

**Breno Veloso Pinheiro**

**Toxoplasmose congênita humana: Caracterização de cepas de  
*Toxoplasma gondii* em linhagens isogênicas de camundongos.**

**Belo Horizonte**

**Minas Gerais**

**2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

Instituto de Ciências Biológicas – ICB

Pós-Graduação em Parasitologia

**Toxoplasmose congênita humana: Caracterização de cepas de  
*Toxoplasma gondii* em linhagens isogênicas de camundongos.**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

**Colaboradores:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosa Maria Esteves Arantes

Dr.<sup>a</sup> Maria Noviello

Msc. Mariana Maciel Cunha

**BRENO VELOSO PINHEIRO**

Belo Horizonte, MG

2014

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

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha mãe pelo apoio dado na construção da minha educação que me proporcionou chegar até aqui, mas principalmente pelo amor, compreensão, amizade e disposição para me ajudar sempre que precisei. Agradeço também ao Bernardo que é, além de irmão, um grande amigo e, claro, ao meu pai que de onde quer que esteja sempre será a minha motivação e um exemplo a ser seguido.

À Luísa, minha companheira de vida e de profissão que me deu suporte com muito amor e carinho em qualquer momento que precisei. Também por ter sido parte fundamental em todo o processo da minha formação como parasitologista, estando junto desde os estudos para a seleção do Mestrado até a elaboração desta dissertação.

Agradeço também ao meu orientador e amigo Professor Ricardo, exemplo de profissional e pessoa, sempre dedicado, paciente e respeitoso com todos.

À Rosa, fundamental não só em todos os projetos, mas no funcionamento e organização do laboratório. Agradeço também por poder contar com sua amizade e conselhos.

Aos colegas e amigos de laboratório: Alice, Anderson, Carol, Daliane, Júlia, Lê, Mariana e Matheus que fizeram parte deste projeto.

Aos meus amigos da graduação, fundamentais na minha formação como biólogo e ainda o são na minha vida e à turma do "Lado B", que deixaram o difícil curso de Mestrado menos puxado com muito humor e companheirismo.

Aos amigos do NIPE, em especial às colaboradoras Prof.<sup>ª</sup> Dra. Rosa Arantes e à Dr.<sup>ª</sup> Maria Noviello, por todo o apoio com os experimentos e análises de histopatologia.

Ao Departamento de Parasitologia, na pessoa da sua chefe Dr.<sup>ª</sup> Deborah Aparecida Negrão-Corrêa, além de todos os professores da Pós-Graduação, que me ajudaram na formação como parasitologista.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa da coordenadora Dr.<sup>ª</sup> Érika Martins Braga e secretárias Sumara e Sibebe, pelo apoio e atenção dedicados a todos os alunos.

## RESUMO

Sabe-se que a patogênese da toxoplasmose depende, dentre outros fatores, da estrutura genética da cepa do parasito e do hospedeiro, além da dose e rota de infecção. Estudos com cepas geneticamente distintas isoladas na América do Sul são ainda incipientes e estudos de associação entre essa estrutura genética distinta e a patogenia em camundongos de linhagens isogênicas são escassos, fazendo-se necessárias maiores abordagens nesse contexto. Recentemente, foram isoladas 27 cepas de casos humanos de toxoplasmose congênita no estado de Minas Gerais, dentre as quais três foram selecionadas para o presente trabalho: TgCTBR5, TgCTBR9 e TgCTBR16. Camundongos isogênicos BALB/c e C57BL/6 foram inoculados pela via oral com 10 cistos teciduais de cada uma das três cepas e foram avaliados quanto à sobrevivência, morbidade e histopatologia. Enquanto todos os camundongos inoculados com a cepa TgCTBR5 sobreviveram, nenhum resistiu à infecção pela cepa TgCTBR9. Camundongos infectados com a cepa TgCTBr16 apresentou 80% de sobrevivência, independentemente da linhagem do animal. Camundongos inoculados com a cepa TgCTBr5 apresentaram queda de peso corporal significativa, além de lesões teciduais irreversíveis, demonstrando que, mesmo não letal, cepas avirulentas podem ser patogênicas para camundongos. Camundongos C57BL/6 se mostraram mais suscetíveis do que animais BALB/c na análise de morbidade e histopatológica. No entanto, os primeiros foram mais resistentes à formação de cistos teciduais no cérebro após 30 dias de infecção. A análise histopatológica demonstrou o fígado e pulmões como órgãos mais afetados, resultado já descrito em vários outros trabalhos e associados à morte de animais durante a segunda semana de infecção. A cepa TgCTBr9, virulenta, se mostrou mais lesiva aos tecidos dos animais do que as demais e camundongos C57BL/6 apresentaram lesões mais consideráveis do que animais BALB/c. A sorologia dos sobreviventes após 30 dias confirmou 100% de infecção nos camundongos de ambas as linhagens inoculados com a cepa TgCTBr5. Em contrapartida, a cepa TgCTBr16 apresentou baixa infectividade, principalmente pela via oral. A genotipagem dessa cepa, não realizada anteriormente, foi concluída e revelou genótipo atípico BrIII, o mesmo da cepa TgCTBr5 nos *loci* analisados. Os resultados do presente trabalho sugerem fortemente que a patogênese da toxoplasmose depende, sobretudo, de fatores intrínsecos às cepas do parasito.

## ABSTRACT

The pathogenesis of toxoplasmosis depends on the genetic structure of the parasite strain and the host, as well as the dose and route of infection, among other factors. There is a lack of pathological studies using inbred strains of mice after inoculation with strains of *Toxoplasma gondii* belonging to atypical genotypes commonly found in Brazil. Previously, 26 strains were isolated from human cases of congenital toxoplasmosis in the state of Minas Gerais, among which three were selected for this study: TgCTBR5, TgCTBR9 and TgCTBR16. BALB/c and C57BL/6 inbred mice were inoculated perorally with 10 tissue cysts of each of the three strains and were evaluated for survival, morbidity and histopathology. While all mice inoculated with the TgCTBR5 strain survived, none of them resisted to infection with the TgCTBR9. The TgCTBR16 strain showed 80% survival, regardless of the mice lineage. Mice inoculated with TgCTBR5 strain had significantly body weight loss and irreversible tissue damage, demonstrating that even non-lethal, avirulent strains can be pathogenic for mice. C57BL/6 mice were more susceptible than BALB/c in the analysis of morbidity and histopathology. However, the former were more resistant than the latter for the formation of tissue cysts in the brains 30 days after infection. Histopathologic examination showed the liver and lungs as the most affected organs, as previously described by others, and associated with lethality during second week of infection. TgCTBR9 strain caused more damage to mice tissue than the others parasites. Serology of survivors after 30 days confirmed 100% infection in both lineages of mice inoculated with TgCTBR5 strain. In contrast, TgCTBR16 strain showed low infectivity, especially by peroral infection. Genotyping of TgCTBR16 strain revealed the atypical genotype BrIII (similar to TgCTBR5), already described by others. Our results strongly suggest that the pathogenesis of toxoplasmosis depends mainly on intrinsic factors of the *T. gondii* strains.

## Sumário

LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS .....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Biologia de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	1
1.2. Estrutura genética de <i>T. gondii</i> .....	5
1.3. Virulência e patogenia de <i>T. gondii</i> .....	7
1.4. Diferenças na suscetibilidade de camundongos BALB/c e C57BL/6 à infecções por <i>T. gondii</i> .....	15
1.5. Isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de casos humanos de Toxoplasmose .....	17
2. JUSTIFICATIVA .....	19
3. OBJETIVOS .....	20
3.1. Objetivo geral .....	20
3.2. Objetivos específicos .....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Análise molecular por <i>Multiplex-nested</i> PCR-RFLP (Mn PCR-RFLP).....	21
4.2. Camundongos e Cepas de <i>T. gondii</i> .....	25
4.3. Infecção e delineamento experimental.....	26
4.4. Critérios de Morbidade e Mortalidade.....	26
4.5. Exame sorológico – ELISA .....	27
4.6. Coleta dos órgãos, preparação e análise dos cortes histopatológicos .....	28
4.7. Infectividade da cepa TgCTBr16 pela via intraperitoneal e suscetibilidade dos bradizoítos à digestão péptica.....	29
4.7.1. Digestão ácida <i>in vitro</i> dos cistos teciduais da cepa TgCTBr16 com Pepsina 30	
4.7.2. Infecção em camundongos por diferentes vias com cistos teciduais da cepa TgCTBr16 previamente tratados ou não por Pepsina.....	30
4.8. Análise estatística .....	32
5. RESULTADOS .....	33
5.1. Análise molecular por <i>Multiplex-nested</i> PCR-RFLP (Mn PCR-RFLP).....	33
5.2. Mortalidade em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com três cepas de <i>T. gondii</i> .....	35
5.3. Morbidade de camundongos de linhagens isogênicas após infecção oral com 10 cistos teciduais pela via oral .....	36
5.4. Suscetibilidade à formação de cistos teciduais e sorologia por ELISA.....	39
5.5. Análise histopatológica comparativa com as três cepas .....	40

5.5.1.	Fígado .....	40
5.5.2.	Pulmão .....	43
5.5.3.	Baço .....	45
5.5.4.	Íleo .....	47
5.5.5.	Jejuno e Cólon .....	49
5.5.6.	Cérebro .....	49
5.6.	Infectividade da cepa TgCTBr16 pela via intraperitoneal e suscetibilidade dos bradizoítos à digestão péptica.....	51
6.	DISCUSSÃO .....	53
6.1.	Mortalidade, Morbidade e Cistogenicidade.....	54
6.2.	Histopatologia .....	56
6.3.	Infectividade da cepa TgCTBr16 pela via intraperitoneal e suscetibilidade dos bradizoítos à digestão péptica.....	64
7.	CONCLUSÕES .....	68
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
	ANEXO .....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores para a genotipagem de <i>Toxoplasma gondii</i> por multilocus Multiplex nested PCR-RFLP (Mn-PCR-RFLP) (Su et al, 2010).....	24
Tabela 2. . Infecção de camundongos com 10 cistos teciduais da cepa TgCTBr16 por diferentes vias.....	31
Tabela 3. Genotipagem da cepa TgCTBR16 de <i>T. gondii</i> por <i>Multiplex-nested</i> PCR-FRLP nos marcadores SAG1, SAG2, SAG2alt, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1 e Apico.....	34
Tabela 4. Sobrevivência, número de cistos cerebrais e sorologia em camundongos BALB/c e C57BL/6 sobreviventes após 30 dias após infecção com as três cepas de <i>T. gondii</i> .....	39
Tabela 5. Mortalidade, parasitismo tecidual e sorologia em camundongos BALB/c e C57BL/6 inoculados com 10 cistos da cepa TgCTBr16, por diferentes vias, e submetidos ou não à digestão ácida por pepsina durante 60 minutos .....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	2
Figura 2. Gel representativo da PCR-RFLP representativa realizada no <i>locus</i> PK1 com as endonucleases de restrição Aval e RsaI em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata, para genotipagem da cepa de <i>T. gondii</i> TgCTBr16.....	33
Figura 3. Curva de sobrevivência de camundongos BALB/c e C57BL/6 inoculados pela via oral com 10 cistos teciduais das cepas de <i>T. gondii</i> .. .....	35
Figura 4. Cinética de ganho de peso dos animais infectados pela via oral com 10 cistos da cepa TgCTBr5 de <i>T. gondii</i> .....	36
Figura 5. Cinética de ganho de peso dos animais infectados pela via oral com 10 cistos da cepa TgCTBr9 de <i>T. gondii</i> . .....	37
Figura 6. Cinética de ganho de peso dos animais infectados pela via oral com 10 cistos da cepa TgCTBr16 de <i>T. gondii</i> .....	38
Figura 7. Alterações histopatológicas observadas no fígado de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 12 dias de infecção com 10 cistos teciduais de <i>T. gondii</i> pela via oral.	42
Figura 8. <i>Toxoplasma gondii</i> (setas) encontrado em pulmões de camundongos C57BL/6, doze dias após infecção oral com 10 cistos teciduais da cepa TgCTBr9. ....	43
Figura 9. Alterações histopatológicas em pulmões de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 12 dias de infecção com 10 cistos teciduais de <i>T. gondii</i> pela via oral. ....	44
Figura 10. Alterações histopatológicas encontradas no baço de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 12 dias de infecção com 10 cistos teciduais de <i>T. gondii</i> pela via oral.	46

Figura 11. Corte histopatológicos do íleo de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 12 dias de infecção com 10 cistos teciduais de <i>T. gondii</i> pela via oral. ....	48
Figura 12. <i>Toxoplasma gondii</i> (setas) encontrado em cérebro de camundongos C57BL/6, doze dias após infecção oral com 10 cistos teciduais da cepa TgCTBr9. Coloração H&E. Barra=20µm. ....	49
Figura 13. Alterações histopatológicas observadas no cérebro de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 12 dias de infecção com 10 cistos teciduais de <i>T. gondii</i> pela via oral. ....	50

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CD4 – Receptor glicoprotéico de linfócitos auxiliares (*cluster of differentiation 4*)

CD8 – Receptor glicoprotéico de linfócitos citotóxicos (*cluster of differentiation 8*)

dATP – 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato

dCTP – 2'-deoxicitosina 5'-trifosfato

dGTP – 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato

dTTP – 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato

DNA – Ácido desoxiribonucleico

ELISA – Ensaio imunoenzimático indireto (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

GRA – Proteína secretada pelos grânulos densos

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido Sulfúrico

H&E – Coloração histológica de Eosina e Hematoxilina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IFN- $\gamma$  – *Interferon gamma*

IP – Intraperitoneal

IL – Interleucina

KO – Animais *Knock out*

MgCl – Cloreto de Magnésio

MHC – Complexo de Histocompatibilidade

NF $\kappa$ -B – fator nuclear  $\kappa$ B

NO – Óxido Nítrico

PBS – Tampão fostato

PCR – Cadeia em reação de Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

qRT-PCR – Cadeia em reação de Polimerase quantitativa em tempo real (*Real time PCR*)

ROP – Proteína secretada pelas roptrias

RFLP – Polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição (*Restricted Fragments Length Polimorfism*)

MnPCR-RFLP – *Multiplex Nested PCR-RFLP*

SNP = Polimorfismo de único nucleotídeo (Single Nucleotide Polimorfism)

STAg – Antígeno solúvel de taquizoíto (*Soluble Tachyzoite Antigen*)

STAT – Sinal de transdução da ativação de transcrição (*Signal transducer and activator of transcription*)

TgCTBr – *Toxoplasma gondii* Congenital Toxoplasmosis from Brazil

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose Tumoral –  $\alpha$

WT – Animais selvagens sem manipulação gênica (*wild type*)

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Biologia de *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasito intracelular obrigatório e causador da toxoplasmose, infecção que apresenta alta prevalência no mundo. Descrito em 1908 simultaneamente por Splendore, no Brasil, e por Nicolle & Manceaux, no norte da África, *T. gondii* pertence ao Filo Apicomplexa, à Sub-classe Coccidia, à Família Sarcocystidae, sendo a única espécie descrita do gênero *Toxoplasma* (Levine et al. 1988).

Estima-se que um terço da população humana total esteja ou já foi exposta ao parasito (Tenter et al. 2000). No entanto, cumpre salientar que a soroprevalência em humanos varia conforme a região geográfica, grupo étnico, hábitos e condições socioeconômicas da população exposta (Montoya & Liesenfeld 2004).

O ciclo de *T. gondii* é heteroxeno facultativo, sendo os hospedeiros definitivos membros da Família Felidae e os hospederios intermediários são animais homeotérmicos, incluindo o homem (Figura 1). Nos hospedeiros definitivos, o parasito passa por uma fase sexuada com diferenciação de gametas. O gameta masculino, possuindo flagelos, se desloca até o gameta feminino (intracelular) onde ocorre a fecundação e formação do oocisto. Enquanto o oocisto ainda é imaturo, a membrana da célula epitelial se rompe liberando-o no lúmen intestinal e conseqüentemente nas fezes. No meio externo ocorre a esporogonia e o oocisto torna-se infectante, contendo dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. Uma vez no ambiente externo, o oocisto pode ser ingerido através de água e alimentos contaminados, sendo essa uma importante forma de transmissão da toxoplasmose (Hill et al. 2005).

Após ingerido pelo hospedeiro intermediário, o oocisto sofre ação enzimática no estômago e intestino delgado, ocorrendo liberação de esporozoítos que invadem as células epiteliais do intestino delgado, preferencialmente na parte mais distal do íleo (Peng et al. 2011). Na lâmina própria, os esporozoítos já podem ser encontrados duas horas após ingestão dos oocistos e a conversão em taquizoítos ocorre entre 12 e 18 horas de infecção. A parasitemia é geralmente encontrada após 48h e, em três dias, órgãos viscerais já estão infectados (Dubey et al. 1997a). Acredita-se que a disseminação pela circulação para as vísceras se dá intracelularmente, uma vez que o soro de vários hospedeiros tem efeito letal para *T. gondii* (Kaneko et al. 2004).

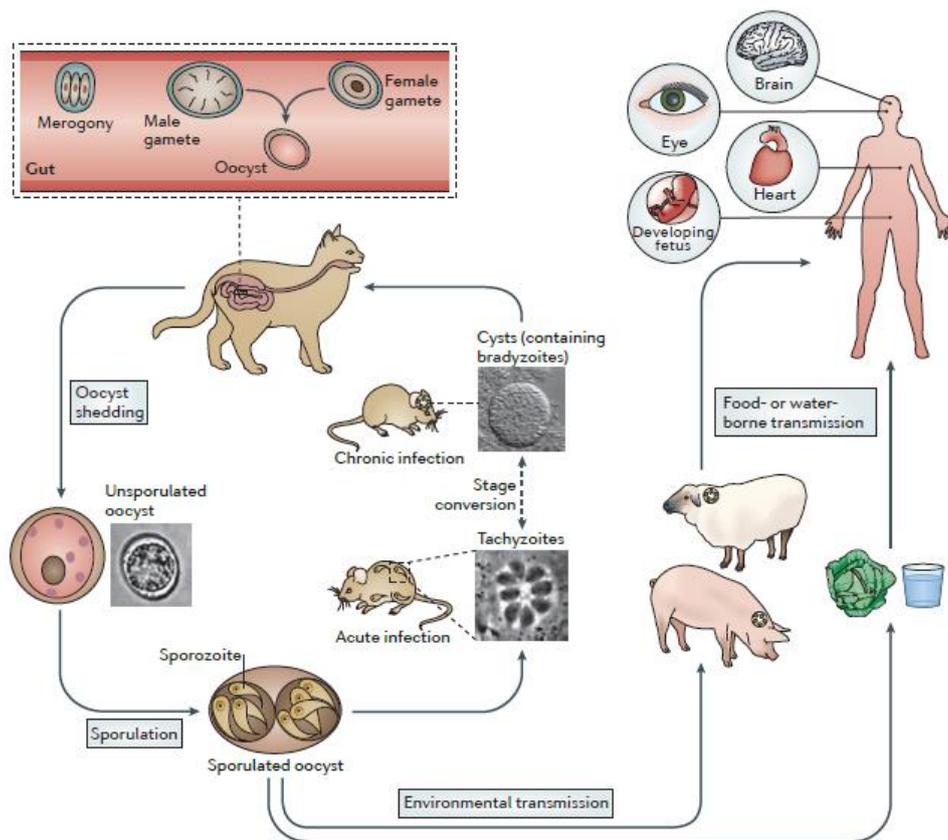


Figura 1. Ciclo de *Toxoplasma gondii* (Hunter & Sibley 2012).

