elevado .....	69
<b>Figura 19.</b> Infecção crônica por cepa atípica de <i>T. gondii</i> induz comportamento depressivo em camundongos, detectado através do teste de nado forçado .....	71
<b>Figura 20:</b> Infecção experimental por <i>T. gondii</i> para avaliação da fase aguda e crônica.....	75

<b>Figura 21:</b> Quantificação do número de cistos no cérebro e dosagem de anticorpos IgG específicos anti- <i>T. gondii</i> durante a infecção aguda .....	79
<b>Figura 22.</b> Infecção aguda por <i>T. gondii</i> estimula forte infiltrado inflamatório no pulmão e contribui para depleção da população de macrófagos alveolares.....	80
<b>Figura 23.</b> Evolução da infecção crônica por <i>T. gondii</i> .....	82
<b>Figura 24.</b> Estratégia de análise das populações células obtidas no bal de camundongos com infecção crônica por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	83
<b>Figura 25.</b> Infecção crônica por cepa atípica de <i>Toxoplasma gondii</i> mantém infiltrado inflamatório elevado no pulmão .....	84
<b>Figura 26.</b> Análise de clusters das populações celulares identificadas nos pulmões de camundongos com infecção crônica por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	86
<b>Figura 27.</b> Análises de clusters das populações macrófagos identificados nos pulmões de camundongos com infecção crônica por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Visão geral da distribuição de cepas atípicas de <i>Toxoplasma gondii</i> , e seus genótipos, no Brasil.....	27
<b>Tabela 2.</b> Principais proteínas liberadas pelo <i>Toxoplasma gondii</i> , identificadas como fatores de virulência e sua interação com o sistema imunológico .....	31
<b>Tabela 3.</b> Lista de anticorpos utilizados para marcação de receptores de superfície de células obtidas do cérebro de camundongos.....	54
<b>Tabela 4.</b> Lista de anticorpos utilizados para marcação de receptores de superfície de células obtidas dos pulmões de camundongos.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACK** – Tampão de lise de hemácias, a base de cloreto de amônio, bicarbonato de potássio e EDTA
- ANOVA** – Análise de variância
- BSA** – Albumina de soro bovino
- CCL2/MCP-1** – Proteína quimiotática de monócitos 1
- CCR2** – Receptor de quimiocina do tipo CC
- CD115/CSF-1R** – Receptor de CSF-1
- CD116** – Receptor de GM-CSF
- CD14** – Glicoproteína expressa na membrana de células mieloides
- CD16** – Receptor FcγRIII para IgG
- CD3** – Marcador de linfócitos T
- CD4** – Marcador expresso em linfócitos T auxiliares
- CD64** – Receptor FcγRI para IgG
- CD8** – Marcador expresso em linfócitos T citotóxicos
- cGAS/STING** – Via de detecção da presença de DNA citosólico
- CMP** – Precusores mieloides comuns
- CX3CL1** – Quimiocina (Fractalquina)
- CX3CR1** – Receptor de CX3CL1
- DPI** – Dias pós infecção
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática
- FoxP3** – Fator de transcrição mestre para diferenciação de linfócitos T reguladores
- GABA** – Neurotransmissor ácido gamma-aminobutírico
- GDNF** – Fator neurotróficos derivado de células da linhagem da glia
- G-CSF** – Fator estimulador de colônias de granulócitos
- GM-CSF** – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
- H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** – Ácido fosfórico
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Ácido sulfúrico
- HLA-DR** – Complexo de histocompatibilidade de classe II
- HSCs** – Células-tronco hematopoiéticas

**ICB** – Instituto de Ciências Biológicas

**IFN- $\gamma$**  - Interferon gama

**IgG** – Imunoglobulina G

**IL** – Interleucina

**MAPK** – Proteína quinase ativada por mitógeno

**MIF** – Intensidade de fluorescência média

**MyD88** – Molécula transdutora de sinal da imunidade inata

**NACHT** – *Central nucleotide-binding domain/NOD*

**NaCl** – Cloreto de sódio

**NaN<sub>3</sub>** – Azida de sódio

**NFAT** – Fator nuclear de células T ativadas

**NF- $\kappa$ B** – Fator nuclear kappa B

**NGF** – Fator de crescimento nervoso

**NLRP3** – Proteína 3 contendo domínio de pirina da família dos receptores Nod

**NMDAR** – Receptor de N-metil-D-aspartato

**P2ry12** – Receptor purinérgico específico de micróglia

**PBS** – Tampão salina-fosfato

**PCR-RFLP** – Análise de polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase

**PPAR $\gamma$**  – Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama

**Siglec** – Família de lectinas do tipo imunoglobulinas que se ligam a ácido siálico

**SNP** – *Single-nucleotide polymorphisms*

**STAT** – Molécula transdutora de sinal e ativadora de transcrição

**TGF- $\beta$**  – Fator de crescimento transformador beta

**Tmem119** – Proteína transmembrana expressa na micróglia

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**ToxoDB** – Banco de dados dos genótipos identificados de *Toxoplasma gondii*

**TRAF** – Receptor associado ao TNF

**tSNE** – *t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding*

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

**v/v** – Proporção volume/volume

**VCAM-1** – Molécula de adesão celular vascular 1

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1.</b> <i>Toxoplasma gondii</i> e Toxoplasmose.....	22
<b>1.2.</b> Ocorrência de cepas atípicas de <i>Toxoplasma gondii</i> no Brasil .....	25
<b>1.3.</b> Resposta imunológica na Toxoplasmose.....	30
<b>1.4.</b> Origem, desenvolvimento e função das células mieloides.....	36
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	40
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	40
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	40
<b>4. RESULTADOS</b> .....	41
<b>CAPÍTULO I</b> .....	41
<b>4.1. Introdução</b> .....	42
<b>4.2. Materiais e Métodos</b> .....	45
<b>4.2.1.</b> Obtenção dos parasitos e manutenção das cepas .....	45
<b>4.2.2.</b> Animais e delineamento experimental .....	45
<b>4.2.3.</b> Testes comportamentais .....	46
<b>4.2.3.1.</b> Campo Aberto .....	47
<b>4.2.3.2.</b> Teste de Reconhecimento de Objetos .....	47
<b>4.2.3.3.</b> Labirinto em Cruz Elevada (LCE).....	48
<b>4.2.3.4.</b> Teste do Nado Forçado .....	49
<b>4.2.4.</b> Eutanásia e obtenção dos tecidos .....	50
<b>4.2.5.</b> Ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA).....	51
<b>4.2.5.1.</b> Quantificação dos níveis de IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	51
<b>4.2.5.2.</b> Quantificação dos níveis de IFN- $\gamma$ , CX3CL1 e fatores neurotróficos no cérebro.....	51

4.2.6.	Quantificação dos níveis de nitrito no cérebro.....	52
4.2.7.	Quantificação de citocinas por <i>Cytometric beads array</i> (CBA).....	52
4.2.8.	Processamento e imunofenotipagem de células imunológicas no cérebro .....	53
4.2.8.1.	Processamento do cérebro .....	53
4.2.8.2.	Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica.....	53
4.2.9.	Análises estatísticas.....	54
<b>4.3.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>56</b>
4.3.1.	Infecção crônica por cepa atípica de <i>Toxoplasma gondii</i> apresenta maior número de cistos no cérebro .....	56
4.3.2.	Infecção crônica por cepa atípica de <i>Toxoplasma gondii</i> é capaz de induzir redução significativa de micróglia e maior inflamação cerebral.....	57
4.3.3.	Infecção por cepa atípica de <i>T. gondii</i> é capaz de induzir alterações nos níveis de fatores neurotróficos em diferentes áreas do cérebro .....	62
4.3.4.	Cepa atípica de <i>T. gondii</i> induz comportamento ansioso e depressivo durante infecção crônica.....	66
<b>CAPÍTULO II.....</b>		<b>72</b>
<b>4.4.</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>73</b>
<b>4.5.</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>75</b>
4.5.1.	Parasitas e animais experimentais.....	75
4.5.2.	Quantificação dos níveis de IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) .....	76
4.5.3.	Lavado Broncoalveolar .....	76
4.5.4.	Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica .....	76
4.5.5.	Análises estatísticas.....	78
<b>4.6.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>79</b>
4.6.1.	Cepa atípica de <i>Toxoplasma gondii</i> induz depleção de macrófagos alveolares durante a infecção aguda .....	79

4.6.2.	Impacto da infecção crônica por <i>T. gondii</i> na população de macrófagos no pulmão.....	81
4.6.3.	Predominância de macrófagos inflamatórios no pulmão de camundongos durante a infecção crônica por <i>Toxoplasma gondii</i> .....	83
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	90
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	102
7.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103

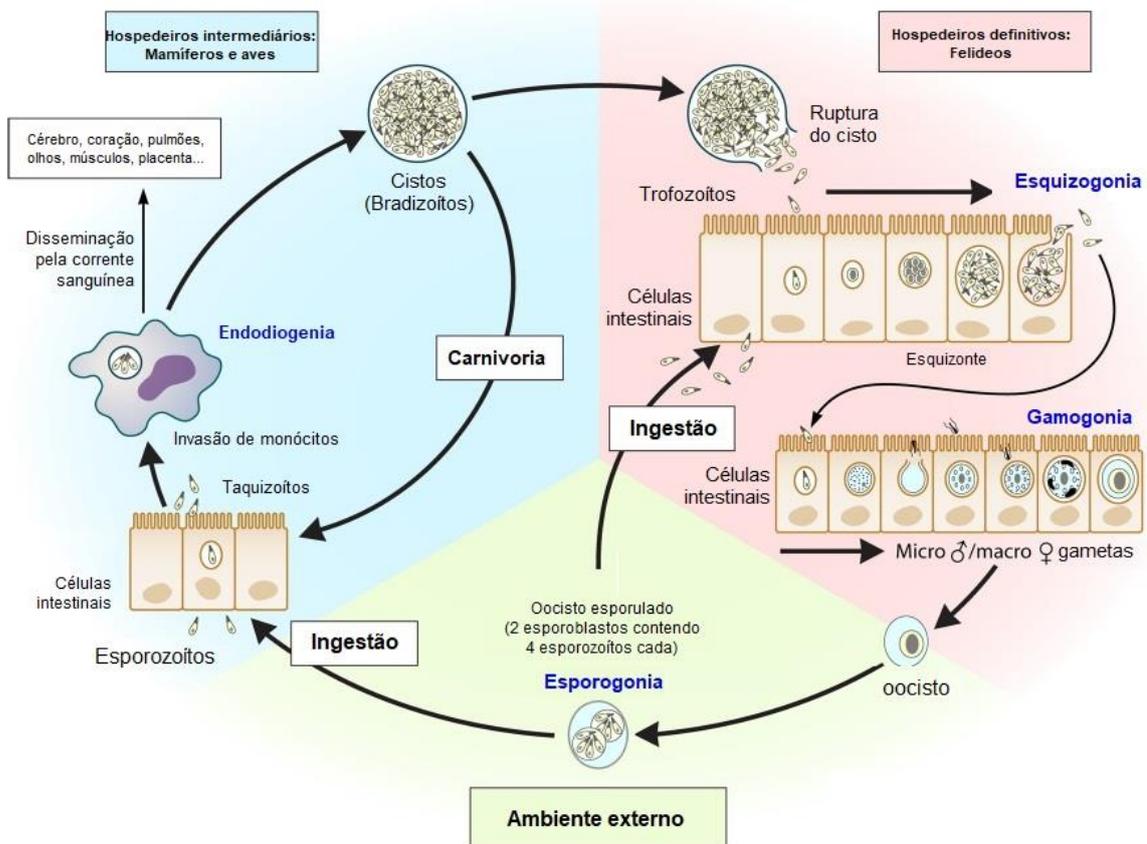
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório, capaz de infectar uma grande variedade de espécies de animais homeotérmicos, incluindo humanos (TENTER et al., 2020). Seu ciclo biológico (Figura 1) apresenta um estágio de reprodução sexuada, que ocorre nas células intestinais de felinos, seus hospedeiros definitivos; e um estágio assexuado, que ocorre em outras espécies de mamíferos e em aves, seus hospedeiros intermediários (TENTER et al., 2000; ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012).

*T. gondii* apresenta três principais estágios infectantes: oocistos; taquizoítos e cistos teciduais contendo bradizoítos. O oocisto é formado durante o processo de reprodução sexuada nas células intestinais do seu hospedeiro definitivo, sendo liberado, junto as fezes do animal, no ambiente ainda na forma não esporulada. Fatores ambientais como temperatura, umidade e pH do solo contribuem para a esporulação do oocisto que se torna infectante, representando uma importante fonte de infecção para outros animais, incluindo gatos e o ser humano; sendo, assim, considerada uma infecção adquirida através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados (ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012; MEIRELES et al., 2015; ALMERIA, DUBEY, 2021).

Com a ingestão de alimentos contaminados, o oocisto tem sua parede digerida durante a passagem pelo sistema gástrico, ocorrendo a liberação dos esporozoítos que conseguem infectar ativamente as células epiteliais intestinais no hospedeiro intermediário (BETANCOURT et al., 2019). A partir desse ponto, ocorre a diferenciação de taquizoítos, que são responsáveis pela disseminação no organismo hospedeiro durante a infecção aguda e pela ativação da resposta imunológica protetora (ZENNER et al., 1998; UNNO et al., 2008). Com o desenvolvimento da resposta imunológica específica, há o estabelecimento da infecção crônica com a conversão de taquizoíto em bradizoíto e a formação de cistos teciduais, presentes nos mais diversos tecidos do hospedeiro (SINAI et al., 2020), especialmente no cérebro e musculatura, podendo servir como importante fonte de infecção através da ingestão de carnes cruas ou sem cozimento adequado (ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012).



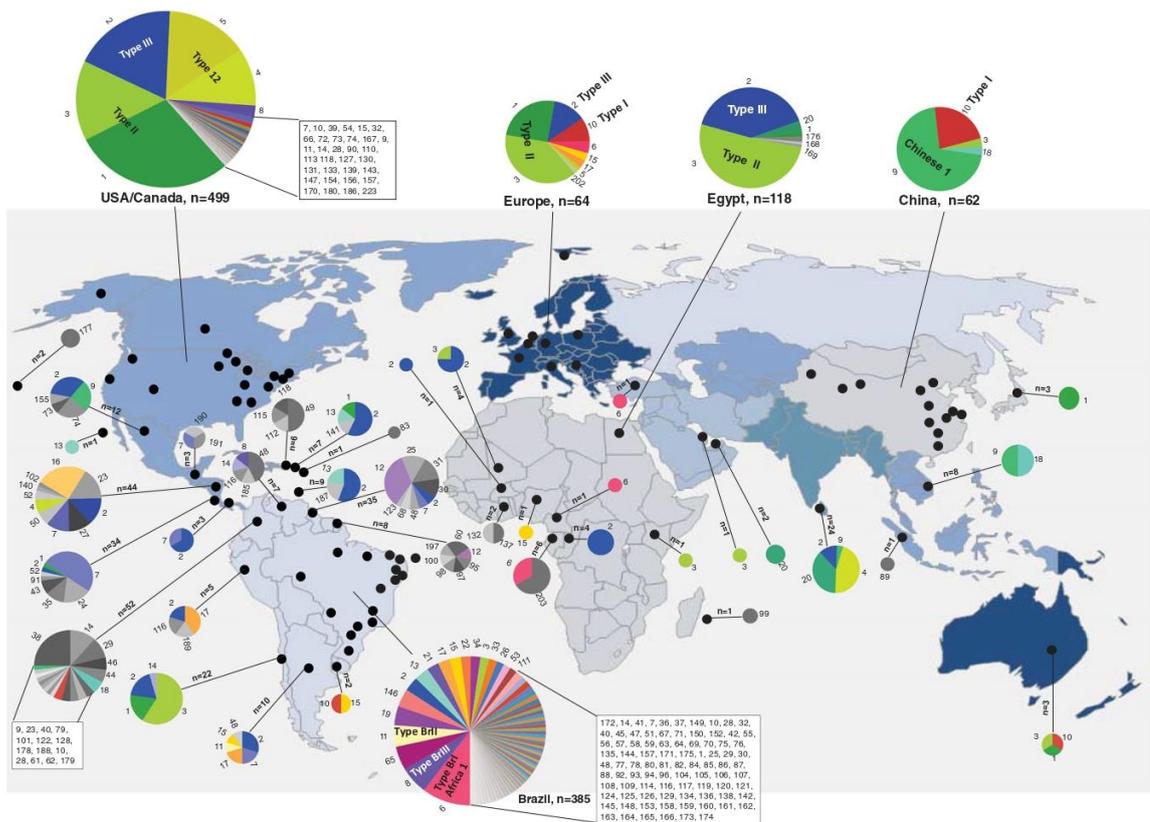
**Figura 1: Esquemática do ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.** Seu ciclo biológico resume-se em três momentos distintos: no hospedeiro definitivo, com formação de oocistos; chegada do oocisto no ambiente, onde torna-se infectante através do processo de esporogonia; após infecção do hospedeiro intermediário, ocorre a disseminação de taquizoítos pelo organismo, com multiplicação intracelular por endodiogenia. Com o estabelecimento da infecção crônica, há formação de cistos teciduais contendo bradizoítos. Figura adaptada de Robert-Gangneux, Dardé, 2012.

A prevalência da infecção por *T. gondii* varia bastante ao redor do mundo, havendo regiões onde a taxa de infecção pode atingir até 90% entre a população (FLEGR et al., 2014). Caminhando junto a incidência de *T. gondii* no mundo, a ocorrência de surtos se mostra bastante distribuída; porém, as Américas apresentam o maior número de surtos já registrados, sendo responsáveis por quase 74% dos surtos descritos nas últimas décadas. Por sua vez, o Brasil conta com 35% dos surtos já publicados (PINTO-FERREIRA et al., 2019), sendo considerado um *hotspot* para toxoplasmose (DUBEY et al., 2021). Estudos sorológicos mostram que 50 a 80% da população brasileira é soropositiva para toxoplasmose, sendo um índice quatro vezes maior que a prevalência identificada nos Estados Unidos da América (DUBEY et al., 2012).

Além da ampla distribuição pelo mundo e grande variedade de hospedeiros, *T. gondii* apresenta uma grande diversidade na sua estrutura populacional, com diferenças genéticas entre cepas, que conferem perfis de virulência distintos. As cepas de *T. gondii* são organizadas entre clonais e atípicas, de acordo com suas características genéticas. As cepas clonais são classificadas como pertencentes aos genótipos I, II e III com menos de 1% de divergência genética (HOWE, SIBLEY 1995; SU et al., 2003). Esses genótipos são amplamente distribuídos pelo hemisfério norte, principalmente na América do Norte e Europa. A utilização de técnicas moleculares, como PCR-RFLP e microsátélites, permitiu a caracterização genética das cepas e, a identificação de SNPs nos isolados contribuiu para uma identificação de cepas mais sensível, tornando possível o estabelecimento mais acurado da sua estrutura populacional (SU et al., 2006; SU et al., 2009).

Com relação a distribuição de cepas de *T. gondii* no mundo (Figura 2), a América do Sul se destaca com sua grande variedade e distribuição de isolados atípicos (SAEIJ et al., 2005; SU et al., 2012; SHWAB et al., 2014). Quase dez anos atrás, análises da distribuição geográfica de *T. gondii* revelou uma estrutura populacional bastante diversa na América do Sul, compreendendo aproximadamente 646 isolados pertencentes a 156 genótipos diferentes. Desses, 385 isolados pertencentes a 106 genótipos foram identificados no Brasil (SHWAB et al., 2014). As cepas atípicas encontradas na América do Sul divergem significativamente daquelas encontradas na América do Norte e Europa, apresentando uma separação geográfica de haplogrupos evidente, além da acumulação de alterações genéticas específicas e haplótipos altamente polimórficos (KHAN et al., 2007).

A divergência geográfica existente entre as cepas das Américas do Norte e do Sul tem sido apontada como um ponto importante na geração de genótipos distintos. Porém, esse fator não pode ser assumido como único contribuinte para a diversificação genotípica apresentada por *T. gondii*. A ocorrência de uma grande diversidade de hospedeiros, tanto definitivos quanto intermediários, contribui significativamente para geração de pressões evolutivas que culminam na maior diversificação genética do parasito. Esse fato é resultado, teoricamente, da ocorrência de coinfeções por diferentes cepas do parasito e seu ciclo de reprodução sexuada nos hospedeiros definitivos (SU et al., 2006; GALAL et al., 2009).



**Figura 2: Panorama da distribuição de genótipos de *Toxoplasma gondii* no mundo.** Na América do Sul, o Brasil se destaca pela ocorrência de grande variedade de cepas atípicas, sem haver dominância clara entre os genótipos circulantes (SHWAB et al., 2014).

## 1.2. Ocorrência de cepas atípicas de *Toxoplasma gondii* no Brasil

Nas Américas Central e do Sul, existe uma grande abundância de cepas atípicas de *T. gondii*, sem haver dominância por um genótipo específico. No Brasil, as cepas atípicas mais abundantes e amplamente distribuídas são consideradas como linhagens clonais brasileiras: BrI (ToxoDB #6), BrII (#11), BrIII (#8), and BrIV (#17) (PENA et al., 2008). Além dessas, existe uma grande variedade de genótipos distribuídos por todas as regiões do país (Tabela 1); e fatores como a extensão territorial, características climáticas e, principalmente, a grande biodiversidade faunística presente no Brasil, são fatores que contribuem para a variabilidade de cepas atípicas existente (FERREIRA et al., 2006).

A grande diversidade de espécies hospedeiras contribui para a diversificação dos genótipos de *T. gondii* encontrados no Brasil. A ocorrência de cepas com genótipos mistos, serve como indicativo da infecção simultânea por mais de uma cepa no mesmo hospedeiro.

Esse tipo de coinfeção, tanto em animais domésticos como em animais silvestres, já foi descrito em várias regiões do Brasil (PENA et al., 2008; YAI et al., 2009; RAGOZO et al., 2010; CARNEIRO et al., 2013; WITTER et al., 2020; WITTER et al., 2022).

Na região Centro-Oeste do Brasil, foram identificadas 22 cepas de *T. gondii*, distribuídas entre 11 genótipos atípicos, obtidas de animais domésticos, selvagens e de infecção humana (WITTER et al., 2020). Recentemente, os mesmos autores identificaram 51 cepas isoladas de galinhas, no estado do Mato Grosso. A genotipagem por PCR-RFLP revelou que essas cepas se distribuem em 17 genótipos atípicos e, desses, cinco ainda não tinham sido descritos (WITTER et al., 2022). Entre os genótipos identificados, o #166 foi o mais encontrado entre as amostras de galinhas e, além disso, já sendo identificado anteriormente em amostras de animais domésticos, selvagens e em humanos da mesma região (WITTER et al., 2020).

Existem muitos registros da incidência de cepas atípicas na região Nordeste do Brasil, refletindo a grande distribuição e variabilidade genotípica do parasito pelo país. No Maranhão, foram identificados quatro genótipos atípicos, isolados de galinhas (SOUSA et al., 2016). Na Bahia, genótipos atípicos foram identificados em gatos naturalmente infectados. Atualmente, aproximadamente 19 genótipos já foram identificados nessa região, provenientes de diferentes espécies hospedeiras: porcos, ovelhas, galinhas e gatos domésticos (BEZERRA et al., 2012; MACIEL et al., 2014; ROCHA et al., 2018; DEIRÓ et al., 2021). No estado do Rio Grande do Norte, foi reportada a ocorrência de cepas atípicas em amostras das carnes de animais destinados ao consumo humano, provenientes de matadouros. Clementino-Andrade e colaboradores (2013) identificaram 19 cepas de *T. gondii*, das quais 17 foram classificadas como virulentas. As cepas encontradas estavam distribuídas entre quatro genótipos atípicos; desses, dois genótipos nunca tinham sido descritos antes. Rêgo e colaboradores (2017) isolaram cepas atípicas de *T. gondii* obtidas de porcos e cabras no estado do Piauí. Nesse estudo, foram identificados 11 genótipos e, diferente do observado em outras regiões do país, 72% dos isolados no Piauí foram considerados avirulentos. Outros estados do Nordeste brasileiro já tiveram a ocorrência de genótipos atípicos registrada, como Paraíba (FEITOSA et al., 2017), Alagoas (SANTOS-SILVA et al., 2020; MELO et al., 2020) e, também, na ilha de Fernando de Noronha (DUBEY et al., 2010; MELO et al., 2016), pertencente ao estado de Pernambuco.

**Tabela 1: Visão geral da distribuição de cepas atípicas de *Toxoplasma gondii*, e seus genótipos, no Brasil.**

<i>T. gondii</i> ID	No. de genótipos identificados	Classificação genotípica	Origem do isolado	Localização (Estados brasileiros)	Ref.
TgCkBr107– 116; TgCkBr141 – 145	11	11 cepas atípicas	Galinhas	Pará	DUBEY et al., 2007
TgCkBr146 – 164; TgOvBrRS1 – 4; TgPkSMBra	12	1 genótipo clonal (II); 11 cepas atípicas	Galinhas, ovelhas, porcos	Rio Grande do Sul	DUBEY et al., 2007; RAMOS et al., 2018; PARABONI et al., 2019
TgCatBr38 -62; TgCatBr64 -84; TgCpBr1 – 36; TgOvBr1 – 13; TgShBr1 – 4; TgShBr16 – 15; TgGtBr1 – 7; 9 – 12	55	2 genótipos clonais (II); 53 cepas atípicas	Gatos domésticos, capivaras, ovelhas	São Paulo	PENA et al., 2008; RAGOZO et al., 2008; YAI et al., 2009; SILVA et al., 2011
TgCkBr210 – 233; TgCatBrPE01 – 02	7	2 genótipos clonais (II and III) 5 cepas atípicas	Galinhas, gatos selvagens	Fernando de Noronha	DUBEY et al., 2010; MELO et al., 2016
TgCkBr188 – 209	11	11 cepas atípicas	Galinhas	Mato Grosso do Sul	SOARES et al., 2011
TgPgBr06 – 16; TgShBr54 TgShBr124; TgShBr127; TgCkBr284 – 308; TgCarBr85 – 89	19	19 cepas atípicas	Porcos, ovelhas, galinhas e gatos domésticos	Bahia	BEZERRA et al., 2012; MACIEL et al., 2014; ROCHA et al., 2018; DEIRO et al., 2021
TgCTBr1 – 27; TgWildBrMG1 – 6	19	19 cepas atípicas	Humanos; pássaros silvestres	Minas Gerais	CARNEIRO et al., 2013; REGO et al., 2018
TgPgBrRN1 – 5; TgCkBrRN1 – 13 TgGtBrRN1; TgGtBr8; 10	8	8 cepas atípicas	Ovelhas, cabras, porcos e galinhas	Rio Grande do Norte	RAGOZO et al., 2010; CLEMENTINO-ANDRADE et al., 2013
TgCkBr234 – 250; TgCkBr252 – 265; TgCkBr267 – 274; TgCkBr277 – 281	11	11 cepas atípicas	Galinhas	Espírito Santo	PENA et al., 2013
TgCTBral; TgCTBrac; TgCTBrv TgCtBRca; TgCkBrPr1 – 18	12	12 cepas atípicas	Humanos, galinhas	Paraná	HIGA et al., 2014; VIEIRA et al., 2018
TgCkBrNA1 – 5	4	4 cepas atípicas	Galinhas	Maranhão	SOUSA et al., 2016
TgPgBRPB3; 8 – 14; 16 – 18; 20 – 24; 26; 27	12	12 cepas atípicas	Porcos	Paraíba	FEITOSA et al., 2017
TgPgBrPI1 – 16; TgGtBrPI1 – 9	11	11 cepas atípicas	Porcos e cabras	Piauí	REGO et al., 2017
TgCkBrSC1 – 4	4	1 genótipo clonal (I); 3 cepas atípicas	Galinhas	Santa Catarina	PENA et al., 2018

TgCkAl1 – 2; TgCTBrAL1	3	3 cepas atípicas	Galinhas, humanos	Alagoas	SANTOS-SILVA et al., 2020; MELO et al., 2020
TgDgBrMT1 – 9; TgCatBrMT1 TgPwBrMT1 – 2; TgCefBrMT1 – 3; TgBfcuBrMT1; TgAagBrMT1; TgCpBrMT1 – 2; TgOceBrMT1; TgRhaBrMT1; TgCantBrMT1; TgMduBrMT1; TgLonloBrMT1; TgSacoBrMT1; TgCpeBrMT1; TgCkBrMT1 – 51	28	1 genótipo clonal (III); 27 cepas atípicas	Animais domésticos e selvagens; humanos; galinhas	Mato Grosso	WITTER et al., 2020; WITTER et al., 2022
TgCkBrRj2 – 4; 6; 15; 21; 22; 28 TgCkBr10; 11; 13; 37; 59; 89; TgDgBr6; TgCatBr1	17	17 cepas atípicas	Galinhas	Rio de Janeiro	CASARTELLI-ALVES et al., 2021
TgCkBrGO1 – 15	3	3 cepas atípicas	Galinhas	Goiás	REZENDE et al., 2021

As análises de genotipagem foram feitas, principalmente, através de PCR-RFLP, usando os alvos moleculares: SAG1, SAG2, SAG3, alt.SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, Apico e CS3

Casartelli-Alves e colaboradores (2021) conduziram um estudo que caracterizou geneticamente isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas criadas na região metropolitana do Rio de Janeiro. Foram identificados 17 genótipos identificados entre 36 cepas isoladas; todos considerados atípicos e com 7 genótipos sendo descritos pela primeira vez. Além de animais com criação voltada para alimentação humana, a ocorrência da infecção em animais silvestres por cepas atípicas de *T. gondii* é bastante frequente. Rêgo e colaboradores (2018) identificaram seis isolados atípicos de *T. gondii* em pássaros silvestres resgatados no estado de Minas Gerais. Foram identificados cinco genótipos diferentes. Na análise de virulência, três isolados foram considerados de virulência intermediária e, os outros três sendo avirulentos para camundongos. A circulação das cepas atípicas, seja no ambiente silvestre ou doméstico, atua como um fator de risco para a infecção humana. Vinte e cinco cepas de *T. gondii* foram isoladas do sangue periférico de recém-nascidos com toxoplasmose congênita, no estado de Minas Gerais, sendo consideradas de genótipo atípico, conforme revelado por PCR-RFLP. O perfil de virulência variou entre os isolados, porém, a maioria apresentou perfil virulento ou de virulência intermediária em camundongos (CARNEIRO et al., 2013).

A infecção por *T. gondii* é amplamente distribuída pela América do Sul, principalmente nas regiões tropicais. Além do Brasil, a ocorrência de cepas atípicas já foi registrada na Colômbia (CORTÉS et al., 2020) e Argentina (MORÉ et al., 2012; PARDINI et al., 2019). Na Colômbia, foram registrados dois casos de toxoplasmose ocular grave com quadro de falência múltipla de órgãos em indivíduos imunocompetentes. Dessas infecções, foram isoladas cepas atípicas, sendo o primeiro registro de toxoplasmose grave com envolvimento ocular e multissistêmico (CORTÉS et al., 2020). Na Argentina, foram identificadas três cepas, obtidas de galinhas, pertencentes ao mesmo genótipo atípico; análise por PCR-RFLP revelou que essas cepas apresentaram padrão genético idêntico a alguns isolados, também obtidos de galinha, no Brasil (MORÉ et al., 2012). Além da detecção de genótipos atípicos circulantes entre galinhas, também foi identificada a ocorrência de cepas atípicas causando infecção congênita humana na Argentina. Seis isolados foram obtidos do sangue de cordão umbilical e placenta, e todos caracterizados como genótipos atípicos. Entre esses, três já tinham sido registrados no ToxoDB (#14, #138 e #182) e dois foram descritos pela primeira vez. O genótipo #138 havia sido reportado anteriormente, sendo identificado em galinhas; e o genótipo #182 já sendo encontrado circulando em pombas-de-bando (*Zenaida auriculata*), ambos no Brasil (PARDINI et al., 2019).

Esses estudos são importantes para demonstrar que várias espécies animais, sejam criadas para o consumo humano ou de ambiente silvestre, podem ser fontes de infecção de *T. gondii*; além de ilustrar a ampla distribuição geográfica do parasito na América do Sul, confirmam a diversidade genética das cepas circulantes.

### 1.3. Resposta imunológica na Toxoplasmose

*Toxoplasma gondii* induz a ativação da resposta imunológica inata e adaptativa através de vários mecanismos que dependem, em parte, da liberação de seus antígenos excretados/secretados (TOMITA et al., 2021). Para induzir a resposta imunológica, células apresentadoras de antígeno reconhecem moléculas específicas liberadas pelo parasito, através de receptores de reconhecimento padrão capazes de iniciar uma cascata de sinalização e induzir a resposta inflamatória necessária para o controle parasitário (TRINCHIERI, 2003). Durante infecção por *T. gondii* em camundongos, o receptor *Toll-like* 11 (TLR11) é capaz de reconhecer a molécula de profilina, liberada pelo parasito, e em sinergia com TLR12 (RAETZ et al., 2013), desencadear a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  pela via dependente de MyD88, cuja ativação é essencial para a construção de uma resposta inflamatória de perfil Th1 contra o parasito (YAROVISKY et al., 2005; LANG et al., 2007; PLATTNER et al., 2008; STURGE, YAROVINSKY 2014).

A produção inata de IL-12 e IFN- $\gamma$  direciona a diferenciação de linfócitos T de perfil Th1, atuando como feedback positivo e aumentando a resposta inflamatória e a capacidade de controlar a replicação parasitária (GAZZINELLI et al., 1993; TRINCHIERI et al., 2003). Durante a infecção por *T. gondii*, e com o estabelecimento do parasito no cérebro, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são recrutados da periferia e atravessam a barreira hematoencefálica seguindo um gradiente de quimiocinas, principalmente CXCL9, CXCL10 e CXCL11, produzidas no cérebro de maneira depende dos níveis de IFN- $\gamma$  (SA et al., 2015; SUZUKI et al., 2020). Os níveis dessa citocina no cérebro durante a infecção por *T. gondii* atuam estimulando a expressão de VCAM-1, o que contribui para o recrutamento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> para cérebro de camundongos BALB/c (WANG et al., 2007). Uma vez infiltradas no nicho, além de contribuírem com a produção de IFN- $\gamma$ , essas células são capazes de desempenhar atividade citotóxica contra os cistos teciduais formados, de maneira dependente da liberação de perforinas e granzimas e independente do tamanho do cisto (TIWARI et al., 2019). Por sua vez, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> tem papel crucial em auxiliar o estabelecimento dos mecanismos efetores e

desenvolvimento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e na ativação de macrófagos, através da produção de citocinas, como IL-2 e IFN- $\gamma$  respectivamente. A atividade sinérgica de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> se mostra, então, de grande importância no controle da infecção crônica e na prevenção de quadros de reagudização (KHAN; HWANG; MORETTO, 2019).

Apesar da capacidade de *T. gondii* em induzir uma resposta inflamatória mediada por IFN- $\gamma$  já ser bem conhecida, as diferentes cepas do parasito atuam de maneira diferente no estímulo imunológico (ROBBEN et al., 2004). As características genótípicas e suas diferenças entre as cepas influenciam o curso da infecção, baseando-se na capacidade do parasito de estimular ou diminuir a resposta inflamatória. Os genótipos clonais (tipos I, II e III) de *T. gondii* exibem padrões de crescimento e virulência variados; cada cepa pode ativar o sistema imunológico de maneira distinta, de acordo com secreção das proteínas produzidas, principalmente, pelas roptrias (ROPs) e grânulos densos (GRAs) (Tabela 2), que podem apresentar variações genéticas significativas entre as cepas (ZHANG et al., 2019). Nos últimos anos, muitas proteínas liberadas por *T. gondii* foram identificadas e suas habilidades em modular a resposta imunológica do hospedeiro mostraram-se envolvidas no perfil de virulência e no curso da infecção.

Proteínas secretadas pelas roptrias, como ROP16 e ROP18, atuam como fatores de virulência na ativação da resposta imunológica modulada por *T. gondii* (SAEIJ et al., 2006). Cada proteína tem uma função particular durante a interação parasito-hospedeiro, sendo capaz de silenciar e/ou induzir a resposta inflamatória. A ROP16 é capaz de interferir na via de sinalização mediada por STAT3/6, levando a supressão da produção de IL-12. Por outro lado, a ROP18 suprime a apresentação de antígenos de maneira dependente e independente de GTPases imunorreguladas (IRG) em macrófagos e células dendríticas (HERNANDEZ-DE-LOS-RIOS et al., 2019; ROMMEREIM et al., 2019).

**Tabela 2: Principais proteínas liberadas por *Toxoplasma gondii*, identificadas como fatores de virulência e sua interação com o sistema imunológico.**

Proteínas	Local de produção	Mecanismos de virulência e importância imunológica	Ref.
ROP5		Regulação da atividade catalítica de ROP18, formando o complexo ROP5/ROP18 Bloqueio da atividade microbicida mediada por IFN- $\gamma$ em macrófagos Limita a apresentação de antígenos em macrófagos e células dendríticas	BEHNKE et al., 2012; ROMMEREIM et al., 2019
ROP7		Interage com o domínio NACHT de NLRP3 e promove a hiperativação de inflamassoma, com indução de IL-1 $\beta$	ZHU et al., 2022

<b>ROP16</b>	Roptrias	Fosforilação de STAT3/6 e indução da resposta inflamatória mediada por IL-12 e IFN- $\gamma$	BUTCHER et al., 2011; HERNANDEZ-DE-LOS-RIOS et al., 2019
<b>ROP18</b>		Diminuição da produção de IL-16, TNF- $\alpha$ e IL-12 por macrófagos através da fosforilação do domínio p65 de NF- $\kappa$ B Supressão dos mecanismos de apresentação de antígenos em macrófagos e em células dendríticas	DU et al., 2014; ROMMEREIM et al., 2019
<b>GRA3</b>		Regulação dos mecanismos de apresentação de antígeno de forma independente de IFN- $\gamma$ ou do tipo celular	ROMMEREIM et al., 2019
<b>GRA6</b>		Regulação cepa-específica da ativação de NFAT4, modulação da expressão de CXCL2 e CCL2; e recrutamento de neutrófilos	MA et al., 2014
<b>GRA7</b>		Interage com o complexo ROP5/ROP18, se ligando diretamente à ROP5 para promover a fosforilação de Irga6 e a inativação dos mecanismos de resistência mediados por IRG	HERMANNNS et al., 2016
<b>GRA12</b>		Confere resistência a resposta imunológica mediada por IFN- $\gamma$ , contribuindo para a sobrevivência parasitária e estabelecimento da infecção de forma cepa-específica	FOX et al., 2019; WANG et al., 2019
<b>GRA15</b>	Grânulos densos	Ativação de NF- $\kappa$ B via TRAF6; Indução da via de ativação do inflamassoma e produção de IL-1 $\beta$ , IL-12 e TNF- $\alpha$	IHARA et al., 2020; MUKHOPADHYAY et al., 2020; TOMITA et al., 2021;
<b>GRA24</b>		Atua como ativador da resposta imunológica, contribuindo para a produção de IL-12, IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ via ativação de MAPK e NF- $\kappa$ B, independentemente de MyD88	MERCER et al., 2020; MUKHOPADHYAY et al., 2020;
<b>GRA25</b>		Modulação da produção de CCL2 por macrófagos e contribui para a sobrevivência do parasito	SHASTRI et al., 2014

Além do impacto nos mecanismos de apresentação de antígeno, estudos anteriores mostraram que as proteínas ROP7, GRA15 e MAG1 são capazes de interferir na ativação da via do inflamassoma. ROP7 consegue agir como o segundo sinal necessário para ativação de NLRP3, interagindo com o domínio NACHT, levando a indução de IL-1 $\beta$  e a hiperativação do inflamassoma (ZHU et al., 2022). As proteínas GRA15 e MAG1, ambas pertencentes ao grupo de proteínas produzidas pelos grânulos densos, são responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre a estimulação e a diminuição da via do inflamassoma, respectivamente. Enquanto GRA15 atua estimulando essa via e, conseqüentemente, protegendo o hospedeiro durante a fase aguda da infecção, MAG1 diminui a ativação do inflamassoma, contribuindo para a disseminação do parasito e formação dos cistos teciduais (TOMITA et al., 2021).

Além da capacidade da GRA15 em induzir a resposta imunológica inata pela via inflamassoma, foi mostrado que essa proteína também é capaz de induzir a produção de IFN- $\beta$  via cGAS/STING (WANG et al., 2019; IHARA et al., 2020). A ativação dessa cascata de sinalização confere, ao camundongo infectado, a resistência necessária para sobreviver à infecção com controle da replicação parasitária (WANG et al., 2019). GRA15 de parasitos

pertencentes ao genótipo clonal tipo II consegue induzir eficientemente a via de ativação de NF- $\kappa$ B e sua translocação nuclear, contribuindo para a indução de IFN- $\gamma$  (ROSOWSKI et al., 2010). Existem diferenças polimórficas nas proteínas produzidas por diferentes cepas de *T. gondii*. Esse fato reflete-se na incapacidade da cepa RH (do tipo I) em ativar eficientemente NF- $\kappa$ B, devido a expressão de uma GRA15 defeituosa, levando a baixos níveis de IL-12; enquanto a cepa GT1 (também do tipo I) consegue ativar essa via eficientemente, induzindo a produção de altos níveis de IL-12, através da expressão de uma GRA15 funcional (YANG et al., 2013).

Outras proteínas produzidas pelos grânulos densos, como GRA6, GRA7, GRA12, GRA24 e GRA25, interferem na indução da resposta imunológica, favorecendo a replicação parasitária e o estabelecimento da infecção crônica (SHASTRI et al., 2014; HERMANNNS et al., 2016; FOX et al., 2019; MERCER et al., 2020). A atividade dessas proteínas pode variar; funcionando como fatores de virulência importantes, conforme mostrado através de camundongos infectados com cepas do tipo I e II, que tiveram a expressão de GRA12 deletada, apresentaram mortalidade reduzida (WANG et al., 2019). Além disso, a GRA6 possui um papel importante no estabelecimento da resposta imunológica, de maneira dependente da cepa. Sua capacidade de induzir a ativação de NFAT4 e, conseqüentemente, estimular a produção de quimiocinas envolvidas no recrutamento de células inflamatórias, como neutrófilos, tem papel crucial nas diferenças de virulência observadas entre cepas clonais dos tipos I e II (MA et al., 2014).

As atividades cepa-específicas observadas entre as proteínas secretadas por *T. gondii* podem servir para explicar os diferentes níveis de gravidade da infecção, como resultado de uma ativação imunológica precoce ou tardia, além de interferir nos mecanismos de recrutamento celular, responsáveis pelo controle parasitário. Na infecção humana, toda a variabilidade genética existente entre as cepas de *T. gondii* conferem diferentes níveis de gravidade da doença. Genótipos altamente diversos podem ser associados a perfis de virulência distintos, como observado entre as cepas circulantes na América do Sul; destacando as distintas manifestações da doença em diferentes regiões geográficas, como casos de toxoplasmose ocular e congênita graves em áreas com elevada incidência de cepas atípicas (BOTTOS et al., 2009; KHAN et al., 2009; XIAO, YOLKEN, 2015).

Análises dos principais fatores de virulência presentes nas cepas atípicas podem ser usados para estimar o nível de patologia induzida no hospedeiro infectado. Importantes proteínas secretadas, e já bem conhecidas entre as cepas clonais de *T. gondii*, como GRA5,

ROP18 e ROP5, estão envolvidas na habilidade de cepas atípicas em induzir infecções mais graves em modelos murinos (CHEN et al., 2012; BEHNKE et al., 2015). As diferenças na virulência das cepas atípicas estão relacionadas a mudanças polimórficas nas proteínas secretadas por *T. gondii*, garantindo mecanismos distintos para ativação da resposta imunológica. Substituições de aminoácidos nos alelos de ROP18 foram mostradas como responsáveis por conferir o aumento da virulência em várias cepas de *T. gondii* (KHAN et al., 2009) através da evasão dos mecanismos antiparasitários mediados por IRG (NIEDELMAN et al., 2013).

Além da identidade polimórfica das ROPs e GRAs, a possibilidade de formar complexos entre si representa um mecanismo chave na predição da virulência entre as cepas atípicas de *T. gondii* identificadas. A importância da associação entre ROP18 e ROP5 na virulência de cepas clonais já é conhecida, e combinações alélicas específicas dessas duas proteínas podem ser fatores preditores da virulência de cepas atípicas (SHWAB et al., 2016). Rêgo e colaboradores (2017) mostraram que o perfil de virulência de cepas atípicas de *T. gondii*, isoladas de porcos, estava relacionado a presença de uma combinação específica no complexo ROP18/ROP5, apresentando alelos 4 e 3, respectivamente. Além disso, cepas consideradas avirulentas ou com virulência intermediária, em modelo experimental murino, esse perfil alélico estava alterado, apresentando alta frequência de alelos 2 e 3 para ROP18 e ROP5 (RÊGO et al., 2017). Foi reportado que cepas virulentas apresentam uma associação de alelos 4 e 3 nesse complexo de ROPs, sendo capaz de induzir níveis elevados de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-17 e TNF- $\alpha$  durante a infecção aguda por *T. gondii* (COSTA et al., 2020).

Em um estudo realizado na Argentina, a mesma combinação alélica presente no complexo ROP18/ROP5, que se tinha pensado ser preditor de virulência, foi encontrada em uma cepa considerada avirulenta durante infecção de camundongos experimentais (BERNSTEIN et al., 2021). Por outro lado, cepas virulentas de *T. gondii* isoladas no Caribe e no Brasil apresentaram combinação alélica de ROP18/ROP5 distinta; enquanto cepas avirulentas identificadas no Caribe e Europa apresentaram a mesma combinação (HAMILTON et al., 2019). As diferenças na virulência entre cepas atípicas, que compartilham (ou não) a mesma combinação alélica do complexo ROP18/ROP5, podem ser reflexo de fatores secundários envolvidos na capacidade do parasito em induzir patologia no hospedeiro. A localização geográfica, espécie animal onde o parasito foi isolado e/ou as características imunológicas do hospedeiro podem contribuir para os diferentes padrões de virulência durante a infecção, de maneira independente do genótipo do parasito.

A diversidade de genótipos e seus perfis de virulência identificados por ensaios de infecção experimental em camundongos, reflete os níveis variáveis de gravidade da toxoplasmose já registrados entre a população. Cepas atípicas de *T. gondii* isoladas de casos de infecção congênita humana, com diferentes níveis de gravidade, foram capazes de induzir diferentes níveis de patologia em camundongos experimentais, mesmo quando infectados com cepas do mesmo genótipo (PINHEIRO et al., 2015). A infecção humana por cepas atípicas altamente virulentas pode ser caracterizada pelo estímulo inflamatório distinto, quando comparado à infecção causada por cepas clonais. Pacientes colombianos com toxoplasmose ocular apresentaram infecção causada por cepas altamente heterogêneas, capazes de suprimir a resposta mediada por IFN- $\gamma$ , enquanto estimularam o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  (DE-LA-TORRE et al., 2013). Essa habilidade de diminuir IFN- $\gamma$  contribui para a redução do controle da replicação parasitária, favorecendo sua disseminação e, ao mesmo tempo, contribuindo para o aumento do dano tecidual em resposta aos níveis de TNF- $\alpha$ . Nesse sentido, o desequilíbrio na resposta imunológica, desencadeada por cepas atípicas virulentas, atua contribuindo para o desenvolvimento de quadros mais graves de toxoplasmose.

Os mecanismos de ativação imunológica variam consideravelmente entre as cepas de *T. gondii*. Apesar de pouco ser conhecido sobre as vias imunológicas ativadas durante infecções por cepas atípicas, alguns estudos demonstraram a capacidade das proteínas secretadas por *T. gondii* em induzir a resposta inflamatória. Melo e colaboradores (2013) mostraram que a proteína GRA15 de cepas atípicas consegue induzir a produção de IFN- $\beta$  por macrófagos e estimular a ativação de NF- $\kappa$ B independentemente da composição alélica presente na proteína do parasito. As variações genéticas entre as cepas atípicas de *T. gondii*, mesmo quando pertencentes ao mesmo genótipo, podem direcionar ativação imunológica distinta, impactando diretamente o curso da infecção e o estabelecimento da patogenicidade no hospedeiro. Cepas atípicas de mesmo genótipo mostraram-se capazes de ativar respostas imunológicas diferentes, através da interação com vários componentes envolvidos na ativação de macrófagos; em que cepas virulentas foram capazes de induzir a ativação alternativa dessas células através da fosforilação de STAT6, enquanto cepas menos virulentas direcionaram para a ativação clássica dos macrófagos, pela indução de NF- $\kappa$ B e produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  (ZHANG et al., 2013).

Nesse contexto, torna-se plausível a conexão entre a ativação da resposta imunológica, os diferentes perfis de virulência exibidos entre as cepas atípicas de *T. gondii* e seu impacto no curso da toxoplasmose.

#### 1.4. Origem, desenvolvimento e função das células mieloides

As células mieloides, como monócitos/macrófagos e células dendríticas, têm papel importante no estabelecimento da resposta imunológica, através do reconhecimento, apresentação, combate e eliminação de patógenos invasores (SERBINA et al., 2008). Essa linhagem celular tem origem através de precursores celulares originados durante os processos de embriogênese (Figura 3) (GODIN et al., 1995; PALIS et al., 1999).

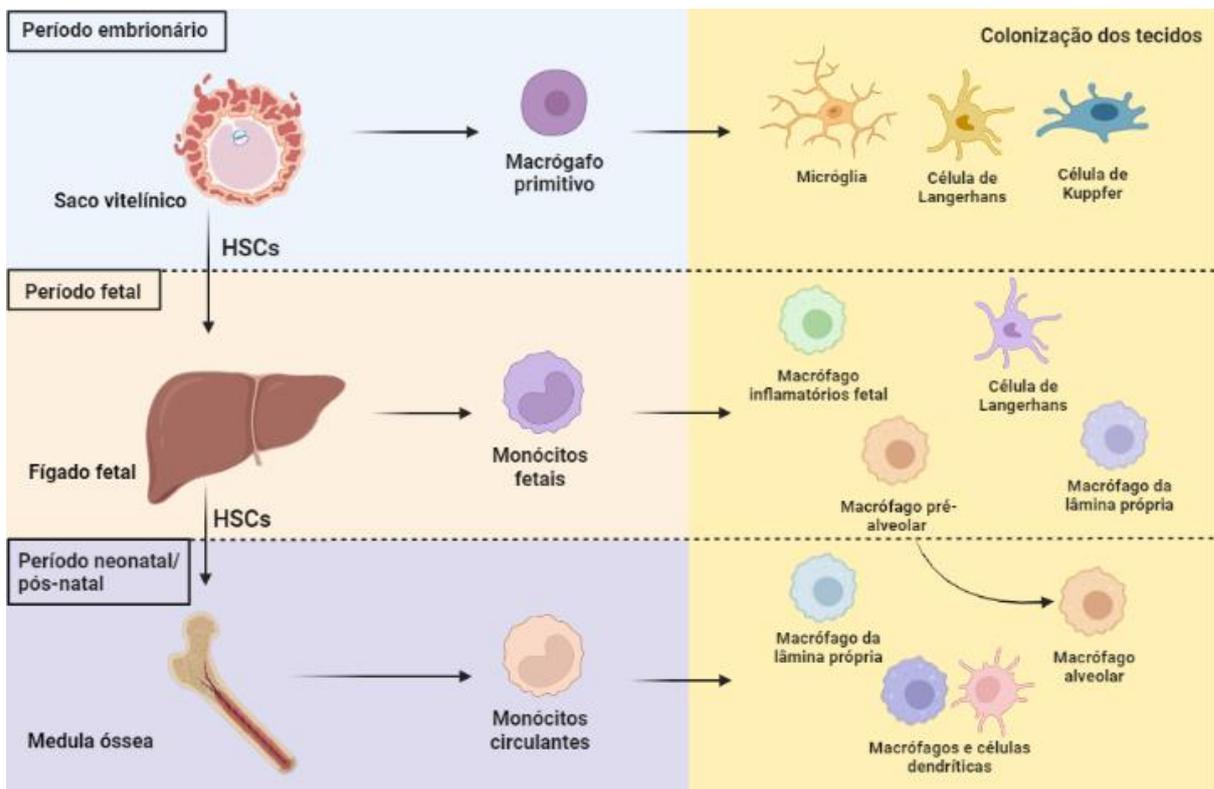
O início da mielopoiese, durante a gestação, se dá com a formação de progenitores mieloides originados na ectoderme primitiva do saco vitelínico (YS – do inglês *Yolk sac*). Esses progenitores darão origem à população de macrófagos primitivos que, com a formação das vias circulatórias embrionárias, chegam às regiões do cérebro, ao fígado fetal e pele, originando populações de macrófagos residentes: micróglia, células de Küpffer e de Langerhans, respectivamente. Posteriormente, ocorre a formação de células-tronco hematopoiéticas (HSCs – do inglês *Hematopoietic stem cells*), derivadas do YS e da região da aorta-gônadas-mesonefros (AGM) (MEDVINSKY, DZIERZAK 1996; PALIS et al., 1999; KUMARAVELU et al., 2002), que migram para o fígado fetal, onde expandem, maturam e dão origem a diversos tipos celulares, incluindo células mieloides maduras (KLEER et al., 2014; HEINIG et al., 2015).

Com a colonização pelas HSCs, o fígado fetal se torna o principal órgão hematopoiético nesse estágio, propiciando o desenvolvimento de monócitos progenitores, capazes de originar populações de células residentes, como os macrófagos alveolares no pulmão (TRAVER et al., 2001; KLEER et al., 2014; HEINIG et al., 2015; SHENG et al., 2015; LI et al., 2020).

Após colonização e diferenciação das células no fígado fetal, HSCs migram para a medula óssea (BM – do inglês *Bone Marrow*) no final da gestação. Nesse ponto, a BM torna-se responsável pela manutenção da hematopoiese ao longo da vida pós-natal; contribuindo para a população de monócitos inflamatórios e células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs), capazes de serem recrutados para locais de infecção ou injúria (KLEER et al., 2014; HEINIG et al., 2015). A ativação de fatores de transcrição específicos, como o PU.1, é essencial para diferenciação de macrófagos que, juntamente a produção de citocinas e quimiocinas no nicho, garantem sua estabilidade fenotípica (DAHL et al., 2003; ROSENBAUER, TENEN 2007; MONTICELLI, NATOLI 2017).

Precursos mieloides comuns (CMP) produzidos na BM originam populações de monócitos circulantes, que adquirem características inflamatórias durante quadros de infecção e/ou injúria tecidual, capazes de infiltrar no tecido (LAVIN et al., 2015). Essas células são

caracterizadas pela expressão de receptores de superfície específicos, responsáveis pela diferenciação das subpopulações conhecidas. Em humanos, o nível de expressão dos receptores CD14 e CD16 garante a separação das populações de monócitos clássicos ( $CD14^+CD16^-$ ), intermediários ( $CD14^+CD16^+$ ) e não clássicos ( $CD14^-CD16^+$ ) (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). Em modelos experimentais murinos, a classificação das subpopulações de monócitos se baseia, principalmente, no nível de expressão do receptor Ly6C. Além dessa, a expressão de outras moléculas, como CX3CR1 e CCR2 auxiliam na classificação de monócitos clássicos e não clássicos (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). Apesar da diferença de receptores usados para identificação dessas populações celulares, foi demonstrado que monócitos murinos e humanos compreendem tipos celulares equivalentes (INGERSOLL et al., 2009).



**Figura 3: Origem e desenvolvimento de células mieloides residentes e circulantes.** Populações de macrófagos residentes, como micróglia e macrófagos alveolares, têm sua origem nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e fetal. A diferenciação de células-tronco a partir do saco vitelínico é responsável pela colonização do tecido nervoso, originando a micróglia no começo do desenvolvimento embrionário. Subsequentemente, o fígado fetal é responsável por dar origem aos precursores mieloides que colonizarão o pulmão fetal, inicialmente originando macrófagos pré-alveolares que, após nascimento, formam a população de macrófagos alveolares. A partir do nascimento, e durante toda a vida adulta, a medula óssea torna-se a responsável pela produção de células mieloides circulantes, que darão origem as populações de células como monócitos/macrófagos e células dendríticas. Imagem adaptada de Kleer et al., 2014.

Em camundongos, monócitos clássicos podem ser classificados como  $\text{Ly6C}^{\text{high}}\text{CCR2}^{\text{high}}\text{CX3CR1}^{\text{low}}$ ; enquanto monócitos não clássicos se caracterizam por apresentar  $\text{Ly6C}^{\text{low}}\text{CCR2}^{\text{low}}\text{CX3CR1}^{\text{high}}$  (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010; MILDNER et al., 2016). Os monócitos clássicos  $\text{Ly6C}^+$  estão envolvidos no estabelecimento do processo inflamatório, sendo recrutados da medula óssea através da interação entre o receptor CCR2 expresso no monócito e a presença do seu ligante: a quimiocina CCL2/MCP-1 (SERBINA, PAMER 2006); além disso, o aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial atuam contribuindo para os mecanismos de transmigração celular para os locais de injúria tecidual e/ou infecção (GALLI et al., 2011; GERHARDT, LEY 2015; WYNN, VANNELLA 2016; KRATOFIL et al., 2017).

Já foi demonstrado que o estabelecimento de infecções contribui para alterações no funcionamento da medula óssea, através da inflamação gerada, estimulando o aumento da mielopoiese e liberação de monócitos que serão recrutados para os locais de infecção (ZARETSKY et al., 2015; PARK, HUNTER 2020). Em modelo experimental de infecção por *Toxoplasma gondii*, foi observado o aumento na mielopoiese com expansão de monócitos  $\text{Ly6C}^+$  na infecção aguda, de maneira dependente de IL-6 (CHOU et al., 2012); além da indução de modificações epigenéticas, principalmente relacionadas a sinalização via STAT1, envolvidas no estabelecimento das funções efetoras dessa população celular (DETAVERNIER et al., 2019). O recrutamento de monócitos clássicos durante a infecção por *T. gondii*, dependente do eixo CCR2-CCL2/MCP-1, é crucial para o controle da replicação parasitária através da produção de mediadores inflamatórios como IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e óxido nítrico (ROBBEN et al., 2004; DUNAY et al., 2008; DUNAY, FUCHS, SIBLEY, 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA

*Toxoplasma gondii* é capaz de induzir a resposta imunológica através da secreção de proteínas específicas, que estão envolvidas nos mecanismos de reconhecimento, ancoragem e invasão da célula hospedeira. A capacidade dessas proteínas em induzir a resposta inflamatória está relacionada com o nível de virulência apresentada pelas cepas, além de conferir estratégias de subversão do sistema imunológico, a fim de favorecer a disseminação parasitária e a manutenção da infecção crônica. Para o estabelecimento da resposta imunológica protetora adequada, os monócitos inflamatórios e macrófagos residentes são essenciais para controlar a replicação parasitária, através da produção de mediadores inflamatórios e microbicidas, além de estimular a resposta imunológica adaptativa mediada por linfócitos T auxiliares de perfil Th1, com produção de IFN- $\gamma$  essencial para a cronificação da infecção. Porém, devido à variabilidade genética existente entre as cepas de *T. gondii*, principalmente entre cepas atípicas que circulam em grande número no ambiente e são responsáveis por parte da infecção humana, como ocorre no Brasil, o perfil de ativação imunológica e o papel das células mieloides podem contribuir para a evolução de quadros mais graves da infecção, com comprometimento tecidual exacerbado e repercussões deletérias no hospedeiro. Nesse contexto, buscamos avaliar o impacto da infecção crônica por cepa atípica de *T. gondii* sobre as populações de macrófagos residentes do cérebro e pulmão; e como a inflamação persistente contribui para alterações na homeostase cerebral e pulmonar.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o impacto da infecção crônica por cepa atípica de *Toxoplasma gondii* sobre os componentes da resposta imunológica, e no estabelecimento de alterações comportamentais em modelo murino experimental.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar os níveis de anticorpos IgG específicos e carga de cistos no cérebro, a fim de acompanhar a evolução da infecção crônica pela cepa atípica de *T. gondii*
- Verificar o nível de infiltrado inflamatório no cérebro, e determinar as populações de células imunológicas presentes no cérebro de camundongos durante a infecção crônica;
- Avaliar o nível de inflamação cerebral desenvolvida durante a infecção crônica;
- Analisar o impacto da infecção crônica por cepa atípica sobre fatores neurotróficos em diferentes áreas do cérebro de camundongos;
- Identificar possíveis alterações comportamentais nos camundongos durante a infecção crônica pelas diferentes cepas de *T. gondii*;
- Determinar o nível de infiltrado inflamatório e identificar as principais células imunológicas presentes no lavado broncoalveolar de camundongos, durante a infecção aguda e crônica por cepa atípica de *T. gondii*;

## 4. RESULTADOS

### CAPÍTULO I

INFECÇÃO CRÔNICA POR CEPA ATÍPICA DE *Toxoplasma gondii* INDUZ INFLAMAÇÃO CEREBRAL, COM REDUÇÃO DE MICRÓGLIA E CONTRIBUI PARA ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO

#### 4.1. Introdução

A infecção por *Toxoplasma gondii* tem levantado a discussão sobre seu papel no desenvolvimento de uma neuroinflamação crônica, com capacidade de interferir na homeostase cerebral e, dessa forma, modificar o comportamento do hospedeiro. Essa hipótese tem sido suportada por estudos que demonstram a presença de modificações neurológicas em cérebros infectados, com consequências comportamentais para o hospedeiro (BERDOY et al., 2000; FLEGR et al., 2013; PARLOG et al., 2014; PARLOG et al., 2015; FLEGR, KUBA 2016).

A interferência no funcionamento cerebral de hospedeiros imunocompetentes se relaciona com o número e localização de cistos no cérebro (GIACOMINI et al., 2007; GONZALEZ et al., 2007; MELZER et al., 2010), podendo estar envolvida no desenvolvimento de sintomas esquizofrênicos, bipolaridade, estimular quadros agressivos, depressivos e impulsividade (COOK et al., 2015; STICH et al., 2015; ELSHEIKHA, ZHU 2016; FLEGR, KUBA 2016; MAHMOUD et al., 2016).

Diferentes padrões inflamatórios e modificações cerebrais no hospedeiro, em resposta a presença do parasito, podem ser explicados pela marcante variabilidade genética existente entre as cepas de *T. gondii*. Esse parasito consegue interferir em vários mecanismos celulares, sendo capaz de modular a resposta imunológica a seu favor sem causar, na maioria das vezes, danos de iminência mórbida no hospedeiro (DENKERS, 2003; FUX et al., 2003; LALIBERTO, CARRUTHERS 2008; LAMBERT, BARRAGAN 2010). As alterações na resposta imunológica, durante a infecção crônica, representam o melhor exemplo de como *T. gondii* consegue subverter o funcionamento celular, e do organismo, a seu favor (LALIBERTO, CARRUTHERS 2008; MELO et al., 2011). Dessa forma, o envolvimento do ambiente inflamatório para manutenção da fase crônica, no estabelecimento da patologia cerebral reflete-se em como o parasito consegue interferir na expressão de mediadores inflamatórios, receptores de membrana e ações enzimáticas que facilitam sua disseminação e passagem por barreiras epiteliais, como a barreira hematoencefálica (CLARK et al., 2010; CHOU, LAI 2011; WANG, LAI 2013; SA et al., 2015).

A chegada de *T. gondii* no cérebro, e a formação de cistos teciduais, não apresenta uma distribuição do parasito com tropismo por áreas específicas do cérebro (BERENREITEROVÁ et al., 2011; GATKOWSKA, WIECZOREK, 2012; SCHLUTER, BARRAGAN 2019); o desenvolvimento de uma infecção crônica e estabelecimento da neuroinflamação persistente pode estimular a quebra da homeostase e funcionamento cerebral, refletindo em alterações

sinápticas, desregulação de neurotransmissores e comprometimento das redes perineuronais (TORRES et al., 2018; BRITO et al., 2020; MEURER et al., 2020). Sendo assim, uma possível explicação para as modificações na homeostase cerebral, durante a infecção crônica por *T. gondii*, pode ter como base o desenvolvimento da inflamação crônica, rica em espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (YAO et al., 2006; DWIR et al., 2009; CABUNGCAL et al., 2013; WANG et al., 2014; DO et al., 2015; MORISHITA et al., 2015).

Durante a fase embrionária, células-tronco embrionárias produzidas no saco vitelínico colonizam e originam a população de micróglia, os macrófagos residentes do cérebro, que se mantém durante a vida adulta de maneira independente das outras populações de monócitos circulantes (PERDIGUERO et al., 2013; KATSUMOTO et al., 2014; THION, GAREL 2020). A micróglia compreende uma população de células residentes que pode ser diferenciada através da expressão de receptores específicos, como Tmem119, SiglecH e P2ry12 (SHEMER et al., 2018; BORST et al., 2021). Em condições fisiológicas, essas células desempenham funções essenciais na manutenção do funcionamento cerebral, sendo capazes de monitorar o funcionamento neuronal, transmissão sináptica, produzir fatores neurotróficos e atuar como sentinelas na detecção de patógenos invasores, com produção de mediadores inflamatórios, sendo essenciais para a comunicação entre os sistemas nervoso e imunológico (SOUSA et al., 2017; BORST et al., 2021).

A plasticidade fenotípica e morfológica da micróglia frente a insultos inflamatórios e/ou infecciosos é bem documentada; durante infecção, essas células têm a capacidade de se tornarem ativadas, apresentando variações morfológicas características, e capazes de contribuir para a produção de mediadores inflamatórios importantes para controle de infecções (ROCK et al., 2004; SALTER, STEVENS 2017; COWAN et al., 2022; JOHNSON, KOSHY 2022).

*T. gondii*, ao chegar no cérebro, é capaz de infectar neurônios e astrócitos, estabelecendo a formação dos cistos nessas células. Porém, foi mostrado que a micróglia consegue atuar inibindo a replicação parasitária, através da produção de óxido nítrico (CHAO et al., 1993), de maneira dependente da presença de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (CHAO et al., 1994). Durante a infecção por *T. gondii* no cérebro, macrófagos inflamatórios que infiltraram no nicho apresentam forte ativação de NF- $\kappa$ B, promovendo as vias de sinalização responsáveis por produção de citocinas inflamatórias clássicas; por sua vez, a micróglia ativada durante a infecção é uma importante fonte da alarmina IL-1 $\alpha$ , capaz de estimular inflamação local e atuar no controle da replicação parasitária (BATISTA et al., 2020). Apesar da sua atividade microbicida eficaz, ao ser infectada por *T. gondii*, a micróglia tem seu perfil de ativação

modulado através da indução de TGF- $\beta$  que atua inibindo as vias inflamatórias, com redução nos níveis de óxido nítrico, o que permite a disseminação do parasito pelo tecido (ROZENFELD et al., 2005). Dessa forma, o parasito se mostra capaz de interferir nas funções da micróglia, seja por estimular um perfil inflamatório que pode comprometer a integridade tecidual, ou por comprometer as funções protetoras da micróglia e favorecer a replicação e disseminação parasitária no nicho (DELLACASA-LINDBERG et al., 2011). Além disso, *T. gondii* consegue interferir no equilíbrio entre a micróglia e neurônios, comprometendo o funcionamento cerebral adequado e contribuindo para desenvolvimento de alterações cerebrais (CARRILLO et al., 2020).

Neste contexto, esse capítulo apresenta o envolvimento da infecção crônica por cepa atípica de *T. gondii* sobre a população de micróglia e no estímulo inflamatório com forte infiltrado de linfócitos e células mieloides derivadas da medula óssea. Além disso, mostramos como a interferência do parasito e da inflamação crônica gerada contribuem para modificações comportamentais em modelo experimental murino.