O desenvolvimento assexuado ocorre tanto no hospedeiro intermediário quanto no definitivo e passa por duas fases. Na primeira fase (fase aguda), os taquizoítos penetram ativamente nas células hospedeiras onde se multiplicam de forma rápida através de endodiogenia em diferentes tipos de células. Os taquizoítos são capazes de invadir ativamente tanto células fagocíticas como não fagocíticas (Dobrowolski & Sibley 1996), bem como serem ativamente fagocitados pelas primeiras (Pacheco-Soares & de Souza 2000). Dentro do vacúolo parasitóforo, o parasito modifica a membrana do vacúolo excluindo proteínas transmembranas do próprio hospedeiro que estão envolvidas na fusão de lisossomos, mantendo assim o vacúolo como um compartimento resistente à acidificação endosoma-lisossomal pela célula hospedeira (Mordue, Desai & Dustin 1999). Além disso, *T. gondii* é também capaz de ajustar a resposta imune da célula infectada de modo que ela seja menos responsiva à sinalização por IFN- $\gamma$ , possibilitando uma evasão de uma robusta resposta celular mediada por IFN- $\gamma$  (Kim et al. 2007).

Durante essa fase proliferativa, a toxoplasmose pode causar a morte do hospedeiro, dependendo da espécie, idade, cepa de *T. gondii*, número de parasitos, dentre outros fatores (Dubey 1988). Em humanos, a toxoplasmose pode ser fatal, sobretudo, em fetos e indivíduos imunocomprometidos. Porém, em casos de indivíduos imunocompetentes, com o desenvolvimento da resposta imune, a multiplicação dos taquizoítos é interrompida e ocorre a formação de cistos teciduais contendo bradizoítos, formas de resistência e de multiplicação lenta, caracterizando a segunda fase (fase crônica) da infecção. Nessa fase, não ocorre sintomatologia significativa no hospedeiro e os cistos podem permanecer no tecido pelo resto da vida do indivíduo (Hill et al. 2005). Ocasionalmente os cistos podem se romper reativando a toxoplasmose, porém por mecanismos ainda desconhecidos. Os cistos podem estar presentes em tecidos de

animais utilizados para consumo humano e assim, o consumo de carne crua ou mal cozida de hospedeiros intermediários infectados com *T. gondii* é outra importante forma de transmissão da toxoplasmose (Dubey 1988).

Quando ingerido por outros hospedeiros, a parede desses cistos sofre ação enzimática proteolítica no estômago, liberando bradizoítos no intestino delgado. Provavelmente, parte dos bradizoítos é destruída durante a digestão no tubo digestivo (Dubey 1998). Os bradizoítos infectam enterócitos no íleo e posteriormente penetram a barreira epitelial, chegando ao tecido da submucosa (Barragan & Sibley 2003). Após quatro dias de infecção, *T. gondii* já pode ser encontrado em órgãos viscerais após invadir a circulação sanguínea (Dubey 1988).

Outra importante forma de transmissão de *T. gondii* é a transmissão transplacentária (congênita). Os taquizoítos são capazes de atravessar a placenta de grávidas soronegativas e atingir a circulação fetal, sendo assim transmitidos verticalmente para o feto. Dentre os principais sintomas, destacam-se a hidrocefalia (macro ou microcefalia), retinocoroidite, calcificações cerebrais e retardo mental, sintomas estes frequentemente denominados de Tétrade de Sabin (Montoya & Liesenfeld 2004).

Apesar de grande parte dos casos de toxoplasmose congênita ser assintomática no momento do nascimento, muitos neonatos apresentam sequelas em algum momento da vida, principalmente complicações do tipo ocular ou do sistema nervoso central (Jones et al. 2003). Além disso, a toxoplasmose congênita é responsável pela ocorrência de abortos, natimortos, debilidade e mortalidade neonatal, tanto no homem como em outros animais (Tenter et al. 2000).

O risco da transmissão congênita aumenta conforme o período da gravidez, ao passo que a probabilidade do aparecimento de sinais clínicos diminui com o decorrer da

gestação. Portanto, casos mais graves ocorrem quando gestantes se infectam em idades gestacionais prematuras, apesar do risco dessa transmissão ocorrer ser menor (Montoya & Liesenfeld 2004).

A prevenção da toxoplasmose congênita pode ser dividida em três categorias, quais sejam, a prevenção primária, baseada em programas de educação em saúde pública e medidas de prevenção da transmissão; prevenção secundária, na qual tenta-se evitar a transmissão transplacentária por meio do diagnóstico pré-natal de gestantes em fase aguda para devido tratamento; e a terciária, que tem como objetivo o diagnóstico precoce do recém-nascido para prevenir ou minimizar sequelas futuras (Elsheikha 2008).

## **1.2. Estrutura genética de *T. gondii***

Estudos moleculares utilizando microssatélites e, principalmente, PCR-RFLP classificaram cepas de *T. gondii* em três linhagens clonais denominadas como tipos I, II e III (Howe & Sibley 1995). Essas linhagens clonais são frequentemente encontradas na América do Norte e na Europa. A reprodução sexuada de *T. gondii* não é obrigatória para o sucesso da disseminação desse parasito na natureza, uma vez que ele é capaz de se manter apenas pela transmissão oral de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários. Além disso, *T. gondii* é haploide e o seu ciclo sexuada apresenta baixa ocorrência na natureza, o que explica a existência de uma estrutura populacional predominantemente clonal nesses países (Boothroyd & Grigg 2002).

Entretanto, estudos moleculares de isolados de *T. gondii* obtidos de animais e de humanos da América do Sul e, principalmente, do Brasil têm mostrado uma estrutura genética distinta das cepas clonais encontradas no hemisfério norte (Ferreira et al. 2006, Pena et al. 2008, Dubey et al. 2008, Carneiro et al. 2013, Clementino Andrade et al.

2013). Os isolados do hemisfério sul apresentam alelos distintos das cepas clonais, para os mesmos segmentos de DNA, sendo denominados “atípicos”. Nessa região, os genótipos clonais frequentes na América do Norte e Europa raramente são encontrados (Silva et al. 2011; Dubey et al. 2011). Essas cepas atípicas são pouco frequentes no hemisfério norte e, quando isoladas, geralmente são de amostras de hospedeiros silvestres, de áreas geograficamente remotas ou de pacientes com formas clínicas incomuns (Dardé 2004).

Para facilitar a comparação dos resultados de genotipagem por PCR-RFLP obtidos por diversos grupos de estudos, Su et al. (2006, 2010) desenvolveram um conjunto de marcadores de segmentos polimórficos de DNA: SAG1, SAG2 (5'+3'), SAG3, SAG2 alt, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico. Segundo esses autores, a utilização dos marcadores mencionados aumenta o poder discriminativo de identificação dos isolados, além de revelar a diversidade genética de *T. gondii*.

Pena et al. (2008) por meio de genotipagem por PCR-RFLP, utilizando os marcadores propostos por Su et al. (2006), observaram alta diversidade genética nas amostras e detectaram quatro genótipos comumente encontrados no Brasil. Essas linhagens foram denominadas tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV. Para esses autores, a população de *T. gondii* no Brasil é altamente diversificada, na qual a troca genética frequente tem gerado uma série de recombinantes e algumas linhagens clonais bem sucedidas expandiram-se para outras áreas geográficas.

Estudos com cepas geneticamente distintas isoladas na América do Sul são ainda incipientes, uma vez que o isolamento e a genotipagem dessas provêm de trabalhos recentes. Estudos de associação entre essa estrutura genética distinta e a patogenia nos diferentes hospedeiros ainda são escassos (Carneiro et al. 2013), fazendo-se necessárias

maiores abordagens nesse contexto, uma vez que evidências de que genótipos distintos possuem diferenças nas capacidades de replicação, penetração em tecido e interação com o sistema imunológico do hospedeiro já foram bem documentadas (Saeij et al. 2006, 2007, Fux et al. 2007).

Sabe-se também, que a toxoplasmose no Brasil, país no qual essas cepas circulam, é considerada mais grave do que nos países onde o parasito possui estrutura populacional clonal. Aqui, a doença ocular é cinco vezes mais frequente em crianças com toxoplasmose congênita do que na Europa, além de lesões recidivas serem mais comuns, maiores e com maior poder de afetar a visão. Sendo assim, a eficácia do tratamento na América do Norte e Europa pode não ser a mesma em locais onde predominam cepas de genótipos mais virulentos (Gilbert 2009).

### **1.3. Virulência e patogenicia de *T. gondii***

A virulência de isolados de *T. gondii* está bem caracterizada em modelo murino. Os principais critérios para sua avaliação são a taxa de mortalidade e o tempo até a morte de camundongos infectados com inóculos graduais de parasitos pela via intraperitoneal em camundongos fêmea BALB/c (Kaufman et al. 1958). A maioria dos isolados tem sido definida como virulenta, avirulenta ou de virulência intermediária (Howe & Sibley 1995).

Classicamente, cepas clonais dos tipos II e III são classificadas como avirulentas, uma vez que são controladas pela resposta imunológica do hospedeiro com consequente cronificação da infecção. Por outro lado, cepas do tipo I são associadas ao fenótipo virulento em camundongos, pois leva a uma toxoplasmose aguda letal nos animais, mesmo com baixo inóculo (Howe & Sibley 1995).

Pouco se sabe da associação de virulência com genótipos atípicos não clonais encontrados na América do Sul. Por outro lado, sabe-se que a toxoplasmose no Brasil, onde essas cepas circulam, é considerada mais grave do que nos países do Hemisfério Norte, de onde as cepas clonais são isoladas (Gilbert 2009). No entanto, faltam ainda estudos que apresentem associações estatísticas entre virulência e cepas de genótipo atípico. Carneiro et al (2013) isolaram e genotiparam por PCR-RFLP 27 cepas obtidas de casos humanos de toxoplasmose congênita e apenas dois foram considerados avirulentos, enquanto os demais virulentos ou de virulência intermediária. O estudo não apresentou, porém, associação estatística entre virulência ou genótipo da cepa com sintomatologia nas crianças, possivelmente pelo baixo número amostral de isolados analisados (Carneiro et al. 2013). No entanto, cepas virulentas foram isoladas de recém-nascidos com toxoplasmose grave e avirulentas de crianças assintomáticas, o que sugere alguma correspondência entre virulência em camundongos e doença em humanos.

Ajzenberg et al. (2002) isolaram e genotiparam 86 cepas de *T. gondii* de cordões umbilicais, fluidos amnióticos, placenta e tecidos de fetos falecidos. Apenas três cepas apresentaram genótipos atípicos e todas elas foram virulentas em camundongos. Além disso, as três crianças das quais elas foram isoladas apresentaram toxoplasmose congênita grave e, apesar de o número de isolados ter sido baixo para qualquer conclusão estatisticamente significativa, esses resultados são indícios de associação entre genótipos atípicos e toxoplasmose grave, o que também já foi sugerido por outros autores (Dardé et al 1998, Grigg et al. 2001).

A patogenia da toxoplasmose depende de fatores genéticos do hospedeiro e do parasito, além de dose e via de inoculação. Em humanos, apesar de a doença ser assintomática na grande maioria das vezes, alguns sintomas podem ocorrer. Inflamação no tecido

nervoso central é comumente encontrado em pacientes imunocomprometidos, principalmente encefalite (Dubey 1988).

Em infecções congênicas, a mãe pode apresentar focos de infiltrado inflamatório no cório, âmnio, decídua e vilosidades, além de focos de necrose na placenta (Frenkel 1988). Em recém-nascidos, os sinais clássicos são hidrocefalia, retinocoroidite, calcificações cerebrais e retardo mental (Montoya & Liesenfeld 2004).

Em infecções adquiridas, o aumento dos linfonodos é o sinal clínico mais comum em toxoplasmose humana adquirida (Hill et al. 2005). Na hiperplasia macroscópica de órgãos linfoides raramente *Toxoplasma* é encontrado. Ocorre hiperplasia folicular e paracortical e, os altos títulos de anticorpos encontrados nos pacientes que apresentam essa hiperplasia, sugerem que essas lesões são consequências de uma hiperplasia imune. Além disso, em humanos ou animais que morrem de toxoplasmose, os tecidos linfoides normalmente apresentam depleção linfocitária (Frenkel 1988).

O fígado é frequentemente acometido quando taquizoítos penetram em hepatócitos e células de *Kupffer* e se multiplicam. Eventualmente, a morte de células infectadas evolui para focos de necrose, frequentemente acompanhadas por infiltrados inflamatórios mononucleares (Frenkel 1988).

Os pulmões também são frequentemente afetados durante a fase aguda de toxoplasmose em pacientes humanos imunocomprometidos (Evans & Schwartzman 1991) e lesões pulmonares podem ser fatais para camundongos em infecções experimentais por *T. gondii* (Dubey et al. 1997a).

Durante a fase crônica da toxoplasmose, danos no Sistema Nervoso Central são achados comuns. As lesões são caracterizadas por intenso infiltrado inflamatório perivascular, nódulos microgliais e destruição de neurônios, características de meningoencefalite

toxoplásmica. Em pacientes imunodeficientes e infectados pelo vírus HIV, a encefalite toxoplásmica é caracterizada frequentemente pela presença de abscessos cerebrais (Luft et al. 1983).

Grande parte dos estudos de patologia na toxoplasmose é realizada em camundongos. Nestes, fatores como a linhagem do animal, dose e via de inoculação e, principalmente, cepa de *T. gondii*, parecem ter papel fundamental na indução de alterações patológicas. Muito se discute, porém, se as lesões são causadas por destruição celular causada por multiplicação de taquizoítos ou por uma resposta imunológica exacerbada do hospedeiro (Liesenfeld et al. 1996, Fux et al. 2003, Dunay et al. 2008, Egan et al. 2011, Dubey et al. 2012). Segundo Dubey et al. (1997a), infecções experimentais em camundongos, quando letais, matam camundongos por enterite durante a primeira semana ou pneumonite a partir da segunda. Após quatro semanas, a encefalite é o principal acometimento em camundongos.

O controle da infecção por *T. gondii* pelo hospedeiro depende principalmente da produção de citocina pró-inflamatória IL-12 (Gazzinelli et al. 1994). Essa citocina, produzida por macrófagos e células dendríticas, ativa células NK e Linfócitos T que secretarão interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), ativando mecanismos de eliminação do *T. gondii* tais como indução de intermediários reativos de nitrogênio e degradação do triptofano (Scharton-Kersten et al. 1997, Pfefferkorn 1984).

Sabe-se, entretanto, que quando estimulada em excesso, essa resposta pró-inflamatória é prejudicial ao hospedeiro, demonstrando a necessidade de um balanço entre sinais pró- e anti-inflamatórios para garantir a sobrevivência tanto do hospedeiro como do parasito (Suzuki et al. 2000). Camundongos *knock out* para a citocina IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>) inoculados com a cepa ME49, clonal tipo II e avirulenta, sucumbem à infecção antes de

15 dias, ao contrário dos animais controle *wild type* (WT) que apresentam sobrevivência de 100%. Essa mortalidade está associada a uma intensa patogenia no fígado e produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 de 4 a 6 vezes maior do que nos animais controle (Gazzinelli et al. 1996).

Camundongos inoculados com cepas clonais de *T. gondii* do tipo I apresentam danos sistêmicos, independente da linhagem de camundongo e da rota de infecção. Nesses casos, o fígado é o principal órgão afetado, com aumento do volume de hepatócitos, degeneração hidrópica, esteatose e perda da arquitetura sinusóide, junto com infiltração celular e focos de necrose coagulativa (Mordue et al. 2001). Acredita-se que a destruição tecidual em infecções experimentais com cepas do tipo I é, primordialmente, causada pelo parasito, uma vez que as lesões são associadas a alta carga parasitária (Howe & Sibley 1995). Outros autores, porém, remetem as lesões à resposta imunológica exacerbada, já que as lesões também são acompanhadas de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Mordue et al. 2001).

Em contrapartida, a patogenicidade de cepas clonais do tipo II depende de outros fatores como genética do hospedeiro, dose e rota de infecção. Infecção oral com alta dose de 100 cistos teciduais em camundongos C57BL/6 com a cepa avirulenta ME49 (clonal do tipo II) acarreta em uma resposta Th1 exacerbada que culmina com a morte dos camundongos causada por uma ileíte fulminante, inexistente no modelo BALB/c. As lesões intestinais são caracterizadas por infiltrados mono e polinucleares na lâmina própria e nas camadas submucosa e muscular, além de destruição de vilosidades e hemorragias que levam a 100% de letalidade dos animais. A neutralização de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e NO previne necrose do íleo e mortalidade dos camundongos, demonstrando que as lesões têm causa inflamatória mais do que destruição celular direta pelo parasito (Liesenfeld et al. 1996, Liesenfeld et al. 1999).

Diversos fatores estariam associados a essa patologia. Buzoni-Gatel et al. (2001) demonstraram o papel crucial do TGF- $\beta$  produzido por linfócitos intraepiteliais como modelador da resposta inflamatória. Egan et al. (2011) sugeriram que não somente os linfócitos T intraepiteliais, mas também os presentes na Lâmina Própria, estão associados à inflamação após infecção oral por *T. gondii*. Dunay et al. (2008) demonstraram a dicotomia da participação de monócitos inflamatórios. Apesar de serem importantes na resistência da mucosa contra *T. gondii*, uma vez que na ausência dessas células os animais morrem por uma ausência de controle de parasitos, a infiltração descontrolada de monócitos inflamatórios leva a uma condição propensa à forte inflamação.

Camundongos *germ-free*, sem microbiota bacteriana intestinal normal, são incapazes de desenvolver ileíte após infecção oral por *T. gondii*, demonstrando a importância da microbiota bacteriana Gram-Negativa no agravamento de imunopatologia Th1 no intestino (Heimesaat et al. 2006). Receptores do tipo Toll (TLR) também têm papel fundamental na indução de lesões, visto que camundongos TLR4<sup>-/-</sup> e TLR9<sup>-/-</sup> também não desenvolvem dano patológico (Heimesaat et al. 2006, Minns et al. 2006). Sabe-se também que alguns antígenos são capazes de induzir alta resposta inflamatória. Parasitos modificados geneticamente que não expressão a proteína de superfície SAG1 são incapazes de causar lesões intestinais inflamatórias (Rachinel et al. 2004).

A dose parece ter papel fundamental na indução de ileíte fulminante. Smiley et al. (2005), utilizando também a cepa ME49, mas em dose menor (10 cistos pela via oral), encontraram ileíte apenas discreta em animais C57BL/6, com pequeno aumento de celularidade na lâmina própria e descamação ocasional de vilosidades, mas sem sinal de necrose, infiltrados intensos ou destruições extensas de vilosidades.

Achado parecido foi o de Djurković-Djaković et al. (2006) que, utilizando dose de oito cistos teciduais da mesma cepa ME49, não encontraram lesões intestinais após 14 dias de infecção, porém em camundongos não isogênicos (*Swiss*). Observaram, contudo, lesões inflamatórias graves nos pulmões e fígado, caracterizadas por pneumonia e pneumonite e inflamação portal e acinar grave no fígado, após 14 dias de infecção oral, tanto com a cepa ME49, quanto com a cepa BGD1, ambas avirulentas e de genótipo clonal do tipo II.

Diferenças na indução de citocinas Th1 foram observadas entre cepas de *T. gondii* dos tipos genéticos clonais I e II (Robben et al. 2004, Melo et al. 2011). Em estágios iniciais da infecção, cepas do tipo I induzem menor quantidade de IL-12 do que cepas do tipo II, o que pode ser associado a um menor controle parasitário pela resposta imune e maior virulência de cepas tipo I. Da mesma forma, a alta indução inicial de IL-12 por cepas do tipo II resulta em maior controle parasitário e, conseqüentemente, menor virulência de *T. gondii* pertencente a esse tipo genético. Contudo, essa mesma alta indução inicial de IL-12 por cepas do tipo II pode ter influência direta no desenvolvimento da patologia exacerbada encontrada no intestino delgado de camundongos C57BL/6 quando inoculados pela via oral com cepa desse tipo, visto que as lesões são causadas por processos inflamatórios do próprio hospedeiro (Robben et al. 2004).

Essas diferenças na modulação da resposta imunológica do hospedeiro podem ser atribuídas a diferenças genéticas entre cepas de *T. gondii*. Genes que expressam proteínas efetoras secretadas por micronemas, roptrias e grânulos densos foram identificados por meio de cruzamentos entre cepas clonais e posterior mapeamento gênico. Dentre eles, destacam-se os genes que expressam as proteínas ROP5, ROP16, ROP18 e GRA15, capazes de alterar a expressão gênica do hospedeiro dependendo do alelo I, II e III de cada genótipo. Esses diferentes alelos vão resultar em proteínas com

maior ou menor capacidade de indução de fatores de transcrição como STAT3, STAT6 e NF- $\kappa$ B, que acarretam em maior ou menor produção de citocinas pró-inflamatórias ou fosforilação de GTPases imunológicas (IRG), que bloqueia seu recrutamento para o vacúolo parasitóforo (Saeij et al. 2007, Rosowski et al. 2011, Fentress et al. 2010, Steinfeldt et al. 2010).

Células Th17 também têm participação na imunopatologia da toxoplasmose experimental. Guiton et al (2010), utilizando infecção oral com 30 cistos da cepa 76K encontraram maior sobrevivência em camundongos C57BL/6 *knockout* para receptor de IL-17A (IL-17RA) do que em C57BL/6 WT. Além disso, os animais WT apresentaram lesões mais proeminentes no íleo, fígado, baço e linfonodo mesentérico do que em camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup>. Essas lesões se apresentaram como úlceras intestinais, necrose e lesões trombóticas no fígado, além de hiperplasia macroscópica do baço com congestão na polpa vermelha e depleção linfocitária, lesões estas menos evidentes nos animais KO. Os autores ainda encontraram maiores níveis de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de cultura de esplenócitos coletados dos animais deficientes para IL-17RA do que nos C57BL/6 WT, bem como maiores níveis de IL-10, o que modularia a inflamação com melhor controle parasitário.

Outros autores, porém, encontraram resultados diversos. Kelly et al (2005), utilizando a mesma cepa 76K pela via oral nos mesmos camundongos C57BL/6 WT e IL-17R<sup>-/-</sup> encontraram maior mortalidade nos animais deficientes para IL-17R do que nos selvagens. No entanto, assim como nos estudos de Guiton et al (2010), os autores também encontraram lesões histopatológicas reduzidas nos animais KO.

Além de camundongos, outros animais podem ser acometidos por lesões teciduais inflamatórias causadas por infecção por *T. gondii*. Em uma busca na literatura de

publicações relacionadas à toxoplasmose, lesões teciduais e animais, Schreiner & Liesenfeld (2009) encontraram publicações que apresentaram casos de 51 espécies de aves e mamíferos que exibiam lesões inflamatórias no trato gastrointestinal quando infectadas, experimental ou naturalmente, por *T. gondii*. De todos os órgãos que exibiram lesão, o fígado foi o mais relatado com lesão em 93,9% dos casos analisados, seguidos de intestino delgado (57,6%) e linfonodos mesentéricos.

#### **1.4. Diferenças na suscetibilidade de camundongos BALB/c e C57BL/6 à infecções por *T. gondii***

A suscetibilidade de camundongos C57BL/6 e a resistência de BALB/c a infecções por *T. gondii* pela via oral com a cepa clonal ME49 já foi bem descrita por vários autores e associadas a diferenças entre eventos imunológicos dos hospedeiros (McLeod et al. 1984, Liesenfeld et al. 1996, Buzoni-Gatel et al. 2001, Fux et al. 2003, Dunay et al. 2008, Egan et al. 2011). Diferenças entre a resposta imune ao *T. gondii* por linhagens de camundongos já foram investigadas por diversos autores. Dentre elas, já foram documentadas variações na expressão de moléculas imunológicas entre camundongos isogênicos e que foram atribuídas, por exemplo, a diferenças na expressão de haplótipos do complexo MHC (Brown & McLeod, 1990; Blackwell et al., 1993) e de receptores do tipo Toll (Liu et al., 2002) que fazem do C57BL/6 uma linhagem com maior e mais rápida produção de citocinas pró-inflamatórias, que pode ser letal ao animal em infecções com *T. gondii*. Contudo, essa maior resposta inflamatória de animais C57BL/6 pode ser protetora contra outros parasitos intracelulares, como a resistência de C57BL/6 e suscetibilidade de BALB/c em infecções por *Leishmania major* (Reiner & Locksley al. 1995).

Ainda são escassos os estudos que avaliam a suscetibilidade de linhagens isogênicas de camundongos a infecções com cepas de genótipos atípicos de *T. gondii*. Brandão et al. (2011) demonstraram que camundongos C57BL/6 são, também, mais suscetíveis à reinfeção por cepas de genótipo atípico do que camundongos BALB/c.

Outro estudo em que foi utilizada cepa pertencente a genótipo atípico foi realizado por Fux et al. (2003). Os autores fizeram um estudo comparativo de infecção oral em camundongos entre a cepa P-Br, pertencente a genótipo atípico e isolada no Brasil, e a cepa clonal do tipo II ME49, utilizando uma baixa dose infectante de 4 cistos teciduais. Como esperado, os autores observaram alta mortalidade e lesões intestinais em camundongos C57BL/6 quando infectados com a cepa clonal ME49, o que não aconteceu com camundongos BALB/c. Em contrapartida, quando infectados com a cepa de genótipo atípico P-Br, tanto animais BALB/c quanto C57BL/6 sobreviveram à infecção sem lesões intestinais significativas. Os autores concluíram que, além da linhagem de camundongo, a patogenicidade de *T. gondii* depende diretamente da estrutura genética da cepa.

Resende et al. (2008), testaram três cepas atípicas, P-Br, D8 e G2, comparativamente à ME49 e também encontraram padrões de lesão intestinal variáveis de acordo com a cepa, após 7 dias de infecção oral. Em camundongos C57BL/6, as lesões foram mais proeminentes nos animais inoculados com a cepa ME49 do que com as atípicas. Já no modelo BALB/c, nenhuma das cepas causou inflamações intestinais graves. Os autores concluem que tanto as diferenças da resposta imune entre as linhagens quanto aspectos intrínsecos às cepas possuem papel fundamental na patogenicidade de *T. gondii*.

Pouco se sabe de propriedades patológicas de cepas pertencentes a esses genótipos atípicos comparativamente em camundongos BALB/c e C57BL/6. Estudos que avaliam

a patogenia e estudam as lesões teciduais induzidas por diferentes cepas de *T. gondii* em animais isogênicos são escassos. Mais raros ainda são os que investigaram cepas isoladas de pacientes humanos e pertencentes aos genótipos atípicos encontrados no nosso país (Saeij, Boyle & Boothroyd 2005).

### **1.5. Isolados de *T. gondii* obtidos de casos humanos de toxoplasmose**

*T. gondii* já foi isolado de diversos hospedeiros mamíferos e aves, apesar de poucos isolados terem sido obtidos a partir de tecidos de humanos. Essa dificuldade se deve pelo isolamento ser um método altamente invasivo, já que cistos de *T. gondii* se desenvolvem, sobretudo, nos sistemas muscular e nervoso, além de órgãos viscerais como pulmão, fígado e rins.

Por outro lado, taquizoítos podem ser encontrados no sangue e em outros fluidos corporais. Chai et al. (2003) isolaram *T. gondii* a partir de bioensaio de células do sangue periférico de pacientes com toxoplasmose ocular na Coreia do Sul. Djurković-Djaković et al. (2006) obtiveram, na Sérvia, um isolado por meio de inoculação de sangue do cordão umbilical de criança com toxoplasmose congênita em camundongos. O isolado, denominado BGD1, foi genotipado por PCR-RFLP e caracterizado como do genótipo clonal II.

Carneiro et al (2013) genotiparam por PCR-RFLP 25 de 27 cepas obtidas do sangue periférico de recém-nascidos com toxoplasmose congênita e todas apresentaram genótipos atípicos. Para uma melhor compreensão da biologia e patogenia dessas novas cepas, três delas foram selecionados para o presente estudo: TgCTBr5, TgCTBr9 e TgCTBR16. A cepa TgCTBR5 apresentou genótipo BrIII segundo Pena et al. (2008) e foi avirulenta para camundongos, além de ter sido isolada de uma criança com toxoplasmose assintomática ao nascimento. Já a cepa TgCTBr9, caracterizada como

virulenta para camundongos e do genótipo BrII, foi obtida de um recém nascido com lesões oculares, calcificações cerebrais e órbita aos 9 meses de vida. A cepa TgCTBR16 não foi genotipada previamente pela ocorrência de produtos de digestão altamente polimórficos, além de não amplificação de alguns segmentos de DNA (Carneiro et al. 2013) foi obtida de criança que apresentou lesão ocular cicatrizada.

## 2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a patogênese da toxoplasmose depende, dentre outros fatores, da estrutura genética da cepa de *T. gondii*. Como a maioria dos estudos histopatológicos em modelos murinos de toxoplasmose experimental utiliza cepas clonais para infecção, fazem-se necessários estudos de cepas de genótipo atípico que circulam no Brasil. Além disso, existem ainda poucos estudos com cepas isoladas de humanos com toxoplasmose congênita, principalmente pela dificuldade em obter esses isolados (Ajzenberg et al. 2002).

Existe, portanto, considerável interesse em determinar se diferentes genótipos podem diferir entre si na capacidade de induzir alterações patológicas em determinado hospedeiro. Análises histopatológicas de cepas atípicas de *T. gondii* são importantes para compreender diferenças na patogênese induzida pelas diferentes cepas e contribuir para o desenvolvimento de terapias que poderiam eliminar a transmissão ou mesmo curar a doença (Saeij et al. 2005). Além disso, cepas que apresentam perfil genético atípico são as que circulam no Brasil e as selecionadas para o estudo circulam em pacientes humanos com toxoplasmose congênita.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar comparativamente a patogenicidade de três cepas de *T. gondii*, obtidos de casos humanos de toxoplasmose congênita em Minas Gerais.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Realizar a genotipagem da cepa de *Toxoplasma gondii* TgCTBR16 por *multiplex nested* PCR-RFLP.
- Avaliar a morbidade e a mortalidade em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com as cepas TgCTBr5, TgCTBR9 e TgCTBr16 de *T. gondii*.
- Avaliar e comparar a extensão e o tipo de lesão em diversos tecidos de camundongos isogênicos na fase aguda da toxoplasmose experimental induzida pelas diferentes cepas;
- Avaliar a infectividade da cepa TgCTBR16 por diferentes vias e a resistência à digestão ácida por pepsina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Análise molecular por *Multiplex-nested* PCR-RFLP (Mn PCR-RFLP)

Para a genotipagem completa da cepa TgCTBr16, foi realizada extração de DNA a partir de taquizoítos obtidos do peritônio de camundongos *Swiss* previamente inoculados com cistos teciduais pela via intraperitoneal. Após um período de cinco a sete dias, o exsudato peritoneal dos camundongos contendo taquizoítos foi coletado, centrifugado a 2.000 g por 10 minutos e ressuspensionado em 5 mL em PBS pH 7.2 e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* estocado a -20 °C.

A extração de DNA dos taquizoítos foi realizada no *pellet* de taquizoítos utilizando-se o kit de purificação de DNA genômico *Wizard* (Promega®) seguindo o protocolo do fabricante. O DNA purificado foi ressuspensionado em água e mantido sob refrigeração, a 4°C, até a utilização.

O isolado teve o perfil genético analisado por *Multiplex-nested* PCR-RFLP (Mn PCR-RFLP) em 11 *loci*: SAG1, SAG2 (3´SAG2 e 5´SAG2), SAG2-alt SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, e APICO (Tabela 1), segundo Su et al. (2010). A Mn PCR-RFLP consiste em duas etapas: a primeira (*Multiplex*) com os iniciadores externos, seguida da *Nested* PCR, com os iniciadores internos.

As reações de amplificação por *Multiplex* PCR foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo 2,5µL de Tampão 5X *green* (Promega®), 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen®), 5u/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega), 25µM de cada iniciador e 1,5µL de DNA molde. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em cada reação e todos os onze marcadores externos foram mantidos em uma única solução.

A reação foi feita em um termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus, com as seguintes etapas: desnaturação a 95 °C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de: 94 °C por 30 segundos para a desnaturação; 55 °C por 1 minuto para o anelamento e 72 °C por 2 minutos para a extensão.

Em seguida, novas reações de amplificação (*Nested*) foram realizadas com os 11 pares de iniciadores internos, separadamente, tendo como DNA molde o produto da primeira reação. Esta nova PCR teve volume final de 25µL, contendo 2,5µL de Tampão 5X green (Promega), 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen®), 5u/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega®), 10µM do iniciador interno forward, 10µM do iniciador interno reverse e 1,5µL do produto do *Multiplex* PCR. A *Nested* PCR seguiu as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para a desnaturação; 60°C por 1 minuto para o anelamento e 72°C por 1,5 minutos para a extensão. O produto desta segunda reação foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e corado com nitrato de prata.

Os produtos amplificados após a segunda PCR foram digeridos utilizando-se as endonucleases de restrição apropriadas segundo Su et al. (2010) (Tabela 1). As digestões foram realizadas em um volume final de 20µL, contendo 3µL do produto da *Nested* PCR, 1µL do tampão correspondente e 0,1µL da enzima, a 37°C, por três horas, segundo o protocolo do fabricante. O DNA dos produtos digeridos foi purificado por extração com igual volume de fenol/clorofórmio (1:1), submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata e fotografado. Foram analisados os perfis de bandas encontrados após digestão e comparados com os perfis de cepas clonais

dos tipos I (RH e GT1); II (ME49 e PTG), III (VEG e CTG) e de cepas com alelos atípicos (TgCgCa1, MAS e TgCatBr5).

**Tabela 1. Iniciadores para a genotipagem de *Toxoplasma gondii* por multilocus Multiplex nested PCR-RFLP (Mn-PCR-RFLP) (Su et al, 2010).**

<b>Marcador</b>	<b>Cromosomo</b>	<b>Iniciadores externos (Multiplex PCR)</b>	<b>Iniciadores Internos (Nested PCR)</b>	<b>Nested PCR (pb)</b>	<b>Enzimas de restrição</b>	<b>Referência</b>
SAG 1	VIII	F: GTTCTAACCACGCACCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau96I+HaeII (digestão dupla)	(Grigg et al. 2001)
5'-SAG2	VIII		F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	MboI	(Howe et al. 1997; Su et al. 2006)
3'-SAG2	VIII	F: TCTGTTCTCCGAAGTGA CTCC R: TCAAAGCGTGCATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	222	HhaI	(Howe et al. 1997)
SAG2-alt	VIII	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTTCCGACCAGCGGGAGCAC	640	HinfI+TaqI (dupla digestão)	(Khan et al. 2005b; Su et al. 2006)
SAG 3	XII	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	225	Nci I	(Grigg et al. 2001)
BTUB	IX	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	BsiEI+TaqI (dupla digestão),	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
GRA6	X	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	MseI,	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
C22-8	Ib	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTCGC	521	BsmAI+MboII (dupla digestão),	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
C29-2	III	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATA CAT	F: AGTTCTGCAGAGTGTGCGC R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	HpyCH4IV+RsaI (dupla digestão),	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
L358	V	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTTCTCGAAGACAGG	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	HaeIII+NlaIII (dupla digestão),	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
PK1	VI	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	AvaI+RsaI (dupla digestão)	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
Apico	Plastídio	F: TGGTTTTAACCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	F: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTTCGAACCCCTTGATA	640	AflIII+DdeI (dupla digestão)	(Su et al. 2006)

#### 4.2. Camundongos e Cepas de *T. gondii*

Fêmeas de camundongos pertencentes às linhagens isogênicas BALB/c e C57BL/6, entre 8 e 10 semanas de idade, foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Todos os experimentos realizados com esses animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG), certificados pelo Protocolo nº 266/2012 (Anexo).