## **4.2. Materiais e Métodos**

### **4.2.1. Obtenção dos parasitos e manutenção das cepas**

Nesse trabalho, foram utilizadas duas cepas de *Toxoplasma gondii*, sendo uma cepa clonal do tipo II (ME49) e uma cepa atípica (TgCkBrRN2, aqui referida como CK2). Os parasitos foram cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor, do Laboratório de Toxoplasmose no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

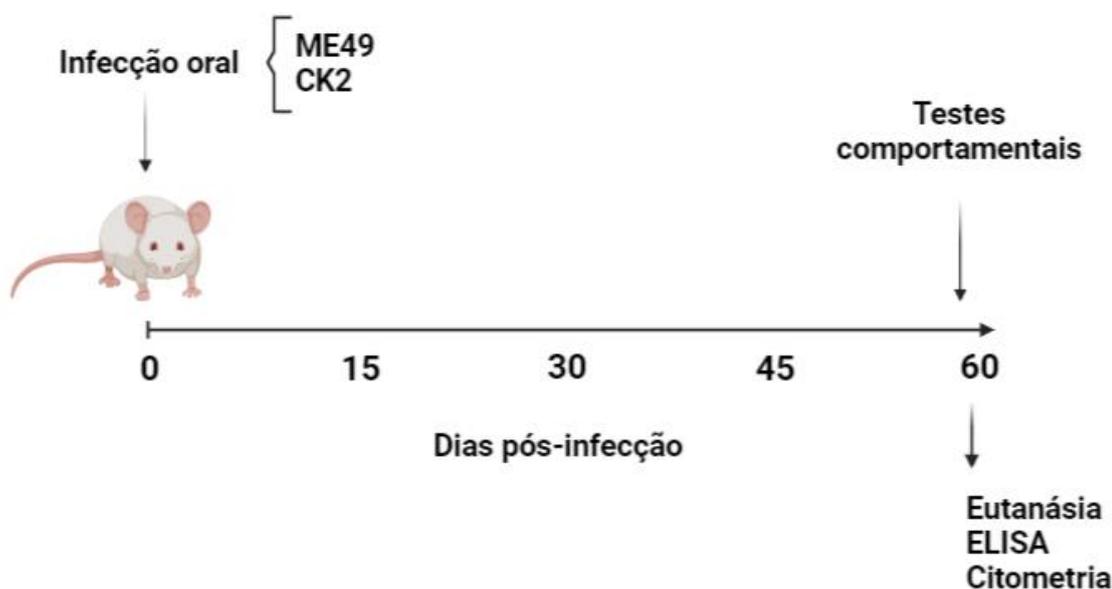
A cepa atípica, CK2, foi isolada por Clementino-Andrade et al. (2013) a partir do coração de galinhas oriundas de uma fazenda de criação no estado do Rio Grande do Norte, sendo identificada como pertencente ao genótipo #163 registrado no ToxoDB.

As cepas foram mantidas congeladas no estágio de taquizoítos, no nitrogênio líquido. Antes do início dos experimentos, as cepas foram descongeladas e inoculadas por via intraperitoneal em camundongos Swiss, que foram mantidos por dois meses para cronificação e formação dos cistos. Após esse período, os cérebros foram removidos para a obtenção e quantificação dos cistos teciduais, destinados a infecção dos grupos experimentais.

### **4.2.2. Animais e delineamento experimental**

Para a realização desse trabalho, foram utilizados camundongos isogênicos machos, da espécie *Mus musculus* e linhagem BALB/c, com idade entre 8 – 9 semanas. Os camundongos foram obtidos do Biotério Central da UFMG, e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia, no Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, em ciclo de 12h/12h de claro/escuro; e fornecimento de água e ração *ad libitum*. Todo o trabalho experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo CEUA 139/2020.

O delineamento experimental está representando na figura 4. Resumidamente, os animais foram organizados em três grupos de sete animais cada, sendo: grupo não infectado (Ni), grupo infectado com cepa atípica (CK2) e grupo infectado com cepa clonal (ME49). A infecção foi realizada por via oral, com 10 cistos teciduais por camundongo, seja da cepa ME49 ou CK2. Os camundongos permaneceram infectados por 60 dias para estabelecimento da infecção crônica.



**Figura 4: Desenho da infecção experimental por *T. gondii*.** Os camundongos foram divididos em três grupos, sendo um grupo não infectado (Ni); um grupo infectado com ME49 e o último grupo infectado com a cepa atípica CK2. Os camundongos permaneceram infectados por 60 dias e, ao final desse período, tiveram seu comportamento avaliado. Após análises comportamentais, os camundongos seguiram para eutanásia e coleta dos cérebros e sangue. Os tecidos seguiram para dosagem de anticorpos, citocinas, fatores neurotróficos e imunofenotipagem por citometria de fluxo.

#### 4.2.3. Testes comportamentais

Os testes comportamentais realizados tiveram por finalidade analisar o perfil locomotor, integridade da memória e traços de ansiedade e depressão apresentados pelos camundongos durante a infecção crônica. Para tais análises, foram realizados os testes de campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto em cruz elevada (LCE) e nado forçado. Os protocolos de análise comportamental foram realizados 60 dias pós-infecção.

Os testes foram realizados de forma a minimizar o estresse durante os procedimentos, dessa forma, sendo realizados em um intervalo de 1 a 2 dias entre cada teste para evitar exaustão dos animais. Os animais foram observados em ordem aleatória e cega, tendo seu comportamento gravado por câmera de vídeo e processado com o auxílio do software ANY-MAZE™ (Stoelting Co., IL, USA).

#### 4.2.3.1. Campo Aberto

Esse teste tem como objetivo analisar a atividade locomotora e sinais de ansiedade nos animais em estudo. O campo aberto consiste em uma arena circular aberta com chão e paredes pretas (Figura 5). Durante o teste, cada animal foi colocado no centro do campo e a distância percorrida (em metros) e o tempo (em segundos) de permanência na região central ou periférica do campo foram registrados.

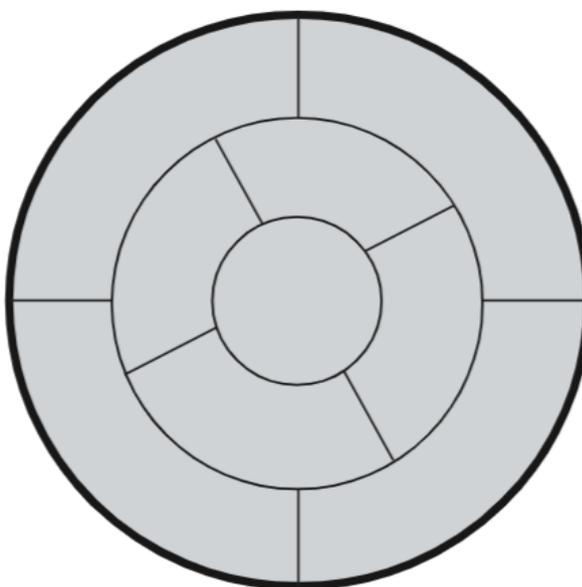


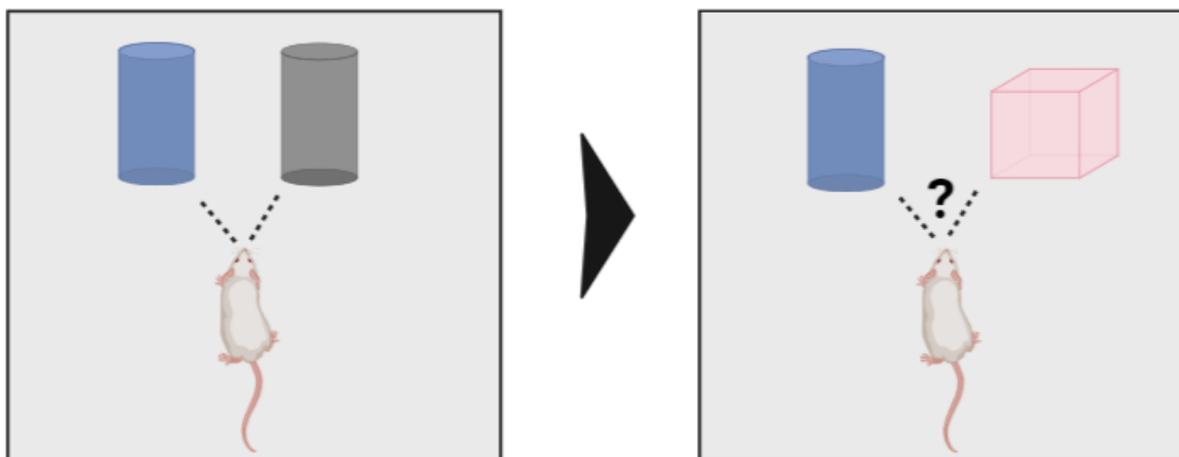
Figura 5: Esquematização do campo aberto em arena circular.

#### 4.2.3.2. Teste de Reconhecimento de Objetos

A Tarefa de reconhecimento de objetos (Figura 6) foi utilizada para avaliação da memória dos camundongos. No 1º dia os animais foram habituados em uma caixa de acrílico de dimensões 380 x 380 x 150 mm (comprimento x largura x altura), coberta por maravalha, durante 5 minutos. No 2º e 3º dia, foi realizado o pré-teste, em que os animais foram reexpostos à caixa, sendo introduzidos 2 objetos iguais, distando 80 mm das paredes da caixa. Os animais foram mantidos na caixa por 10 minutos e 5 minutos, respectivamente. No 4º dia foi realizado o teste, com a troca de um objeto antigo (OA) por um objeto novo (ON), e os animais

permanecendo na caixa por 5 minutos. O índice de reconhecimento do novo objeto (TRO) foi calculado pela fórmula:

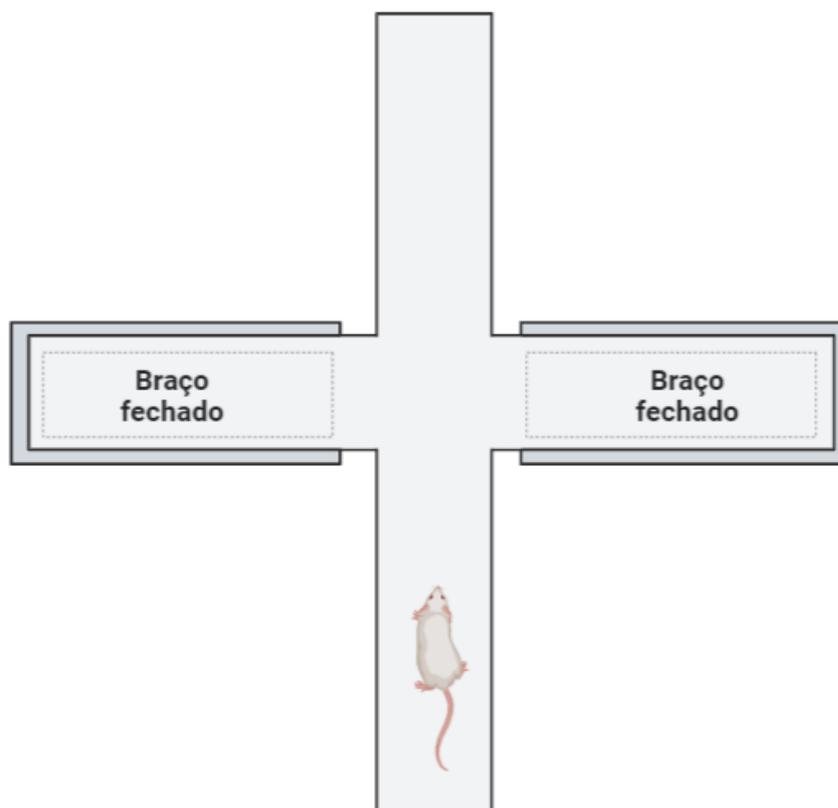
$$\text{TRO} = \text{Tempo explorando ON} / (\text{tempo explorando OA} + \text{tempo explorando ON})$$



**Figura 6: Esquematização do teste de reconhecimento de objetos**

#### **4.2.3.3. Labirinto em Cruz Elevada (LCE)**

O Labirinto em cruz elevada (LCE) é utilizado na avaliação do comportamento semelhante ao ansioso nos animais. Nesse teste, os camundongos foram colocados no labirinto e permaneceram explorando o ambiente durante 5 minutos. O labirinto tem formato de cruz, contendo dois braços abertos e dois fechados, a 1 metro de distância do chão (Figura 7). Neste teste foi avaliado o número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo total (em segundos) de permanência nos braços abertos e fechados.



**Figura 7: Esquemática do labirinto em cruz elevado.**

#### **4.2.3.4. Teste do Nado Forçado**

O teste do nado forçado foi realizado utilizando um béquer de vidro, com as dimensões de 400 mm de altura e 180 mm de diâmetro, e capacidade para 5 litros de água (Figura 8). Para a realização do teste, o béquer foi preenchido até a altura de 150 mm com água à temperatura de 25°C.

O teste teve duração de 6 minutos para cada animal, sendo realizadas filmagens com câmera Sony® DCR SR20. As análises dos vídeos foram feitas de maneira cega, por um único examinador, sendo considerados os 4 minutos finais do teste. Para determinação do comportamento do tipo ansioso, levou-se em consideração o tempo (em segundos) que os camundongos permaneceram imóveis e em movimentação na água.



**Figura 8: Esquematização do teste de nado forçado.**

#### **4.2.4. Eutanásia e obtenção dos tecidos**

Sessenta dias após infecção, os camundongos foram devidamente anestesiados com solução de Xilazina e Cetamina. Para a coleta do sangue, os camundongos tiveram a caixa torácica aberta para exposição do coração; as amostras de sangue foram obtidas por meio de punção cardíaca e mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos para retração do coágulo e, em seguida, foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos para separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até uso. Após punção cardíaca, a caixa craniana dos camundongos foi aberta para retirada do cérebro, que foi destinado à quantificação de cistos e análises imunológicas subsequentes.

#### **4.2.5. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)**

##### **4.2.5.1. Quantificação dos níveis de IgG anti-*Toxoplasma gondii***

Esse ensaio foi utilizado para quantificar a concentração de anticorpos IgG anti-*T. gondii* específicos presentes nas amostras de soro camundongos. Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL de solução de antígeno de *T. gondii* (na concentração de 1 µg/mL/poço) durante 2 horas, a 37°C. Após sensibilização, a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem PBS-Tween-20 a 0.05%.

O bloqueio foi realizado utilizando 200 µL/poço de solução de BSA 3%, com incubação de 1 hora, a 37°C e ao abrigo da luz. Após incubação a placa foi lavada conforme descrito anteriormente. Ao final dessa etapa, 50 uL/poço das amostras foram adicionadas, em duplicata. A placa foi incubada por 1 hora, a 37°C e ao abrigo da luz. Após lavagem, 100 µL/poço do anticorpo secundário conjugado a peroxidase, anti-IgG (1:2000) foi adicionado. A placa foi incubada por 1 hora, nas mesmas condições descritas acima. Após incubação, mais uma sequência de lavagens foi realizada. Após a última lavagem, foram adicionados 50 µL/poço de solução reveladora OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride). A placa foi incubada por 20 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, a reação foi interrompida com a adição de 30 µL/poço de solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mol/L). A placa foi lida em espectrofotômetro com comprimento de onda a 490 nm.

Os resultados foram calculados com base no ponto de corte (cut off), calculado pela média das absorbâncias de seis amostras de soro, conhecidamente negativos, mais três vezes seu desvio padrão. Os soros que apresentaram os valores de índice de reatividade (IR) maior ou igual a 1 foram considerados positivos; valores abaixo desse índice foram considerados negativos. Os níveis de anticorpos IgG específicos foram apresentados de acordo com a densidade óptica (OD) identificada.

##### **4.2.5.2. Quantificação dos níveis de IFN-γ, CX3CL1 e fatores neurotróficos no cérebro**

Os cérebros foram dissecados para isolamento do córtex pré-frontal, estriado e hipocampo. Nessas regiões, os níveis de IFN-γ, fractalquina (CX3CL1) e dos fatores neurotróficos NGF e GDNF foram quantificados, através do método ELISA *sandwich*

associado a uma curva padrão, com metodologia descrita pelo fabricante de cada *kit* (DuoSet® ELISA, R&D Systems).

#### **4.2.6. Quantificação dos níveis de nitrito no cérebro**

A quantificação dos níveis de nitrito no cérebro, através do ensaio colorimétrico de Griess, foi realizada como método indireto para detecção da presença do óxido nítrico nas regiões do córtex pré-frontal, estriado e hipocampo.

Para a quantificação dos níveis de nitrito presentes no sobrenadante das regiões analisadas do cérebro, 100 µL/poço das amostras foram adicionados em uma placa de 96 poços, em duplicata. Após adição das amostras, 100 µL/poço do reagente Griess (solução feita a partir de Sulfanilamida 1% em H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5% e N-1-naftil-etilenodiamina 0.1% em água destilada) foi adicionado. Após adição do reagente, a placa foi incubada durante 10 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito nas amostras foi determinada através de interpolação a partir da curva padrão.

#### **4.2.7. Quantificação de citocinas por *Cytometric beads array* (CBA)**

O sobrenadante resultante do macerado de cérebro, usado para a citometria, foi utilizado aqui para determinação dos níveis totais de citocinas no cérebro dos camundongos durante a infecção crônica.

Os níveis das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-2 e IL-6 foram determinados através do *Cytometric beads array* (CBA). Esse ensaio utiliza beads de captura para detecção das citocinas presentes no sobrenadante do tecido estudado. Os procedimentos para a realização desse ensaio seguiram de acordo com as instruções do fabricante (BD Bioscience, USA). A aquisição das amostras foi realizada no citômetro BD FACS Calibur, e o processamento dos dados realizados no *software* FlowJo (Tree Star, Ashlan, OR).

## **4.2.8. Processamento e imunofenotipagem de células imunológicas no cérebro**

### **4.2.8.1. Processamento do cérebro**

Após eutanásia, os camundongos receberam perfusão transcardíaca com 20 mL de PBS 1x gelado para retirada do sangue residual nos tecidos. Após esse procedimento, a caixa craniana foi aberta e o cérebro removido.

Cada cérebro foi transferido para um tubo de ensaio (de vidro) e macerado com bastão de vidro, em 1 mL de meio RPMI. Desse macerado, foi retirado 40  $\mu$ L do homogenato foi separado para quantificação de cistos no microscópio óptico (em objetiva de 10x).

O homogenato cerebral teve seu volume ajustado para 7 mL com RPMI; em seguida, adicionou-se 3 mL de solução SIP (proporção v/v (mL) – 1:9 de PBS 10x para Percoll, respectivamente). Após homogeneizar o macerado de cérebro com a solução SIP, esse conteúdo foi cuidadosamente transferido para outro tubo, contendo 2 mL de solução SIP 70%. Os tubos foram, então, centrifugados a 500 g, por 30 minutos a 18°C, com desaceleração baixa. Essa etapa permite a formação de um gradiente de concentração, capaz de realizar a separação do anel de leucócitos. Cerca de 4 a 5 mL da interface correspondendo ao anel de leucócitos foi retirada e transferida para um tubo novo. Esse volume foi ajustado para 10 mL com PBS 1x e centrifugado a 500 g, por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet teve volume final ajustado para 200  $\mu$ L com tampão de lavagem B ( $\text{NaN}_3$  2mM, BSA 0.5% e PBS 1x). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo U e 10  $\mu$ L de cada amostra foram retirados para contagem total de células na câmara de Neubauer (na diluição 1:9 em corante azul de tripan).

### **4.2.8.2. Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica**

A marcação das células começou com a adição do marcador de viabilidade celular (*LiveDead*, AF700, BD Bioscience), seguida de incubação por 10 minutos a 4°C. Após incubação, a placa foi centrifugada a 1300 rpm, por 8 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 200  $\mu$ L de PBS 1x, seguido de centrifugação a 1300 rpm, por 8 minutos a 4 °C. Esse processo foi repetido duas vezes. Ao final da última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 50  $\mu$ L/poço do mix contendo os anticorpos para receptores de superfície, diluídos em solução diluidora de anticorpos (v/v (mL) – 1:1

tampão *wash B* e PBS 1x). Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 3. A placa foi incubada por 15 minutos a 4°C. Após incubação, repetiu-se o processo de lavagem e centrifugação descrito anteriormente. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo CX3CR1. A placa foi incubada por 30 minutos, em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após incubação, seguiu-se duas etapas de lavagem e centrifugação, conforme já descrito. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço de paraformaldeído 4% e 100 µL/poço de PBS; a placa foi incubada por 20 min em temperatura ambiente, seguida de lavagem e centrifugação. Após a última centrifugação, os pellets foi ressuspensionado em 200 µL/poço de PBS 1x e transferidos para tubos FACS. As células foram adquiridas em citômetro Fortessa (BD Biosciences, San Jose, USA) e analisados com o *software* FlowJo (Tree Star, Ashlan, OR).

Os dados foram analisados através da redução de dimensionalidade e visualizados por *t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding* (tSNE), através do Cytokit (CHEN et al., 2016).

**Tabela 3:** Lista de anticorpos utilizados para marcação de receptores de superfície de células obtidas do cérebro

Anticorpo	Fluoróforo	Clone	Marca
CD3	FITC	17A2	eBioscience
Ly6C	PE	AL-21	
CD11b	PerCP	M1/70	
CD45	PeCy7	30-F11	BD Biosciences
SiglecH	BV421	440c	
P2ry12	APC	S16007D	
CX3CR1	BV605	SA011F11	BioLegend

#### 4.2.9. Análises estatísticas

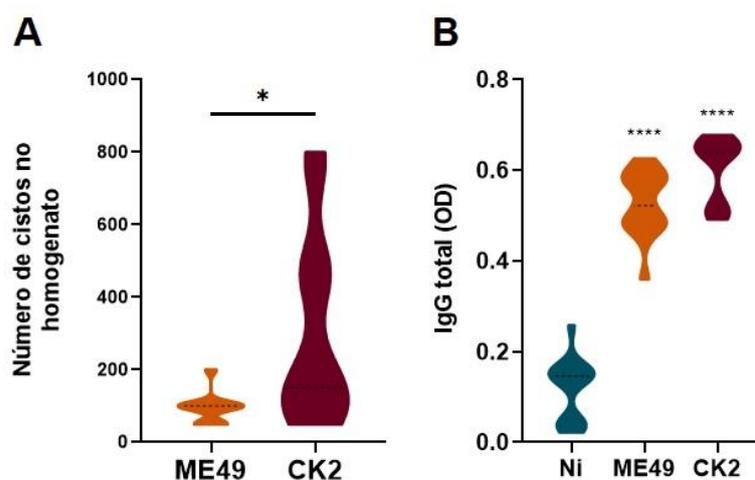
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação de dados entre os três grupos, foi realizada a análise através do teste de variância ANOVA, seguido pelo pós-teste de *Tukey* para dados paramétricos. Para comparação de dois grupos, com dados também paramétricos, foi utilizado o teste *t-student*. A análise dos dados não paramétricos, também considerando o número de

grupos analisados, foi realizada através do teste Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de *Dunn*; ou através do teste Mann-Whitney. A correlação entre os dados foi realizada através do cálculo do coeficiente de correlação de *Pearson*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0.05$ .

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Infecção crônica por cepa atípica de *Toxoplasma gondii* apresenta maior número de cistos no cérebro

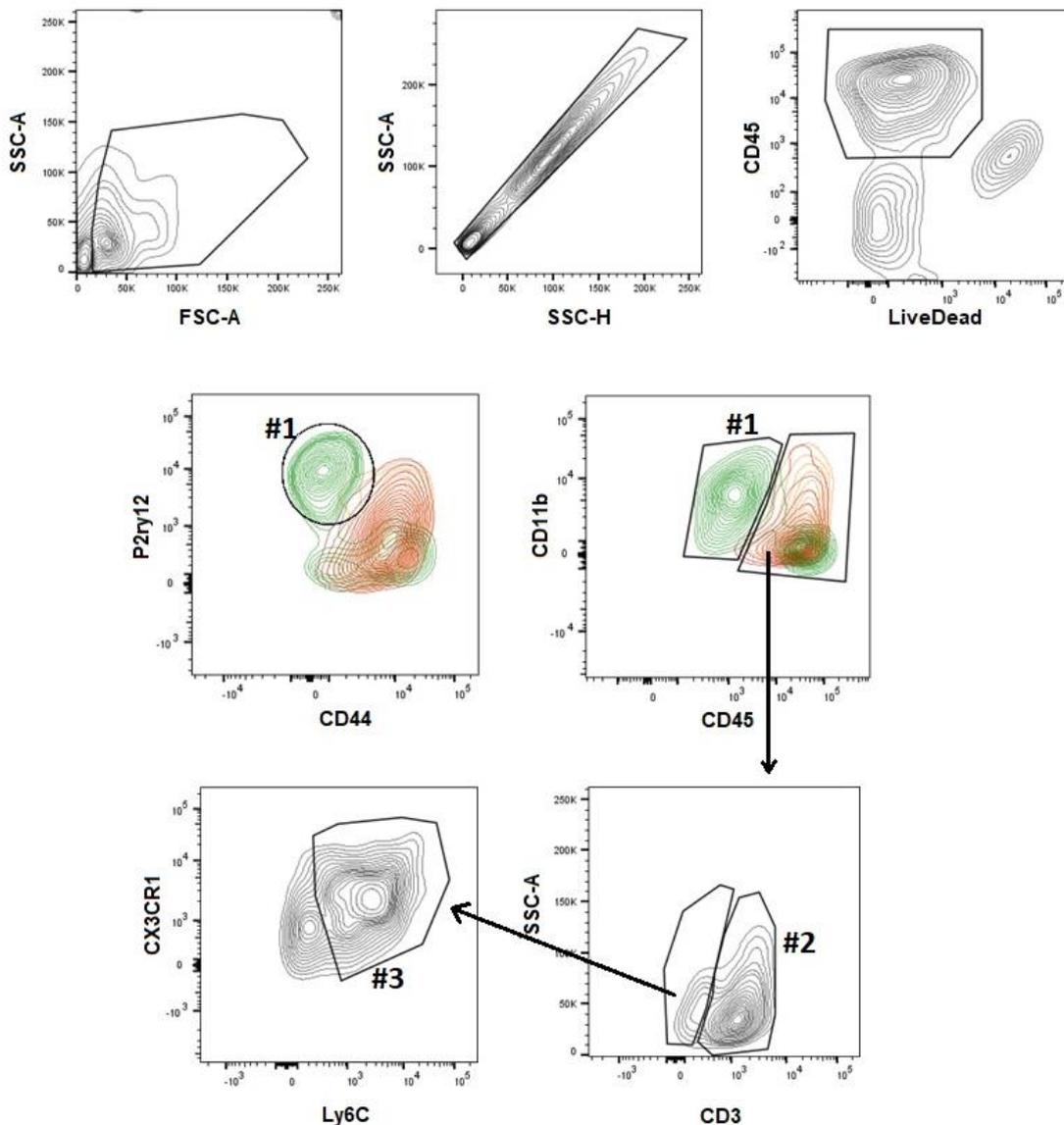
Os camundongos permaneceram 8 semanas infectados com a cepa clonal (ME49) e com a cepa atípica (CK2), para estabelecimento da infecção crônica. Após esse período, a quantificação da carga de cistos revelou que a cepa CK2 é capaz de induzir maior formação de cistos quando comparada a ME49 (Figura 9 A). Com relação a quantificação de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, as duas cepas conseguiram induzir eficientemente a produção de anticorpos específicos quando comparadas ao grupo controle, sem haver diferença significativa entre os grupos infectados (Figura 9 B).



**Figura 9. Quantificação do número de cistos no cérebro e dosagem de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii*.** (A) Carga de cistos presente no homogenato de cérebro de camundongos Balb/c machos, infectados com cepa clonal (ME49) e cepa atípica (CK2) de *T. gondii* 8 semanas após infecção. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. (B) Quantificação dos níveis de anticorpos IgG específicos, 8 semanas após infecção. Os valores de densidade óptica (OD) foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. A análise estatística foi realizada através do teste t student. Em "B" o \* indica diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo controle \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 4.3.2. Infecção crônica por cepa atípica de *Toxoplasma gondii* é capaz de induzir redução significativa de micróglia e maior inflamação cerebral

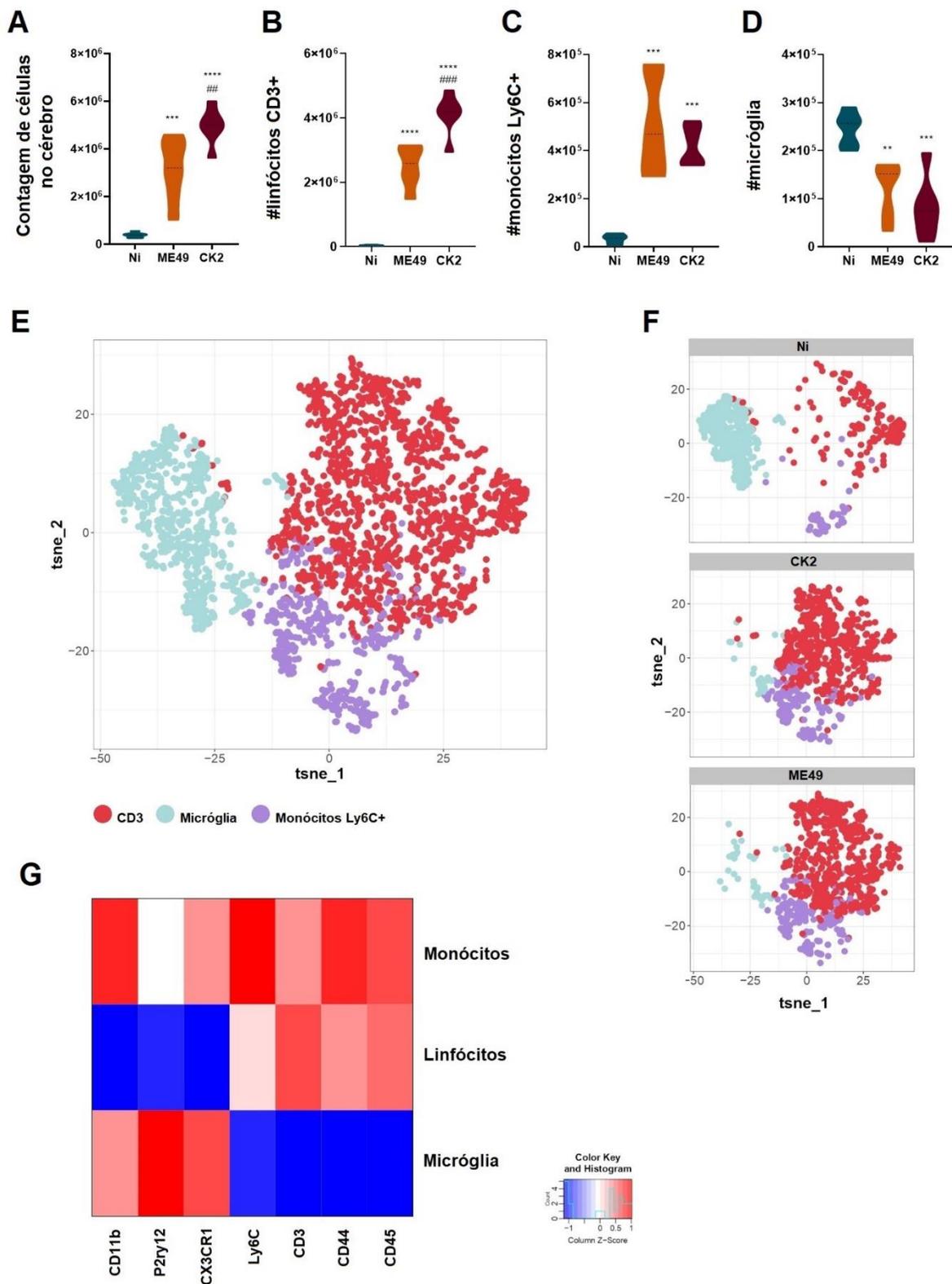
A análise da população celular no cérebro, a partir do nível de expressão dos marcadores de superfície celular CD45, CD11b, CX3CR1, CD44, Ly6C e P2ry12 permitiu a separação dos monócitos infiltrados ( $\text{LiveCD45}^{\text{hi}}\text{CD11b}^+\text{CX3CR1}^+\text{CD44}^{\text{hi}}\text{Ly6C}^{\text{hi}}\text{P2ry12}^-$ ) da população de micróglia ( $\text{CD45}^{\text{low}}\text{CD11b}^+\text{CX3CR1}^{\text{hi}}\text{CD44}^-\text{Ly6C}^-\text{P2ry12}^+$ ) (Figura 10).



**Figura 10. Estratégia de análise das populações de células imunológicas nos cérebros dos camundongos.** As células foram, inicialmente, selecionadas de acordo com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), seguida pela seleção de singlets (SSC-A x SSC-H). A partir da seleção de células  $\text{LiveCD45}^+$ , pode-se identificar as populações de micróglia ( $\text{LiveCD45}^{\text{low}}\text{CD11b}^+\text{CX3CR1}^{\text{hi}}\text{CD44}^-\text{Ly6C}^-\text{P2ry12}^+$ , #1); linfócitos ( $\text{LiveCD45}^{\text{hi}}\text{CD11b}^+\text{CD44}^+\text{CD3}^+$ , #2) e monócitos inflamatórios ( $\text{LiveCD45}^{\text{hi}}\text{CD11b}^+\text{CX3CR1}^+\text{CD44}^{\text{hi}}\text{Ly6C}^{\text{hi}}\text{P2ry12}^-$ , #3).

Camundongos cronicamente infectados apresentaram um recrutamento celular significativo, tanto para a infecção por ME49 quanto por CK2, em comparação ao grupo não infectado; sendo a cepa CK2 capaz de estimular um maior infiltrado inflamatório do que o observado no grupo infectado com ME49 (Figura 11 A). Através da imunofenotipagem multiparamétrica, o infiltrado inflamatório no cérebro mostrou-se formado principalmente por linfócitos, identificados pelo nível de expressão de CD3; nessa análise, observou-se que a infecção por CK2 é capaz de induzir maior recrutamento de linfócitos T quando comparada à infecção por ME49 (Figura 11 B).