Carneiro et al. (2013) isolaram 27 cepas de sangue periférico de crianças recém-nascidas com toxoplasmose congênita, entre o período de Novembro de 2006 a Maio de 2007 em Minas Gerais. Os isolados foram denominados TgCTBR1 a TgCTBR27 (*Toxoplasma gondii* Congenital Toxoplasmosis from Brazil) e apresentaram estrutura genética diferente dos tipos clonais encontrados no hemisfério norte, além de perfis de virulência variados. Para este estudo, selecionamos três dessas cepas: TgCTBr5, avirulenta para camundongos, tipo genético BRIII segundo Pena et al. (2008), isolado de um recém-nascido com toxoplasmose congênita assintomática; TgCTBr9, virulenta para camundongos (tipo BRII), isolada de um recém-nascido com toxoplasmose grave e óbito após 9 meses de vida; e TgCTBr16, de virulência intermediária, isolada de criança com cicatriz de lesão ocular e que apresentou genotipagem não conclusiva pela ocorrência de produtos de digestão extremamente polimórficos além da não amplificação para alguns marcadores.

Os taquizoítos dessas cepas, então armazenados a -196 °C em nitrogênio líquido, foram descongelados em banho-maria a 37 °C por 1 minuto, ressuspensos em 10mL de tampão fosfato (PBS) pH 7,2 estéril, e centrifugados a 1300 x g por 10 minutos, para novamente serem ressuspensos em salina (1mL) e então inoculados em dois camundongos *Swiss* pela via intraperitoneal.

Posteriormente, as cepas foram mantidas por passagens sucessivas em camundongos *Swiss* através do inóculo de cistos teciduais pela via oral. Camundongos inoculados com a cepa virulenta TgCTBR9 foram tratados do 2º ao 12º dia pós infecção com sulfadiazina (500 mg/l) via oral na água oferecida aos animais (Dubey & Beattie 1988) para cronificar a infecção e assim obter cistos teciduais.

#### **4.3. Infecção e delineamento experimental**

Cérebros de camundongos *Swiss* entre aproximadamente 2 e 3 meses de infecção com cada uma das três cepas foram macerados a seco em tubos de hemólise e diluídos em 1ml de PBS pH 7,2 estéril. Os cistos teciduais foram contados, em duplicata, em 10µl do homogenato de cérebro entre lâmina e lamínula sob microscopia de luz. A inoculação foi feita por gavagem de 10 cistos, em 100µl da suspensão, por animal.

Os camundongos foram divididos em seis grupos dependendo da linhagem e da cepa utilizada na infecção. Dezesesseis camundongos foram inoculados por grupo, sendo dez para análise de morbidade e curva de mortalidade e seis para os experimentos de histopatologia em duas coletas: a primeira com três animais, sete dias pós infecção (DPI), e a segunda com outros três animais 12 DPI. Dois animais não inoculados, de cada linhagem, foram utilizados como controle dos experimentos.

#### **4.4. Critérios de Morbidade e Mortalidade**

Para avaliação da morbidade dos animais infectados, os animais foram pesados em balança portátil digital durante 30 dias a partir do dia da infecção para obtenção do peso corporal. Além disso, eles foram observados durante esse período de acordo com a evolução dos sinais clínicos normalmente apresentados por camundongos infectados com *T. gondii*, tais como pelagem arrepiada, arqueamento postural e atividade motora.

Como controle do experimento, cinco camundongos não infectados de cada linhagem também foram pesados da mesma forma.

A curva de sobrevivência foi realizada a partir do registro diário da mortalidade dos camundongos durante 30 dias, conforme Smiley et al (2005). Após esse período, os animais sobreviventes tiveram o sangue coletado por lancetamento da cauda para pesquisa de IgG anti-*Toxoplasma* por ELISA, sendo sacrificados logo em seguida por deslocamento cervical. O cérebro foi retirado, macerado a seco em tubos de hemólise e suspenso em 1ml de PBS pH 7,2 estéril. Cerca de 10 $\mu$ l foram examinados, em duplicata, entre lâmina e lamínula, sob microscopia de luz, para contagem de cistos teciduais.

#### **4.5. Exame sorológico – ELISA**

Para confirmação de infecção após 30 dias de inoculação, anticorpos IgG anti-*T. gondii* foram pesquisados no plasma dos camundongos sobreviventes pelo método de ELISA de acordo com Brandão et al. (2009). Após coletado, o sangue foi acondicionado em tubo com heparina e centrifugado. O plasma obtido foi estocado a -20 °C até a realização da sorologia.

Para preparação do antígeno, taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram obtidos de camundongos *Swiss* previamente infectados. A cavidade peritoneal dos camundongos foi lavado com PBS pH 7,2 e o material obtido foi lavado três vezes por centrifugação em PBS pH 7,2. Alíquotas de 10<sup>7</sup> taquizoítos foram sonicadas, centrifugadas e estocadas a -20°C até o momento do uso, sendo denominadas “soluble tachyzoite antigen” (STAg). A concentração de proteínas foi estimada segundo Lowry (1951). STAg foi diluído em tampão carbonato pH 9,6 a uma concentração de 5 $\mu$ g/ml. A placa de ELISA foi sensibilizada com 100 $\mu$ l deste antígeno em cada orifício por 18 horas a 4°C. Em

seguida, a placa foi lavada e aplicado o plasma dos camundongos diluído em PBS-Tween-20 0.05% (PBS-T) na concentração de 1:100. A placa foi incubada por 45 minutos a 37°C, lavada, e posteriormente foi adicionado anti-IgG (1:10000) de camundongo (Sigma®), marcado com peroxidase. Após 45 minutos de incubação a 37°C, a placa foi lavada e o substrato (orto-fenilenodiamino + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em ácido cítrico, pH 5,0) adicionado. Para interromper a reação foram utilizados 30 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N e para realizar a leitura automatizada foi utilizado um leitor de microplacas da BIO RAD modelo 3550 e filtro de 490nm. Amostras com valores em absorbância maiores que o *cut off* foram consideradas positivas. O *cut off* foi calculado pela média de absorbância de oito plasmas negativos mais três desvios-padrão.

#### **4.6. Coleta dos órgãos, preparação e análise dos cortes histopatológicos**

Os camundongos foram eutanasiados aos 7 DPI (3 animais) e 12 DPI (3 animais) com sobredose de anestésico (cetamina e xilazina), administrada pela via intraperitoneal. Posteriormente, foi retirado o cérebro, que foi fixado em formaldeído 8% por 24h, até ser trocado por formaldeído tamponado a 10%. O fígado, baço, pulmão e intestinos também foram coletados e fixados em formaldeído 10%. Uma vez retirados, os intestinos foram separados em jejuno, íleo e cólon e, em seguida, estendidos com a serosa em contato com papel filtro e aberto pela borda anti-mesentérica e todo o conteúdo foi removido. Posteriormente, os fragmentos foram imersos em solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial, para pré-fixação, até serem enrolados em espiral com a mucosa voltada para dentro, formando um “rolo suíço”, conforme descrito por Arantes & Nogueira (1997), permitindo uma análise de toda a extensão de cada segmento em uma única lâmina.

Após fixadas em formaldeído tamponado a 10%, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em duas trocas de xilol, embebidas e incluídas em parafina. Os blocos de parafinas obtidos foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes semi-seriados entre 3 e 5 micrômetros e, em seguida, corados com hematoxilina-eosina (H&E). Foram avaliados os aspectos qualitativos decorrentes da infecção por *T. gondii* nos tecidos.

As imagens obtidas ao microscópio foram capturadas com resolução de 1392 X 1040 pixels e transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador através do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

#### **4.7. Infectividade da cepa TgCTBr16 pela via intraperitoneal e suscetibilidade dos bradizoítos à digestão péptica**

Para avaliar se a baixa infectividade da cepa TgCTBr16 foi devida à via de inoculação oral, grupos adicionais de oito camundongos BALB/c e oito C57BL/6 foram inoculados pelas vias intraperitoneal e oral com dez cistos teciduais da referida cepa (Tabela 3). Também, para avaliar se a baixa infectividade apresentada pela cepa TgCTBr16 foi devida a uma baixa resistência dos bradizoítos à digestão enzimática estomacal após inoculação oral, camundongos de ambas as linhagens foram inoculados intraperitonealmente com dez cistos teciduais tratados *in vitro* com pepsina por 60 minutos (Dubey 1997b), conforme descrito a seguir. Oito animais de cada linhagem também foram inoculados com dez cistos da cepa ME49 de *T. gondii* tratados com pepsina da mesma maneira, como controle.

#### 4.7.1. Digestão ácida *in vitro* dos cistos teciduais da cepa TgCTBr16 com Pepsina

Cérebro de camundongos *Swiss* infectados com a cepa TgCTBr16 (entre 2 e 3 meses de infecção) foram macerados a seco em tubos de hemólise e diluídos em 1ml de PBS pH 7,2 estéril. Os cistos teciduais foram contados, em duplicata, em 10µl do homogenato de cérebro entre lâmina e lamínula sob microscopia de luz. Posteriormente, foi adicionada solução de pepsina (pepsina 1,3g; NaCl 3.5g; HCl 2,5g; H<sub>2</sub>O dest. qsq 500ml) no homogenato na proporção de 1:1 e mantido a 37°C. A cada 5 minutos, a mistura foi homogeneizada. Após 60 minutos, a mistura foi lavada três vezes com PBS para eliminar a pepsina, ressuspensa também em PBS e o pH da suspensão foi medido para garantir que a solução ácida foi retirada.

#### 4.7.2. Infecção em camundongos por diferentes vias com cistos teciduais da cepa TgCTBr16 previamente tratados ou não por Pepsina

Seis camundongos de cada linhagem foram inoculados intraperitonealmente com macerado de cérebro de animais não infectados com *T. gondii* e tratados com pepsina, servindo como grupo controle (Tabela 3) para garantir que a suspensão final após digestão ácida não é letal para os animais.

**Tabela 2. . Infecção de camundongos com 10 cistos teciduais da cepa TgCTBr16 por diferentes vias: Via intraperitoneal e oral, ou com 10 cistos tratados com pepsina por 60 minutos e inoculados intraperitonealmente. Animais do grupo controle inoculados pela via intraperitoneal com macerado de cérebro sem cistos teciduais e tratados com pepsina e inoculados com a cepa ME49 i.p. após tratamento com pepsina.**

Grupo	Linhagem	Nº animais	Nº cistos	Tempo de digestão com pepsina (min)
Infecção i.p.	BALB/c	8	10	0
Infecção i.p. + Pepsina	BALB/c	8	10	60
Infecção oral	BALB/c	8	10	0
Cepa ME49 i.p. + Pepsina	BALB/c	8	10	60
Controle Pepsina	BALB/c	6	0	60
Infecção i.p.	C57BL6	8	10	0
Infecção i.p. + Pepsina	C57BL6	8	10	60
Infecção oral	C57BL6	8	10	0
Cepa ME49 i.p. + Pepsina	C57BL/6	8	10	60
Controle Pepsina	C57BL6	6	0	60

Para confirmar a infecção, os camundongos foram acompanhados por 30 dias e, logo após a morte, foram examinados para pesquisa de taquizoítos nos pulmões e cavidade peritoneal e busca de cistos teciduais no cérebro. Além disso, os cérebros dos animais sobreviventes onde não foram observados cistos cerebrais foram macerados, diluídos em PBS e reinoculados em novos camundongos *Swiss* para bioensaio. Após 30 dias de infecção, os animais sobreviventes foram sangrados para busca de anticorpos IgG anti-*T. gondii* por ELISA e posteriormente sacrificados para coleta de cérebro para busca de cistos cerebrais e reinoculação em novos camundongos para o bioensaio.

#### **4.8. Análise estatística**

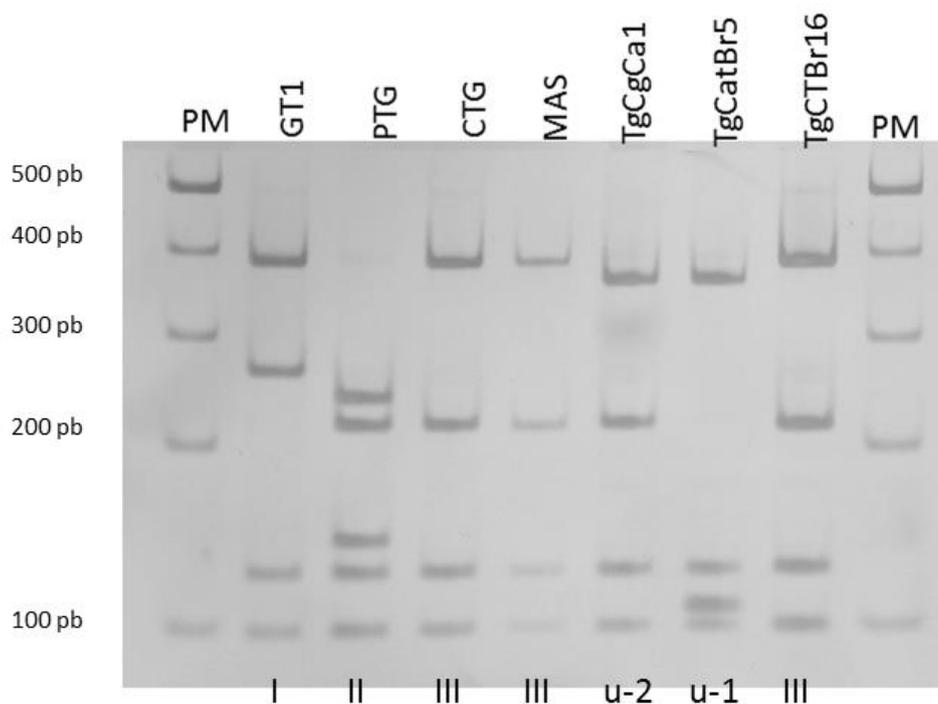
A significância estatística das curvas de sobrevivência foi avaliada pelo teste *log-rank*. A análise da cinética de ganho de peso foi realizada pelos testes *t-student* para dados paramétricos e *Mann Whitney* para dados não paramétricos e a avaliação da normalidade da distribuição dos dados pelo teste *D'agostino & Pearson*. Para comparação do número de cistos nos cérebros dos sobreviventes após 30 dias, também foi realizado o teste *t-student* para dados paramétricos.

Valores de probabilidade menores do que 0,05 ( $p < 0.05$ ) foram considerados significantes. Todos os testes estatísticos foram feitos pelo software GraphPad Prism 5.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise molecular por da cepa TgCTBr16 *Multiplex-nested PCR-RFLP* (Mn PCR-RFLP)

A cepa TgCTBr16 foi genotipada utilizando os onze marcadores propostos por Su et al. (2010) por meio da Mn PCR-RFLP. O genótipo determinado corresponde ao genótipo #8, segundo o banco de dados *Toxodb* ([www.toxodb.org](http://www.toxodb.org)), e é classificado como BrIII segundo Pena et al. (2008) (Tabela 4). Resultado da Mn PCR-RFLP do marcador PK1 está representado de forma exemplificativa na Figura 2.



**Figura 2.** PCR-RFLP representativa realizada no *locus* PK1 com as endonucleases de restrição *Ava*I e *Rsa*I em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata, para genotipagem da cepa de *T. gondii* TgCTBr16. Cepas de referências para alelos dos tipos I (GT1), II (PTG), III (CTG e MAS), u-1 (TgCatBr5), u-2 (TgCgCa1). PM = Padrão de peso molecular.

Tabela 3. Genotipagem da cepa TgCTBR16 de *T. gondii* por *Multiplex-nested* PCR-FRLP nos marcadores SAG1, SAG2, SAG2alt, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1 e Apico.

Cepa	SAG1	3'5'SAG2	SAG2alt	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	Apico	Genótipo PCR-RFLP*
RH/GT1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	10
ME49/PTG	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	1
VEG/CTG	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	2
TgCgCa1	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	66
MAS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	17
TgCatBr5	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	19
TgCTBr 16	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	8 (BrIII)

\*Segundo toxodb.

## 5.2. Mortalidade em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com três cepas de *T. gondii*.

Todos os camundongos, BALB/c ou C57BL/6, sobreviveram após 30 dias de inoculação oral com 10 cistos teciduais da cepa TgCTBr5 (Figura 3A). Em contrapartida, quando a cepa utilizada foi a TgCTBr9, nenhum animal sobreviveu à infecção após 30 dias, independentemente da linhagem (Figura 3B). Dos 10 camundongos BALB/c e 10 C57BL/6 infectados com a cepa TgCTBr16, apenas dois de cada linhagem sucumbiram à infecção após 30 dias (Figura 3C). Não houve diferença estatística na curva de sobrevivência entre as duas linhagens de camundongos infectados com qualquer uma das três cepas ( $p > 0,05$ ).

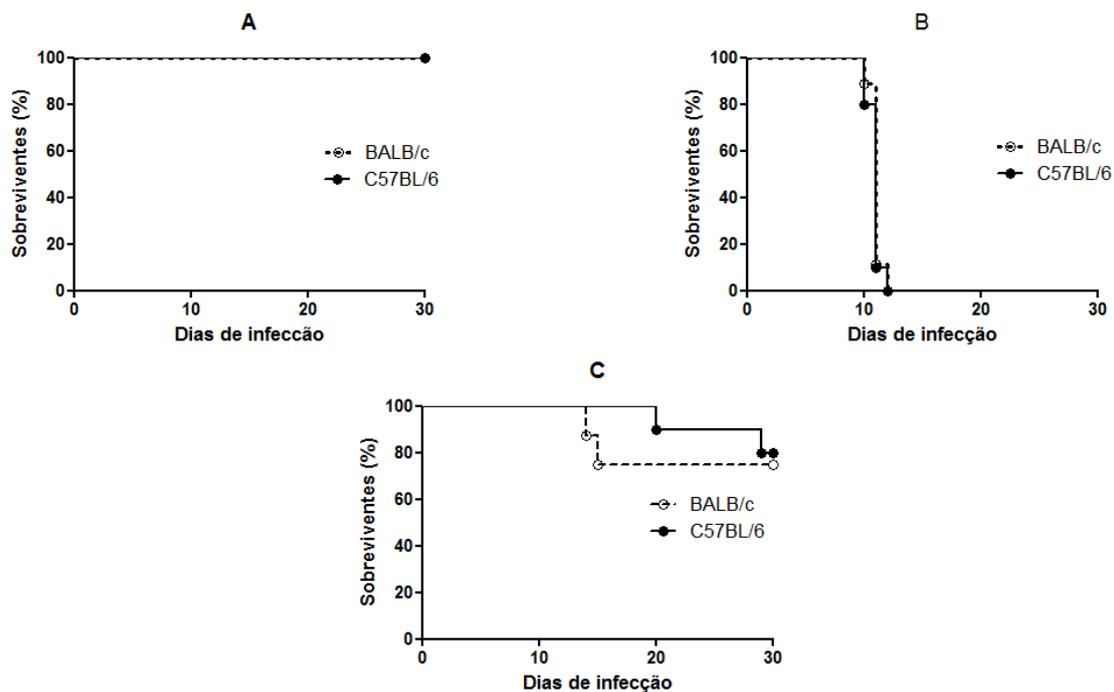


Figura 3. Curva de sobrevivência de camundongos BALB/c e C57BL/6 inoculados pela via oral com 10 cistos teciduais das cepas: (A) TgCTBr5 ( $p=1$ ); (B) TgCTBr9 ( $p=0,692$ ); (C) TgCTBr16 ( $p=0,622$ ) de *T. gondii*. Os experimentos de mortalidade foram realizados em duplicata e apresentaram resultados compatíveis.

### 5.3. Morbidade de camundongos de linhagens isogênicas após infecção oral com 10 cistos teciduais pela via oral

Não houve diferença estatística na perda de peso ou na ocorrência de sinais clínicos em camundongos BALB/c infectados com a cepa TgCTBr5, quando comparados com o grupo controle não infectado (Figura 4A). Por outro lado, observou-se diferença significativa na curva de cinética de peso corporal em animais C57BL/6 quando infectados por essa mesma cepa, comparados com o controle (Figura 4B). Essa diferença foi observada entre o 10º e o 22º dia de infecção, apesar de não terem sido observadas manifestações clínicas nos camundongos. Após esse período, os animais se recuperaram e mantiveram a cinética de peso semelhante estatisticamente à do grupo controle. Quando se comparam as diferentes linhagens infectadas, percebe-se uma perda de peso significativamente maior em animais C57BL/6 comparados com BALB/c entre o 10º e 14º dia de infecção (Figura 4C).

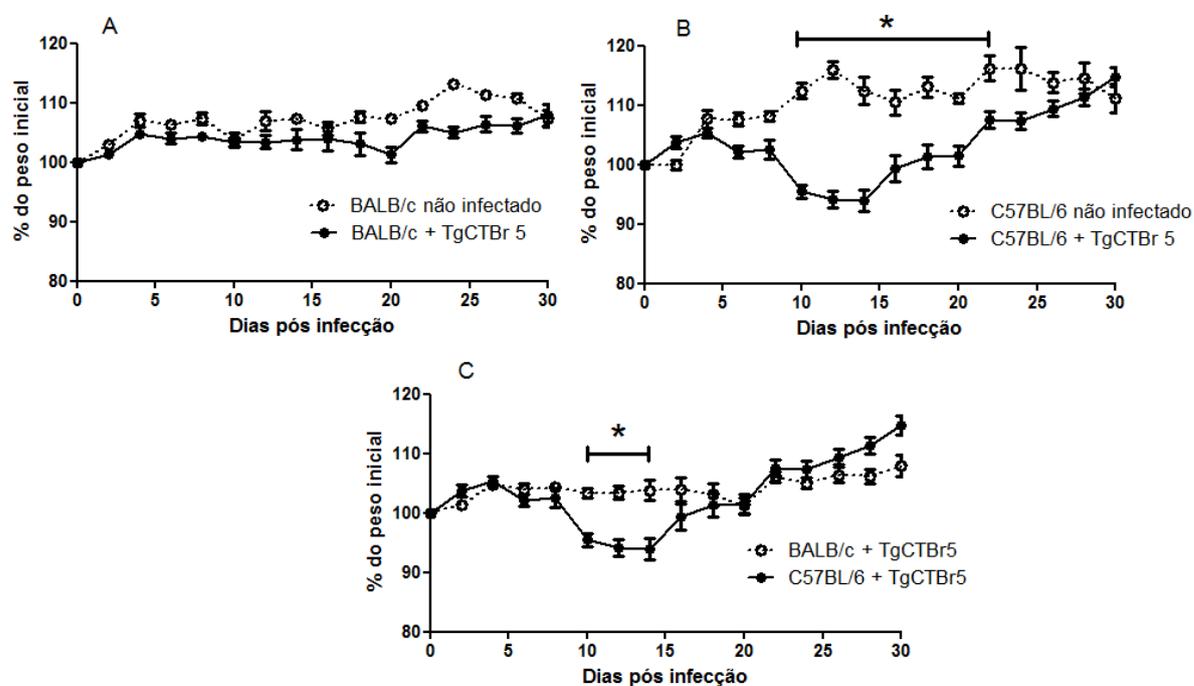


Figura 4. Cinética de ganho de peso dos animais infectados pela via oral com 10 cistos da cepa TgCTBr5 de *T. gondii*: (A) BALB/c controle x infectado; (B) C57BL/6 controle x infectado; (C) BALB/c infectado x C57BL/6 infectado (\*dia ou intervalos de dias em que ocorreu diferença significativa).

Quando a cepa de infecção utilizada foi a TgCTBr 9, todos os animais infectados tiveram queda de peso brusca e sinais típicos da toxoplasmose experimental como arrepio de pelo, arqueamento postural e debilidade motora antes de morrerem entre o 10º e 12º dias de infecção (Figura 5A e 5B). Apesar de ambas as linhagens terem apresentado perda de peso significativa em relação ao grupo controle não infectado, quando as linhagens foram comparadas entre si, houve maior queda na média de peso de camundongos C57BL/6 do que em BALB/c, comprovada estatisticamente no 6º e no 10º dia de infecção (Figura 5C).

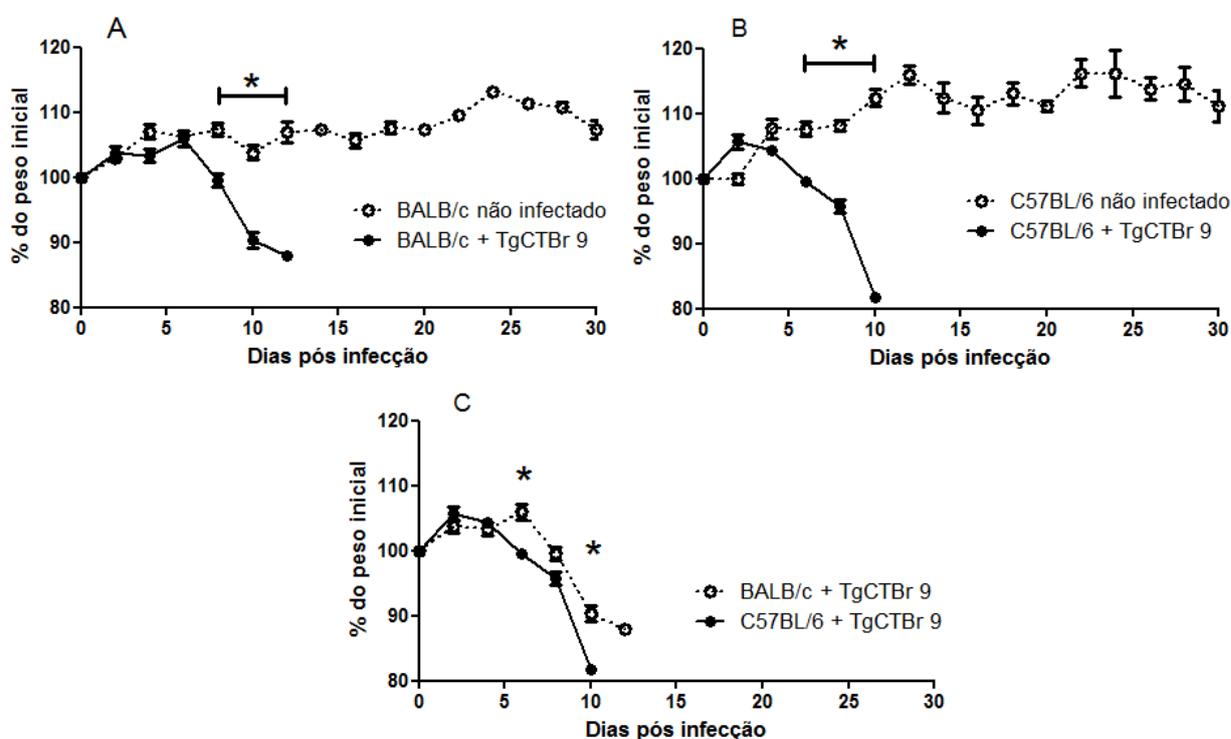
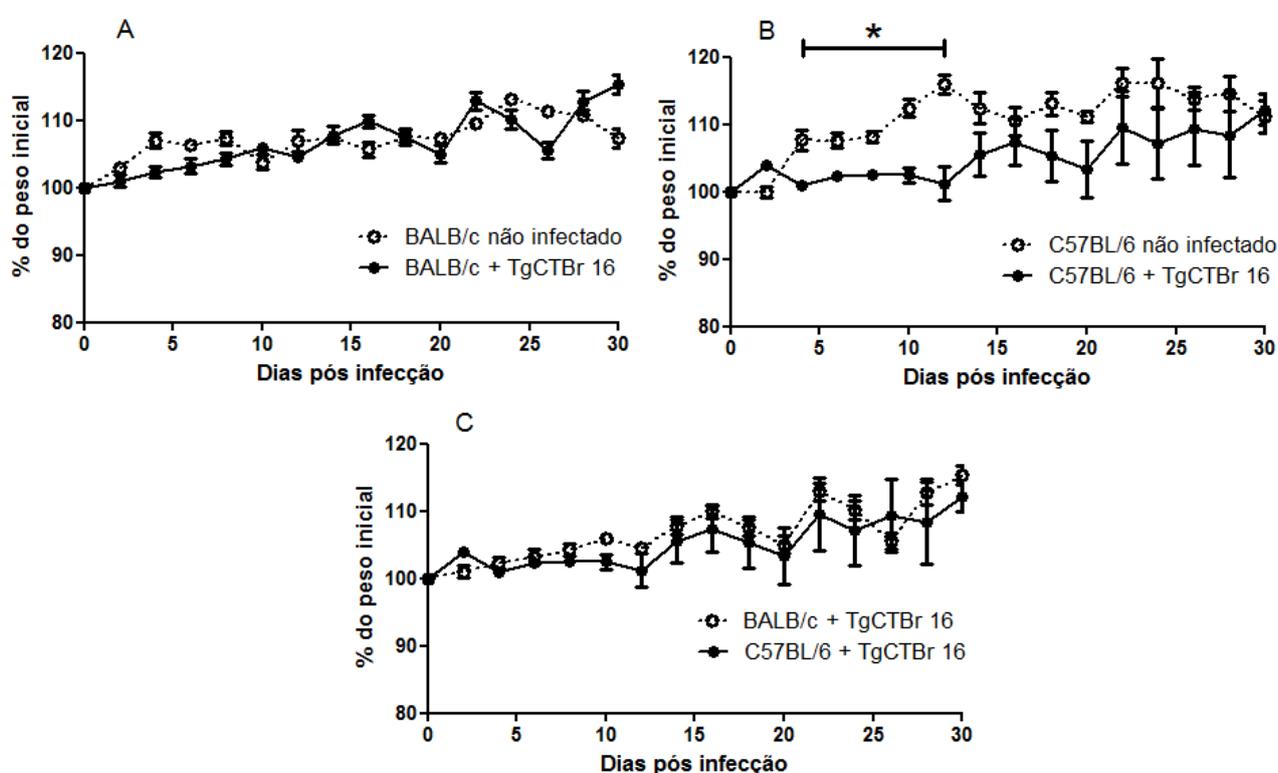


Figura 5. Cinética de ganho de peso dos animais infectados pela via oral com 10 cistos da cepa TgCTBr9 de *T. gondii*: (A) BALB/c controle x infectado; (B) C57BL/6 controle x infectado; (C) BALB/c infectado x C57BL/6 infectado (\*dia ou intervalos de dias em que ocorreu diferença significativa).

Os camundongos BALB/c infectados com a cepa TgCTBr16 e sobreviventes após 30 dias não apresentaram diferença estatística na curva de cinética de peso quando comparados ao grupo não infectado ou qualquer sinal clínico sugestivo de toxoplasmose (Figura 6A). Em contrapartida, animais C57BL/6 tiveram queda de peso significativa entre o 4º e o 12º dia de infecção (Figura 6B). Quando se comparam as duas linhagens infectadas com a cepa TgCTBr9, não houve diferença significativa na cinética de ganho de peso (Figura 6C).



**Figura 6. Cinética de ganho de peso dos animais infectados pela via oral com 10 cistos da cepa TgCTBr16 de *T. gondii*:** (A) BALB/c controle x infectado; (B) C57BL/6 controle x infectado; (C) BALB/c infectado x C57BL/6 infectado (\*dia ou intervalos de dias em que ocorreu diferença significativa).

#### 5.4. Suscetibilidade de camundongos à formação de cistos teciduais e sorologia por ELISA

Após 30 dias de infecção, nenhum camundongo inoculado com a cepa TgCTBR9 sobreviveu para sorologia ou contagem de cistos no cérebro. Dos camundongos inoculados com a cepa TgCTBR5, os pertencentes à linhagem BALB/c apresentaram média de  $130,60 \pm 29,98$  cistos contra média de  $38,89 \pm 11,11$  cistos encontrada no cérebro de C57BL/6 ( $p=0,0112$ ). A busca de IgG anti-*T. gondii* por ELISA mostrou sorologia positiva em 100% de camundongos BALB/c e 100% em C57BL/6 inoculados com a cepa TgCTBR 5 (Tabela 5).

Já nos animais sobreviventes inoculados com a cepa TgCTBR16, apenas um camundongo C57BL/6 apresentou sorologia positiva, mas sem a presença de cistos no cérebro. Os demais C57BL/6, bem como todos os BALB/c sobreviventes foram negativos para IgG anti-*T. gondii* no plasma e para cistos cerebrais (Tabela 5).

**Tabela 4. Sobrevivência, número de cistos cerebrais e sorologia em camundongos BALB/c e C57BL/6 sobreviventes após 30 dias após infecção com as três cepas de *T. gondii*.**

Cepa	Linhagem	Sobrevivência <sup>a</sup> (%)	Nº de cistos <sup>b</sup>	ELISA <sup>c</sup>
TgCTBR5	BALB/c	10/10 (100)	$130,60 \pm 29,98^*$	10/10
	C57BL/6	10/10 (100)	$38,89 \pm 11,11^*$	10/10
TgCTBR9	BALB/c	0/10 (0)	NR	NR
	C57BL/6	0/10 (0)	NR	NR
TgCTBR16	BALB/c	8/10 (80)	0	0/8
	C57BL/6	8/10 (80)	0	1/8

a Número de camundongos sobreviventes/número de camundongos inoculados.

b Número de cistos cerebrais  $\pm$  desvio padrão.

c Animais com sorologia positiva/animais com plasma testado por ELISA.

NR - não realizado (sem sobreviventes após 30 dias).

\* $p=0,0112$ .

### **5.5. Análise histopatológica comparativa com as três cepas**

De forma geral, há um quadro sistêmico de inflamação tecidual mais exuberante em animais infectados com a cepa TgCTBr9 do que com as demais cepas. Essa foi a única cepa em que os camundongos inoculados apresentaram sinais clínicos como pelo arrepiado, arqueamento postural e debilidade motora no momento da eutanásia. Ao se comparar as linhagens de camundongos, houve maior dano tecidual em animais C57BL/6 do que em BALB/c. Em relação à cepa TgCTBr16, apenas alguns animais apresentaram lesões em determinados órgãos – que serão demonstradas nas pranchas (Figuras 7, 9, 10, 12 e 13) – enquanto outros não possuíam qualquer lesão tecidual. Os animais analisados após 12 dias de infecção apresentaram maior comprometimento tecidual do que aqueles necropsiados após 7 dias. Sendo assim, apenas as imagens dos cortes de órgãos coletados aos 12 dias de infecção estão representadas nas pranchas (Figuras 7, 9, 10, 12 e 13). Os órgãos que apresentaram maior comprometimento foram fígado e pulmão, que apresentaram sinais característicos de uma resposta inflamatória grave, com fenômenos vasculares, reatividade endotelial, marginação leucocitária, edema de interstício e focos de inflamação, conforme serão descritos a seguir.

#### **5.5.1. Fígado**

O fígado apresentou muitos focos inflamatórios mononucleares, alterações degenerativas e regiões de necrose próximas aos focos de inflamação. Quando se comparam as cepas, percebe-se maior inflamação nos fígados dos animais infectados com a cepa TgCTBr9 do que com a cepa TgCTBr5. E comparando as linhagens de camundongos, as lesões foram bem mais significativas nos animais C57BL/6 do que nos BALB/c (Figura 7). Um animal C57BL/6 inoculado com a cepa TgCTBr9, com 12

dias de infecção apresentou, inclusive, trombos recentes e regiões de microinfarto. No entanto, dos seis animais de cada linhagem inoculados com a cepa TgCTBr16, apenas um BALB/c e dois C57BL/6 apresentaram lesões caracterizadas por infiltrados inflamatórios focais e hiperemia intensa (Figura 7G e 7H). O fígado dos demais camundongos inoculados com essa cepa não apresentou lesões histopatológicas.