Além disso, observou-se que a infecção crônica induziu infiltração significativa de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>hi</sup> no cérebro de maneira independente do tipo de cepa do parasito (Figura 11 C). Concomitantemente, descobriu-se uma redução dramática na população de micróglia (P2ry12<sup>hi</sup>), tanto para o grupo infectado com ME49 quanto para o grupo infectado com CK2 (Figura 11 D e G). A análise de *cluster* por tSNE identificou os 3 tipos celulares, separando as populações de linfócitos CD3<sup>+</sup>, monócitos Ly6C<sup>hi</sup> e micróglia P2ry12<sup>hi</sup> (Figura 11 E). Ao analisar os grupos separadamente, o tSNE evidenciou a predominância de linfócitos e monócitos inflamatórios nos grupos infectados por ME49 e CK2 e a redução significativa da população de micróglia, quando comparados ao grupo não infectado (Figura 11 F).

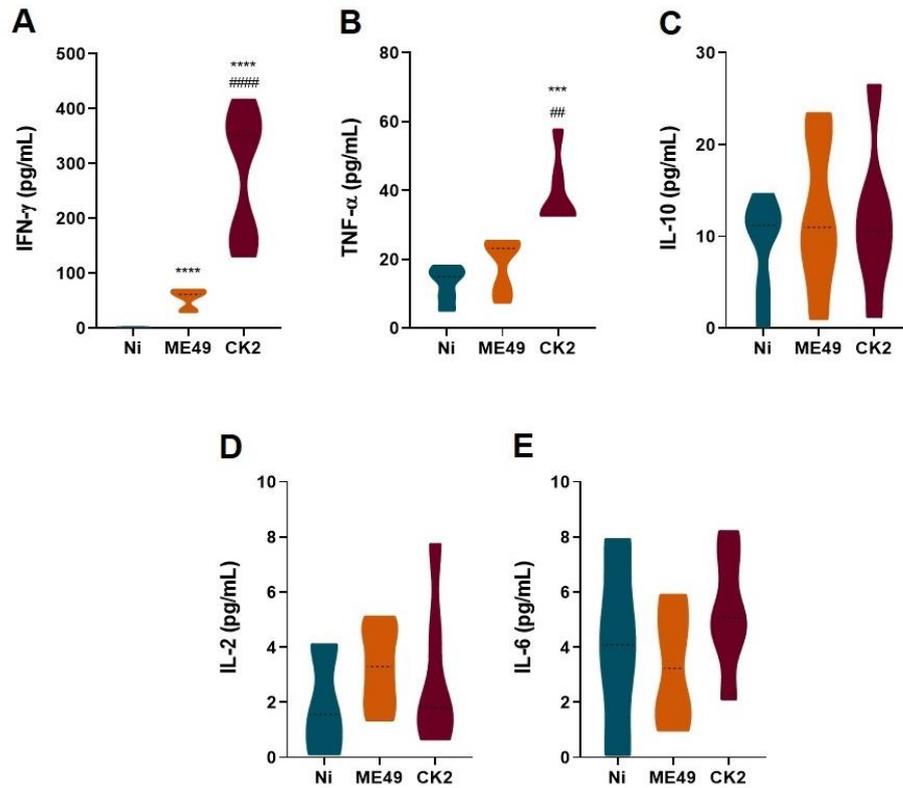


**Figura 11.** Análise das populações de células imunológicas presentes no cérebro de camundongos com infecção crônica por *T. gondii*. (A) Quantificação do número total de células no cérebro; (B) quantificação da população de linfócitos no cérebro; (C) quantificação da população de monócitos inflamatórios (Ly6C<sup>hi</sup>) no cérebro; (D) quantificação da população de microglia (P2ry12<sup>hi</sup>) no cérebro; (E) tSNE de dados combinados de camundongos não infectados (7) e 8 semanas após infecção pelas cepas ME49 (7) e CK2 (7) a partir do *gate* de LiveCD45<sup>+</sup>, dos grupos de células identificados, evidenciando as populações de linfócitos (vermelho), microglia

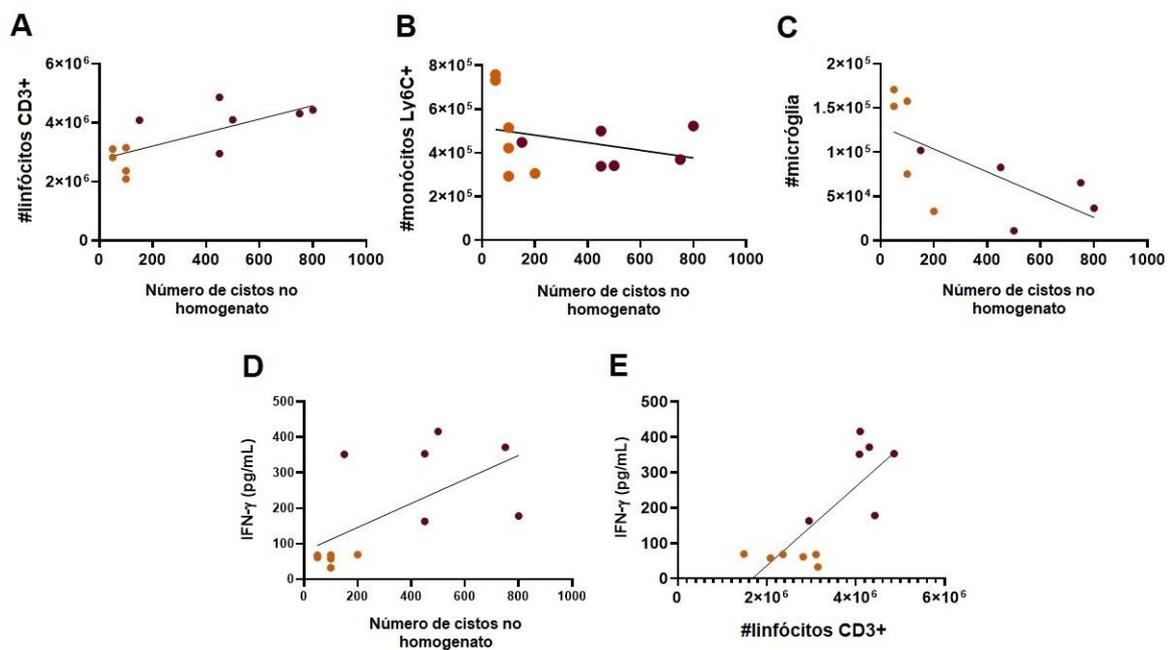
(azul) e monócitos inflamatórios Ly6C<sup>hi</sup> (roxo); (F) tSNE de “E”, evidenciando a distribuição de linfócitos, micróglia e monócitos nos grupos de camundongos infectados com CK2, ME49 e no grupo de camundongos não infectados (NI); (G) Heatmap evidenciando os níveis de expressão de cada marcador de superfície, de acordo com a população de micróglia e monócitos. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. \* indica diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo controle; # indica diferença estatística entre os grupos infectados. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. \*/# p<0.05; \*\*/## p<0.01; \*\*\*/### p<0.001; \*\*\*\*/#### p<0.0001.

A infecção por *T. gondii* é capaz de induzir a resposta imunológica, com ativação do perfil Th1, responsável pelo estabelecimento da infecção crônica e estimular a formação de cistos teciduais. A quantificação de citocinas inflamatórias, no cérebro dos camundongos cronicamente infectados, revelou que a infecção pela cepa CK2 estimulou a produção de IFN- $\gamma$  em níveis significativamente mais elevados do que a infecção pela cepa ME49 (Figura 12 A). Curiosamente, além da maior concentração de IFN- $\gamma$ , a cepa atípica também foi capaz de manter os níveis de TNF- $\alpha$  elevados (Figura 12 B), mesmo após o final da fase aguda da infecção, contribuindo para a manutenção de um ambiente constantemente inflamado. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-10, IL-2 ou IL-6 ao comparar os grupos infectados com o não infectado (Figura 12 C, D e E).

Análises de correlação foram realizadas a fim de verificar o impacto da infecção crônica no cérebro dos camundongos infectados. O resultado mostrou que a carga de cistos se relaciona diretamente com o recrutamento de linfócitos no cérebro (Figura 13 A). Além disso, apesar de não ter sido encontrada uma relação significativa entre a carga de cistos e a população de monócitos Ly6C<sup>hi</sup> (Figura 13 B), a presença dos cistos pode ser considerada um importante fator contribuinte para a redução da micróglia (Figura 13 C) e para a produção local de IFN- $\gamma$  (Figura 13 D), observadas no cérebro dos camundongos infectados. Considerando a ausência de correlação entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a população de monócitos, a correlação observada entre os níveis dessa citocina e a população de linfócitos (Figura 13 E) indica o papel dessas células como importantes fontes do IFN- $\gamma$  detectado no cérebro dos camundongos infectados.



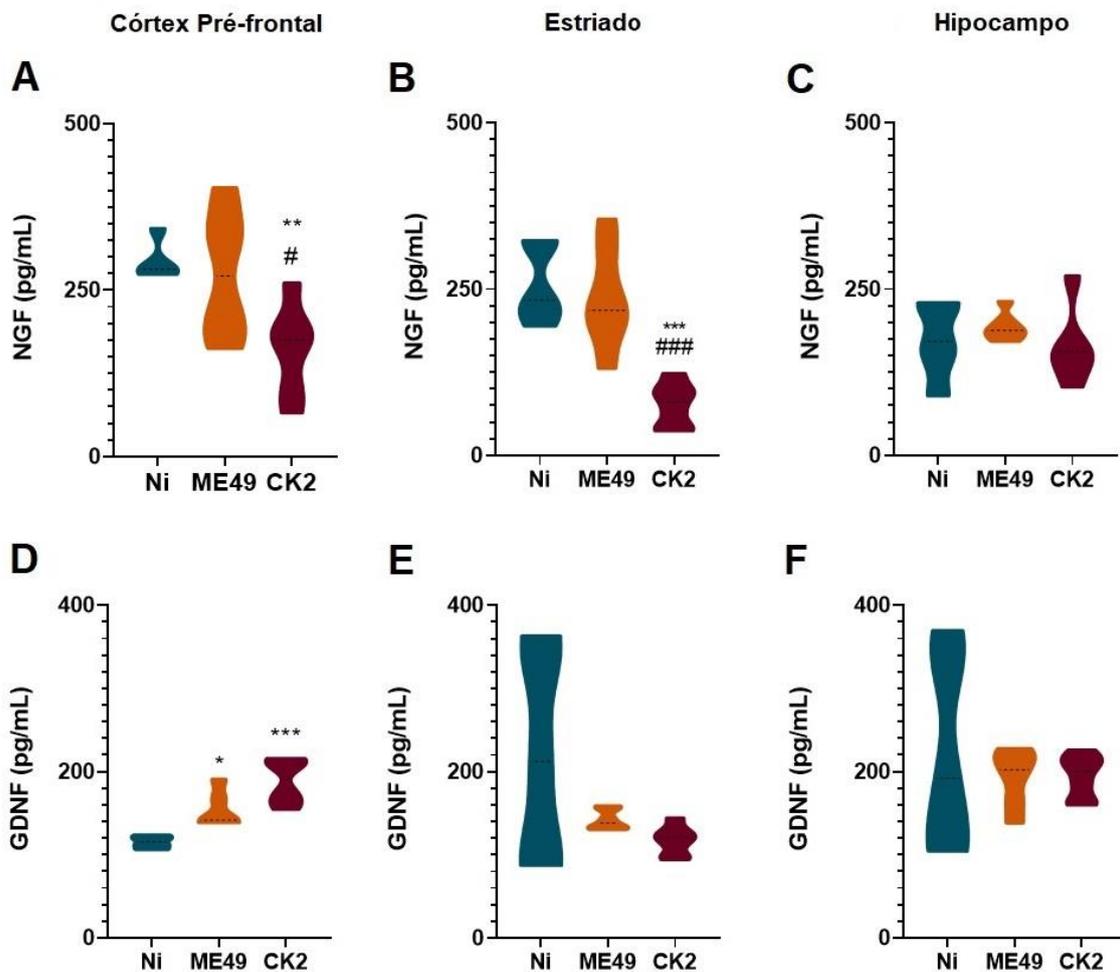
**Figura 12. Determinação dos níveis de citocinas no cérebro dos camundongos infectados com *T. gondii*.** Os níveis das citocinas IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C), IL-2 (D) e IL-6 (E) foram determinados por CBA no sobrenadante do macerado do órgão. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. \* indica diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo controle; # indica diferença estatística entre os grupos infectados. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. \*/#  $p < 0.05$ ; \*\*/###  $p < 0.01$ ; \*\*\*/####  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*/#####  $p < 0.0001$ .



**Figura 13. A carga de cistos de *T. gondii* no cérebro contribui para a depleção da micróglia e para a produção de IFN- $\gamma$  no cérebro.** (A) o número de linfócitos correlaciona-se positivamente com a carga de cistos encontrada no cérebro dos camundongos infectados ( $r=0.707$ ;  $p=0.014$ ); (B) análise da relação entre a população de monócitos infiltrados com a carga de cistos ( $r=-0.3054$ ;  $p=0.334$ ); (C) o número de micróglia é inversamente relacionado a carga de cistos presente no cérebro dos camundongos infectados ( $r=-0.665$ ;  $p=0.035$ ); (D) os níveis de IFN- $\gamma$  estão diretamente relacionados com a carga de cistos ( $r=0.622$ ;  $p=0.03$ ) e com (E) a população de linfócitos no cérebro dos camundongos infectados ( $r=0.79$ ;  $p=0.002$ ). A análise de correlação foi realizada através do Coeficiente de correlação de Pearson, seguida de regressão linear com 95% CI. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p<0.05$ .

#### **4.3.3. Infecção por cepa atípica de *T. gondii* é capaz de induzir alterações nos níveis de fatores neurotróficos em diferentes áreas do cérebro**

O funcionamento cognitivo depende de uma intercomunicação bem regulada entre as diferentes áreas do cérebro e o processamento de sinais neuroquímicos, responsáveis pelo estabelecimento e modulação comportamental. Nesse contexto, buscamos analisar o impacto da infecção crônica por *T. gondii* na produção do fator de crescimento nervoso (NGF) e do fator neurotrófico derivado de células da linhagem da glia (GDNF), essenciais para a manutenção e funcionamento neuronal. A partir da quantificação dos níveis de NGF e GDNF no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo, constatou-se que a infecção com a cepa CK2 induziu a redução dos níveis de NGF no córtex pré-frontal e, mais significativamente, no estriado dos camundongos infectados, quando comparado ao grupo infectado com ME49 e ao grupo não infectado (Figura 14 A, B). Além das alterações observadas nos níveis de NGF, tanto a CK2 quanto a ME49 induziram um aumento significativo da concentração de GDNF disponível no córtex pré-frontal (Figura 14 D).

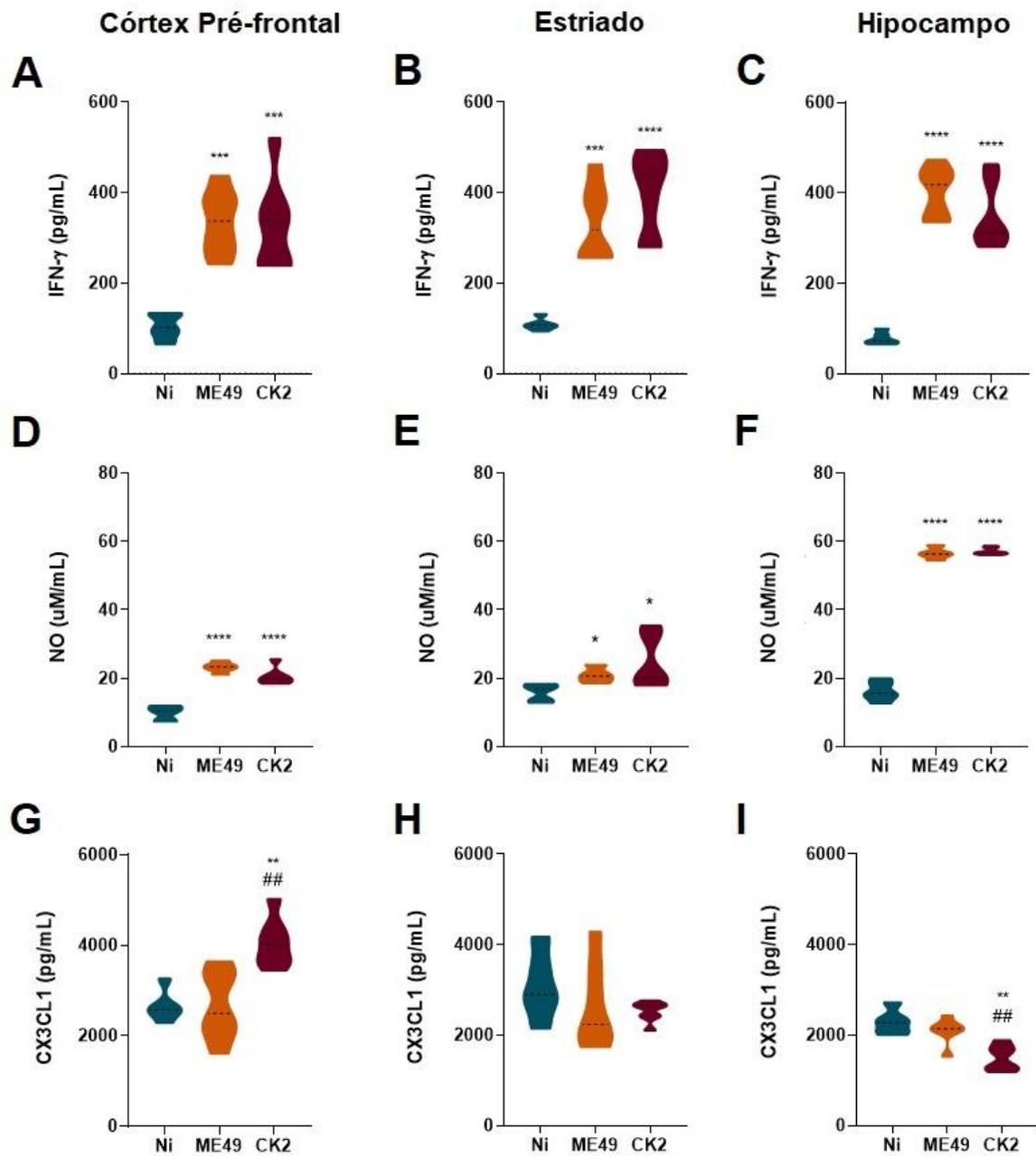


**Figura 14. Infecção com cepa atípica de *T. gondii* induz redução nos níveis de NGF no córtex pré-frontal e no estriado de camundongos com infecção crônica.** Os gráficos representam as concentrações de NGF e GDNF no córtex pré-frontal (A, D), estriado (B, E) e no hipocampo (C, F), respectivamente, de camundongos infectados com as cepas CK2 e ME49 de *T. gondii*. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. \* indica diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo controle; # indica diferença estatística entre os grupos infectados. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. \*/# p<0.05; \*\*/## p<0.01; \*\*\*/### p<0.001; \*\*\*\*/#### p<0.0001.

Após a detecção da interferência da infecção crônica na disponibilidade de fatores neurotróficos, buscamos verificar os níveis de inflamação no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo. A quantificação da concentração de IFN- $\gamma$  revelou a manutenção dos níveis elevados dessa citocina nas três regiões cerebrais analisadas, sem haver uma diferença significativa nas concentrações presentes entre os grupos infectados (Figura 15 A – C). O óxido nítrico, produzido por macrófagos classicamente ativados em resposta à presença de IFN- $\gamma$ , é

resultado do processo de estresse oxidativo gerado em quadros inflamatórios. A determinação dos níveis de óxido nítrico, a partir da quantificação da concentração de nitrito presente no sobrenadante das três regiões analisadas, revelou um aumento sutil, porém significativo, no córtex pré-frontal e estriado de forma independente da cepa infectante (Figura 15 D e E). Já no hipocampo, os níveis de nitrito foram encontrados significativamente elevados, quando comparado as duas outras regiões, também de maneira independente da cepa (Figura 15 F). Dessa forma, observa-se que a infecção por *T. gondii*, seja pela cepa atípica ou clonal, mantém os níveis de inflamação elevados em diferentes áreas do cérebro.

A fractalquina (CX3CL1) é uma importante quimiocina que atua na comunicação entre neurônios e micróglia. Essa molécula tem importante papel neuroprotetor, regulando a ativação microglial, sendo capaz de modular negativamente a inflamação gerada. Nesse contexto, realizamos a quantificação dos níveis de CX3CL1 no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo. A infecção crônica pela cepa CK2 de *T. gondii* foi capaz de induzir um aumento significativo na concentração de CX3CL1 no córtex pré-frontal, enquanto a infecção com ME49 não induziu alterações significativas, quando comparada ao grupo não infectado (Figura 15 G). Não foram observadas alterações nos níveis dessa molécula no estriado, quando os grupos infectados foram comparados ao grupo não infectado (Figura 15 H). Curiosamente, de maneira oposta ao observado no córtex pré-frontal, a cepa CK2 levou a redução significativa dos níveis de CX3CL1 no hipocampo (Figura 15 I).

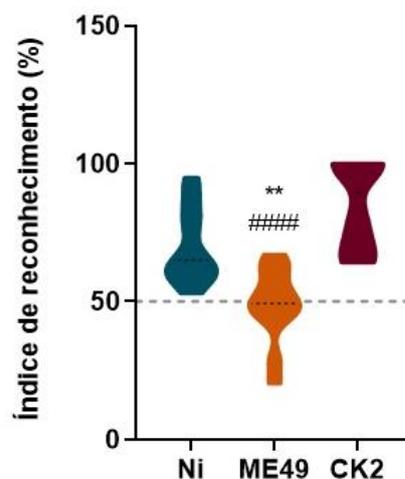


**Figura 15. Infecção crônica por *T. gondii* mantém níveis elevados de inflamação em diferentes áreas do cérebro.** Os gráficos representam as concentrações de IFN- $\gamma$ , óxido nítrico (NO) e fractalquina (CX3CL1) no córtex pré-frontal (A, D, G), estriado (B, E, H) e hipocampo (C, F, I), respectivamente, de camundongos infectados com as cepas CK2 e ME49 de *T. gondii*. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. \* indica diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo controle; # indica diferença estatística entre os grupos infectados. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. \*/# p<0.05; \*\*/## p<0.01; \*\*\*/### p<0.001; \*\*\*\*/#### p<0.0001.

#### 4.3.4. Cepa atípica de *T. gondii* induz comportamento ansioso e depressivo durante infecção crônica

Buscando verificar a influência da infecção crônica por cepa atípica de *T. gondii* sobre o comportamento dos camundongos, foram realizados testes para avaliar a integridade da memória, atividade locomotora e perfis ansioso e depressivo após 8 semanas de infecção.

A memória dos camundongos infectados foi avaliada através do teste de reconhecimento de objetos. Esse teste é dividido em duas etapas: na primeira, os animais são apresentados a dois objetos distintos para que haja o reconhecimento; na segunda etapa, um dos objetos é substituído por um novo. Esse teste utiliza o tempo que os animais gastam na exploração dos objetos para determinar o índice de reconhecimento e, assim, indicar o nível de integridade da memória. Nesse teste, apenas a cepa ME49 foi capaz de induzir déficit de memória nos camundongos durante a infecção crônica (Figura 16). O déficit de memória foi identificado através de um índice de reconhecimento de objetos abaixo de 50%, significativamente menor que os índices apresentados pelo grupo infectado com cepa atípica e pelo grupo não infectado.



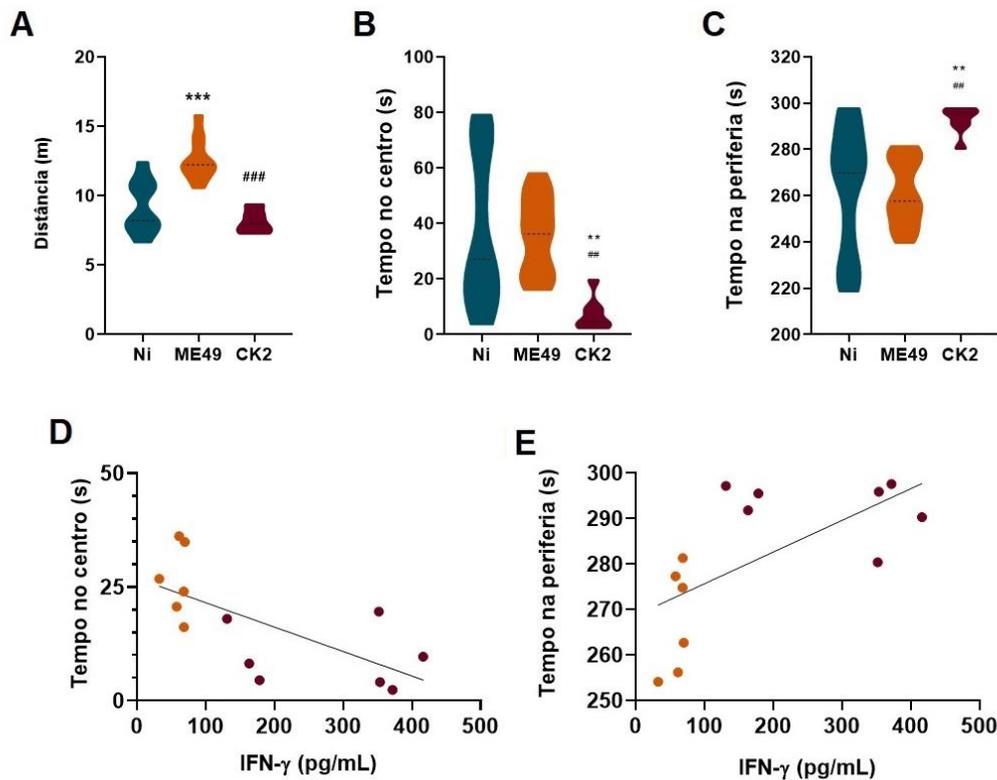
**Figura 16: A cepa ME49 de *T. gondii* é capaz de induzir déficit de memória, identificado pelo teste de reconhecimento de objetos, nos camundongos com infecção crônica.** Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. \* indica diferença estatística entre o grupo infectado e o grupo controle; # indica diferença estatística entre os grupos infectados. A análise estatística para determinação do índice de reconhecimento com ponto de corte de 50% foi realizada através do one sample t test. A diferença estatística entre os grupos infectados e não infectado foi determinada através do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. \*/# p<0.05; \*\*/## p<0.01; \*\*\*/#### p<0.001; \*\*\*\*/##### p<0.0001.

O teste de campo aberto foi utilizado para verificar a atividade locomotora dos camundongos, bem como identificar possíveis comportamentos do tipo ansioso durante a

infecção crônica por *T. gondii*. A análise da distância percorrida revelou que os camundongos com infecção crônica pela cepa ME49 apresentaram um perfil de hiperlocomoção, quando comparados ao grupo não infectado. Já com relação ao grupo infectado com a cepa CK2, não houve diferença significativa na distância percorrida (Figura 17 A). Além da atividade locomotora, o teste de campo aberto permite identificar a presença de perfil do tipo ansioso nos camundongos, com base no tempo que gastam permanecendo no centro e na periferia da arena. O teste revelou que durante a infecção crônica pela cepa CK2, os camundongos permaneceram menos tempo no centro (Figura 17 B) e mais tempo na periferia (Figura 17 C) da arena. Esses resultados servem para indicar o comportamento do tipo ansioso nesses camundongos.

Análises de correlação foram realizadas a fim de verificar um possível envolvimento entre a inflamação presente no cérebro e a manifestação do comportamento observado entre os camundongos infectados. Os resultados mostraram que os níveis de IFN- $\gamma$  influenciam diretamente o tempo gasto pelos animais tanto no centro (Figura 17 D) quanto na periferia (Figura 17 E) da arena. Dessa forma, pode-se ter a inflamação local, induzida pela infecção, como fator contribuinte para as alterações comportamentais detectadas.

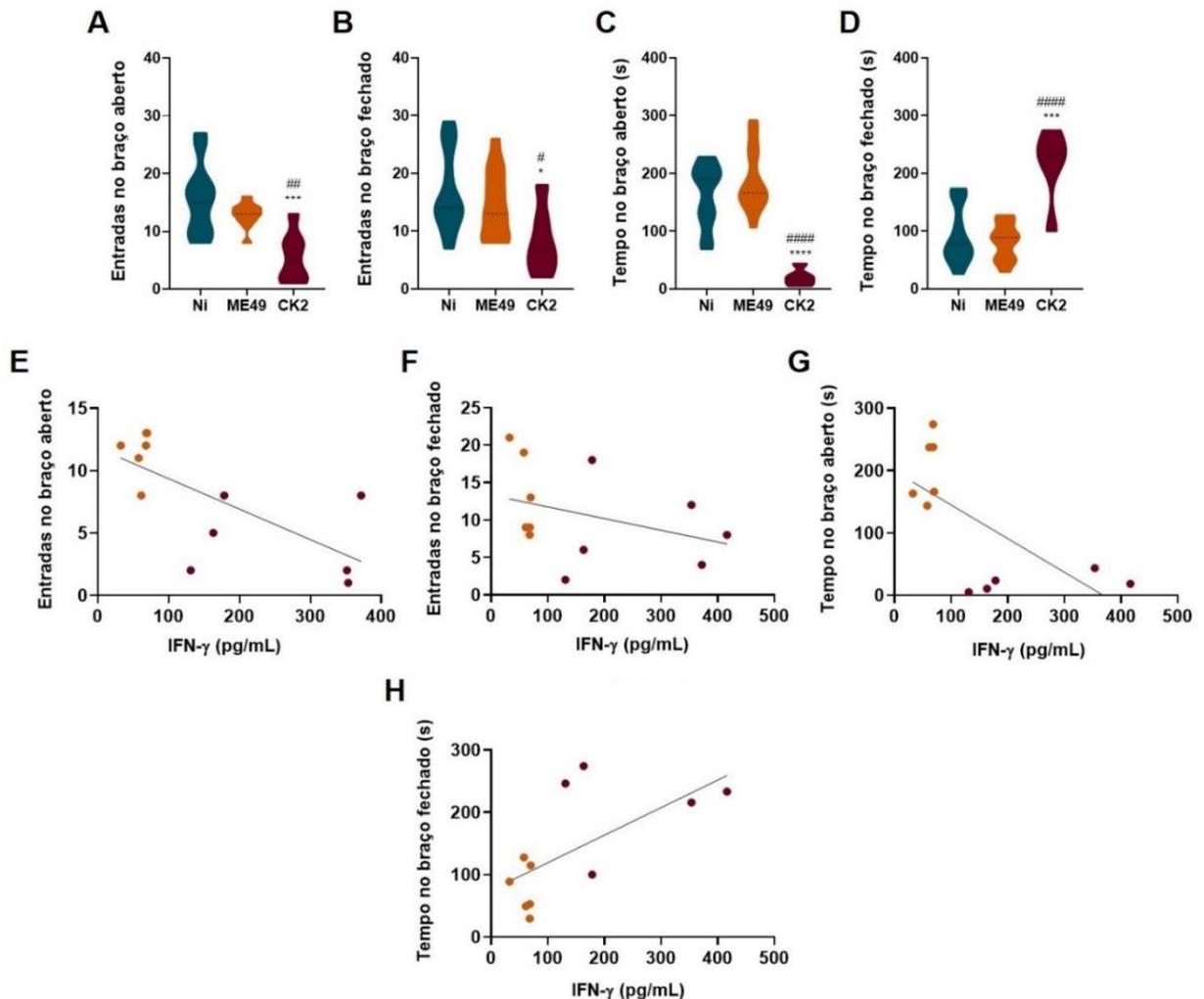
A observação de comportamento do tipo ansioso nos camundongos infectados foi confirmada através do teste de labirinto em cruz elevado (LCE), considerado como padrão ouro para detecção de ansiedade em camundongos. Esse teste utiliza o número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados do labirinto como parâmetros para identificação de comportamento ansioso. Entre os camundongos submetidos ao LCE, apenas aqueles com infecção pela cepa CK2 apresentaram padrão de comportamento ansioso caracterizado pelo baixo número de entradas e baixa permanência no braço aberto (Figura 18 A e C) e maior tempo de permanência no braço fechado do labirinto (Figura 18 D). Curiosamente, o número de entradas no braço fechado também se apresentou reduzido no grupo infectado com CK2 (Figura 18 B), podendo ser reflexo de uma redução da taxa exploratória do ambiente em consequência da infecção crônica. Os camundongos infectados com a cepa ME49 não apresentaram comportamentos característicos de quadro ansioso, quando comparados ao grupo não infectado.



**Figura 17.** Cepa atípica de *T. gondii* induz comportamento do tipo ansioso, durante teste de campo aberto, influenciado pelos níveis de IFN- $\gamma$  no cérebro, em camundongos com infecção crônica. (A) Distância percorrida (em metros) pelos camundongos na arena; (B) tempo (em segundos) gasto no centro da arena pelos camundongos; (C) tempo (em segundos) gasto na periferia da arena pelos camundongos; (D) análise de correlação entre o tempo gasto no centro da arena e os níveis de IFN- $\gamma$  ( $r=-0.6784$ ;  $p=0.01$ ) no cérebro dos camundongos infectados; (E) análise de correlação entre o tempo gasto na periferia da arena e os níveis de IFN- $\gamma$  ( $r=0.6374$ ;  $p=0.02$ ) no cérebro dos camundongos infectados. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. \* indica diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo controle; # indica diferença estatística entre os grupos infectados. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. A análise de correlação foi realizada através do Coeficiente de correlação de Pearson, seguida de regressão linear com 95% CI. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p<0.05$ . \*/#  $p<0.05$ ; \*\*/###  $p<0.01$ ; \*\*\*/####  $p<0.001$ ; \*\*\*\*/#####  $p<0.0001$ .

Os parâmetros utilizados para determinação do perfil ansioso foram submetidos à análise de correlação com os níveis de IFN- $\gamma$  detectados no cérebro dos camundongos infectados, a fim de identificar a influência da inflamação gerada sobre a modulação comportamental observada. Assim como observado no teste de campo aberto, as alterações comportamentais, detectadas através do LCE, nos camundongos infectados com a cepa CK2 são diretamente influenciadas pelos níveis de IFN- $\gamma$  presente no cérebro. O número de entradas,

assim como o tempo de permanência no braço aberto, mostrou-se inversamente relacionado com a concentração de IFN- $\gamma$  presente na infecção crônica (Figuras 18 E e G). Apesar de não ter sido encontrada uma relação significativa entre o número de entradas no braço fechado com os níveis de IFN- $\gamma$  (Figura 18 F), o tempo de permanência no braço fechado se mostrou diretamente relacionado com os níveis dessa citocina (Figura 18 H).