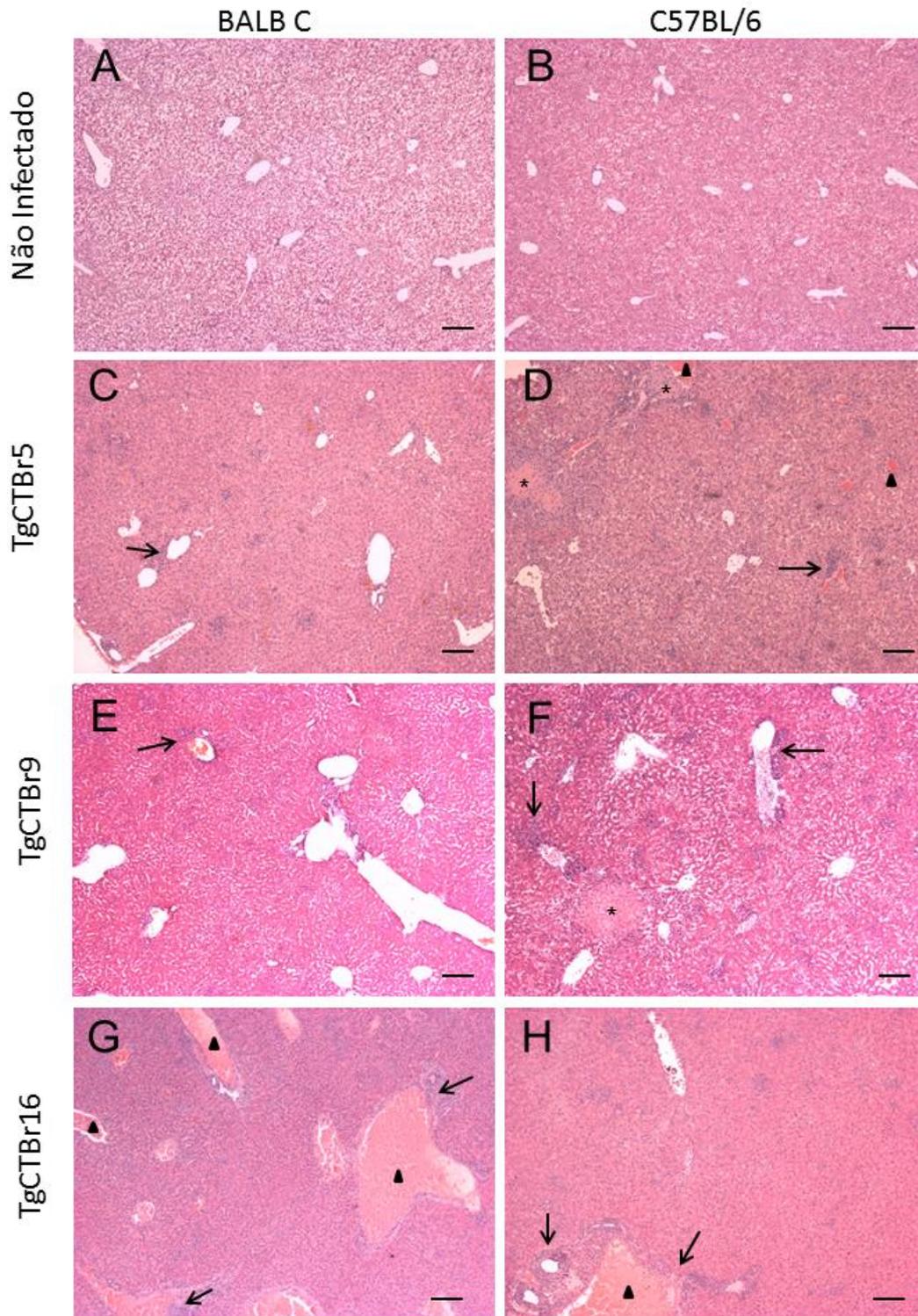


Figura 7. Alterações histopatológicas observadas no fígado de camundongos BALB/c (A, C, E e G) e C57BL/6 (B, D, F e H) após 12 dias de infecção com 10 cistos teciduais de *T. gondii* pela via oral. Estão representados os controles não infectados (A e B), animais infectados com a cepa TgCTBr5 (C e D), infectados com a cepa TgCTBr9 (E e F) e infectados com a cepa TgCTBr16 (G e H). Todos os animais infectados com as cepas TgCTBr5 e TgCTBr9 apresentaram alterações no parênquima hepático. Apenas dois C57BL/6 (G) e um BALB/c (H) entre três inoculados com a cepa TgCTBr16 apresentaram algum tipo de alteração. Notam-se lesões caracterizadas por focos de infiltrados inflamatórios em localizações periportais e perivasculares (setas), acompanhadas de hiperemia intensa (cabeças de seta). Camundongos C57BL/6 apresentaram regiões de necrose (asteriscos) no parênquima hepático (D e F). Coloração H&E. Barra = 20µm.

### 5.5.2. Pulmão

Foi observada pneumonite intersticial em todos os animais infectados com as cepas TgCTBr5 e TgCTBR9 após 12 dias, apresentando infiltrado peribrônquico e perivascular com aumento da celularidade nos septos, congestão e atelectasias (Figura 9). Os animais inoculados com a cepa TgCTBr9 apresentaram lesões mais graves (Figuras 9E e 9F). Apenas um animal BALB/c e um C57BL/6 inoculados com a cepa TgCTBr16 apresentaram alterações teciduais (Figura 9G e 9H), os demais não apresentaram lesões. Foram também encontrados parasitos intracelulares nos pulmões de animais C57BL/6 inoculados com a cepa TgCTBr9 após 12 dias de infecção (Figura 8).

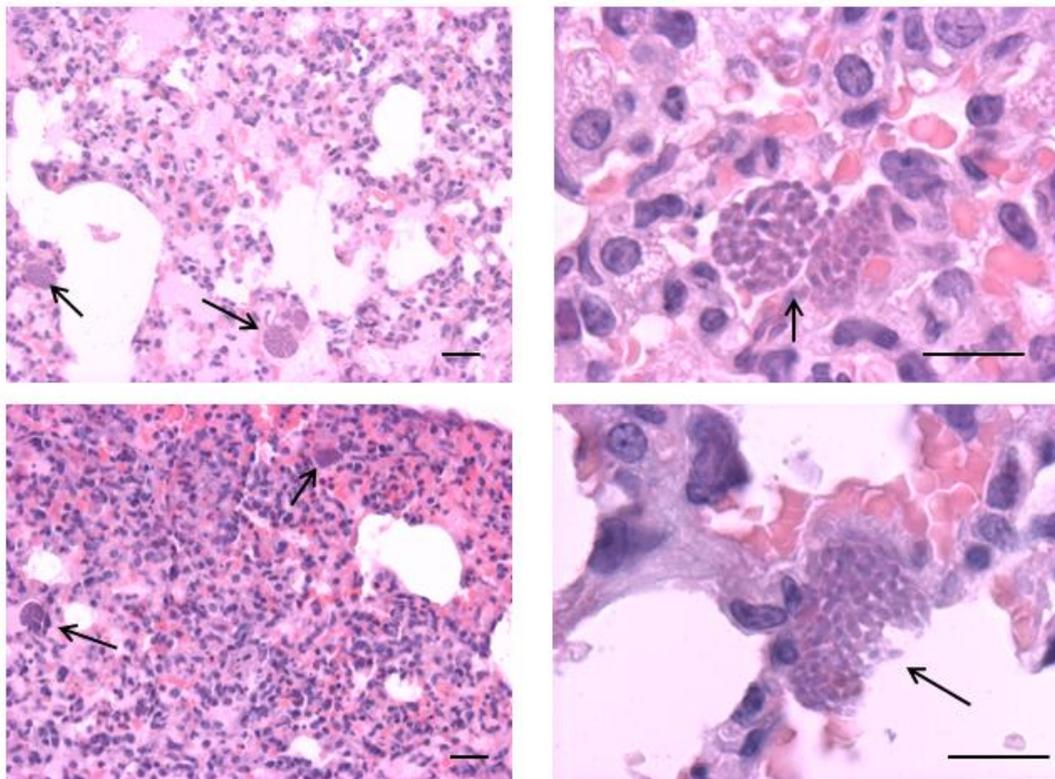


Figura 8. *Toxoplasma gondii* (setas) encontrado em pulmões de camundongos C57BL/6, doze dias após infecção oral com 10 cistos teciduais da cepa TgCTBr9. Coloração H&E. Barra=20µm.

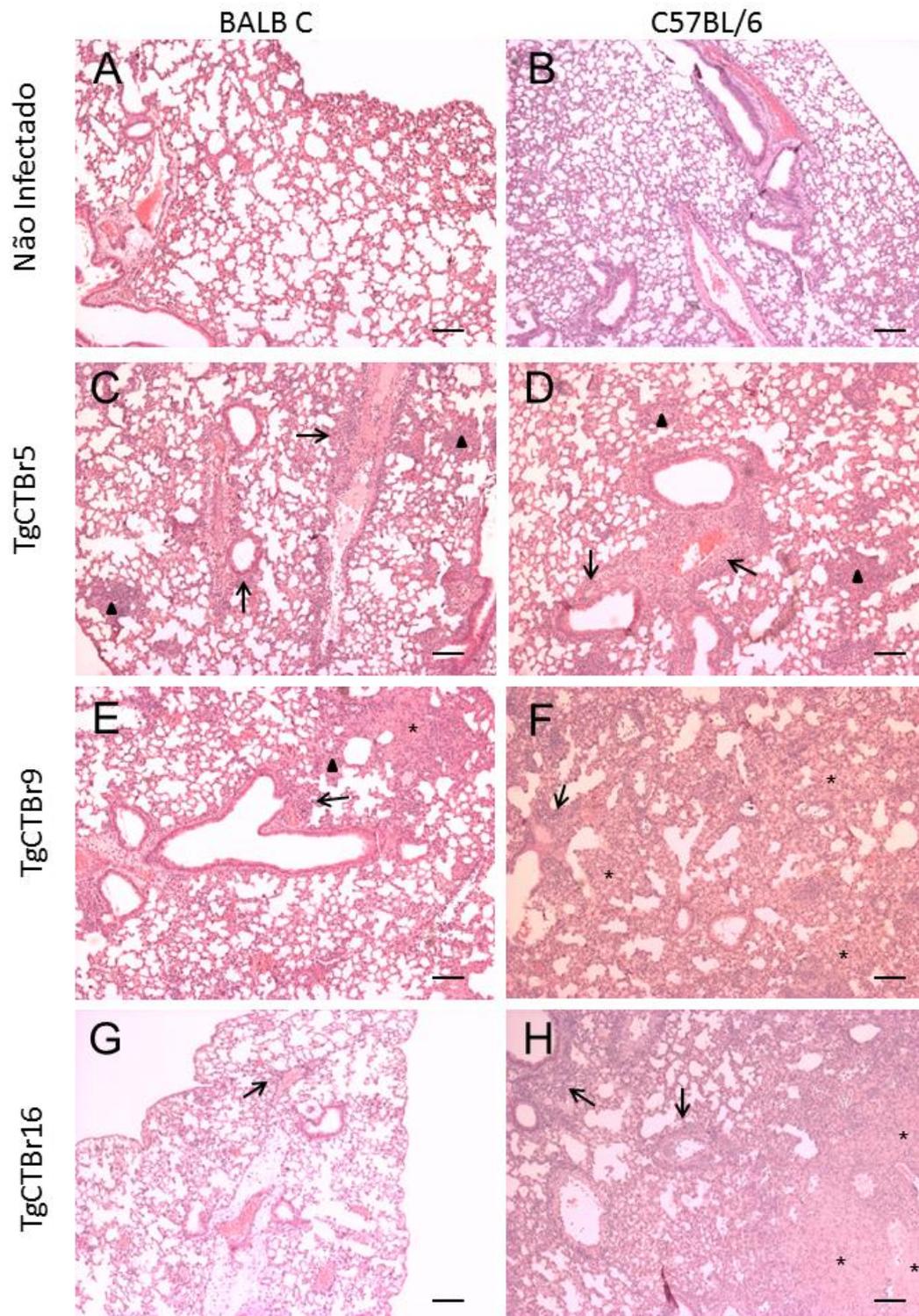


Figura 9. Alterações histopatológicas em pulmões de camundongos BALB/c (A, C, E e G) e C57BL/6 (B, D, F e H) após 12 dias de infecção com 10 cistos teciduais de *T. gondii* pela via oral. Estão representados os controles não infectados (A e B), animais infectados com a cepa TgCTBr5 (C e D), infectados com a cepa TgCTBr9 (E e F) e infectados com a cepa TgCTBr16 (G e H). Todos os animais infectados com as cepas TgCTBr5 e TgCTBr9 apresentaram alterações no parênquima hepático. Apenas um C57BL/6 (G) e um BALB/c (H) entre três inoculados com a cepa TgCTBr16 apresentaram algum tipo de alteração. Notam-se lesões caracterizadas por infiltrados inflamatórios peribrônquicos e perivascularares (setas), acompanhadas de congestão e aumento e celularidade dos septos (cabeça de seta). Regiões de atelectasia (asterisco) foram encontradas em animais inoculados com a cepa TgCTBr9 e em um dos camundongos inoculados com a cepa TgCTBr16 (F e H). Coloração H&E. Barra = 20µm.

### 5.5.3. Baço

O baço dos animais C57BL/6 infectados com a cepa TgCTBr9 aos 12 dias apresentou redução da área dos folículos linfoides que se apresentaram sem a arquitetura habitual e com compostos por células linfoides pequenas que não se organizavam em estruturas nodulares típicas (Figura 10F). Os demais camundongos apresentaram hiperplasia reacional com nódulos típicos, apesar de todos os grupos com 12 dias de infecção apresentarem hiperplasia macroscópica do órgão.

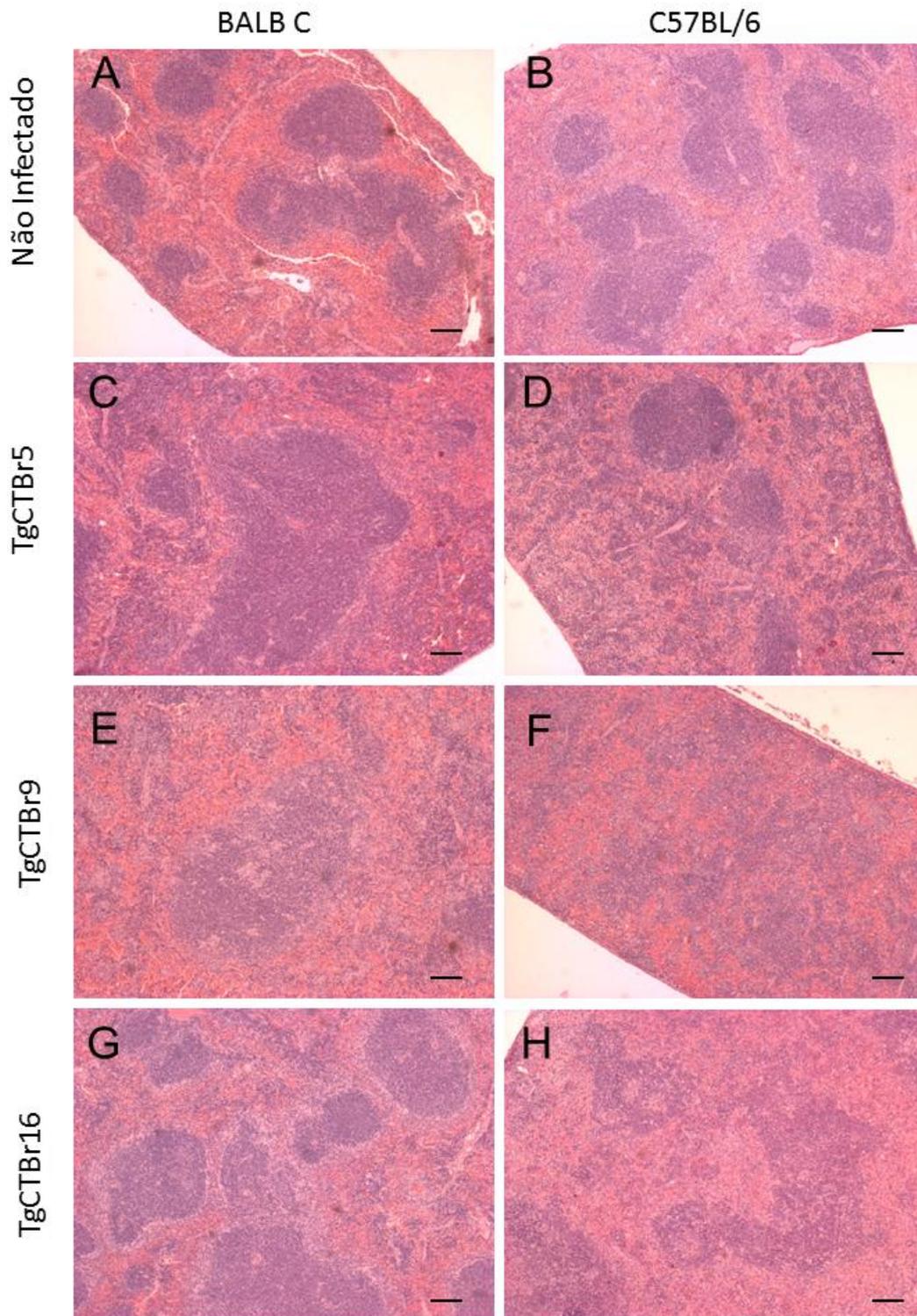


Figura 10. Alterações histopatológicas encontradas no baço de camundongos BALB/c (A, C, E e G) e C57BL/6 (B, D, F e H) após 12 dias de infecção com 10 cistos teciduais de *T. gondii* pela via oral. Controles não infectados (A e B), animais infectados com a cepa TgCTBr5 (C e D), infectados com a cepa TgCTBr9 (E e F) e infectados com a cepa TgCTBr16 (G e H). Todos os camundongos infectados apresentaram hiperplasia macroscópica do órgão. Percebe-se reatividade com aumento dos folículos linfoides, exceto nos animais C57BL/6 infectados com a cepa TgCTBr9 (F) que apresentaram folículos linfoides sem a arquitetura habitual. Coloração H&E. Barra = 20µm.

#### 5.5.4. Íleo

No íleo de camundongos, tanto BALB/c quanto C57BL/6 inoculados com a cepa TgCTBr5, foram observadas raras lesões teciduais como aumento discreto de celularidade na lâmina própria e camada submucosa. Nos camundongos inoculados com a cepa TgCTBr9 após 12 dias, o íleo se apresentou com edemas discretos e aumento de celularidade caracterizada por um infiltrado inflamatório misto, composto de neutrófilos e eosinófilos nas camadas da lâmina própria e submucosa. Contudo, não foram observadas lesões necróticas e as vilosidades mantiveram a arquitetura habitual (Figura 13).

Em contrapartida, um maior comprometimento com infiltrados inflamatórios mais proeminentes e ocasional destruição de vilosidades foi encontrado em um camundongo BALB/c e outro C57BL/6 dos três animais de cada linhagem infectados com a cepa TgCTBr16 (Figura 13G e 13H). Os demais animais infectados com essa cepa não apresentaram alterações histopatológicas.