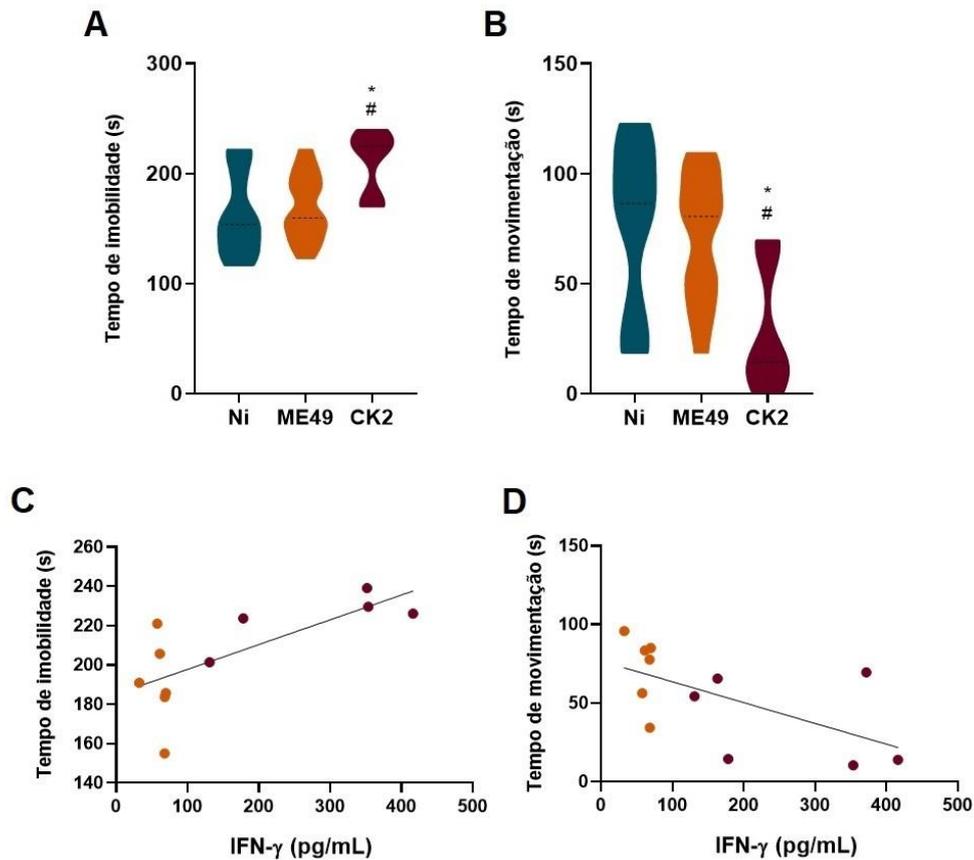


**Figura 18. Comportamento do tipo ansioso observado nos camundongos infectados com CK2 é confirmado com o teste do labirinto em cruz elevado.** (A) Número de entradas no braço aberto do labirinto; (B) número de entradas no braço fechado do labirinto; (C) tempo (em segundos) de permanência dos camundongos no braço aberto; (D) tempo (em segundos) de permanência dos camundongos no braço fechado do labirinto. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. \* indica diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo controle; # indica diferença estatística entre os grupos infectados. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Análise de correlação entre (E) o número de entradas no braço aberto ( $r=-0.7003$ ;  $p=0.01$ ) e (F) no braço fechado ( $r=-0.3593$ ;  $p=0.25$ ) com os níveis de IFN- $\gamma$  no cérebro dos camundongos infectados; análise de correlação entre o tempo de permanência no (G) braço aberto ( $r=-0.668$ ;  $p=0.02$ ) e (H) no braço fechado ( $r=0.644$ ;  $p=0.03$ ) com os níveis de IFN- $\gamma$  no cérebro dos camundongos infectados. A análise de correlação foi realizada através do Coeficiente de correlação de Pearson, seguida de regressão linear com 95% CI. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p<0.05$ . \*/#  $p<0.05$ ; \*\*/##  $p<0.01$ ; \*\*\*/###  $p<0.001$ ; \*\*\*\*/####  $p<0.0001$ .

Além da avaliação do perfil ansioso apresentado pelos camundongos infectados com *T. gondii*, verificamos a possibilidade da infecção crônica induzir o desenvolvimento de traços depressivos nos camundongos. Para essa avaliação, realizamos o teste de nado forçado que tem como parâmetro de análise o tempo de movimentação e imobilidade dos camundongos, em um tanque com água. Esse teste serve para verificar a motivação dos camundongos em escapar de um ambiente estressante.

Os resultados mostraram que a infecção crônica por CK2 consegue induzir um comportamento do tipo depressivo nos camundongos (Figura 19), quando comparados ao grupo infectado com ME49 e ao grupo não infectado. A determinação do comportamento depressivo se baseou no aumento do tempo de imobilidade (Figura 19 A) e na redução do tempo de movimentação (Figura 19 B) dos camundongos infectados com a cepa atípica.

Essa alteração comportamental se mostrou relacionada com os níveis de IFN- $\gamma$  presentes no cérebro dos animais infectados. As análises de correlação mostraram que o aumento da concentração dessa citocina no cérebro contribuir diretamente para a imobilidade dos camundongos no tanque de água (Figura 19 C); por outro lado, a inflamação gerada por essa citocina atua de forma inversa na taxa de movimentação dos camundongos (Figura 19 D). Esses resultados apontam para a capacidade da infecção crônica em estimular um ambiente inflamado, que repercute na modulação comportamental dos camundongos, induzindo perfil depressivo.



**Figura 19. Infecção crônica por cepa atípica de *T. gondii* induz comportamento depressivo em camundongos, detectado através do teste de nado forçado.** (A) Tempo (em segundos) de imobilidade dos camundongos no tanque de água; (B) tempo (em segundos) de movimentação dos camundongos no tanque de água; análise de correlação entre (C) o tempo de imobilidade ( $r=0.7116$ ;  $p=0.01$ ) e (D) o tempo de movimentação ( $r=-0.6075$ ;  $p=0.03$ ) com os níveis de IFN- $\gamma$  no cérebro dos camundongos infectados. A análise de correlação foi realizada através do Coeficiente de correlação de Pearson, seguida de regressão linear com 95% CI. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p<0.05$ .

## CAPÍTULO II

INFECÇÃO POR CEPA ATÍPICA DE *Toxoplasma gondii* INDUZ DEPLEÇÃO DA POPULAÇÃO DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES E SUBSTITUIÇÃO POR MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS INFILTRADOS DA PERIFERIA

#### 4.4. Introdução

A diferenciação dos macrófagos alveolares inicia no período fetal; porém, sua maturação ocorre após o nascimento. Uma vez diferenciados, e em condições fisiológicas, essas células conseguem se manter de maneira independente de outros tipos celulares. O processo que garante o comprometimento da população de macrófagos alveolares, é dependente da ativação do fator de transcrição PPAR $\gamma$ , através da influência de GM-CSF e TGF- $\beta$  (SCHNEIDER et al., 2014a; YU et al., 2017; EVREN et al., 2019). Os macrófagos alveolares diferenciam-se a partir de células-tronco precursoras derivadas do fígado fetal, que expressam o receptor para GM-CSF, CD116. Foi demonstrado que células precursoras expressando CD116<sup>+</sup>CD64<sup>-</sup>CD115<sup>+</sup> migram do fígado fetal para o pulmão, e se desenvolvem em macrófagos alveolares após exposição a GM-CSF e M-CSF (EVREN et al., 2021); subsequentemente, passam a ser caracterizados, também, pela expressão elevada dos receptores de superfície SiglecF e CD11c (GUILLIAMS et al., 2013).

Os macrófagos alveolares têm papel importante na manutenção da homeostase pulmonar, sendo responsáveis por monitorar o funcionamento do nicho e ter papel importante na imunidade de barreira. Além disso, eles são capazes de fagocitar partículas inaladas e surfactante pulmonar, além de eliminar debris celulares e iniciar a resposta imunológica contra patógenos (YUAN et al., 2012; SCHNEIDER et al., 2014b; EVREN et al., 2019). Porém, o estabelecimento de infecções e/ou injúria pulmonar, com desenvolvimento de uma resposta inflamatória intensa, induzem processos de remodelação do nicho que afetam diretamente a população de macrófagos alveolares (WANG et al., 2012; WOO et al., 2021).

O comprometimento da população de macrófagos alveolares depende do nível da inflamação e injúria tecidual desencadeadas. Estudos mostraram, durante quadros de infecção pulmonar, a capacidade de monócitos inflamatórios circulantes de infiltrar no pulmão e se diferenciarem em macrófagos derivados de monócitos (Mon-Mac) (EVREN et al., 2019; AEGERTER et al., 2020). Essas duas populações celulares podem coabitar o nicho; porém, a depleção de macrófagos alveolares em resposta às infecções pode ser seguida por sua substituição por Mon-Mac, que passam a adquirir características semelhantes, e desempenhar funções importantes no estabelecimento da resposta inflamatória local (MACHIELS et al., 2017; AEGERTER et al., 2020; MARTIN et al., 2021).

Durante a infecção por *Toxoplasma gondii*, o recrutamento e ativação de monócitos para seu perfil clássico é essencial para controle da infecção e direcionamento da resposta

imunológica adaptativa de perfil Th1. Monócitos inflamatórios ativados, após a infecção por *T. gondii*, são responsáveis pela produção de níveis elevados de óxido nítrico e, junto a produção de IFN- $\gamma$ , induzem a cronificação da infecção com formação de cistos teciduais, principalmente no cérebro (DUNAY et al., 2008; STURGE, YAROVINSKY, 2014; PARK, HUNTER, 2020). Porém, durante a infecção aguda e devido ao alto nível de disseminação parasitária, taquizoítos podem ser identificados nos pulmões do hospedeiro (UNNO et al., 2013). Apesar de já ser descrita a ocorrência de toxoplasmose pulmonar entre indivíduos imunocompetentes (LEAL et al., 2007; PENA et al., 2021), poucos estudos avaliando o impacto da infecção por *T. gondii* no ambiente pulmonar estão disponíveis na literatura. Zhao e colaboradores (2013) mostraram em modelo de cultivo primário de macrófagos alveolares de ratos, a infecção celular por *T. gondii* apresentou maior proliferação parasitária e menores níveis de óxido nítrico do que o observado durante a infecção por macrófagos peritoneais.

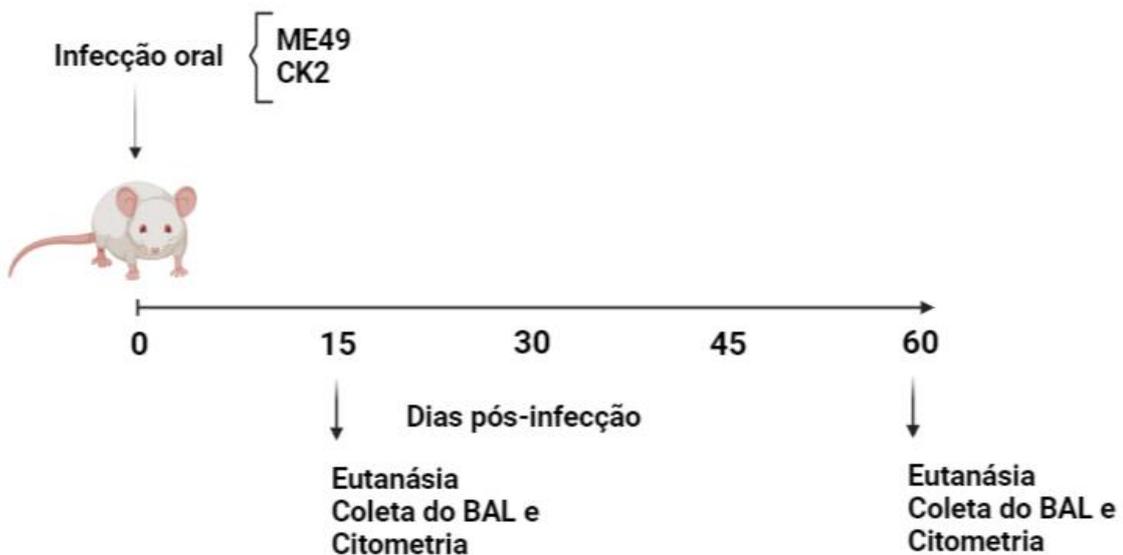
Outro ponto importante envolvendo a infecção por *T. gondii* e o ambiente pulmonar, é a capacidade do parasito em modular a resposta inflamatória local. Em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica, induzida por ovalbumina, foi demonstrado que a infecção prévia por *T. gondii*, seja durante a fase aguda ou crônica, é capaz de modular o perfil inflamatório local; contribuindo para redução da eosinofilia e dos níveis de IL-4 e IL-5 (FENOY et al., 2008), de maneira possivelmente dependente da expansão de linfócitos T CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> reguladores e produção elevada de TGF- $\beta$  (FENOY et al., 2012).

Com base nessas evidências e considerando a importância de cepas atípicas de *T. gondii* na evolução da infecção e suas consequências no hospedeiro, esse capítulo apresentará o envolvimento da infecção aguda e crônica por cepa atípica de *T. gondii* no ambiente pulmonar, focando no impacto sobre a população de macrófagos alveolares.

## 4.5. Materiais e Métodos

### 4.5.1. Parasitos e animais experimentais

Nesse trabalho, foram utilizadas as mesmas cepas de *Toxoplasma gondii*, sob o mesmo protocolo de ética, conforme descrito no capítulo I. Para o protocolo experimental, os animais foram organizados em três grupos de sete animais cada, sendo: grupo não infectado (Ni), grupo infectado com cepa atípica (CK2) e grupo infectado com cepa clonal (ME49). A infecção foi realizada por via oral, com 10 cistos teciduais por camundongo, seja da cepa ME49 ou CK2. Os camundongos permaneceram infectados por 60 dias, sendo avaliados em dois momentos: 15 e 60 dias pós-infecção (Figura 19).



**Figura 20: Infecção experimental por *T. gondii* para avaliação da fase aguda e crônica.** Os efeitos da infecção por *T. gondii* foram analisados durante a infecção aguda (15 dpi) e na fase crônica (60dpi). Para cada momento a ser avaliado, os camundongos foram divididos em três grupos, sendo um grupo não infectado (Ni); um grupo infectado com ME49 e o último grupo infectado com a cepa atípica CK2. Para a primeira análise, os camundongos permaneceram infectados por 15 dias e, ao final desse período, foi realizada a coleta do lavado broncoalveolar (BAL) e a imunofenotipagem das células recuperadas no BAL. No segundo momento, os outros grupos foram mantidos infectados por 60 dias, para cronificação da infecção. Após esse período, foram realizados os mesmos procedimentos feitos com os grupos da infecção aguda.

#### **4.5.2. Quantificação dos níveis de IgG anti-*Toxoplasma gondii* pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)**

A quantificação de anticorpos no soro dos camundongos foi realizada conforme descrita no capítulo I, através do ensaio de imunoabsorção enzimática. Para esse procedimento, o sangue dos camundongos foi coletado nos momentos de 15 e 60 dias após infecção, por meio de punção cardíaca.

Os resultados foram calculados com base no ponto de corte (*cut off*), calculado pela média das absorbâncias de seis amostras de soro, conhecidamente negativos, mais três vezes seu desvio padrão. Os soros que apresentarem os valores de índice de reatividade (IR) maior ou igual a 1 foram considerados positivos; valores abaixo desse índice foram considerados negativos. Os níveis de anticorpos IgG específicos foram apresentados de acordo com a densidade óptica (OD) identificada.

#### **4.5.3. Lavado Broncoalveolar**

Após a coleta de sangue, foi realizada a lavagem broncoalveolar para obtenção das populações celulares no pulmão. Esse procedimento iniciou com uma incisão na parte superior da traqueia para introdução de um cateter (Safety Catheter® 18G x 1<sup>3</sup>/<sub>4</sub>" ) acoplado à seringa. Subsequentemente, duas lavagens intratraqueais com 1 mL de PBS a 4°C foram realizadas, totalizando um volume final de 2 mL. Após a coleta, o lavado broncoalveolar (BAL) foi centrifugado a 300 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi separado e armazenado a -80 °C para análises futuras; e o *pellet* foi direcionado para imunofenotipagem multiparamétrica por citometria de fluxo.

#### **4.5.4. Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica**

Após a coleta do BAL e obtenção do *pellet* celular, as amostras seguiram para incubação por 5 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com tampão ACK para lise de hemácias. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 min a 4°C; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de PBS 1x, seguido de outra centrifugação. Após observar a lise completa das hemácias, o *pellet* foi ressuspenso em 200 µL de PBS 1x e transferidos para placas de 96 poços com fundo em U. O número de células

recuperadas no BAL foi determinado por contagem em câmara de Neubauer (na diluição 1:2 em corante azul de tripan).

A marcação das células começou com a adição do marcador de viabilidade celular (*Live/Dead* AF700, BD Bioscience), seguida de incubação por 10 minutos a 4°C. Após incubação, a placa foi centrifugada a 1300 rpm, por 8 minutos a 4 °C. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 50 µL/poço do mix contendo os anticorpos para receptores de superfície, diluídos em solução diluidora de anticorpos (v/v (mL) – 1:1 tampão wash B e PBS 1x). Os anticorpos utilizados para os camundongos com infecção aguda e crônica estão descritos na tabela 4. A placa foi incubada por 15 minutos a 4°C. Após incubação, repetiu-se o processo de lavagem e centrifugação descrito anteriormente. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo CX3CR1 nas amostras referentes aos grupos da infecção crônica. A placa foi incubada por 30 minutos, em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após incubação, seguiu-se duas etapas de lavagem e centrifugação, conforme já descrito. Os pellets foram ressuspensos em 100 µL de PBS 1x e foi adicionado 100 µL de paraformaldeído 4%, seguido por incubação por 20 minutos em temperatura ambiente e, após esse tempo, a placa foi centrifugada. Os pellets foram ressuspensos em 200 µL/poço de PBS 1x e transferidos para tubos FACS.

Para a marcação das células obtidas dos camundongos com infecção aguda, foram adicionados 150 µL de tampão de ligação (0.1M HEPES, 1.4M NaCl e 25 mM CaCl<sub>2</sub>) para marcação por Anexina V. Após adição do tampão, a placa foi centrifugada a 1300 rpm por 8 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 50 µL de Anexina V (2.5 µL de Anexina V em 50 µL de tampão de ligação, por camundongo). A placa foi incubada por 15 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, foram adicionados 150 µL de PBS 1x gelado e, em seguida, centrifugados. Os pellets foram ressuspensos em 200 µL/poço de PBS 1x e transferidos para tubos FACS; em sequência, as amostras foram adquiridas em citômetro Fortessa (BD Biosciences, San Jose, USA) e analisados com o *software* FlowJo (Tree Star, Ashlan, OR).

Os dados foram analisados através da redução de dimensionalidade e visualizados por *t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding* (tSNE), através do Cytokit (CHEN et al., 2016).

**Tabela 4:** Lista de anticorpos utilizados para marcação de receptores de superfície de células obtidas do pulmão

Anticorpos	Fluorófoto	Clone	Marca
Infecção aguda			
<b>CD45</b>	PeCy7	30-F11	BD Biosciences
<b>Ly6C</b>	PE	AL-21	
<b>SiglecF</b>	PETX	E50-2440	
<b>Anexina V</b>	AF647	B171343	BioLegend
<b>CD3</b>	FITC	17A2	eBioscience
Infecção crônica			
<b>HLA-DR</b>	FITC	AF6-120.1	BD Biosciences
<b>Ly6C</b>	PE	AL-21	
<b>CD11c</b>	APCCy7	HL3	
<b>SiglecF</b>	PETX	E50-2440	
<b>CD8</b>	APC	53-6.7	
<b>CD45</b>	PeCy7	30-F11	
<b>CX3CR1</b>	BV605	SA011F11	BioLegend
<b>CD4</b>	PerCP	RM4-5	eBioscience

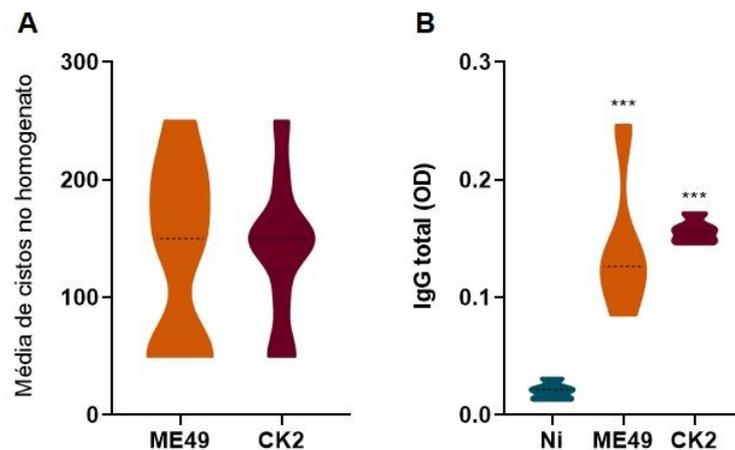
#### 4.5.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prims, versão 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação de dados entre os três grupos, foi realizada a análise através do teste de variância ANOVA, seguido pelo pós-teste de *Tukey* para dados paramétricos. Para comparação de dois grupos, com dados também paramétricos, foi utilizado o teste *t-student*. A análise dos dados não paramétricos, também considerando o número de grupos analisados, foi realizada através do teste Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de *Dunn*; ou através do teste Mann-Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0.05$ .

## 4.6. Resultados

### 4.6.1. Cepa atípica de *Toxoplasma gondii* induz depleção de macrófagos alveolares durante a infecção aguda

Para avaliarmos o impacto da infecção aguda por *T. gondii*, os camundongos permaneceram infectados por aproximadamente duas semanas. Nesse período, já foi possível encontrar cistos formados no cérebro dos animais, porém sem haver diferença significativa na carga entre os camundongos infectados com a cepa clonal ME49 e aqueles infectados com a cepa atípica CK2 (Figura 21 A). Nesse momento da infecção, já é possível a detecção de anticorpos IgG específicos no soro; as duas cepas estimularam a produção de níveis semelhantes de anticorpos (Figura 21 B).



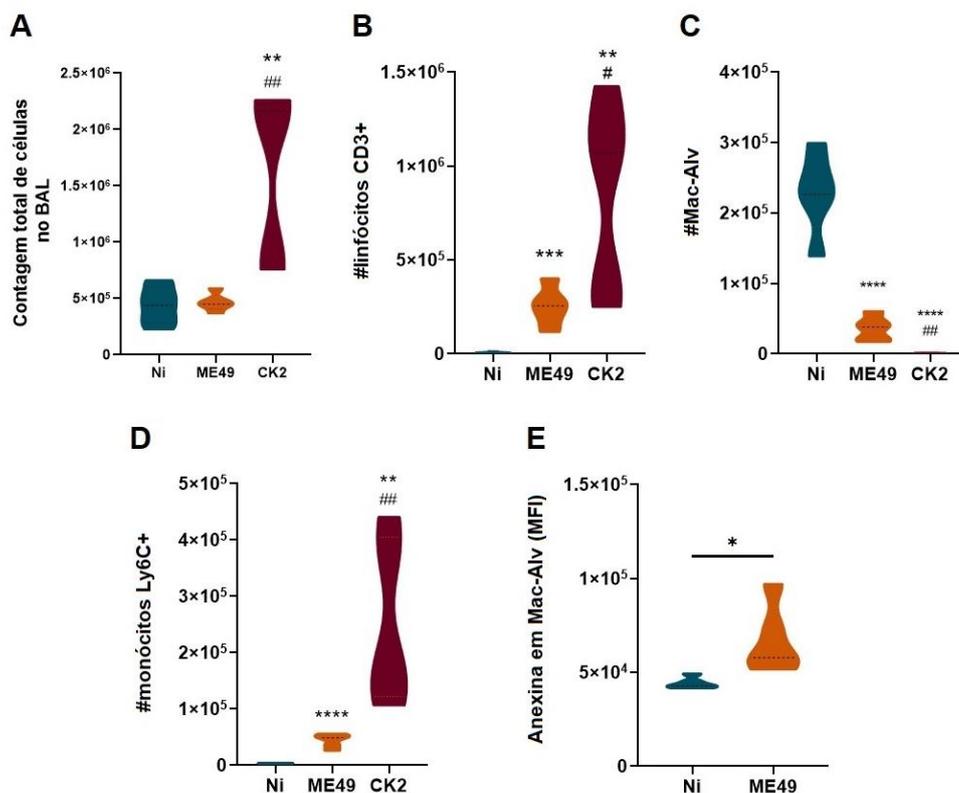
**Figura 21: Quantificação do número de cistos no cérebro e dosagem de anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii* durante a infecção aguda.** (A) Carga de cistos presente no homogenato de cérebro de camundongos Balb/c machos, infectados com cepa clonal (ME49) e cepa atípica (CK2) de *T. gondii* 2 semanas após infecção. (B) Quantificação dos níveis de anticorpos IgG específicos, 2 semanas após infecção. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. OD: densidade óptica. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Durante a infecção aguda, analisamos as populações de células presentes no pulmão dos camundongos infectados com a cepa ME49 e com a cepa CK2. Na infecção com a cepa atípica, os camundongos apresentaram maior infiltrado celular (Figura 22 A) com predominância de

linfócitos (CD3<sup>+</sup>) (Figura 22 B) quando comparados ao grupo infectado com ME49 e o grupo não infectado.

Ao quantificar a população de macrófagos alveolares (Siglec<sup>Fhi</sup>), as duas cepas de *T. gondii* induziram a redução dessa população. Porém, a cepa atípica foi capaz de induzir uma diminuição drástica no número de macrófagos alveolares, quando comparada a ME49 e ao grupo não infectado (Figura 22 C). Além disso, durante a infecção aguda observou-se um marcante infiltrado de monócitos inflamatórios (Ly6C<sup>hi</sup>), caracterizados pela expressão elevada de Ly6C, principalmente nos camundongos infectados com a cepa atípica (Figura 22 D).

Buscando identificar as causas da dramática redução de macrófagos alveolares durante a infecção, nós realizamos a marcação de Anexina V. Esse marcador é uma proteína que se liga a resíduos de fosfatidilserina expostos durante o processo de apoptose. Foi identificada uma maior intensidade de marcação por Anexina V em macrófagos alveolares após a infecção com a cepa ME49 em comparação com esses macrófagos no grupo não infectado (Figura 22 E). Devido à ausência de macrófagos alveolares em camundongos infectados pela cepa CK2, não foi possível realizar a análise de apoptose nesse grupo.



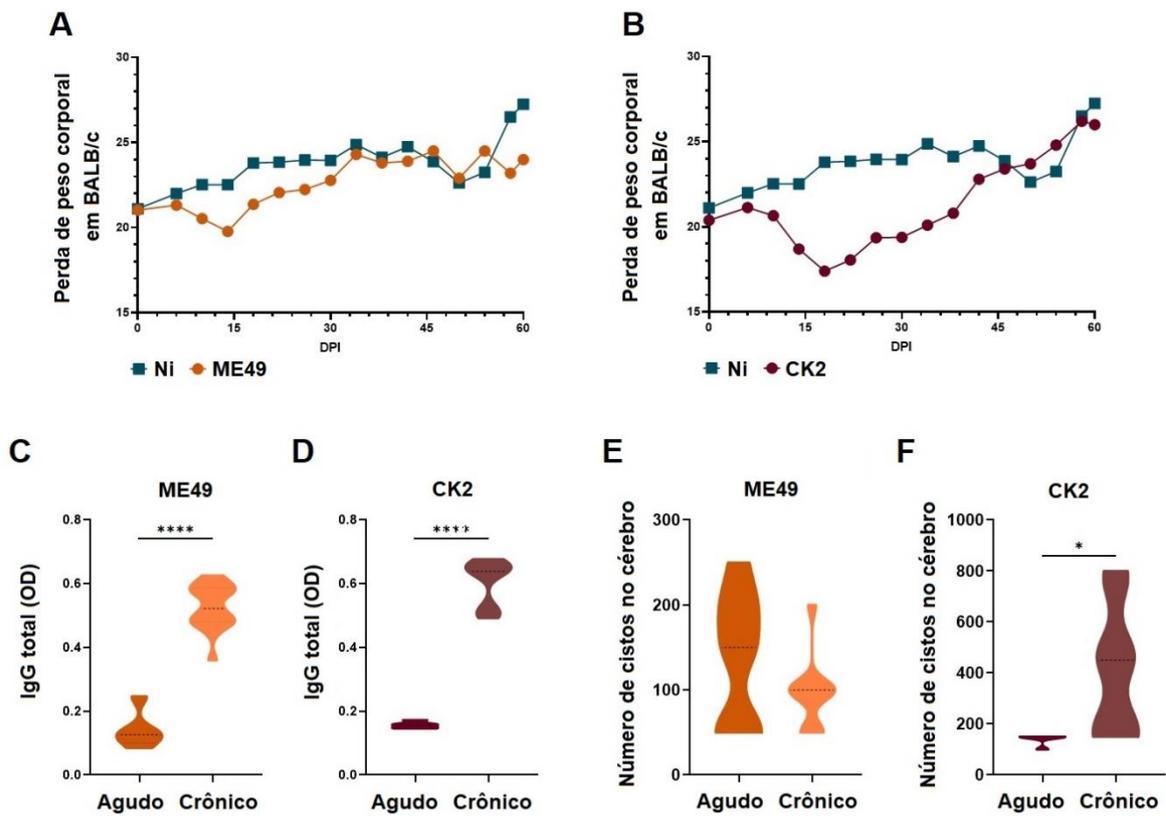
**Figura 22. Infecção aguda por *T. gondii* estimula forte infiltrado inflamatório no pulmão e contribui para depleção da população de macrófagos alveolares. (A) Contagem de células totais no lavado broncoalveolar; (B)**

infiltrado de linfócitos T no pulmão de camundongos infectados; (C) população de macrófagos alveolares; (D) infiltrado de monócitos inflamatórios no pulmão; (D) macrófagos alveolares em processo de apoptose. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. BAL: lavado broncoalveolar; CK2: cepa atípica de *T. gondii*; ME49: cepa clonal de *T. gondii*; Ni: grupo não infectado; Mac-Alv: macrófagos alveolares. \* indica diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo controle; # indica diferença estatística entre os grupos infectados. \*/# p<0.05; \*\*/## p<0.01; \*\*\*/### p<0.001; \*\*\*\*/#### p<0.0001.

#### **4.6.2. Impacto da infecção crônica por *T. gondii* na população de macrófagos no pulmão**

A evolução da infecção nos camundongos foi acompanhada ao longo de 60 dias, através da variação do peso corporal apresentada. Os camundongos infectados com a cepa ME49 apresentaram redução de peso já esperada durante a infecção aguda, que se manteve até aproximadamente o décimo quinto dia pós infecção. Após esse período, os camundongos começaram a recuperar o peso gradativamente (Figura 23 A). Com relação aos camundongos infectados com CK2, a perda de peso foi mais acentuada e o tempo para sua recuperação mais longo (Figura 23 B).

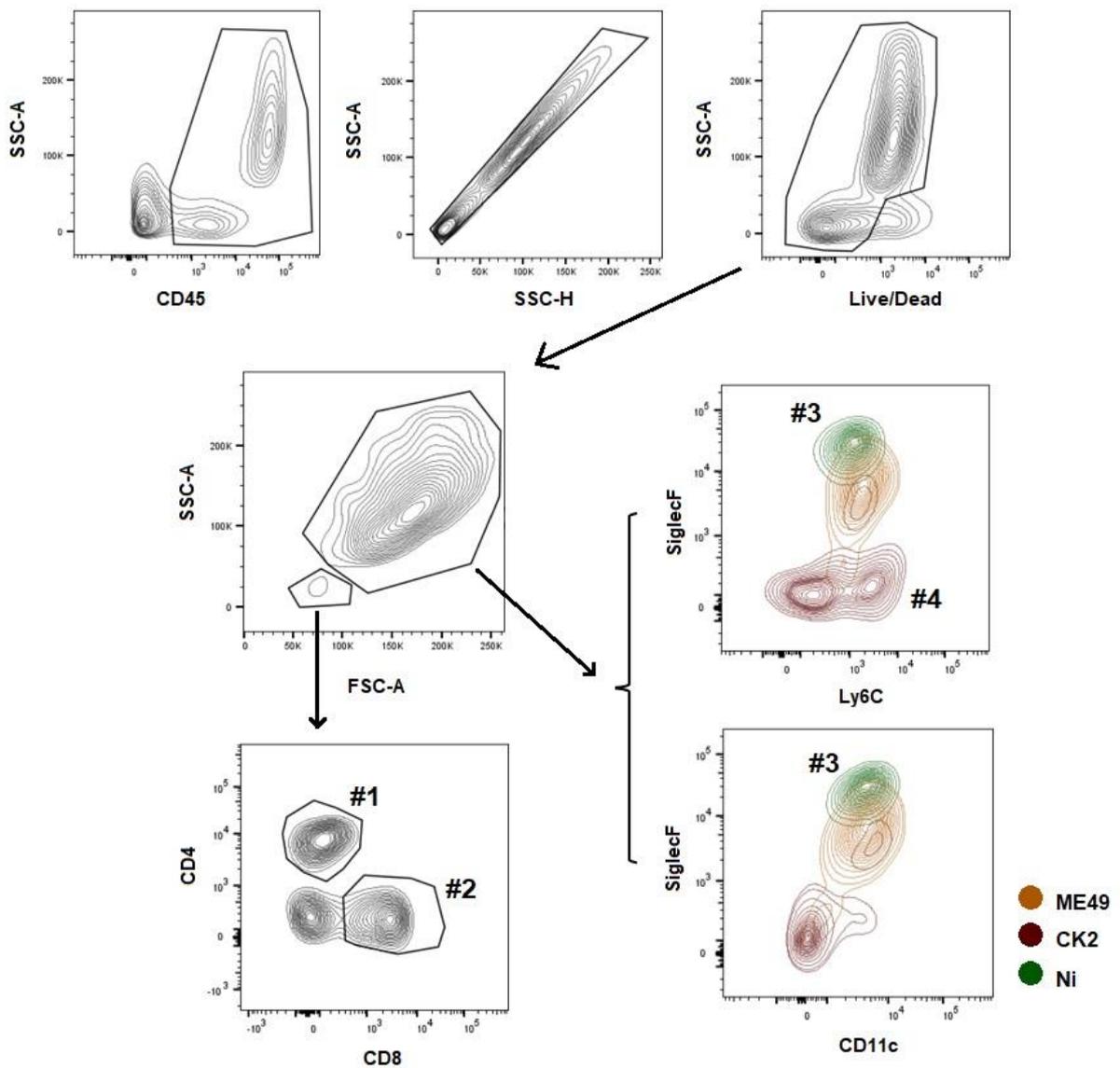
Com o estabelecimento da infecção crônica, os níveis de anticorpos IgG específicos aumentaram consideravelmente quando comparados aos encontrados durante o período de infecção aguda, tanto para os camundongos infectados com ME49 (Figura 23 C) quanto para aqueles infectados com CK2 (Figura 23 D). A fim de verificar a evolução da infecção crônica, além das análises de peso e níveis de anticorpos, a carga de cistos no cérebro durante a infecção crônica foi comparada à carga obtida durante a infecção aguda. Os resultados mostraram que, durante a infecção crônica pela cepa ME49, não houve diferença significativa na carga de cistos quando comparada à infecção aguda (Figura 23 E). Porém, quando analisamos o número de cistos presentes no cérebro dos camundongos infectados com a CK2, obtivemos uma carga significativamente maior durante a infecção crônica, quando comparada ao número de cistos identificados na infecção aguda (Figura 23 F).



**Figura 23. Evolução da infecção crônica por *T. gondii*.** Acompanhamento da evolução da infecção através da variação do peso corporal de camundongos infectados com a cepa clonal ME49 (A) e com a cepa atípica CK2 (B); comparação dos níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* nas fases aguda e crônica da infecção por ME49 (C) e CK2 (D); comparação da carga de cistos no cérebro durante as fases aguda e crônica da infecção por ME49 (E) e por CK2 (F). Os dados presentes nos gráficos A e B estão representados como média dos pesos apresentados pelos camundongos em cada grupo; nos gráficos C, D, E e F, os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. A análise estatística foi realizada através do teste t-student. CK2: cepa atípica de *T. gondii*; ME49: cepa clonal de *T. gondii*; Ni: grupo não infectado; OD: densidade óptica; DPI: dias pós infecção. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 4.6.3. Predominância de macrófagos inflamatórios no pulmão de camundongos durante a infecção crônica por *Toxoplasma gondii*

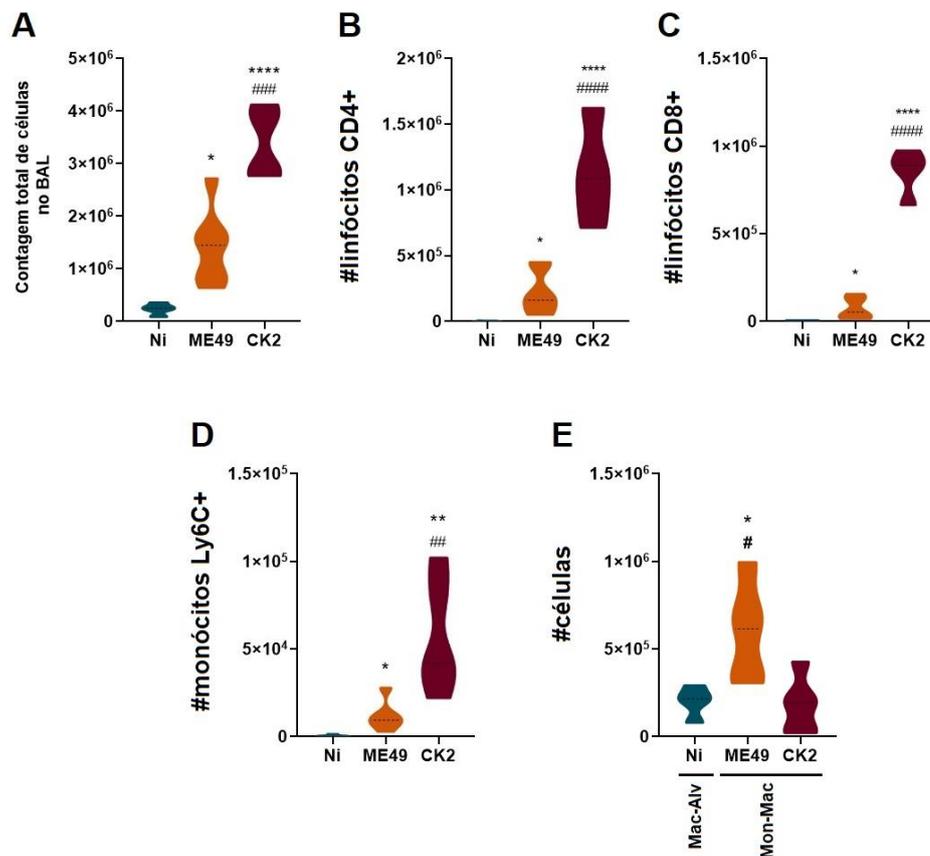
Para avaliar a população de células inflamatórias no pulmão durante a infecção crônica, foi realizada imunofenotipagem por citometria de fluxo nas células obtidas no BAL (Figura 24).



**Figura 24.** Estratégia de análise das populações células obtidas no BAL de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii*. Foram selecionadas células CD45<sup>+</sup> no plot SSC-A x CD45, seguido pela seleção de singlets (SSC-A x SSC-H). Após a seleção de células vivas (SSC-A x Live) foram separadas através de tamanho e granulosidade (SSC-A x FSC-A) as células linfóides (pequeno tamanho e pequena granulosidade) das mielóides (grande tamanho e granulosidade). Os linfócitos T foram identificados a partir da marcação CD4<sup>+</sup> (#1) e CD8<sup>+</sup> (#2) e, as populações de células mielóides no lavado bronchoalveolar dos camundongos foram identificadas a partir da expressão de SiglecF, CD11c e Ly6C. #3 macrófagos SiglecF<sup>hi</sup>CD11c<sup>+</sup> presentes nos camundongos não

infectados (verde) e macrófagos SiglecF<sup>low</sup>CD11c<sup>+</sup> em camundongos cronicamente infectados por ME-49 (laranja) ou CK2 (vermelho); #4 monócitos SiglecF<sup>low</sup>Ly6C<sup>+</sup> presentes nos camundongos infectados com cepa atípica.

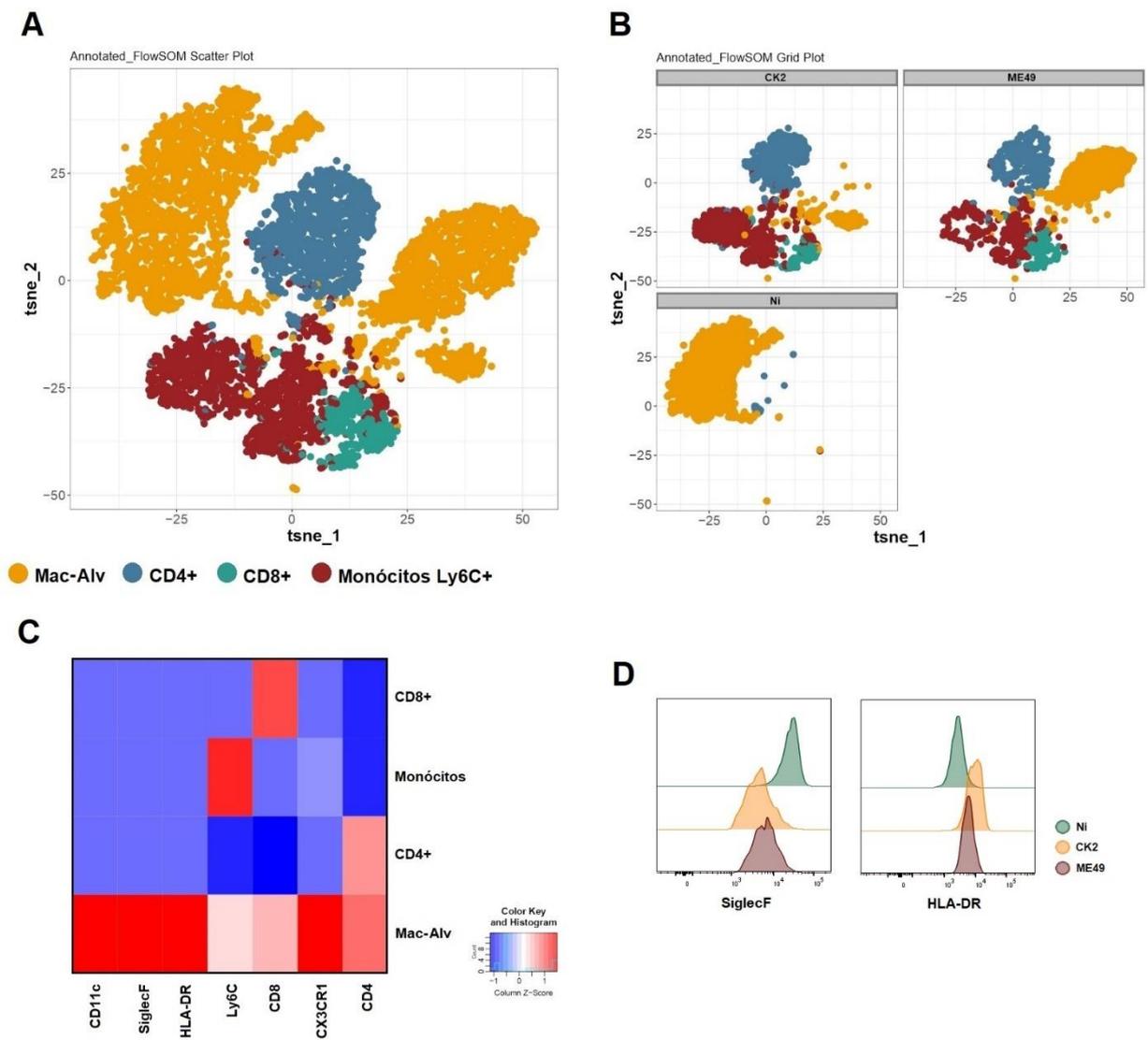
Nesse estágio da infecção, assim como observado na infecção aguda, os camundongos infectados com a cepa atípica CK2 apresentaram maior infiltrado inflamatório quando comparados aos infectados com ME49 e ao grupo não infectado (Figura 25 A). Além disso, a infecção crônica pela cepa CK2 apresenta maior infiltrado de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 25 B), T CD8<sup>+</sup> (Figura 25 C) e monócitos Ly6C<sup>+</sup> (Figura 25D) no pulmão, quando comparada a infecção por ME49. Com relação a população de macrófagos alveolares, os camundongos com infecção crônica por *T. gondii* apresentam substituição da população de células residentes por monócitos inflamatórios, que originaram uma população de macrófagos derivados de monócitos infiltrados (Mon-Mac). Além disso, o grupo infectado com ME49 apresentou um número significativamente maior dessas células do que os camundongos infectados com CK2 (Figura 25 E).



**Figura 25. Infecção crônica por cepa atípica de *Toxoplasma gondii* mantém infiltrado inflamatório elevado no pulmão.** (A) contagem total de células no BAL; (B) infiltrado de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no pulmão; (C) infiltrado

de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no pulmão; (D) infiltrado de monócitos inflamatórios Ly6C<sup>+</sup> no pulmão. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0.05$ . \* indica diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo controle; # indica diferença estatística entre os grupos infectados. CK2: cepa atípica de *T. gondii*; ME49: cepa clonal de *T. gondii*; Ni: grupo não infectado. \*/#  $p < 0.05$ ; \*\*/##  $p < 0.01$ ; \*\*\*/###  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*/####  $p < 0.0001$ .

As populações celulares identificadas no pulmão foram submetidas a análise por tSNE, de acordo com o nível de expressão dos receptores CD11c, SiglecF, HLA-DR, CX3CR1, Ly6C, CD8 e CD4. Essa análise tornou possível identificar os *clusters* formados por macrófagos alveolares (LiveSiglecF<sup>hi</sup>CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>), monócitos Ly6C<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Figura 26 A). Com a separação dos grupos infectados e não infectado, obtivemos a distribuição de células para cada grupo (Figura 26 B). O grupo não infectado apresentou predominância da população de macrófagos alveolares característicos (Figura 25 B, quadro inferior esquerdo), identificados pela expressão de CD11c<sup>hi</sup>SiglecF<sup>hi</sup>HLA-DR<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>hi</sup> (Figura 26 C); os camundongos com infecção crônica por *T. gondii* apresentaram expressão de SiglecF e HLA-DR com perfis distintos dos observados para os camundongos não infectados (Figura 26 D). Nos camundongos com infecção crônica por ME49, foi evidenciada a presença dos *clusters* referentes aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Figura 26 B, quadro superior direito); nesse grupo, além do agrupamento de monócitos inflamatórios infiltrados, identificados pela expressão elevada de Ly6C; também foi possível observar a presença de macrófagos com características similares às apresentadas pelos macrófagos alveolares do grupo não infectado (Figura 26 B e C). Com relação ao grupo com infecção crônica por CK2, a análise por tSNE evidenciou a redução significativa na população de macrófagos alveolares, com predomínio de monócitos Ly6C<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Figura 26 B, quadro superior esquerdo).



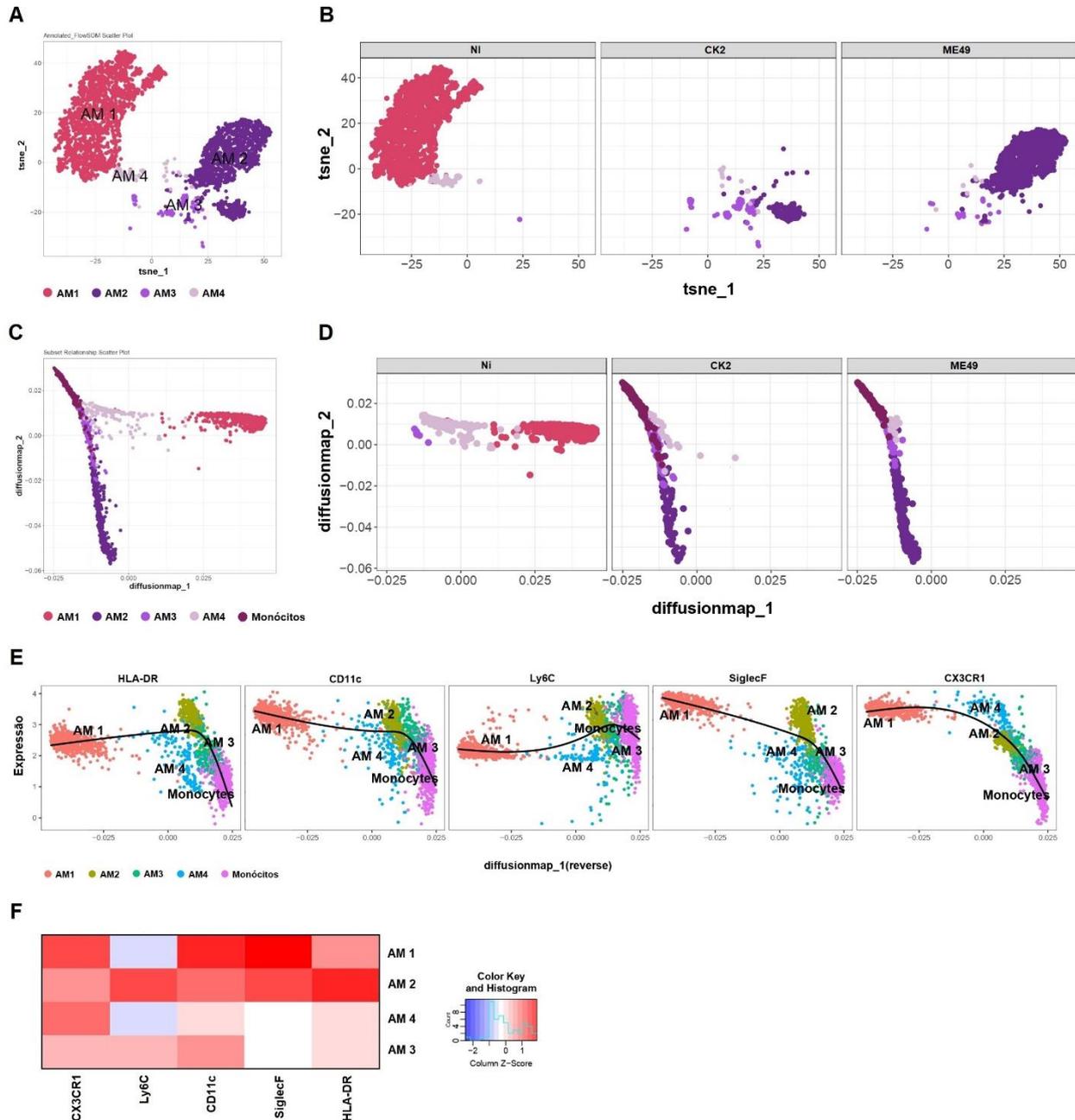
**Figura 26. Análise de clusters das populações celulares identificadas nos pulmões de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii*.** (A) tSNE de dados combinados de camundongos não infectados (7) e 8 semanas após infecção pelas cepas ME49 (7) e CK-2 (7) a partir do gate de LiveCD45<sup>+</sup> dos grupos de células identificadas, evidenciando as populações de macrófagos alveolares (Mac-Alv, amarelo), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (azul), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (verde) e monócitos Ly6C<sup>+</sup> (vermelho-escuro); (B) tSNE de “A”, evidenciando a distribuição de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, macrófagos alveolares e monócitos Ly6C nos grupos de camundongos infectados com CK2, ME49 e no grupo de camundongos não infectados; (C) Heatmap evidenciando os níveis de expressão de cada marcador de superfície, de acordo com a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, macrófagos alveolares e monócitos Ly6C; (D) diferenças no padrão de expressão de SiglecF e HLA-DR entre os camundongos não infectados e os infectados por *T. gondii*. Os dados foram expressos através da mediana e padrão de distribuição das amostras. CK2: cepa atípica de *T. gondii* (vermelho); ME49: cepa clonal de *T. gondii* (laranja); Ni: grupo não infectado (verde).

As populações de macrófagos alveolares identificadas no BAL dos camundongos infectados e não infectados foram submetidas a análise por *rPhenograph*, a fim de caracterizar os tipos celulares de acordo com o perfil de expressão dos receptores CX3CR1, CD11c, SiglecF, HLA-DR e Ly6C. Essa análise separou os macrófagos em quatro populações distintas: AM1 – 4 (Figura 27 A). A população AM1 está presente apenas no grupo de camundongos não infectados; apresentando perfil fenotípico característico de macrófagos alveolares (SiglecF<sup>hi</sup>CD11c<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>) (Figura 27 B – esquerda; E). Além dessa população, os camundongos não infectados também apresentaram macrófagos identificados como AM4, porém em menor frequência, que também não apresentam expressão de Ly6C mas apresentaram uma menor expressão de Siglec F, CD11c, CX3CR1 e HLA-DR em comparação com a população de AM1. AM4 também está presente, em pequena porcentagem no BAL de camundongos cronicamente infectados por ME-49 e CK2.

As populações identificadas como AM2 e AM3 foram encontradas apenas nos grupos infectados com as cepas ME49 e CK2 (Figura 27 B, centro e direita, respectivamente); além disso, a população AM2 está presente principalmente no grupo de camundongos infectados com ME49. Ambas as populações apresentam menor expressão de SiglecF, CD11c e CX3CR1 em comparação com a população AM1, majoritária em camundongos não infectados. A população presente em maior frequência em camundongos infectados por *T. gondii* (AM2) apresenta níveis elevados de Ly6C (marcador de linhagem monocítica) e do marcador de ativação HLA-DR (Figura 27 F).

A fim de investigar a relação entre as populações mieloides encontradas no BAL de camundongos dos diferentes grupos, nós realizamos uma análise de progressão (*diffusion map*). Essa técnica realiza uma redução de dimensionalidade não linear (e, portanto, diferente de PCA) e através da técnica de *machine learning*, essa técnica permite uma descrição global de todos os parâmetros e a distância euclidiana entre os clusters representa a similaridade entre eles. Através de análise de progressão, tornou-se evidente que as populações AM2 e AM3, presentes nos camundongos infectados, são mais relacionadas com monócitos inflamatórios infiltrados (“Monocytes”, em roxo escuro) do que com a população de macrófagos alveolares (AM1, em vermelho) presente no grupo não infectado (Figuras 27 C e D). As diferenças entre essas populações celulares podem ser observadas pelas variações no nível de expressão dos marcadores de superfície, garantindo uma separação evidente entre os grupos de células identificados (Figura 27 E). Além disso, outro ponto importante relacionado às características fenotípicas apresentadas, é que tanto a população AM2 quanto AM3 caracterizam-se pela

expressão de Ly6C<sup>hi</sup>, além da expressão reduzida de CX3CR1 (Figura 27 F); indicando assim o desaparecimento do macrófago alveolar de origem embrionária e a substituição por macrófagos derivados de monócitos de origem na medula óssea.



**Figura 27.** Análises de clusters das populações macrófagos identificados nos pulmões de camundongos com infecção crônica por *Toxoplasma gondii*. (A) tSNE da figura 26 A evidenciando os clusters de macrófagos identificados via Rphenograph evidenciando as populações de macrófagos AM1 (roxo escuro), AM2 (rosa), AM3 (roxo claro) e AM4 (lilás); (B) tSNE de “A”, evidenciando a distribuição das populações AM1 – 4 nos grupos de

camundongos infectados com CK2, ME49 e no grupo de camundongos não infectados; (C) análises de progressão demonstrando a distribuição das populações celulares, (D) análise de progressão de C considerando os grupos de camundongos analisados; (E) distribuição e relação entre os grupos celulares de acordo com o nível de expressão dos marcadores de superfície utilizados; (F) heatmap evidenciando os níveis de expressão de cada marcador de superfície, de acordo com as populações AM1 – 4. CK2: cepa atípica de *T. gondii*; ME49: cepa clonal de *T. gondii*; Ni: grupo não infectado.

## 5. DISCUSSÃO

A ocorrência de *Toxoplasma gondii* no Brasil é marcada pela ampla distribuição de cepas atípicas, caracterizadas pela presença de variações polimórficas nas proteínas secretadas que garantem perfis de ativação imunológica distintos e, conseqüentemente, diferentes padrões de patogênese no hospedeiro infectado.

Camundongos BALB/c são considerados resistentes à infecção por *T. gondii*, sendo capazes de estabelecer uma infecção crônica, tendo essa característica associada à presença do haplótipo H2<sup>d</sup> pertencente ao *locus* gênico do MHC de classe I. Nesse sentido, essa linhagem de camundongos, durante a infecção pela cepa clonal tipo II ME49, consegue evitar o desenvolvimento de encefalite toxoplásmica, sem focos inflamatórios exacerbados (SUZUKI et al., 1991). Aqui, camundongos BALB/c machos foram utilizados como modelo de resistência para avaliar a progressão da infecção por cepa atípica de *T. gondii* (CK2). Essa cepa foi previamente isolada a partir do coração de galinhas criadas para consumo humano em uma fazenda no estado do Rio Grande do Norte; sendo descrita como virulenta em modelo experimental e pertencente ao genótipo #163 de acordo com a análise molecular por PCR-RFLP (CLEMENTINO-ANDRADE et al., 2013). Um estudo anterior realizado por Oliveira e colaboradores (2016) apresentou uma análise inicial de patogenicidade das cepas atípicas identificadas no Rio Grande do Norte, incluindo a cepa alvo do estudo realizado aqui. Nesse trabalho, foi demonstrada a ocorrência de cepas naturalmente resistentes à sulfadiazina e com diferentes níveis de patogenicidade, incluindo outros isolados também pertencentes ao genótipo #163 e ao genótipo #109 registrados no ToxoDB.

No presente trabalho, realizamos a avaliação do desenvolvimento da infecção crônica por CK2, comparando-a ao curso de cronificação da infecção por ME49. Durante a fase aguda, avaliada 15 dias após infecção oral dos camundongos, a cepa atípica apresentou número de cistos no cérebro semelhante ao apresentado pelos camundongos infectados com a cepa clonal. Vários fatores precisam ser considerados para a avaliação da patogênese e estabelecimento da infecção crônica no hospedeiro. Padrões de invasão celular e replicação intracelular do parasito, influenciados por proteínas liberadas e suas variações polimórficas garantem uma assinatura genética específica para cada cepa, contribuindo para níveis de ativação imunológica distintos e, conseqüentemente, impactando a formação de cistos teciduais e estabelecimento da infecção crônica e a patogênese desenvolvida no hospedeiro (LAMBERT, BARRAGAN 2010; JONES; WANG; SIBLEY, 2017; FOX et al., 2019). Em um estudo recente, analisando o perfil

patogênico da cepa atípica isolada de *Saimiri boliviensis* (Macaco-de-cheiro-Boliviano) na Argentina, e pertencente ao genótipo #163 (nomeada como TgSb), apresentou elevada capacidade replicativa *in vitro* semelhante à cepa do Tipo I RH, de alta virulência; além disso, a infecção com a cepa TgSb apresentou elevada taxa de mortalidade, focos de necrose no cérebro e produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* menor que a observada para infecção por ME49 (BERNSTEIN et al., 2020). A ocorrência do genótipo #163 já foi descrita em diversas espécies de hospedeiros pelo Brasil (GENNARI et al., 2015; REGO et al., 2017), com cepas apresentando diferentes perfis de virulência (REGO et al., 2017).

Com o avanço da infecção e estabelecimento da fase crônica, sessenta dias após infecção seja com a cepa atípica ou clonal, todos os camundongos infectados apresentaram taxa de sobrevivência de 100% e perfil de ativação da resposta humoral semelhante, observado pela produção de anticorpos IgG. Por outro lado, e contrastando com o observado para os camundongos infectados com ME49, a cepa atípica induziu uma redução do peso corporal mais acentuada e maior número de cistos teciduais formados no cérebro durante a infecção crônica. Este perfil apresentado durante a infecção pela cepa atípica relaciona-se com o quadro inflamatório estimulado, e pode ser resultado de uma ativação imunológica mais tardia durante a infecção por CK2. Mecanismos de evasão imunológica apresentados por *T. gondii*, levando a uma ativação da imunidade protetora tardia através de interferência na translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo, bloqueio da apresentação de antígeno via MHC de classe II ou retardo na produção de IFN- $\gamma$ , garantem sua capacidade de disseminação pelo hospedeiro e estabelecimento de uma infecção latente (LANG et al., 2007). Estudos apontam para a maior virulência apresentada por cepas atípicas, em decorrência de diferentes níveis de expressão de mediadores inflamatórios, capazes de contribuir para um comprometimento tecidual exacerbado (CHIEBAO et al., 2021).

Durante a infecção por cepa clonal do Tipo II, com o estabelecimento da infecção crônica, os níveis de IFN- $\gamma$  tendem a reduzir, quando comparados à infecção aguda (MOSE et al., 2019); além de haver uma diferença clara no nível de inflamação e comprometimento tecidual estimulados por cepas de genótipos distintos (GAVRILESCU, DENKERS 2001; MUKHOPADHYAY et al., 2020). Aqui, os níveis de IFN- $\gamma$  no cérebro continuaram elevados durante a infecção crônica por CK2, seguidos da manutenção de níveis altos de TNF- $\alpha$  que atua em sinergia com IFN- $\gamma$  no controle da replicação parasitária por macrófagos (SIBLEY et al., 1991; PITTMAN, KNOLL 2014). Assim, a alta carga de cistos e os níveis elevados de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no cérebro durante a infecção crônica pela cepa atípica refletem a possível demora na

ativação da resposta imunológica protetora, contribuindo para a disseminação do parasito e estabelecimento da infecção crônica, além de destacar o perfil de virulência mais acentuado (MELO et al., 2011; JIANG et al., 2020).

A assinatura imunológica distinta, presente nas infecções pelas cepas analisadas, pode ser explicada através das diferenças genéticas presentes em proteínas liberadas pelo parasito, como ROPs e GRAs, que conseguem interferir na ativação imunológica e, dessa forma, favorecer a disseminação parasitária através da modulação de vias essenciais para a produção de IFN- $\gamma$  (MELO et al., 2011). Como exemplo, temos as proteínas ROP5 e ROP18 que são consideradas importantes fatores de virulência, capazes de interferir na resposta imunológica através do bloqueio da atividade microbicida dependente de IFN- $\gamma$  e modular negativamente a produção de citocinas inflamatórias importantes para o controle parasitário (BEHNKE et al., 2012; NIEDELMAN et al., 2013; DU et al., 2014; ROMMEREIN et al., 2019). Além dessas, a GRA12 e GRA25 foram apresentadas com papel importante na determinação do nível de virulência entre as cepas de *T. gondii* por conferir resistência ao estabelecimento da resposta imunológica mediada por IFN- $\gamma$ , e modular os níveis de CCL2 produzidos por macrófagos (FOX et al., 2019; SHASTRI et al., 2014; WANG et al., 2019). Sendo assim, cepas atípicas, mesmo que pertencentes ao mesmo genótipo, podem levar ao desenvolvimento de patogênese distinta, com comprometimento tecidual variável (PINHEIRO et al., 2015).

Durante a infecção por *T. gondii*, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> têm papel crucial no estabelecimento da resposta protetora e no controle parasitário representando, juntamente às células NK, as principais fontes de IFN- $\gamma$  durante a fase aguda da infecção (DENKERS, GAZZINELLI 1998). Além dos linfócitos T, monócitos e macrófagos são capazes de eliminar patógenos intracelulares através da produção de mediadores microbicidas, como óxido nítrico, e secretar citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e TNF- $\alpha$ , que atuam em uma alça de *feedback* positivo garantindo, assim, a ativação da resposta imunológica protetora adequada (ANDRADE et al., 2006; SHAUGHNESSY, SWANSON 2007; WEISS, SCHAIBLE 2015; PARK, HUNTER 2020).

Através da imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica, fomos capazes de identificar os principais tipos celulares que compõem o infiltrado inflamatório no cérebro e no lavado broncoalveolar de camundongos com infecção crônica por ME49 e CK2; sendo composto principalmente por linfócitos T e monócitos inflamatórios Ly6C<sup>hi</sup> infiltrados da periferia. Curiosamente, os camundongos infectados com a cepa atípica apresentaram maior infiltrado de linfócitos T, quando comparados à infecção por ME49. Alguns estudos avaliando

o nível de patogênese desenvolvida durante a infecção por cepas atípicas de *T. gondii*, além da carga de cistos, verificaram a presença de focos inflamatórios no cérebro e em outros órgãos, incluindo pulmões. Pinheiro e colaboradores (2015) mostraram que a infecção experimental com cepa atípica pertencente ao genótipo #11 (BrII), isolada de crianças recém-nascidas com toxoplasmose congênita (CARNEIRO et al., 2013), apresentou focos de infiltrado inflamatório com danos teciduais graves, com comprometimento do fígado, pulmões e baço em camundongos C57BL/6 e, ativação endotelial com infiltrado leucocitário no cérebro de camundongos BALB/c. Em outro estudo, alterações histológicas com reações granulomatosas, infiltrado inflamatório e focos necróticos foram observados com maior frequência nos pulmões, coração, baço e fígado, porém, sem haver grandes alterações no cérebro de camundongos Swiss Webster infectados com cepas atípicas isoladas de galinhas no estado do Rio de Janeiro (CASARTELLI-ALVES et al., 2020).

Em um estudo recente, foi realizada a análise do comprometimento tecidual gerado após infecção por dez cepas atípicas; dessas, duas cepas (TgShSp16 e TgShSp24), isoladas de ovelhas na Espanha, se destacaram por apresentar maior carga parasitária no cérebro, seguida de maior lesão tecidual com forte infiltrado inflamatório perivascular (FERNÁNDEZ-ESCOBAR et al., 2022). Outros trabalhos também avaliaram a disseminação do parasito e alterações histológicas em diferentes órgãos; as lesões teciduais sendo caracterizadas, principalmente, por infiltrado de células inflamatórias sugerindo níveis de patogênese distintos, o que se relaciona com as variações no nível de virulência apresentado entre as cepas atípicas de *T. gondii* (COSTA et al., 2017; HAMILTON et al., 2019; COSTA et al., 2020; BERNSTEIN et al., 2020). No estudo desenvolvido aqui, a caracterização celular por imunofenotipagem evidencia a forte presença de linfócitos T e monócitos inflamatórios durante as fases aguda e crônica da infecção.

Entre as células que compõem o infiltrado inflamatório gerado durante a infecção por *T. gondii*, monócitos e macrófagos residentes têm papel crucial no controle e eliminação do parasito. Monócitos inflamatórios que expressam o receptor Ly6C, representam metade da população de monócitos circulantes e são recrutados para os locais de infecção de maneira dependente da expressão do CCR2 e do seu ligante, a quimiocina MCP-1/CCL2. Essas células conseguem controlar a infecção através da produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, além de contribuírem com a ativação de linfócitos T através da produção, principalmente, de IL-12 via ativação de MyD88 (KIM et al., 2006; DUNAY, SIBLEY 2010; DUNAY et al., 2010; TOSH et al., 2016; PARK, HUNTER 2020). Durante a infecção por *T.*

*gondii*, monócitos derivados da medula óssea passam por mudanças fenotípicas que contribuem para sua diferenciação em células efetoras, através do aumento da expressão de MHC de classe II e de genes dependentes de IFN via sinalização por STAT1; seguidas por alterações epigenéticas que contribuem para expressão de fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B (DETAVERNIER et al., 2019).