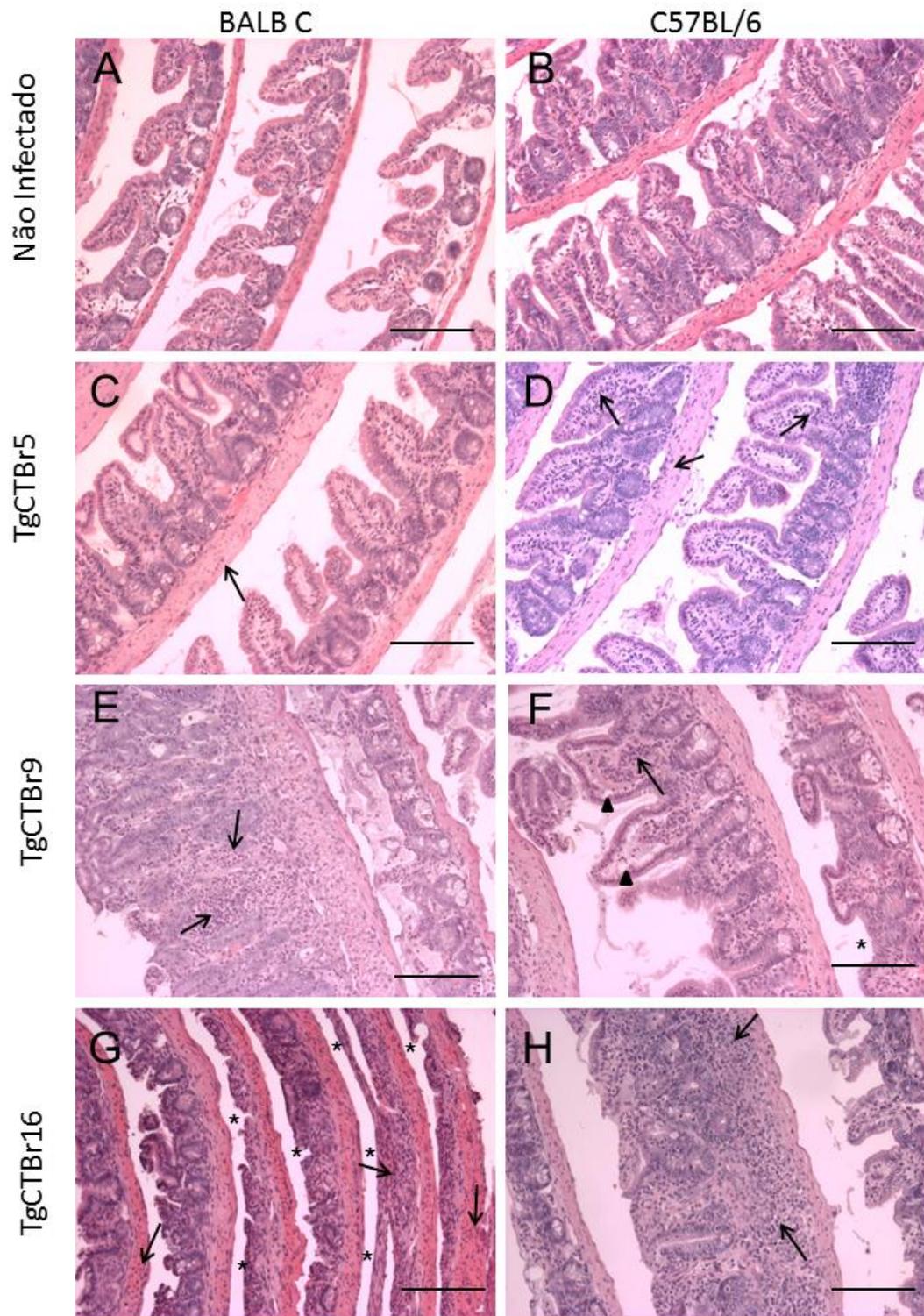


Figura 11. Corte histopatológicos do íleo de camundongos BALB/c (A, C, E e G) e C57BL/6 (B, D, F e H) após 12 dias de infecção com 10 cistos teciduais de *T. gondii* pela via oral. (A e B) Controles não infectados. (C e D) animais infectados com a cepa TgCTBr5, (E e F) infectados com a cepa TgCTBr9 e (G e H) infectados com a cepa TgCTBr16. Foram encontradas poucas alterações histopatológicas significativas nos grupos infectados com as cepas TgCTBr5 e TgCTBr9, caracterizadas por aumento de celularidade na lâmina própria e na camada submucosa (setas) e edemas discretos nas vilosidades (cabeças de seta). As alterações mais significativas foram encontradas em um camundongo C57BL/6 (G) e um BALB/c (H) entre três de cada linhagem inoculados com a cepa TgCTBr16. Destaca-se destruição de vilosidades (asteriscos) e infiltrados inflamatórios mais exuberantes do que nas demais cepas (setas). Coloração H&E. Barra = 20µm.

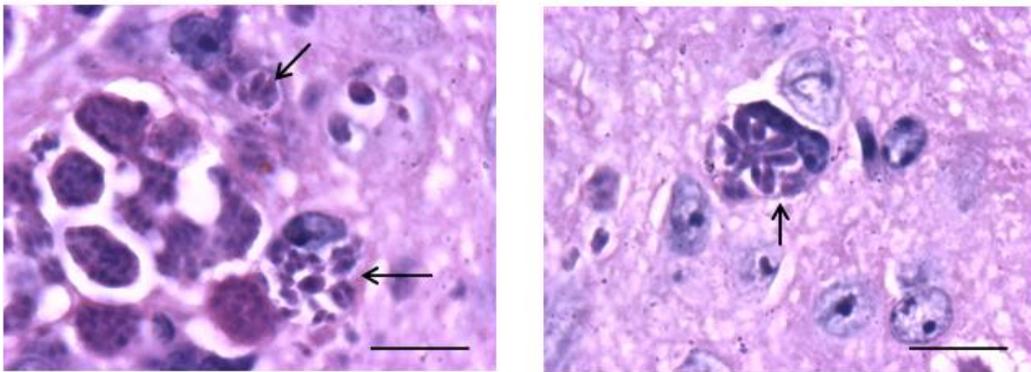
#### 5.5.5. Jejun e C6lon

N6o foram encontradas altera66es patol66gicas significativas no c66lon e no jejuno dos animais infectados com qualquer uma das cepas.

#### 5.5.6. C66rebro

N6o foram encontradas altera66es patol66gicas nos c66rebros de animais com 7 dias de infec666o. Com 12 dias, foi observada alguma resposta vascular aparentemente geral, mas nenhum foco inflamat66rio ou les66es degenerativas ou necr66ticas.

Em camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com a cepa TgCTBr9 ap66s 12 dias de inocula666o, existe ativa666o endotelial com margina666o leucocit66ria e algumas c66lulas migrando para o tecido, caracterizando meningite focal e discreta (Figura 12E e 12F). Nesses animais foram encontrados raros aglomerados de parasitos (Figura 11).



**Figura 12.** *Toxoplasma gondii* (setas) encontrado em c66rebro de camundongos C57BL/6, doze dias ap66s infec666o oral com 10 cistos teciduais da cepa TgCTBr9. Colora666o H&E. Barra=20 $\mu$ m.

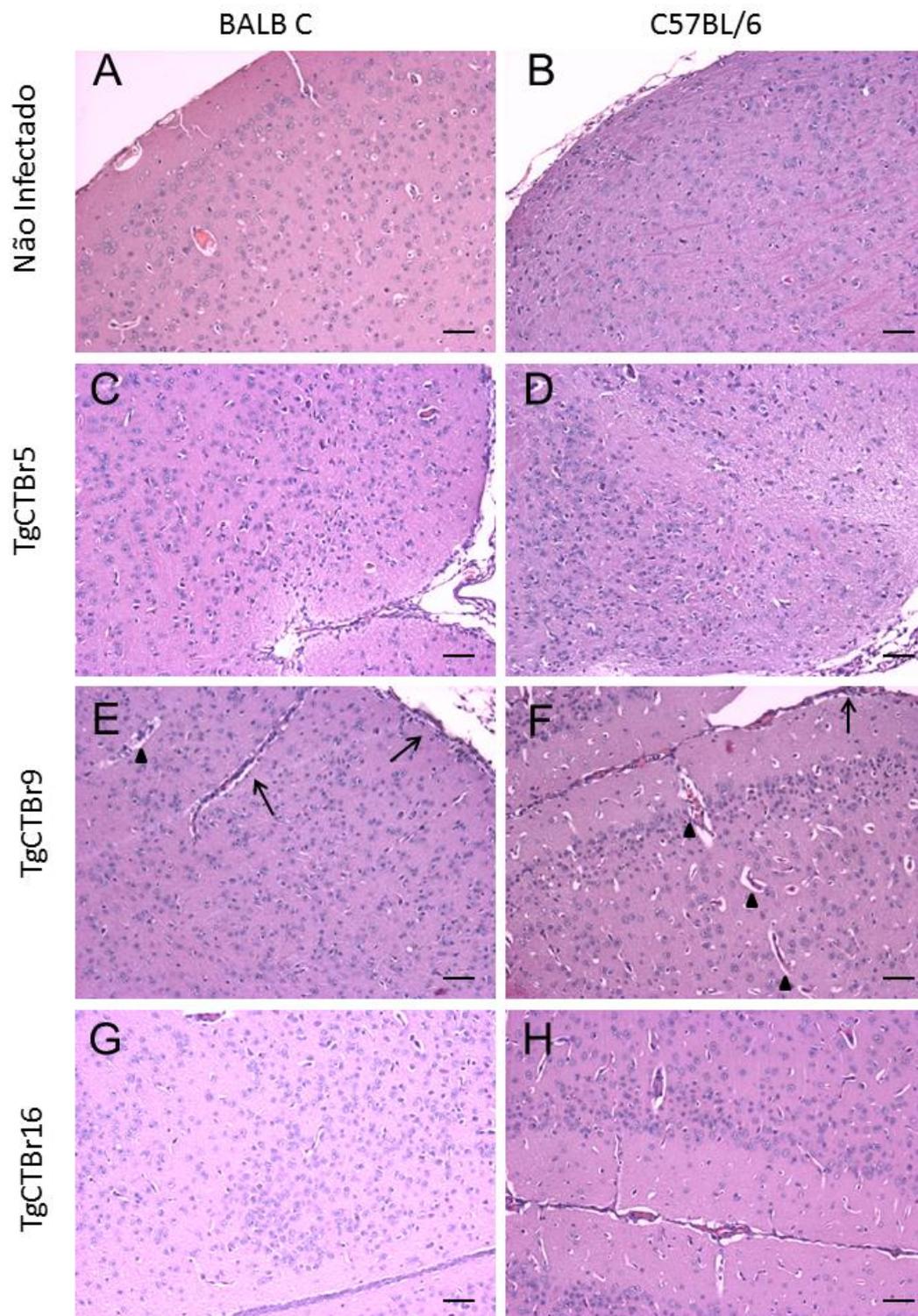


Figura 13. Alterações histopatológicas observadas no cérebro de camundongos BALB/c (A, C, E e G) e C57BL/6 (B, D, F e H) após 12 dias de infecção com 10 cistos teciduais de *T. gondii* pela via oral. (A e B) Controles não infectados. (C e D) Animais infectados com a cepa TgCTBr5, (E e F) infectados com a cepa TgCTBr9 e (G e H) infectados com a cepa TgCTBr16. Ocorrência de meningite discreta (setas), associada a fenômenos vasculares e discreto edema do parênquima cerebral em animais de ambas as linhagens infectados com a cepa TgCTBr9. Os animais infectados com as demais cepas mostram apenas marginação leucocitária discreta (cabeça de seta), sem migração celular significativa para o parênquima. Coloração H&E. Barra = 20µm.

## **5.6. Infectividade da cepa TgCTBr16 pela via intraperitoneal e suscetibilidade dos bradizoítos à digestão péptica**

Observou-se sucesso da infecção em apenas quatro camundongos C57BL/6 e dois BALB/c inoculados pela via intraperitoneal com 10 cistos não tratados com pepsina da cepa TgCTBr16. Estes animais morreram entre 20 e 24 dias de infecção. Não foram encontrados taquizoítos na cavidade peritoneal ou pulmões desses animais, porém a infecção foi confirmada pela presença de cistos teciduais no cérebro (Tabela 6).

Em contrapartida, o sucesso da infecção em camundongos inoculados via intraperitoneal com 10 cistos tratados previamente com pepsina foi de 0% para ambas as linhagens de animais. Após 30 dias, esses animais foram negativos para sorologia (ELISA), presença de cistos cerebrais e bioensaio de cérebro, assim como os animais inoculados com 10 cistos pela via oral e os animais controle inoculados com homogenato de cérebro de animais não infectados tratados com pepsina (Tabela 6).

As proporções de sucesso de infecção intraperitoneal com cistos da cepa TgCTBr16 tratados previamente *in vitro* com pepsina em camundongos foram significativamente menores quando comparadas com as proporções de infecção com cistos não tratados apenas em camundongos C57BL/6 ( $p=0,0331$ ).

Todos os animais inoculados com 10 cistos da cepa ME49 após tratamento com pepsina sobreviveram após 30 dias, mas tiveram o sucesso de infecção confirmado pela positividade no ELISA e pela presença de cistos cerebrais.

**Tabela 5. Mortalidade, parasitismo tecidual e sorologia em camundongos BALB/c e C57BL/6 inoculados com 10 cistos da cepa TgCTBr16, por diferentes vias, e submetidos ou não à digestão ácida por pepsina durante 60 minutos. Como controle, camundongos de ambas linhagens foram inoculados com homogenato de cérebro de animais não infectados, porém tratados com pepsina**

Linhagem	Grupo	Mortalidade <sup>a</sup>	Taquizoítos <sup>b</sup>	Cistos (ao óbito) <sup>c</sup>	ELISA (30dpi) <sup>d</sup>	Cistos (30dpi) <sup>e</sup>	Bioensaio (30dpi) <sup>f</sup>	Sucesso da infecção <sup>g</sup>
BALB/c	Infecção i.p.	2/8	0/2	1/2	0/6	0/6	0/6	2/8 (25%)*
	Infecção i.p.+ pepsina	0/8	na	na	0/8	0/8	0/8	0/8 (0%)*
	Infecção oral	0/8	na	na	0/8	0/8	0/8	0/8 (0%)
	Cepa ME49 i.p.+ pepsina	0/8	na	na	8/8	8/8	nr	8/8 (100%)
	Controle pepsina	0/6	na	na	0/6	0/6	0/6	0/6 (0%)
C57BL/6	Infecção i.p.	4/8	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4	4/8 (50%)**
	Infecção i.p.+ pepsina	0/8	na	na	0/8	0/8	0/8	0/8 (0%)**
	Infecção oral	0/8	na	na	0/8	0/8	0/8	0/8 (0%)
	Cepa ME49 i.p.+ pepsina	0/8	na	na	8/8	8/8	nr	8/8 (100%)
	Controle pepsina	0/6	na	na	0/6	0/6	0/6	0/6 (0%)

a. Número de camundongos mortos/número de camundongos inoculados.

b. Número de camundongos com taquizoítos encontrados na cavidade peritoneal ou nos pulmões imediatamente após morte/Número de animais mortos até 30 dias.

c. Número de camundongos com cistos teciduais encontrados no cérebro imediatamente após morte/ Número de animais mortos até 30 dias.

d. Número de camundongos positivos com sorologia positiva/Número de sobreviventes após 30 dias.

e. Número de camundongos com cistos cerebrais/Número de sobreviventes após 30 dias.

f. Número de camundongos com bioensaio positivo/Número de sobreviventes após 30 dias.

g. Número de camundongos inoculados/Número de camundongos efetivamente infectados (%).

na. Não se aplica (sem mortalidade até 30 dias).

nr. Não realizado.

\*p= 0,1705;

\*\*p= 0,0331

## 6. DISCUSSÃO

Carneiro et al. (2013) genotiparam 25 de 27 amostras de *T. gondii* obtidas do sangue periférico de recém-nascidos com toxoplasmose congênita pela técnica de PCR-RFLP, três das quais selecionadas para este estudo: TgCTBr5, TgCTBr9 e TgCTB16. Porém, a genotipagem da cepa TgCTBr 16 (selecionado para o presente estudo) não foi conclusiva. Isso se deu pela não amplificação de alguns marcadores e por produtos polimórficos oriundos de restrição por endonucleases em fragmentos de marcadores que foram amplificados.

No presente estudo, a genotipagem da cepa TgCTBr16, usando os mesmos fragmentos de DNA foi completa e conclusiva. O genótipo encontrado foi caracterizado como do tipo BrIII, segundo Pena et al (2008) e já foi descrito no banco de dados Toxodb (genótipo #8) em outros hospedeiros e em outras regiões geográficas não só do Brasil - gatos no Pará e galinhas e cães em São Paulo - como também dos Estados Unidos, em suínos usados para consumo humano (Velmurugan et al. 2009). Sendo assim, o encontro do genótipo BrIII corrobora a prevalência e ampla distribuição de genótipos atípicos clonais de *T. gondii*. Cumpre ressaltar que a carne suína contaminada com *T. gondii* de genótipo atípico nos Estados Unidos poderia ser devido à importação da mesma, uma vez que a maioria dos genótipos circulantes nesse país pertencem a linhagens clonais.

A cepa TgCTBr16 apresenta, portanto, o mesmo genótipo da cepa TgCTBr5, nos marcadores propostos por Su et al. (2010). Todavia, no presente estudo, as cepas se mostraram distintas em diversos aspectos tais quais, letalidade em camundongos, extensão de lesões teciduais, infectividade pela via oral e formação de cistos teciduais em camundongos. Além disso, estudo prévio já havia demonstrado diferenças na

virulência entre as cepas (Carneiro et al. 2013) e sintomatologia na criança da qual cada uma foi isolada (Andrade GM. Comunicado pessoal). Esses resultados sugerem fortemente que, apesar de os polimorfismos nos alelos dos fragmentos de DNA propostos por Su et al (2010) elucidarem aspectos de epidemiologia molecular e genética de populações, eles subestimam a real variedade biológica entre cepas.