Os monócitos infectados passam a apresentar um fenótipo de hiper mobilidade, além do aumento na liberação de metaloproteinases de matriz, que leva a redução da adesividade celular à matriz extracelular e maior capacidade de rolamento no endotélio ativado, percorrendo maiores distâncias; o que contribui para a disseminação parasitária através do mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia” (GAMA et al., 2004; LACHENMAIER et al., 2011; SEIPEL et al., 2010; HARKER et al., 2013). Além de “manipular” o perfil migratório de monócitos, *T. gondii* consegue estimular o desenvolvimento dos perfis de ativação clássica e alternativa de macrófagos através da expressão concomitante dos genes *Irgm3* e *IRF4*, respectivamente; contribuindo para uma autorregulação do estado pró-inflamatório como tática para evadir-se da atividade microbicida dessas células (PATIL et al., 2014). Vários mecanismos de evasão já foram descritos para *T. gondii*, como a capacidade de retardar a produção de IL-12 por macrófagos nas primeiras horas pós-infecção (JIANG et al., 2020); levar ao bloqueio da sinalização via IFN- $\gamma$  necessária para ativação do macrófago através da indução de SOCS-1, que atua como inibidor do receptor de IFN- $\gamma$  (ZIMMERMANN et al., 2006), além de interferir na responsividade de macrófagos a IFN- $\gamma$  através de alterações na remodelação da cromatina em regiões associadas a STAT1 (LANG et al., 2012); e bloqueio do recrutamento de Irgb6 para o vacúolo parasitóforo, como resultado da ligação e fosforilação de IRGs pela proteína ROP18 liberada pelo parasito, dessa forma, evitando a eliminação do parasito e contribuindo para sua sobrevivência e disseminação (FENTRESS et al., 2010). Esses mecanismos garantem a disseminação de *T. gondii* pelo tecido, conseguindo atravessar as barreiras biológicas e estabelecer a infecção em órgãos, até então, considerados “imunoprivilegiados”. Todos esses fatores podem contribuir para o acúmulo de células infiltradas da periferia para os nichos onde o parasito irá permanecer durante a infecção crônica, atuando na alteração da homeostase local e podendo ser um fator crucial no impacto da infecção e inflamação gerada sobre as populações de macrófagos residentes.

No contexto de macrófagos residentes teciduais, os macrófagos alveolares compreendem uma população celular capaz de se manter e garantir sua autorrenovação de maneira independente de monócitos circulantes da periferia (HASHIMOTO et al., 2013). Essas

células residentes têm grande importância na manutenção da homeostase do nicho, tendo suas características fenotípicas e funções efetoras moldadas pelo microambiente onde residem (LAVIN et al., 2014; LAVIN et al., 2015; WYNN, VANNELLA 2016). Apesar de representarem a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, os macrófagos alveolares não apresentam uma capacidade de ativação pró-inflamatória tão forte quanto os monócitos circulantes derivados da medula óssea, tendendo a um perfil de hiporresponsividade e maior atividade fagocítica, além de serem os responsáveis pela manutenção da homeostase nos níveis de surfactante pulmonar e patrulhamento tecidual (GUILLIAMS et al., 2021; HETZEL et al., 2021; MARTIN et al., 2021). Em modelo experimental murino, depleção seletiva de macrófagos alveolares levou ao comprometimento pulmonar e maior susceptibilidade a infecções virais (SCHNEIDER et al., 2014). Porém, o estabelecimento de quadros inflamatórios, seja por infecção ou injúria pulmonar, pode contribuir para o comprometimento dessa população, levando a depleção dessas células de maneira dependente do nível e da duração do estímulo inflamatório desenvolvido (GUILLIAMS et al., 2021).

Foi demonstrado que durante modelo experimental de infecção por gammaherpesvirus, macrófagos alveolares foram substituídos por monócitos circulantes, que passam a ocupar o nicho e interferir no estabelecimento da resposta imunológica local (MACHIELS et al., 2017). Semelhante ao observado para modelos de infecções virais (VAN RIEL et al., 2011; AEGERTER et al., 2020), a avaliação da população mieloide no pulmão dos camundongos infectados por *T. gondii* realizada aqui, revelou que durante a infecção aguda há uma depleção dramática, via apoptose, da população de macrófagos alveolares, principalmente entre os camundongos infectados com a cepa atípica. A infecção por *T. gondii* é capaz de induzir apoptose de células não infectadas, através da produção de óxido nítrico e outros fatores solúveis liberados por células infectadas que conseguem permanecer intactas, escapando das vias apoptóticas (NISHIKAWA et al., 2007). Considerando esses achados, é plausível assumir a capacidade da infecção por *T. gondii* em estimular a apoptose de macrófagos alveolares já durante a fase de infecção aguda, como resultado do estabelecimento do parasito no nicho e o estímulo inflamatório gerado que se mantém ao longo da infecção crônica; dessa forma, impedindo a recuperação das células residentes e contribuindo para sua substituição por monócitos inflamatórios derivados da periferia que adquirem características fenotípicas influenciadas pelo nicho e pela inflamação local gerada durante a infecção. Uma mudança no microambiente pulmonar pode estar associada a maior ou menor susceptibilidade a outras doenças. Recentemente Chen e colaboradores demonstraram que pacientes que apresentam um

aumento de monócitos inflamatórios e macrófagos derivados de monócitos, com consequente diminuição da população de macrófagos alveolares apresentam risco aumentado de desenvolver COVID-19 severa (CHEN et al., 2022). Nosso grupo também demonstrou que pacientes IgG+ para *T. gondii* apresentam alterações em marcadores importantes na COVID-19, com menor número de neutrófilos e monócitos circulantes, fator também associado a maior severidade da doença (BRITO et al, em preparação; Anexo II).

Um perfil semelhante de depleção de macrófagos residentes durante a infecção por *T. gondii* foi observado para macrófagos peritoneais, sendo substituídos por monócitos inflamatórios Ly6C+ recrutados durante a infecção (GOLDZMID et al., 2012). No trabalho desenvolvido aqui, além da depleção de macrófagos alveolares, observamos um desaparecimento significativo da população de micróglia, os macrófagos residentes do cérebro. Infecções virais que atingem o sistema nervoso central são responsáveis pelo estabelecimento de inflamação acentuada, levando ao desenvolvimento de encefalites e desencadeando processos danosos no tecido cerebral (FILGUEIRA et al., 2021). A micróglia tem papel fundamental em processos de regulação da homeostase cerebral, além de garantir mecanismos de defesa contra infecções do sistema nervoso central (TSAI et al., 2016). A depleção farmacológica da micróglia mostrou o impacto do desaparecimento dessa população no controle da infecção viral pelo Vírus do Nilo Ocidental (WNV), Vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e Zika Virus (ZIKV), levando ao aumento dos títulos virais e mortalidade em modelo experimental murino (SEITZ et al., 2018; ENLOW et al., 2021). Em modelo experimental *in vitro* da infecção de micróglia por SARS-CoV-2, observou-se a indução de um perfil pró-inflamatório dessas células, com produção de níveis elevados de citocinas como IL-6 e TNF- $\alpha$ ; além da ativação das vias pró-inflamatórias, essa infecção também foi capaz de desencadear vias apoptóticas levando a depleção de micróglia durante modelo de infecção em modelo murino experimental (JEONG et al., 2022).

Contrastando com nossos resultados de micróglia, um trabalho recente mostrou que a infecção por *T. gondii* via instilação de taquizoítos no saco conjuntival, no olho de camundongos BALB/c, levou ao aumento no número de micróglia, 22 dias após infecção (SOARES et al., 2022). Nesse trabalho foi utilizada para identificação da micróglia apenas marcação com Iba-1, por imunohistoquímica. A marcação realizada exclusivamente por Iba-1 não permite uma real diferenciação entre a população de micróglia e os monócitos inflamatórios infiltrados; diferenciação esta, que é garantida através da marcação de receptores que são exclusivamente expressos pela micróglia, como Tmem119 e P2ry12 (utilizado no nosso

trabalho). Além disso, outros dois fatores que precisam ser considerados são a via administrada para infecção e a virulência da cepa utilizada, que podem contribuir com o impacto mais grave da infecção do hospedeiro. Neste contexto, a infecção crônica por *T. gondii* atua estimulando o desaparecimento de macrófagos residentes, ao mesmo tempo que induz forte infiltrado inflamatório para o pulmão e cérebro dos camundongos infectados.

O estabelecimento da inflamação cerebral é apontado como um fator importante no desenvolvimento de distúrbios neurocomportamentais, como sintomas esquizofrênicos, Alzheimer, Parkinson, depressão e ansiedade (FEIGENSON et al., 2014; TANG, LE et al., 2016; TROUBAT et al., 2021). A micróglia tem papel importante na regulação do sistema nervoso central. A diminuição de 50-60% de micróglia em camundongos ou humanos, está associada a perda da integridade da mielina (McNAMARA et al., 2022). Ademais, a produção de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias liberadas pela micróglia reativa e por monócitos inflamatórios infiltrados contribuem para um ambiente oxidativo, capaz de comprometer o funcionamento cerebral (MAENG, HONG 2019; SPITERI et al., 2021). Os achados desta tese podem indicar aspectos importantes do impacto da infecção por *T. gondii* no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas.

Durante a infecção cerebral por *T. gondii*, os neurônios são as principais células-alvo do parasito, representando 85% das células cerebrais infectadas (CABRAL et al., 2016). Os impactos da presença do *T. gondii* no cérebro já são bem documentados na literatura. Foi demonstrado que a infecção crônica por *T. gondii* induz retração na árvore dendrítica de neurônios localizados na região da amígdala basolateral (MITRA et al., 2013), além de contribuir para a degeneração de neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos em diferentes áreas do córtex pré-frontal; essas células em processo de neurodegeneração encontram-se rodeadas por micróglia reativa e exibem produção elevada de fractalquina (CX3CL1) (LI et al., 2019). Essa quimiocina tem papel fundamental na comunicação entre neurônios e micróglia, uma vez que é produzida por neurônios e reconhecida especificamente pelo receptor CX3CR1 expresso pela micróglia (HARRISON et al., 1998).

O eixo de sinalização CX3CL1-CX3CR1 é capaz de influenciar a homeostase cerebral, através da regulação dos níveis inflamatórios gerados pela micróglia reativa (CARDONA et al., 2006; LIMATOLA, RANSOHOFF 2014); alterações nessa via podem interferir no funcionamento cerebral, sendo mostrado que a redução dos níveis de CX3CL1 é capaz de contribuir para o comprometimento cognitivo de camundongos, gerando déficit na memória de longo prazo (WINTER et al., 2020). Na infecção crônica pela cepa atípica de *T. gondii*, além

da manutenção da inflamação por IFN- $\gamma$  e óxido nítrico no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo; os níveis de CX3CL1 mostraram-se alterados no córtex pré-frontal e no hipocampo. Essas alterações nos níveis de CX3CL1 destacam o impacto da infecção crônica nas vias de comunicação entre neurônio e micróglia, como resultado do comprometimento celular ocasionado em resposta à presença do *T. gondii* e à inflamação gerada no cérebro.

A produção de fatores neurotróficos tem papel fundamental no funcionamento cerebral, estando envolvidos na manutenção, plasticidade e sobrevivência neuronal; além de estarem envolvidos na manutenção das funções cognitivas (BERRY et al., 2012; BUDNI et al., 2015). Em modelo experimental de isquemia cerebral, camundongos com a lesão desenvolveram comportamento do tipo ansioso e depressivo, com níveis elevados de NGF (FERNANDES et al., 2020). Por outro lado, modelos experimentais usando roedores mostraram-se capazes de estimular o desenvolvimento de perfis depressivo e ansioso, apresentando redução nos níveis de NGF em diferentes áreas do cérebro (SONG et al., 2009; FILHO et al., 2015; HASHIKAWA et al., 2015). Outro estudo também demonstrou a redução dos níveis de NGF e GDNF no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo de ratos em modelo experimental para avaliação de perfil bipolar e comportamentos do tipo ansioso e depressivo induzindo por anfetamina (VALVASSORI et al., 2019).

As variações nos níveis dos fatores neurotróficos e sua associação com alterações comportamentais refletem o impacto de agressões no sistema nervoso central, resultando da quebra da homeostase cerebral de acordo com o modelo experimental utilizado. Durante a infecção pela cepa atípica de *T. gondii*, a disponibilidade de NGF foi impactada, levando a redução dos níveis desse fator no córtex pré-frontal e estriado; por outro lado, a infecção contribuiu para o aumento dos níveis de GDNF apenas no córtex pré-frontal dos camundongos, de maneira independente da cepa infectante. Em uma análise feita, os níveis elevados de GDNF mostraram-se capazes de estimular o aumento da locomoção em camundongos (LITTRELL et al., 2013), fato este que pode estar associado com o aumento do perfil locomotor entre os camundongos infectados pela cepa ME49. As alterações nos níveis de fatores neurotróficos de acordo com a região cerebral analisada podem ser influenciadas pelo tipo de lesão provocada, e no caso da infecção por *T. gondii*, por fatores como carga parasitária distribuída de maneira distinta no cérebro e o estímulo citotóxico gerado por níveis elevados de IFN- $\gamma$ . A neuroinflamação, e o ambiente oxidativo gerado, tem papel importante no estabelecimento de distúrbios neurológicos, como o desenvolvimento de perfis depressivos e ansiosos (KIM et al., 2016; XIA et al., 2018; HAN et al., 2020). Aqui, as alterações comportamentais encontradas

entre os camundongos infectados com a cepa atípica se mostraram correlacionadas com o nível de IFN- $\gamma$  detectado no cérebro; esse fato mostra como o estabelecimento de uma neuroinflamação crônica, em resposta a persistência parasitária no tecido, contribui para modificações na homeostase cerebral, contribuindo para a geração de distúrbios neurocomportamentais em camundongos com características de resistência à infecção. Dessa forma, a ocorrência desses comportamentos nos camundongos infectados toma como base parâmetros multifatoriais, incluindo a conexão entre carga parasitária, neuroinflamação mediada por IFN- $\gamma$  gerada e as alterações nos níveis de fatores neurotróficos no cérebro.

O impacto da infecção por *T. gondii* no estabelecimento de alterações comportamentais vem sendo bastante estudado ao longo dos anos; com pesquisas sendo feitas buscando elucidar as vias cerebrais envolvidas e impactadas pelo parasito que contribuem para alterações neurocomportamentais (YIN et al., 2022). A capacidade do parasito em interferir em várias vias essenciais para a manutenção da conectividade cerebral (PARLOG et al., 2014), sendo capaz de induzir alterações cognitivas em modelos experimentais usando camundongos, levanta a discussão da relação entre a ocorrência dessa infecção com o desenvolvimento de quadros depressivos, ansiedade, bipolaridade e até com estabelecimento de perfis esquizofrênicos (FABIANI et al., 2015; ELSHEIKA et al., 2016; MAHMOUD et al., 2016; XIAO et al., 2018; COSSU et al., 2022). Em um estudo realizado recentemente, foi mostrada a relação entre os níveis de IgG anti-*T. gondii* entre pacientes com deterioração cognitiva e sintomas de Alzheimer (GUIMARÃES et al., 2022). Em outro estudo, que analisou a ocorrência da toxoplasmose entre pacientes com Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), revelou a associação entre os níveis séricos de IgG entre os pacientes com TOC e maior risco em desenvolver resistência ao tratamento (KAZEMI et al., 2022).

A infecção por *T. gondii* é capaz de interferir nas vias GABAérgicas e Glutamatérgicas; foi mostrado que durante a infecção de camundongos C57BL/6 com a cepa ME49, há aumento na expressão de GAD67, enzima importante nas vias de síntese de GABA, ao mesmo tempo que há redução da expressão de NMDAR, importante receptor glutamatérgico expresso em neurônios (TORRES et al., 2018). Além disso, outro estudo mostrou que a infecção crônica por *T. gondii*, em camundongos CD-1, estimula a produção de autoanticorpos anti-NMDAR. A produção desses autoanticorpos se mostrou influenciada pela carga de cistos no cérebro e, também, envolvida no estabelecimento de alterações comportamentais, como redução da atividade locomotora e de exploração durante a infecção crônica (LI et al., 2018).

Comprometimento da ativação neuronal e alterações na plasticidade sináptica e na conectividade entre regiões do cérebro estão presentes em camundongos com infecção crônica por *T. gondii*, em camundongos C57BL/6 que apresentam déficit na memória de curto prazo (TYEBJI et al., 2019). Além disso, alterações nos níveis de neurotransmissores disponíveis podem influenciar no estabelecimento de alterações comportamentais. A infecção crônica por *T. gondii* mostrou-se capaz de interferir nos níveis de serotonina, norepinefrina e dopamina (PRANDOVSKY et al., 2011; GATKOWSKA et al., 2013; IHARA et al., 2016) e ser capaz de estimular a degradação das redes perineuronais em diferentes áreas do cérebro (MEURER et al., 2020; BRITO et al., 2020), fatos que podem estar por trás do surgimento de alterações comportamentais, como aumento da atividade locomotora e déficits cognitivos. Além disso, a quebra da barreira hematoencefálica e o desenvolvimento de uma inflamação crônica contribuem para as alterações cerebrais observadas durante a infecção crônica, contribuindo para o surgimento de comportamento do tipo depressivo em camundongos (WANG et al., 2019; BARRIOS et al., 2021). Apesar da existência de estudos que apontam para a capacidade da infecção em induzir alterações comportamentais em camundongos, essas observações podem variar de acordo com o modelo animal utilizado e com o perfil de virulência de cepa utilizada para a infecção (BEZERRA et al., 2019; GALEH et al., 2023). Boilat e colaboradores (2020) mostraram que a infecção por *T. gondii* reduziu os níveis de ansiedade em camundongos B6CBAF1/J e aumentou a atividade exploradora, sendo as alterações comportamentais relacionadas com a carga de cistos e o nível inflamatório estabelecido.

Camundongos de diferentes linhagens e, conseqüentemente, backgrounds genéticos distintos podem responder à infecção por *T. gondii* de maneira variada, apresentando maior ou menor inflamação e, por sua vez, maior ou menor impacto tecidual. A linhagem C57BL/6 é geneticamente mais susceptível à infecção por *T. gondii* do que os camundongos BALB/c (SUZUKI et al., 1991; BROWN et al., 1995); sendo assim, quando infectados, os camundongos C57BL/6 apresentam uma ativação inflamatória exacerbada, além de falhar no estabelecimento da infecção realmente crônica. Assim, alterações comportamentais observadas entre camundongos susceptíveis à infecção podem ser resultado das próprias características genéticas apresentadas por esses hospedeiros, que contribuem para maior inflamação durante a infecção. Em um estudo recente, camundongos C57BL/6 foram infectadas com a cepa ME49 de *T. gondii*, e tratadas com sulfadiazina e pirimetamina durante o período de estabelecimento da infecção crônica. Após o tratamento, observou-se que os camundongos apresentaram melhora no perfil comportamental exibido, com redução dos comportamentos do tipo ansioso e depressivo, além

de reduzir o perfil de hiperlocomoção. Após o tratamento, que leva à cronificação da infecção, a resolução das alterações comportamentais foi seguida, também, de redução da carga de cistos, menor neuroinflamação e redução na permeabilidade da barreira hematoencefálica (CASTAÑO et al., 2022). Sendo assim, a utilização dos medicamentos preconizados para tratamento da toxoplasmose aguda, durante a infecção crônica, pode atuar contribuindo para redução dos danos cerebrais gerados em resposta à carga parasitária e neuroinflamação gerada; e assim, efeitos positivos na remissão das alterações comportamentais desencadeadas pela infecção. Apesar disso, ainda há necessidade da avaliação do impacto do tratamento em vias que garantem a conectividade cerebral adequada e que são afetadas durante a infecção crônica.

É importante ressaltar a importância da dinâmica parasito-hospedeiro exibida por cepas atípicas de *T. gondii* circulantes e isoladas do ambiente; uma vez que essas cepas são responsáveis por grande parte da infecção humana, principalmente na América Latina. As cepas atípicas de *T. gondii* divergem muito com relação ao nível de virulência; esse fato relaciona-se com o perfil de ativação inflamatória e a patogenia desencadeada no hospedeiro. Sendo assim, a identificação de fatores de virulência e as vias de ativação imunológica, que culminam em uma resposta inflamatória mais acentuada e contribui para o desenvolvimento da patologia, é de grande importância.

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que a infecção por *T. gondii* leva ao desaparecimento de macrófagos teciduais, com substituição por macrófagos derivados de monócitos, que apresentam um perfil inflamatório, com manutenção de altos níveis de IFN $\gamma$  no pulmão e cérebro. Demonstramos também que cepas atípicas podem estar relacionadas a maior inflamação, e por consequência, manutenção de um ambiente mais inflamatório durante a fase crônica. Esta mudança no microambiente imunológico pode estar relacionada a consequências para o hospedeiro. Sendo assim, fomos capazes de demonstrar que a virulência de cepas de *T. gondii* influencia o nível de resposta imunológica estimulada durante a infecção crônica cerebral, onde a forte neuroinflamação gerada, juntamente à interferência nos níveis de fatores neurotróficos disponíveis, podem ser fatores cruciais para o estabelecimento dos comportamentos do tipo depressivo e ansioso em camundongos considerados resistentes à infecção.

## 6. CONCLUSÕES

- Infecção por *T. gondii* induz apoptose de macrófagos alveolares na fase aguda, e com avanço da infecção essa população é substituída por monócitos inflamatórios infiltrados;
- Infecção crônica por cepa atípica CK2 de *T. gondii* é capaz de estimular forte infiltrado inflamatório nos pulmões já durante a infecção aguda, persistindo durante o estabelecimento da fase crônica;
- Infecção crônica por cepa atípica CK2 de *T. gondii* induz inflamação cerebral acentuada, marcada por níveis elevados de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e óxido nítrico;
- Infecção por *T. gondii* contribui para redução significativa da população de micróglia e alteração de fatores neurotróficos em diferentes áreas do cérebro;
- As alterações observadas, resultado da inflamação cerebral crônica, podem estar por trás das alterações comportamentais observadas nos camundongos infectados com a cepa atípica CK2;
- O comportamento do tipo ansioso e depressivo mostrou-se relacionado com os níveis de inflamação cerebral, especialmente com os níveis de IFN- $\gamma$ .

## 7. REFERÊNCIAS

AEGERTER H., et al. Influenza-Induced Monocyte-Derived Alveolar Macrophages Confer Prolonged Antibacterial Protection. **Nature Immunology**. 21: 145 – 157, 2020.

ALMERIA S., DUBEY J.P. Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. an overview. **Research In Veterinary Science**. 135: 371 – 385, 2021.

ANDRADE, R. M. et al. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 9, p. 2366–2377, 1 set. 2006.

BARRIOS, L. C. et al. Behavioral alterations in long-term *Toxoplasma gondii* infection of C57BL/6 mice are associated with neuroinflammation and disruption of the blood brain barrier. **PLoS ONE**, v. 16, n. 10 October, 1 out. 2021.

BATISTA S.J., et al. Gasdermin-D-Dependent IL-1 $\alpha$  Release From Microglia Promotes Protective Immunity During Chronic *Toxoplasma gondii* Infection. **Nature Communications**. 11: 3687, 2020.

BEHNKE M.S., et al. Rhoptry Proteins ROP5 And ROP18 Are Major Murine Virulence Factors In Genetically Divergent South American Strains Of *Toxoplasma gondii*. **Plos Genetics**. 11(8): E1005434, 2015.

BEHNKE M.S., et al. The Polymorphic Pseudokinase ROP5 Controls Virulence In *Toxoplasma gondii* By Regulating The Active Kinase ROP18. **Plos Pathogens**. 8(11): E1002992, 2012.

BERDOY, M.; WEBSTER, J. P.; MCDONALD, D. W. Fatal Attraction in Rats Infected With *Toxoplasma gondii*. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, V. 267, N. 1452, P. 1591–1594, 2000.

BERENREITEROVÁ, M.; et al. The Distribution of *Toxoplasma gondii* Cyst In The Brain Of A Mouse With Latent Toxoplasmosis: Implications For Behavioural Manipulation

Hypothesis. **Plos One**, V. 6 (12), P. 1 – 14, 2011.

BERNSTEIN M., et al. ROP18 And ROP5 Alleles Combinations Are Related With Virulence Of *T. gondii* Isolates From Argentina. **Parasitology International**. 83: 102328, 2021.

BERNSTEIN, M. et al. Evaluation of biological behavior of *Toxoplasma gondii* atypical isolates # 14 and # 163. **Experimental Parasitology**, v. 211, 1 abr. 2020.

BERRY A, BINDOCCI E, ALLEVA E. NGF, Brain and behavioral plasticity. **Neural**

BETANCOURT E.D., et al. From Entry to Early Dissemination – *Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter with Its Host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 9(46). Doi: 10.3389/Fcimb.2019.00046, 2019.

BEZERRA R.A., et al. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates From Pigs Intended For Human Consumption In Brazil. **Veterinary Parasitology**. 189: 153 – 161, 2012.

BEZERRA, E. C. M. et al. Behavioral evaluation of BALB/c (*Mus musculus*) mice infected with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 279–286, 1 jan. 2019.

BOILLAT, M. et al. Neuroinflammation-Associated Aspecific Manipulation of Mouse Predator Fear by *Toxoplasma gondii*. **Cell Reports**, v. 30, n. 2, p. 320- 334.e6, 14 jan. 2020.

BORST K., et al. Microglia: Immune and non-Immune Functions. **Immunity**. 54: 2194 – 2208, 2021.

BOTTOS J., et al. Bilateral Retinochoroiditis Caused by an Atypical Strain of *Toxoplasma gondii*. **Brazilian Journal of Ophthalmology**. 93: 1546 – 1550, 2009.

BRITO R.M.M., et al. Chronic *Toxoplasma gondii* Infection Contributes To Decreasing Of Perineuronal Nets Surrounding Neurons In The *Corpus Striatum* Of Mice. **Parasitology**

**Research.** 119: 1989 – 1995, 2020.

BROWN, C. R. et al. Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. **Immunology**. v. 85, n.3, p. 419-28, 1995.

BUDNI, J. et al. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. **Aging and Disease**. v. 6, n. 5, p. 331-41, 2015

BUTCHER B.A., et al. *Toxoplasma gondii* Rhoptry Kinase ROP16 Activates STAT3 And STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control. **Plos Pathogens**. 7(9): E1002236, 2011.

CABRAL, C. M. et al. Neurons are the Primary Target Cell for the Brain-Tropic Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2016.

CABUNGCAL, J. et al. Early-Life Insults Impair Parvalbumin Interneurons Via Oxidative Stress Reversal By N-Acetylcysteine. *Biological Psychiatry*, V. 73, N. 6, P. 574–582, 2013.

CARDONA et al., Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. **Nature Neuroscience**, v.9, n.7, p.917-924, 2006;

CARNEIRO A.C.A.V., et al. Genetic Characterization Of *Toxoplasma gondii* Revealed Highly Diverse Genotypes For Isolates From Newborns With Congenital Toxoplasmosis In Southeastern Brazil. **Journal Of Clinical Microbiology**. 51(3): 901 – 907, 2013.

CARNEIRO, A. C. A. V. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 901–907, 2013.

CARRILLO G.L., et al. *Toxoplasma* Infection Induces Microglia-Neuron Contact and the Loss of Perisomatic Inhibitory Synapses. **Glia**. 68: 1968 – 1986, 2020.

CASARTELLI-ALVES L., et al. Genetic And Histopathological Characterization of

*Toxoplasma gondii* Genotypes Isolated from Free-Range Chickens Reared in The Metropolitan Region of Rio De Janeiro State, Brazil. **Parasitology Research**. 120 (2): 665–77, 2021

CASTAÑO, B. L. et al. Sulfadiazine Plus Pyrimethamine Therapy Reversed Multiple Behavioral and Neurocognitive Changes in Long-Term Chronic Toxoplasmosis by Reducing Brain Cyst Load and Inflammation-Related Alterations. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 27 abr. 2022.

CHAO C.C., et al. Activated Microglia Inhibit Multiplication of *Toxoplasma gondii* Via a Nitric Oxide Mechanism. **Clinical Immunology and Immunopathology**. 67: 178 – 183, 1993.

CHAO C.C., et al. Human Microglial Cell Defense Against *Toxoplasma gondii*. The Role of Cytokines. **Journal of Immunology**. 152: 1246 – 1252, 1994.

CHEN J., et al. Genetic Diversity Among *Toxoplasma gondii* Strains from Different Hosts and Geographical Regions Revealed by Sequence Analysis of GRA5 Gene. **Parasites & Vectors**. 5: 279, 2012.

CHEN, H., et al. Cytokit: A Bioconductor Package for an Integrated Mass Cytometry Data Analysis Pipeline. **Plos Computational Biology**. 12(9): E1005112, 2016.

CHEN, S. T. et al. A shift in lung macrophage composition is associated with COVID-19 severity and recovery. **Science Translational Medicine**, v. 14, n. 662, p. 5168, 14 set. 2022.

CHIEBAO, D. P. et al. Early immune responses and parasite tissue distribution in mice experimentally infected with oocysts of either archetypal or non-archetypal genotypes of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 148, n. 4, p. 464–476, 1 abr. 2021.

CHOU D.B., et al. Stromal-Derived IL-6 Alters the Balance of Myeloerythroid Progenitors During *Toxoplasma gondii* Infection. **Journal of Leukocyte Biology**. 92: 123 – 131, 2012.

CHOU, P.H., LAI, S.C. Elevated Concentrations of Matrix Metalloproteinase-12 and Elastin Degradation Products in The Sera of Pregnant Women Infected with *Toxoplasma gondii*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. V. 105, N. 3, P. 225–231, 2011.

CLARK R.T. et al. T Cell Production of Matrix Metalloproteinases and Inhibition of Parasite Clearance by TIMP-1 During Chronic *Toxoplasma* Infection in the Brain. **ASN Neuro**. V. 3, N. 1, P. AN20100027, 2010.

CLEMENTINO ANDRADE M.M., et al. New Genotypes of *Toxoplasma gondii* Obtained from Farm Animals in Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**. 94(3): 587-9, 2013

COOK T. B. et al. “Latent” Infection with *Toxoplasma gondii*: Association with Trait Aggression and Impulsivity in Healthy Adults. **Journal of Psychiatric Research**, V. 60, P. 87–94, 2015.

CORTÉS D.A., et al. Severe Acute Multi-Systemic Failure with Bilateral Ocular Toxoplasmosis in Immunocompetent Patients from Urban Settings in Colombia: Case Reports. **American Journal of Ophthalmology**. 18: 100661, 2020.

COSSU, G. et al. Association between toxoplasmosis and bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Psychiatric Research**, v. 153, p. 284–291, 1 set. 2022.

COSTA DF, et al., Ocular disease in mice inoculated with Pork heart samples infected with *Toxoplasma gondii*. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 30, n.2, p.463-469, 2020

COSTA J.G.L., et al. *Toxoplasma gondii*: Cytokine Responses in Mice Reinfected with Atypical Strains. **Experimental Parasitology**. 218: 108006, 2020.

COSTA JGL, et al., Kinetics of parasite distribution after reinfection with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v.184, p.22-30, 2018

COWAN M.N., et al. Microglia in CNS Infections: Insights from *Toxoplasma gondii* and Other Pathogens. **Trends in Parasitology**. 38: 217 – 229, 2022.

DAHL R., et al. Regulation of Macrophage and Neutrophil Cell Fates by the PU.1:C/EBP $\alpha$  Ratio and Granulocyte Colony-Stimulating Factor. **Nature Immunology**. 4: 1029 – 1036, 2003

DEIRÓ A.G.J., et al. Presence of Atypical Genotypes of *Toxoplasma gondii* Isolated from Cats in the State of Bahia, Northeast of Brazil. **Plos One**. 16(10): E0253630., 2021

DE-LA-TORRE A., et al. Severe South American Ocular Toxoplasmosis is Associated with Decreased IFN- $\gamma$ /IL-17a and Increased IL-6/IL-13 Intraocular Levels. **Plos Neglected Tropical Diseases**. 7(11): E2541, 2013

DELLACASA-LINDBERG I., et al. Migratory Activation of Primary Cortical Microglia Upon Infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. 79: 3046 – 3052, 2011

DENKERS, E. Y. From Cells to Signaling Cascades: Manipulation of Innate Immunity by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. V. 39, P. 193–203, 2003.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, n. 4, p. 569 – 88, 1998.

DETAVERNIER A., et al. Monocytes Undergo Multi-Step Differentiation in Mice During Oral Infection by *Toxoplasma gondii*. **Nature Communications Biology**. 2: 472, 2019

DO K. Q., et al. Targeting Oxidative Stress and Aberrant Critical Period Plasticity in the Developmental Trajectory to Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**. V. 41, N. 4, P. 835–846, 2015.

DU J., et al. *Toxoplasma gondii* Virulence Factor ROP18 Inhibits the Host ND-Kb Pathway

by Promoting P65 Degradation. **Journal Of Biological Chemistry**. 289(18): 12578 – 12592, 2014

DUBEY J.P. Outbreaks of Clinical Toxoplasmosis in Humans: Five Decades of Personal Experience, Perspectives and Lessons Learned. **Parasites & Vectors**. 14:263, 2021.

DUBEY J.P., et al. Biologic and Genetic Comparison of *Toxoplasma gondii* Isolates in Free-Range Chickens from the Northern Pará State and the Southern State Rio Grande do Sul, Brazil Revealed Highly Diverse and Distinct Parasite Populations. **Veterinary Parasitology**. 143: 182 – 188, 2007

DUBEY J.P., et al. Toxoplasmosis in Humans and Animals in Brazil: High Prevalence, High Burden of Disease, and **Epidemiology. Parasitology**. 139: 1375 – 1424, 2012.

DUBEY J.P., et al. New *Toxoplasma gondii* Genotypes Isolated from Free-Range Chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: Unexpected Findings. **Journal of Parasitology**. 96(4): 709 – 712, 2010

DUNAY I.R., et al. Gr1+ inflammatory macrophages are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. **Immunity**. 29: 306 – 317, 2008

DUNAY, I. R.; FUCHS, A.; SIBLEY, LD. Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1564–1570, abr. 2010.

DUNAY, I. R.; SIBLEY, L.D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 461–466, 1 ago. 2010.

DWIR, D. et al. MMP9/RAGE pathway overactivation mediates redox dysregulation and neuroinflammation, leading to inhibitory/excitatory imbalance: a reverse translation study in schizophrenia patients. **Molecular Psychiatry**, 25: 3105, 2009.

ELSHEIKHA, H. M.; ZHU, X. Q. *Toxoplasma gondii* infection and schizophrenia: An inter-

kingdom communication perspective. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 3, p. 311–318, 2016.

ELSHEIKHA, H. M.; ZHU, X. Q. *Toxoplasma gondii* infection and schizophrenia: an inter-kingdom communication perspective. **Current opinion in infectious diseases**, v. 29, n. 3, p. 311–318, 1 jun. 2016.

ENLOW et al., Microglia are involved in phagocytosis and extracellular digestion during Zika virus encephalitis in young adult immunodeficient mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, p.178, 2021

EVREN E., RINGQVIST E., WILLINGER T. Origin and ontogeny of lung macrophages: from to humans. **Immunology**. 160: 126 – 138, 2019

EVREN R., et al. Distinct developmental pathways from blood monocytes generate human lung macrophage diversity. **Immunity**. 54: 259 – 275, 2021.

FABIANI, S. et al. Neurobiological studies on the relationship between toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases. **Journal of the neurological sciences**, v. 351, n. 1–2, p. 3–8, 15 abr. 2015.

FEIGENSON KA, KUSNECOV A, SILVERSTEIN SM. Inflammation and the Two-hit hypothesis of Schizophrenia. **Neuroscience and Behavioral Research**, v.38, p.72-93, 2014

FEITOSA T.F., et al. High genetic diversity in *Toxoplasma gondii* from pigs at slaughterhouses in Paraíba state, northeastern Brazil: circulation of new genotypes and Brazilian clonal lineages. **Veterinary Parasitology**. 244: 76 – 80, 2017

FENOY I.M., et al. *Toxoplasma gondii* infection blocks the development of allergic airway inflammation in BALB/c mice. **Clinical Experimental Immunology**. 155: 275 – 284, 2008

FENOY I.M., et al. *Toxoplasma gondii* infection induces suppression in a mouse model of allergic airway inflammation. **PloS One**. 7: e43420, 2012

FENTRESS, S. J. et al. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n. 6, p. 484–495, 16 dez. 2010.

FERNANDES JGA, et al. High levels of NGF during anxiety-like behavior in a murine model of brain ischemic stroke. **Neurology, Psychiatry and Brain Research**, v.38, p.114-120, 2020

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, M. et al. *Toxoplasma gondii* Genotyping: A Closer Look Into Europe. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 842595, 2022.

FERREIRA, A.M., et al. Genetic Analysis of Natural Recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* Strains by Multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**. 6(1): 22 – 31, 2006

FILGUEIRA, L.; LARIONOV, A.; LANNES, N. The Influence of Virus Infection on Microglia and Accelerated Brain Aging. **Cells**, v. 10, n. 7, p.1836, 2021.

FILHO CB, et al., Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: antidepressant effect of chrysin. **Neuroscience**, v.289, p.367-380, 2015

FLEGR J., et al. Toxoplasmosis a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. **PlosOne**. (3): e90203, 2014.

FLEGR J.; KUBA R. The relation of *Toxoplasma* infection and sexual attraction to fear, danger, pain, and submissiveness. **Evolutionary Psychology**. 14(3): 1–10, 2016

FLEGR, J. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 156–163, 2013.

FOX B.A., et al. *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane-associated dense granule proteins orchestrate chronic infection and GRA12 underpins resistance to host

gamma interferon. **mBio**. 10(4): e00589-19, 2019

FUX, B. et al. Role of Cytokines and Major Histocompatibility Complex Restriction in Mouse Resistance to Infection with a Natural Recombinant Strain (Type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**. 71(11):6392–6401, 2003.

GALAL L., et al. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. **Food and Waterborne Parasitology**. 12: e00052, 2019

GALEH, T. M. et al. Effects of diverse Types of *Toxoplasma gondii* on the outcome of Alzheimer's disease in the rat model. **Microbial Pathogenesis**, v. 174, p. 105931, jan. 2023.

GALLI S.J., BORREGAARD N., WYNN T.A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. **Nature Immunology**. 12: 1035 – 1044, 2011

GAMA, L. M. et al. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 14, p. 1287–1296, nov. 2004.

GATKOWSKA, J. et al. Sex-dependent neurotransmitter level changes in brains of *Toxoplasma gondii* infected mice. **Experimental parasitology**, v. 133, n. 1, p. 1–7, jan. 2013.

GATKOWSKA, J.; WIECZOREK, M. Behavioral changes in mice caused by *Toxoplasma gondii* invasion of brain. **Parasitology Research**. 111:53–58, 2012.

GAVRILESCU, L. C.; DENKERS, E. Y. IFN- $\gamma$  Overproduction and High Level Apoptosis Are Associated with High but Not Low Virulence *Toxoplasma gondii* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 902–909, 15 jul. 2001.

GAZZINELLI, R. T. et al. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon  $\gamma$  by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-

deficient hosts (*Toxoplasma gondii*/natural killer cells). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n.13, p.6115-9, 1993.

GENNARI, S. M. et al. Occurrence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and its isolation and genotyping in donkeys, mules, and horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1–2, p. 129–132, 15 abr. 2015.

GERHARDT T., LEY K. Monocyte trafficking across the vessel wall. **Cardiovascular Research**. 107: 321 – 330, 2015

GIACOMINI N. et al. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 104(15): 6442–6447, 2007.

GODIN I., DIETERLEN-LIEVRE F., CUMANO A. Emergence of multipotent hematopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. **PNAS**. 92: 773 – 777, 1995

GOLDZMID et al., NK cell-derived interferon- $\gamma$  orchestrates the cellular dynamics and differentiation of monocytes into inflammatory dendritic cells at the site of infection. **Immunity**, v.36, n.6, p.1047-1059, 2012

GONZALEZ, L.E. et al. *Toxoplasma gondii* infection lower anxiety as measured in the plus-maze and social interaction tests in rats: a behavioral analysis. **Behavior Brain Research**. 177: 70 – 79, 2007.

GUILLIAMS M., et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. **Journal of Experimental Medicine**. 210: 1977 – 1992, 2013

GUILLIAMS M; SVEDBERG FR. Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? **Nature Immunology**, v. 22, p. 118-127, 2021

GUIMARÃES, A. L. et al. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on cognition, symptoms, and response to digital cognitive training in schizophrenia. **Schizophrenia**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2022.

HAMILTON C.M., et al. Comparative virulence of Caribbean, Brazilian and European isolates of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**. 12: 104, 2019

HAN YY, et al. Microglial activation in the dorsal striatum participates in anxiety-like behavior in *Cyld* knockout mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v.89, 326-338, 2020

HARKER, K. S. et al. *Toxoplasma gondii* modulates the dynamics of human monocyte adhesion to vascular endothelium under fluidic shear stress. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 5, p. 789–800, maio 2013.

HARRISON, J. K. et al. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 18, p. 10896–10901, 1 set. 1998.

HASHIKAWA N, et al. Time course of behavioral alteration and mRNA levels of neurotrophic factor following stress exposure in mouse. **Cell Mol Neurobiol**, v.35, p.807-817, 2015

HASHIMOTO et al., Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v.37, n.4, 2013

HEINIG K., et al. Development and trafficking function of haematopoietic stem cells and myeloid cells during fetal ontogeny. **Cardiovascular Research**. 107: 352 – 363, 2015

HERMANN T., et al. The *Toxoplasma gondii* rhopty protein ROP18 is an Irga6-specific kinase and regulated by the dense granule protein GRA7. **Cellular Microbiology**. 18(2): 244 – 259, 2016

HERNANDEZ-DE-LOS-RIOS A., et al. Influence of two major *Toxoplasma gondii*

virulence factors (ROP16 and ROP18) on the immune response of peripheral blood mononuclear cells to human toxoplasmosis infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 9: 413, 2019

HETZEL M, ACKERMANN M, LACHMANN N. Beyond “Big Eaters”: the versatile role of alveolar macrophages in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, p:3308, 2021

HIGA L.T., et al. *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from pregnant women with follow-up of infected children in southern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**. 108: 244 – 246, 2014

HOWE D.K., SIBLEY L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**. 172: 1561 – 1566, 1995

IHARA F., et al. *Toxoplasma gondii* dense granule proteins 7, 14, and 15 are involved in modification and control of the immune response mediated via NF- $\kappa$ B pathway. **Frontiers in Immunology**. 11: 1709, 2020

IHARA, F. et al. *Toxoplasma gondii* infection in mice impairs long-term fear memory consolidation through dysfunction of the cortex and amygdala. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 10, p. 2861–2870, 2016.

INGERSOLL M.A., et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. **Blood**. 115: 10 – 19, 2009

JEONG et al., SARS-CoV-2 infection of microglia elicits pro-inflammatory activation and apoptotic cell death. **Microbiology Spectrum**, v.10, n.3, p.e0109122, 2022

JIANG, H. et al. Delayed IL-12 production by macrophages during *Toxoplasma gondii* infection is regulated by miR-187. **Parasitology Research**, v. 119, n. 3, p. 1023–1033, 1 mar. 2020.

JOHNSON H.J., KOSHY A.A. Understanding neuroinflammation through central nervous system infections. **Current Opinion in Neurobiology**. 76: 102619, 2022

JONES, N. G.; WANG, Q.; SIBLEY, L. D. Secreted protein kinases regulate cyst burden during chronic toxoplasmosis. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 2, 1 fev. 2017.

KATSUMOTO A., et al. Ontogeny and functions of central nervous system macrophages. **Journal of Immunology**. 193: 2615 – 2621, 2014

KAZEMI, F. et al. Toxoplasmosis in Treatment-Resistant Obsessive–Compulsive Disorder Patients. **Acta Parasitologica**, v. 67, n. 1, p. 356–361, 1 mar. 2022.

KHAN A., et al. Recent transcriptional sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **PNAS**. 104(37): 14872 – 17877, 2007

KHAN A., et al. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. **PloS Pathogens**. 5(3): e10000404, 2009

KHAN, I. A.; HWANG, S.; MORETTO, M. Toxoplasma gondii: CD8 T cells cry for CD4 help. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 136, 1 maio 2019.

KIM YK, et al. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.64, p. 277-284, 2016

KIM, L. et al. Toxoplasma gondii Genotype Determines MyD88-Dependent Signaling in Infected Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 2584–2591, 15 ago. 2006.

KLEER I.D., et al. Ontogeny of myeloid cells. **Frontiers in Immunology**. 5: 423, 2014

KRATOFIL R.M., KUBES P., DENISET J.F. Monocyte conversion during inflammation

and injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. 37: 35 – 42, 2017

KUMARAVELU P., et al. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonization of the mouse embryonic liver. **Development**. 129: 4891 – 4899, 2002

LACHENMAIER, S. M. et al. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. **Journal of Neuroimmunology**, v. 232, n. 1–2, p. 119–130, mar. 2011.

LALIBERTØ, J.; CARRUTHERS, V. B. Review Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 65: 1900–1915, 2008.

LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Microreview Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cellular Microbiology**. 12: 292–300, 2010.

LANG C., GROB U., LUDER C.G.K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**. 100: 191 – 203, 2007

LANG, C. et al. Impaired chromatin remodelling at STAT1-regulated promoters leads to global unresponsiveness of *Toxoplasma gondii*-infected macrophages to IFN- $\gamma$ . **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 1, jan. 2012.

LAVIN et al., Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1312-1326, 2014

LAVIN Y., et al. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. **Nature Reviews**. 15: 731, 2015

LEAL F. E., et al. *Toxoplasma gondii* pneumonia in immunocompetent subjects: case report and review. **CID**. 44: 62 – 66, 2007

LI F., et al. Fetal monocytes possess increased metabolic capacity and replace primitive macrophages in tissue macrophage development. **EMBO Journal**. 39: e103205, 2020

LI, Y. et al. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma Gondii* and their functions in modulating immune responses. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 467–477, 19 jan. 2018.

LI, Y. et al. Persistent *Toxoplasma* Infection of the Brain Induced Neurodegeneration Associated with Activation of Complement and Microglia. **Infection and Immunity**, v. 87, n.8, p.00139-19, 2019.

LIMATOLA C; RANSOHOFF RM. Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signalling. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.8, n.229, 2014

LITTRELL, O. M. et al. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) replacement attenuates motor impairments and nigrostriatal dopamine deficits in 12-month-old mice with a partial deletion of GDNF NIH Public Access Author Manuscript. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 104, p. 10–19, 2013.

MA J.S., et al. Selective and strain-specific NFAT4 activation by *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6. **Journal of Experimental Medicine**. 211: 2013 – 2032, 2014

MACHIELS B., et al. A gammaherpesvirus provides protection Against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. **Nature Immunology**. 18: 1310 – 1320, 2017

MACHIELS et al., A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. **Nature Immunology**, v.18, n.12, p.1310-1320, 2017

MACIEL B.M., et al. Identification and genetic characterization of a new Brazilian genotype of *Toxoplasma gondii* from sheep intended for human consumption. **Parasitology International**. 63: 567 – 570, 2014

MAENG SH, HONG H. Inflammation as the potential basis in depression. **International Neurology Journal**, v.23, p.s63-71, 2019

MAHMOUD, M. E. et al. Induction of depression-related behaviors by reactivation of chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Behavioural Brain Research**. 298: 125–133, 2016.

MARTIN F.P., et al. Alveolar macrophages: adaptation to their anatomic niche during and after inflammation. **Cells**. 10: 2720, 2021

MCNAMARA, N. B. et al. Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity. **Nature**, v. 17, p. 1–10, 14 dez. 2022.

MEDVINSKY A., DZIERZAK E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. **Cell**. 86: 897 – 906, 1996

MEIRELES L.R., et al. Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infecting form. Findings from a systematic review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 57(5): 369 – 376, 2015

MELO M.B., et al. Transcriptional analysis of murine macrophages infected with different *Toxoplasma* strains identifies novel regulation of host signaling pathways. **PLoS Pathogens**. 9(12): e1003779, 2013

MELO R.P.B., et al. Atypical *Toxoplasma gondii* genotype in feral cats from the Fernando de Noronha Island, Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**. 224: 92 – 95, 2016

MELO R.P.B., et al. Description of an atypical *Toxoplasma gondii* isolate from a case of congenital toxoplasmosis in northwestern Brazil. **Parasitology Research**. 119: 2727 –

2731, 2020

MELO, M. B.; JENSEN, K. D. C.; SAEIJ, J. P. J. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in Parasitology**.27(11): 487–495, 2011.

MELZER, T.C.; et al. Host cell preference of *Toxoplasma gondii* cysts in murine brain: a confocal study. **Journal of Neuroparasitology**, 2010.

MERCER H.L., et al. *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA24 drives MyD88-independent p38 MAPK activation, IL-12 production and induction of protective immunity. **PloS Pathogens**. 16(5): e1008572, 2020

MEURER Y.S.R., et al. *Toxoplasma gondii* infection damages the perineuronal nets in a murine model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 115: e200007, 2020

MILDNER A., MARINLOVIC G., JUNG S. Murine monocytes: origins, subsets, fates and functions. **Microbiology Spectrum**. 4: MCHD-0033-2016, 2016

MITRA, R.; SAPOLSKY, R. M.; VYAS, A. *Toxoplasma gondii* infection induces dendritic retraction in basolateral amygdala accompanied by reduced corticosterone secretion. **Disease Models and Mechanisms**, v. 6, n. 2, p. 516–520, mar. 2013.

MONTICELLI S., NATOLI G. Transcriptional determination and functional specificity of myeloid cells: making sense of diversity. **Nature Reviews**. 17: 595, 2017

MORÉ G., et al. *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. **Veterinary Parasitology**. 184(2-4):116-21, 2012

MORISHITA H., et al. Prolonged period of cortical plasticity upon redox dysregulation in fast-spiking interneurons. **Biology Psychiatry**. 78(6): 396 – 402, 2015.

MOSE, JM. et al. Organ Pathology and Associated IFN- $\gamma$  and IL-10 Variations in Mice Infected with *Toxoplasma gondii* Isolate from Kenya. **Parasites and Parasitic Diseases**, IntechOpen, London. 10.5772/intechopen.79700, 2019.

MUKHOPADHYAY D., ARRANZ-SOLIS D., SAEIJ J.P. Influence of the host and parasite strain on the immune response during *Toxoplasma* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 10: 580425, 2020

MUKHOPADHYAY, D.; ARRANZ-SOLÍS, D.; SAEIJ, J. P. J. *Toxoplasma* GRA15 and GRA24 are important activators of the host innate immune response in the absence of TLR11. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 5, 1 maio 2020.

NIEDELMAN W., et al. The rhoptry proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response. **PloS Pathogens**. 8(6): e1002784, 2013

NISHIKAWA, Y. et al. *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in noninfected macrophages: Role of nitric oxide and other soluble factors. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 7, p. 375–385, jul. 2007.

PALIS J., et al. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. **Development**. 126: 5073 – 5084, 1999

PARABONI M.L.R., et al. A new strain of *Toxoplasma gondii* circulating in southern Brazil. **Journal of Parasitic Diseases**. 44(1): 248 – 252, 2019

PARDINI L., et al. Congenital human toxoplasmosis caused by non-clonal *Toxoplasma gondii* genotypes in Argentina. **Parasitology International**. 68(1):48-52, 2019

PARK J., HUNTER C.A. The role of macrophages in protective and pathological responses to *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**. 42: e12712, 2020

PARLOG, A. et al. Chronic murine toxoplasmosis is defined by subtle changes in neuronal connectivity. **Disease Models & Mechanisms**. 7(4): 459–469, 2014.

PARLOG, A.; SCHLÜTER, D.; DUNAY, I. R. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. **Parasite Immunology**. 37(3): 159–170, 2015.

PATIL, V. et al. Co-existence of classical and alternative activation programs in macrophages responding to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 161–164, fev. 2014.

PENA H.F.J., et al. Free-range chickens from Santa Catarina state, southern Brazil, as asymptomatic intermediate hosts for *Toxoplasma gondii* clonal type I and typical Brazilian genotypes. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 13: 55 – 59, 2018

PENA H.F.J., et al. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. **Veterinary Parasitology**. 192: 111 – 117, 2013

PENA H.F.J., et al. *Toxoplasma gondii* isolated from a Brazilian patient with rare pulmonar toxoplasmosis has a novel genotype and is closely related to Amazonian isolates. **Parasitology Research**. 120: 1109 – 1113, 2021

PENA, H.F.J., et al. Population Structure and Mouse-Virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**. 38(5): 561 – 569, 2008

PERDIGUERO E.G., SCHULZ C., GEISSMANN F. Development and homeostasis of “Resident” myeloid cells: the case of microglia. **Glia**. 61: 112 – 120, 2013

PINHEIRO B.V., et al. Pathological changes in acute experimental toxoplasmosis with *Toxoplasma gondii* strains obtained from human cases of congenital disease. **Experimental Parasitology**. 156: 87 – 94, 2015

PINTO-FERREIRA F., et al. Patterns of transmission and sources of infection in outbreaks of human toxoplasmosis. **Emerging Infectious Diseases**. 25(12): 2177 – 2182, 2019

PITTMAN, K. J.; ALIOTA, M. T.; KNOLL, L. J. Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 20 set. 2014.

**Plasticity**, v. 2012, p.9, 2012

PLATTNER F., et al. *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. **Cell Host & Microbe**. (3): 77 – 87, 2008

PRANDOVSKY, E. et al. The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. **PLoS one**, v. 6, n. 9, 21 set. 2011.

RAETZ M., et al. Cooperation of TLR12 e TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. **Journal of Immunology**. 191(1): 4818 – 4827, 2013

RAGOZO A.M.A., et al. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed. **Veterinary Parasitology**. 170: 307 – 312, 2010

RAMOS T.S., et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from herds of sheep in southern Brazil reveals the archetypal type II genotype and new non-archetypal genotypes. **Parasitology International**. 67: 59 – 63, 2018

RÊGO, W.M.F., et al. Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* Isolates Obtained from Free-Living Wild Birds Rescued in Southeastern Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites Wildlife**. 7 (3): 432–38, 2018

RÊGO, W.M.F., et al. Association of ROP18 and ROP5 Was Efficient as a Marker of Virulence in Atypical Isolates of *Toxoplasma gondii* Obtained from Pigs and Goats in Piauí, Brazil. **Veterinary Parasitology**. 247: 19 – 25, 2017

REZENDE H.H.A., et al. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens reveals new genotypes in Goiania, Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. 30(2): e000321, 2021

ROBBEN P.M., et al. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **Journal of Immunology**. 172: 3686 – 3694, 2004

ROBERT-GANGNEUX F., DARDÉ M.L. Epidemiology of and Diagnostic strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**. 264 – 296, 2012

ROCHA D.S., et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens in Bahia, Brazil. **Journal of Parasitology**. 104(4): 377 – 382, 2018

ROCK R.B., et al. Role of microglia in central nervous system infections. **Clinical Microbiology Reviews**. 17: 942 – 964, 2004

ROMMEREIM L.M., et al. Rhoptry and dense granule secreted effectors regulate CD8+ T cell recognition of *Toxoplasma gondii* infected host cells. **Frontiers in Immunology**. 10: 2104, 2019

ROSENBAUER F., TENEN D.G. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. **Nature Reviews**. 7: 105, 2007

ROSOWSKI E.E., et al. Strain-specific activation of the NF- $\kappa$ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. **Journal of Experimental Medicine**. 208(1): 195 – 2012, 2010

ROZENFELD C., et al. *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon- $\gamma$ -activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor- $\beta$ 1 production by infected microglia. **American Journal of Pathology**. 167: 1021 – 1031, 2005

SA, Q. et al. Cutting Edge: IFN- $\gamma$  Produced by Brain-Resident Cells Is Crucial to Control

Cerebral Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**. 195(3): 796–800, 2015

SAEIJ J.P., BOYLE J.P., BOOTHROYD J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**. 21(10): 476 – 481, 2005

SAEIJ J.P., et al. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. **Science**. 314(5806): 1780 – 1783, 2006

SALTER M.W., STEVENS B. Microglia emerge as central players in brain disease. **Nature Medicine**. 23: 1018 – 1027, 2017

SANTOS SILVA, A.C., et al. Occurrence of Atypical and New Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Free-Range Chickens Intended for Human Consumption in Brazil. **Acta Parasitologica**. 65 (3): 774, 2020

SASAI M., PRADIPTA A., YAMAMOTO M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. **International Immunology**. 30(3): 113 – 119, 2018.

SASAI M., YAMAMOTO M., Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **Experimental and Molecular Medicine**. 51:156, 2019.

SCHLÜTER, D.; BARRAGAN, A. Advances and Challenges in Understanding Cerebral Toxoplasmosis. **Frontiers in Immunology**. 10: 1–13, 2019

SCHNEIDER C., et al. Alveolar macrophages are essential for protection from respiratory failure and associated morbidity following influenza virus infection. **PloS Pathogens**. 10: e1004053, 2014a

SCHNEIDER C., et al. Induction of the nuclear receptor PPAR- $\gamma$  by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. **Nature Immunology**. 15: 1026 – 1037, 2014b

SEIPEL, D. et al. *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alphavbeta3 integrin. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 3–4, p. 312–319, maio 2010.

SEITZ, S.; CLARKE, P.; TYLER, K. L. Pharmacologic Depletion of Microglia Increases Viral Load in the Brain and Enhances Mortality in Murine Models of Flavivirus-Induced Encephalitis. **Journal of Virology**, v. 92, n.16, p.e00525-18, 2018.

SERBINA N.V., et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annual of Reviews of Immunology**. 26: 421 – 452, 2008

SHASTRI A.J., et al. GRA25 is a novel virulence factor of *Toxoplasma gondii* and influences the host immune response. **Infection and Immunity**. 82(6): 2595 – 2605, 2014

SHAUGHNESSY, L. M.; SWANSON, J. A. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. **Frontiers in Biosciences**, v. 12, p.2683-92, 2007.

SHEMER A., et al. Engrafted parenchymal brain macrophages differ from microglia in transcriptome, chromatin landscape and response to challenge. **Nature Communications**. 9: 5206, 2018

SHENG J., RUEDL C., KARJALAINEN K. Most tissue-resident macrophages except microglia are derived from fetal hematopoietic stem cells. **Immunity**. 43: 382 – 393, 2015

Shwab E.K., et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**. 141: 453 – 461, 2014

SHWAB E.K., et al. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. 46:141 – 146, 2016

SIBLEY et al., 1991; SIBLEY, L. D. et al. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. **Journal of Immunology**. v. 147, p. 2340-2345, 1991.

SILVA R.C., LANGONI H., SU C., SILVA A.V. Genotype characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**. 175: 173 – 177, 2011

SINAI A.P., KNOLL L.J., WEISS L.M. Bradyzoite and sexual stage development. In *Toxoplasma gondii: the model apicomplexan – Perspectives and Methods* (pp. 807 – 857). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00018-9>, 2020

SOARES R.M., et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Veterinary Parasitology**. 178: 29 – 34, 2011

SOARES, G. L. DA S. et al. Behavioral and Neuropathological Changes After *Toxoplasma gondii* Ocular Conjunctival Infection in BALB/c Mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 9 mar. 2022.

SONG, C.; YANG ZHANG, X.; MANKU, M. Neurobiology of Disease Increased Phospholipase A2 Activity and Inflammatory Response But Decreased Nerve Growth Factor Expression in the Olfactory Bulbectomized Rat Model of Depression: Effects of Chronic Ethyl-Eicosapentaenoate Treatment. **Journal of Neuroscience**, v.29, n.1, p.14-22, 2009.

SOUSA C., BIBER K., MICHELUCCI A. Cellular and molecular characterization of microglia: a unique immune cell population. **Frontiers in Immunology**. 8: 198, 2017

SOUSA I.C., et al. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens on São Luis island, Maranhão state, Brazil, with new genotyped describe. **Veterinary Parasitology**. 223: 159 – 164, 2016

SPITERI, A. G. et al. Microglia and monocytes in inflammatory CNS disease: integrating phenotype and function. **Acta Neuropathologica**, v. 143, n. 2, p. 179–224, 1 dez. 2021.

STICH, O. et al. An observational study of inflammation in the central nervous system in patients with bipolar disorder. **Bipolar Disorders** 17(3): 291–302, 2015.

STURGE, C.R., YAROVINSK F., Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**. 82(8): 3090 – 3097, 2014

SU C., et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **PNAS**. 109(15): 5844 – 5849, 2012

SU C., et al. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**. 137: 1 – 11, 2009

SU C., et al. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**. 299: 414, 2003

SU C., ZHANG X., DUBEY J.P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**. 36: 841 – 848, 2006

SUZUKI, Y. et al. A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. **Immunology**, v. 74, n.4, p. 732–739, 1991

SUZUKI, Y. The immune system utilizes two distinct effector mechanisms of T cells depending on two different life cycle stages of a single pathogen, *Toxoplasma gondii*, to control its cerebral infection. **Parasitology International**, v. 76, p. 102030, 1 jun. 2020.

TANG, Y.; LE, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n.2, p.1181-1194, 2016.

TENTER A.M., HECKEROTH A.R., WEISS L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**. 30: 1217 – 1258, 2002

THION M.S., GAREL S. Microglial ontogeny, diversity and neurodevelopmental functions. **Current Opinion in Genetics & Development**. 65: 186 – 194, 2020

TIWARI, A. et al. Penetration of CD8+ Cytotoxic T Cells into Large Target, Tissue Cysts of *Toxoplasma gondii*, Leads to Its Elimination. **American Journal of Pathology**, v. 189, n. 8, p. 1594–1607, 1 ago. 2019.

TOMITA T., et al. Secreted effectors modulating immune responses to *Toxoplasma gondii*. **Life**. 11: 988, 2021

TORRES, L. et al. *Toxoplasma gondii* alters NMDAR signalling and induces signs of Alzheimer's disease in wild-type, C57BL/6 mice. **Journal of Neuroinflammation**. 15(1): 1–19, 2018.

TOSH, K. W. et al. The IL-12 Response of Primary Human Dendritic Cells and Monocytes to *Toxoplasma gondii* Is Stimulated by Phagocytosis of Live Parasites Rather Than Host Cell Invasion. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 1, p. 345–356, 1 jan. 2016.

TRAVER D., et al. Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. **Blood**. 98: 627 – 635, 2001

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n.2, p.133-46, 2003.

TROUBAT, R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 151–171, 1 jan. 2021.

TSAI TT, et al. Microglia retard dengue virus-induced acute viral encephalitis. **Scientific Reports**, v.6, p.27670, 2016

TYEBJI, S. et al. Impaired social behaviour and molecular mediators of associated neural circuits during chronic *Toxoplasma gondii* infection in female mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 80, p. 88–108, 1 ago. 2019.

UNNO A., et al. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. **Parasitology International**. 57:515 – 518, 2008

UNNO A., et al. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-infected peripheral blood mononuclear cells are enriched in mouse lungs and liver. **Experimental parasitology**. 134: 160 – 164, 2013

VALVASSORI, S. S. et al. The role of neurotrophic factors in manic-, anxious- and depressive-like behaviors induced by amphetamine sensitization: Implications to the animal model of bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 245, p. 1106–1113, 15 fev. 2019.

VAN RIEL, D. et al. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF-alpha induction. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 6, jun. 2011.

VIEIRA F.E.G., et al. *Toxoplasma gondii*: prevalence and characterization of new genotypes in free-range chickens from south Brazil. **Parasitology Research**. 117: 681 – 688, 2018

WANG J., et al. Innate immune response of human alveolar macrophages during Influenza A infection. **PloS One**. 7: e298779, 2012

WANG P., LI S., et al. The GRA15 protein from *Toxoplasma gondii* enhances host defense responses by activating the interferon stimulator STING. **Journal of Biological Chemistry**. 294(45): 16494 – 165508, 2019

WANG Z., LI S., HUANG B. Alveolar macrophages: achilles's heel of SARS-CoV-2 infection. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. 7: 242, 2022

WANG, M. F.; LAI, S. C. Fibronectin degradation by MMP-2/MMP-9 in the serum of pregnant women and umbilical cord with *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**. 33(4): 370–374, 2013.

WANG, P. et al. The GRA15 protein from *Toxoplasma gondii* enhances host defense responses by activating the interferon stimulator STING. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 45, p. 16494–16508, 8 nov. 2019a.

WANG, T. et al. From inflammatory reactions to neurotransmitter changes: Implications for understanding the neurobehavioral changes in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 737–748, 1 fev. 2019b.

WANG, X. et al. Importance of IFN- $\gamma$ -mediated expression of endothelial VCAM-1 on recruitment of CD8<sup>+</sup> T cells into the brain during chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 27, n. 4, p. 329–338, abr. 2007.

WANG, X. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ - and interleukin-1 $\beta$ -dependent matrix metalloproteinase-3 expression in nucleus pulposus cells requires cooperative signaling via syndecan 4 and mitogen-activated protein kinase-NF- $\kappa$ B axis: Implications in inflammatory disc disease. **American Journal of Pathology**. 184(9): 2560–2572, 2014.

WEISS, G.; SCHAIBLE, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunological reviews**, v. 264, n. 1, p. 182–203, 1 mar. 2015.

WINTER AM, et al. Two forms of CX3CL1 display differential activity and rescue cognitive deficits in CX3CL1 knockout mice. **Journal of Neuroinflammation**, v.17, n.157, 2020

WITTER R., et al. First report on the isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from free-range chickens in the state of Mato Grosso, Midwestern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. 80:101725, 2022

WITTER R., et al. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in the Midwestern Brazil

revealed high genetic diversity and new genotypes. **Acta Tropica**. 212:105681, 2020

WOO Y.D., JEONG D., CHUNG D.H. Development and functions of alveolar macrophages. **Molecules and Cells**. 44: 292 – 300, 2021

WYNN TA; VANNELLA KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. **Immunity**, v.44, n.3, p. 450-462, 2016

XIA J, et al. Different effects of immune stimulation on chronic unpredictable mild stress-induced anxiety- and depression-like behaviors depending on timing of stimulation. **International Immunopharmacology**, v.58, p.48-56, 2018

XIAO J, et al., *Toxoplasma gondii*: Biological parameters of the connection to Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 44, n.5, p.:983-992, 2018

XIAO, J., YOLKEN R.H. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. **Acta Physiologica**. 213(4): 828 – 845, 2015

YAI L.E.O., et al. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Veterinary Parasitology**. 162(3–4): 332–337, 2009

YANG N., et al. Genetic basis for phenotypic differences between different *Toxoplasma gondii* type I strains. **BMC Genomics**. 14: 467, 2013

YAO, J. K.; LEONARD, S.; REDDY, R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. **Disease Markers**. 22: 83–93, 2006.

YAROVINSKY F., et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**. 308: 1626 – 1629, 2005

YIN, K. et al. Epigenetic Manipulation of Psychiatric Behavioral Disorders Induced by *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p.803502 2022.

YU X., et al. The cytokine TGF- $\beta$  promotes the development and homeostasis of alveolar macrophages. **Immunity**. 47:1 – 10, 2017

YUAN K., et al. Autophagy plays an essential role in the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages. **Journal of Cell Science**. 125: 507 – 515, 2012

ZARETSKY A.G., ENGILES J.B., HUNTER C.A. Infection-induced changes in hematopoiesis. **Journal of Immunology**. 192: 27 – 33, 2015

ZENNER L., et al. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. **Experimental Parasitology**. 90: 86 – 94, 1998

ZHANG A.M., et al. Comparative studies of macrophage-biased responses in mice to infection with *Toxoplasma gondii* ToxoDB #9 strains of different virulence isolated from China. **Parasites & Vectors**. 6: 308, 2013

ZHANG Y., et al. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. **Microbiological Research**. 227: 126293, 2019

ZHAO Z.J., et al. Lower expression of inducible nitric oxide synthase and higher expression of arginase in rat alveolar macrophages are linked to their susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection. **PloS One**. 8: e63650, 2013

ZHU L., et al. *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 7 (ROP7) interacts with NLRP3 and promotes inflammasome hyperactivation in THP-1-derived macrophages. **Cells**. 11: 1630, 2022

ZIEGLER-HEITBROCK L., et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**. 116: 74 – 80, 2010

ZIMMERMANN, S. et al. Induction of Suppressor of Cytokine Signaling-1 by *Toxoplasma gondii* Contributes to Immune Evasion in Macrophages by Blocking IFN-Signaling. **The Journal of Immunology**. v. 176, n.3, p.1840-7, 2006.