### **6.1. Mortalidade, Morbidade e Cistogenicidade**

Sabe-se que a letalidade de *T. gondii* depende, dentre outros fatores, da cepa e de sua forma evolutiva, além da rota de inoculação. Utilizando diferente via de infecção (oral) e forma evolutiva (cistos teciduais), a curva de sobrevivência das três cepas de *T. gondii* em ambas as linhagens de camundongos, foi similar à encontrada por Carneiro et al. (2013) nos estudos de virulência com infecções intraperitoneais de taquizoítos em camundongos BALB/c. Os autores obtiveram 100% de sobrevivência de animais BALB/c inoculados com a cepa TgCTBr5 mesmo com alta dose de 1000 taquizoítos e nenhum sobrevivente após inoculação com a cepa TgCTBr9, mesmo com a dose de apenas um taquizoíto. A cepa TgCTBr16 apresentou virulência intermediária, com a letalidade variando de acordo com a dose. Esses resultados demonstram que a letalidade de *T. gondii* pode ser a mesma em camundongos, independentemente da rota de infecção e da forma evolutiva do parasito. Os resultados confirmam, também, o caráter de virulência das três cepas.

Além do mais, a cepa TgCTBr9, virulenta para camundongos, foi isolada de recém nascido com toxoplasmose congênita grave e óbito após nove meses de nascimento (Andrade GM. Comunicado pessoal) o que sugere que cepas muito virulentas em camundongos podem também ser mais patogênicas para humanos. Da mesma forma, a cepa TgCTBr5, avirulenta para camundongos, foi obtida a partir de sangue de recém-nascido com toxoplasmose assintomática ao nascimento, enquanto que a cepa

TgCTBr16, de virulência intermediária para camundongos, foi isolada de criança com toxoplasmose ocular.

Não houve diferenças estatísticas nas curvas de mortalidade entre as duas linhagens de camundongos infectadas com qualquer uma das três cepas, reforçando o caráter de virulência das cepas já que, mesmo com diferenças imunológicas entre as linhagens, ambas se mostraram igualmente suscetíveis ou resistentes à cepa virulenta e avirulenta, respectivamente.

Fux et al. (2003) encontraram 23% e 80% de sobrevivência em camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente, com inóculo oral de 20 cistos da cepa clonal ME49. Mas, ao infectar os camundongos com a cepa atípica P-BR isolada no Brasil, obtiveram 100% de sobrevivência nas duas linhagens, reforçando o papel fundamental da cepa de *T. gondii* na letalidade de animais experimentalmente infectados.

Todavia, quando se avalia a morbidade dos animais infectados, percebe-se uma maior suscetibilidade de camundongos C57BL/6 quando comparados aos BALB/c. Aqueles apresentaram perda de peso significativamente maior do que estes quando infectados com qualquer uma das três cepas (Figuras 4, 5 e 6). Esses resultados vão de encontro à maior suscetibilidade da linhagem C57BL/6 comparada à BALB/c à infecção por *T. gondii*, já bem documentada por outros autores (McLeod et al, 1984; Liesenfeld et al.; 1996, Buzoni-Gatel et al., 2001; Fux et al., 2003; Dunay et al., 2008; Egan et al., 2011).

Interessante perceber também que, mesmo sendo considerada avirulenta e não causando manifestações clínicas em camundongos, a cepa TgCTBr5 foi capaz de causar acometimento nos animais de ambas as linhagens, já que os C57BL/6 infectados com essa cepa apresentaram perda de peso significativamente maior, entre o 10º e 22º dia de

infecção, do que os animais não infectados, além de lesões teciduais que serão discutidas mais adiante.

Após 30 dias de infecção, apenas os camundongos infectados com a cepa TgCTBr 5 sobreviveram após 30 dias e apresentaram cistos teciduais no cérebro. Destes, os pertencentes à linhagem BALB/c apresentaram maior número de cistos do que os animais C57BL/6. Resende et al. (2008), investigando o envolvimento de haplótipos d e b do complexo MHC, também encontraram maior resistência de camundongos BALB/c (haplótipo H2<sup>d</sup>) do que C57BL/6 (haplótipo H2<sup>b</sup>) para a formação de cistos, após infecção intraperitoneal com a cepa clonal ME49. Porém, ao utilizarem cepas de genótipos atípicos o resultado não se repetiu. Enquanto em algumas cepas (D8 e G2) não houve diferença estatística no número de cistos independentemente do *background* ou haplótipo do MHC, em outra cepa (P-Br), os camundongos C57BL/6 apresentaram menor número de cistos do que os animais BALB/c. Resultado semelhante já fora obtido por Fux et al. (2003) que, utilizando a mesma cepa P-Br, dessa vez com infecção oral, também encontraram maior número de cistos em BALB/c, assim como no presente estudo com a cepa TgCTBr 5. Em ambos os estudos foi concluído, então, que o papel do MHC na resistência ou suscetibilidade do hospedeiro varia conforme o genótipo da cepa de infecção.

## **6.2. Histopatologia**

Camundongos C57BL/6 exibiram um quadro inflamatório mais intenso e extenso do que animais BALB/c, resultados coincidentes com a maior suscetibilidade do primeiro em relação ao segundo, já publicada por diversos outros autores que estudaram infecções por *T. gondii* em linhagens isogênicas (McLeod et al 1984, Liesenfeld et al. 1996, Buzoni-Gatel et al. 2001, Fux et al. 2003, Dunay et al. 2008, Egan et al. 2011).

Diferenças imunológicas e genéticas entre as linhagens, como expressão de haplótipos do complexo MHC e expressão de moléculas de receptores do tipo Toll, por exemplo, já foram atribuídas à maior e mais rápida produção de citocinas Th1 por camundongos C57BL/6 (Brown & McLeod 1990, Blackwell et al. 1993, Liu et al., 2002). Essa resposta inflamatória robusta inicial poderia levar a uma resposta imunológica desregulada que causaria destruição tecidual e, assim, explicaria a maior suscetibilidade de camundongos C57BL/6 em relação ao modelo BALB/c.

Ao se comparar as cepas, percebemos lesões mais graves e extensas nos animais inoculados com a cepa TgCTBr9 do que com as demais. Isso confirma a alta virulência já descrita para esta cepa (Carneiro et al. 2013), associada aos resultados de mortalidade aqui apresentados. Além disso, ressalta-se o fato de ter sido isolada de criança que foi a óbito em decorrência de toxoplasmose congênita grave.

Apesar da inexistência de uma associação clara e conclusiva entre patogenicidade em camundongos ou genótipo atípico com gravidade de doença em humanos, os indícios aqui apresentados e já encontrados em outros trabalhos (Dardé et al 1998, Grigg et al. 2001, Ajzenberg et al. 2002, Carneiro et al. 2013) são consideráveis e merecem atenção para que estudos futuros nesse contexto possam ser realizados e resultar em prognósticos e tratamentos diferenciados para a toxoplasmose causada por cepas circulantes no Brasil.

Os resultados de histopatologia com a cepa TgCTBr5 demonstram que, apesar de nenhuma das linhagens inoculadas com essa cepa ter apresentado sinais clínicos específicos de toxoplasmose murina – pelo arrepiado, arqueamento postural ou debilidade motora –, os animais sofreram lesões teciduais consideráveis, principalmente no fígado onde foram encontrados, inclusive, áreas de necrose em animais C57BL/6

com 12 dias de infecção (Figura 7). Camundongos C57BL/6 obtiveram, também, perda de peso significativa (Figura 4B), já discutida anteriormente. Esses resultados demonstram que cepas consideradas avirulentas, mesmo não letais em camundongos, podem causar prejuízo ao hospedeiro causando, inclusive, lesões teciduais irreversíveis.

Os camundongos inoculados com a cepa TgCTBr16 exibiram resultados diferentes individualmente. Apenas dois camundongos C57BL/6 e um BALB/c apresentaram lesões teciduais dentre três de cada linhagem avaliados. Os demais camundongos se apresentaram como os animais controle, sem qualquer lesão nos órgãos. As possíveis razões para essas diferenças individuais serão discutidas mais adiante (Seção 6.3).

Quando se comparam os diferentes órgãos, o fígado e pulmões apresentaram um quadro histopatológico mais acentuado do que nos demais.

Djurković-Djaković et al. (2006) utilizando baixa dose de oito cistos teciduais de cepa clonal do tipo II, também encontraram as maiores alterações histopatológicas no fígado e nos pulmões. Estas lesões foram caracterizadas por pneumonia e pneumonite, além de inflamação portal e acinar grave no fígado, após 14 dias de infecção oral com cepas clonais do tipo II.

Silva et al. (2009) também encontraram o fígado e pulmões como órgãos mais afetados, caracterizados por infiltrados inflamatórios e focos de necrose no fígado e intensa pneumonite intersticial com aumento dos septos pulmonares, após infecção intraperitoneal em camundongos C57BL/6 *WT* e *KO* para IFN- $\gamma$ , TNFRp55 e iNOS. Os autores discutem um papel dicotômico do óxido nítrico, atribuindo a sua baixa expressão à imunopatologia no fígado, mas atribui a sua presença ao controle da inflamação no pulmão.

Unno et al (2013), desenvolvendo um método de monitoramento da taxa de infecção de células mononucleares do sangue periférico em diferentes órgãos de camundongos C57BL/6 por meio de qRT-PCR, encontraram maiores taxas de infecção dessas células em pulmão e fígado, o que poderia explicar os achados patológicos aqui descritos e pelos autores acima citados.

O fígado se mostrou muito alterado tanto em camundongos BALB/c quanto em C57BL/6 inoculados com as três cepas. Alterações degenerativas, infiltrados inflamatórios periportais e perivasculares, além de regiões de necrose em animais C57BL/6 foram encontrados (Figura 7). Mordue et al. (2001) associaram morte de camundongos infectados com cepas clonais do tipo I a lesões hepáticas. Essas lesões também se caracterizaram por alterações degenerativas de hepatócitos, além de infiltrados inflamatórios e necrose coagulativa, assim como nos nossos resultados.

Schreiner & Liesenfeld (2009) fizeram uma revisão bibliográfica sobre lesões histopatológicas inflamatórias em 51 espécies de aves e mamíferos infectados por *T. gondii* observando que o fígado tinha lesão em 93,9% dos casos analisados.

Infiltrados inflamatórios mononucleares e focos de necrose encontrados no presente estudo já foram descritos no passado como sendo resultados da multiplicação de taquizoítos nos hepatócitos e, ocasionalmente, em células de Kupffer (Frenkel 1988). Entretanto, alguns autores atribuem a patogênese no fígado à alta expressão de óxido nítrico. Camundongos KO para iNOS apresentam lesões inflamatórias menos extensas do que camundongos C57BL/6 controle (Khan et al. 1997, Silva et al. 2009).

Os pulmões dos animais inoculados estavam muito lesados, principalmente aqueles inoculados com a cepa TgCTBr9. Além de lesões inflamatórias consideráveis, os órgãos exibiram atelectasia o que poderia ter causado insuficiência respiratória. Apesar de não

podermos precisar, é provável que a *causa mortis* dos animais tenha sido a pneumonite grave. Outros autores também atribuem lesões nos pulmões à letalidade em camundongos (Frenkel 1988, Dubey et al 1998). Boyle et al. (2007) reportaram que após infecção oral por cistos de *T. gondii*, os parasitos chegam ao pulmão rapidamente, antes que outros órgãos da cavidade abdominal sejam infectados.

Sabe-se, também, que os pulmões são frequentemente afetados durante a fase aguda de toxoplasmose em pacientes humanos imunocomprometidos (Evans & Schwartzman 1991), o que mais uma vez sugere que a doença em animais de experimentação pode possuir correspondência em humanos.

Todos os animais infectados com a cepas TgCTBr5 apresentaram hiperplasia macroscópica do baço com nódulos típicos, o que é indício de uma hiperplasia esplênica reacional à infecções em geral. Entretanto, animais com 12 dias de infecção com a cepa TgCTBr9 exibiram folículos linfóides sem a arquitetura habitual, com aumento de áreas interfoliculares que não se organizaram em nódulos típicos, o que pode indicar falência imunológica, uma vez que os animais inoculados com essa cepa estavam extremamente debilitados no momento da coleta dos órgãos ao 12º dia de infecção e nenhum sobreviveu após 12 dias.

Frenkel (1988), em revisão de patofisiologia da toxoplasmose, sugere que a hiperplasia de órgãos linfóides estaria relacionada a uma hiperplasia imune e que, geralmente, pacientes humanos ou animais que morrem de toxoplasmose apresentam depleção linfocitária em tecidos linfóides.

Smiley et al. (2005) também encontraram hiperplasia macroscópica e microscópica do baço, com aumento das células epitelióides na polpa vermelha, após infecção com dez cistos teciduais da cepa ME49 em camundongos C57BL/6. Hiperplasia do baço já foi

também relacionada à formação de cistos teciduais no cérebro (Blackwell et al., 1993). Os autores discutem que a atividade imunológica nos órgãos linfoides induziria a formação de cistos em outros locais como o cérebro.

Em humanos, é bem descrita a hiperplasia de órgãos linfoides como sintoma de toxoplasmose aguda. A linfadenopatia é o principal sintoma da toxoplasmose aguda em humanos (Hill et al. 2005).

Os folículos linfoides sem a arquitetura habitual poderiam estar relacionados a uma depleção linfocitária. Segundo Frenkel (1988), humanos e animais que estão prestes a morrer por toxoplasmose aguda apresentam falência imunológica caracterizada por depleção linfocitária.

Camundongos inoculados com as cepas TgCTBr5 e TgCTBr9 apresentaram alterações discretas no íleo. Essas alterações se caracterizavam por edemas discretos e aumento de celularidade. As lesões letais no íleo, já descritas por outros autores (Liesenfeld et al. 1996, Liesenfeld et al. 1999), não foram encontradas em nosso estudo. No entanto, dos três animais de cada linhagem infectados com a cepa TgCTBr16, dois C57BL/6 e um BALB/c apresentaram lesões mais graves, como destruição de vilosidades e infiltrado inflamatório mais intenso (Figura 13).

Essas lesões são, a nível tecidual, similares às encontradas por Liesenfeld et al (1996) com a cepa ME49, apesar de em menores proporções. Além do mais, os autores mencionados encontraram essas lesões com sete dias após infecção, enquanto nos resultados aqui apresentados, as lesões são menos graves com sete dias e mais proeminentes aos 12 dias de infecção. Diferente também, foi a observação de lesões graves no íleo de camundongos BALB/c infectados com a cepa TgCTBr16, ao passo que Liesenfeld et al. (1996) não obtiveram ileíte em BALB/c.

Dubey et al (2012) também encontraram ileíte em camundongos BALB/c, após infecção oral por oocistos de cepas clonais. Segundo os próprios autores em outro estudo (Dubey et al. 2010), infecções por oocistos em animais são mais graves do que por cistos, o que poderia ter provocado na linhagem BALB/c, a mesma enterite letal vista em C57BL/6. Resultado esse que não explica o aparecimento de ileíte em um camundongo BALB/c no presente estudo, o que nos leva a crer que a cepa usada na infecção possui papel importante na indução de lesões.

Smiley et al (2005), após inóculo oral de dez cistos da cepa ME49 em animais C57BL/6 também encontraram enterite discreta com pequeno aumento de celularidade na lâmina própria e descamação ocasional de vilosidades, mas sem sinal de necrose, infiltrados intensos ou destruições extensas de vilosidades. Djurković-Djaković et al. (2006), após infecção oral com oito cistos de cepa ME49 em camundongos não isogênicos, também não encontraram lesões significativas no intestino após 7 dias. Os autores discutem que a ausência de lesões intestinais se deve, sobretudo, ao tempo de dissecação, uma vez que as lesões no íleo se dariam nos primeiros dias. Em contrapartida, Liesenfeld et al (1996, Liesenfeld et al. 1999) encontraram lesões graves nos animais mesmo com 7 dias, o que vai contra à conclusão acima, porém utilizando camundongos mais suscetíveis – C57BL/6 – e dose infectante de 100 cistos teciduais por animal.

A importância da dose de inóculo também foi demonstrada por Fux et al. (2003). Com doses de 4, 20 ou 100 cistos da cepa ME49, os autores encontraram mortalidade de 67%, 100% e 100%, respectivamente, em camundongos C57BL/6. A gravidade das lesões intestinais correlacionou diretamente à dose de inóculo. Interessantemente, porém, quando a cepa utilizada foi a atípica P-Br, somente houve mortalidade em animais inoculados com 100 cistos (34% em BALB/c e 10% em C57BL/6) e nenhuma das duas linhagens de camundongos apresentou lesões intestinais significativas. Esses

resultados reforçam a grande importância da cepa na indução de lesões, independentemente da dose inoculada.

Assim, a observação de camundongos inoculados com as cepas TgCTBr5 e TgCTBr9 apresentando lesões apenas discretas no íleo e animais inoculados com a cepa TgCTBr16 apresentaram alterações mais significativas sugere que aspectos intrínsecos das cepas são fundamentais na indução de danos teciduais ao hospedeiro infectado. Conclusão esta, que é corroborada por vários outros autores já mencionados que também encontraram variação na inflamação intestinal de acordo com a cepa utilizada, independente de linhagem de camundongo ou dose de inóculo (Fux et al. 2003, Resende et al. 2008, Dubey et al. 2012).

Melo et al. (2011) revisaram alelos de genes que expressam proteínas associadas à virulência (ROP5, ROP16, ROP18 e GRA15) de cepas clonais e os associaram com a capacidade de retardar ou superestimular uma resposta Th1 do hospedeiro, dependendo da combinação desses alelos. Cepas clonais do tipo I apresentam combinação de alelos dessas proteínas que se acredita reduzir a produção inicial de citocinas pró-inflamatórias que culminam com a morte do hospedeiro por carga elevada de parasitos.

Da mesma maneira, cepas de genótipo clonal do tipo II (como a cepa ME49) possuem combinação de alelos dos mencionados genes capaz de induzir prematuramente uma alta resposta inflamatória no intestino delgado, letal para camundongos C57BL/6. Utilizando a mesma linhagem de camundongo, bem como a mesma rota de infecção e forma evolutiva do parasito, nenhuma das três cepas do estudo foi capaz de induzir a mesma ileíte letal encontrada no modelo com a cepa ME49. Esses resultados nos indicam que, possivelmente, nenhuma das cepas do presente estudo compartilha a mesma combinação dos alelos dos genes ROP5, ROP16, RP18 e GRA15 com cepas

clonais do tipo II, responsáveis pela indução de ileíte letal para os animais, apesar de, obviamente, apenas o estudo desses segmentos nas cepas deste estudo seria capaz de confirmar essa sugestão.

Pesquisas futuras no tocante à expressão dessas proteínas efetoras em cepas de genótipos atípicos abririam novos caminhos para o entendimento de fatores do parasito relacionados à sua patogenicidade.

Nenhum camundongo infectado com qualquer uma das cepas apresentou alterações patológicas significativas no cérebro. A ausência de lesões cerebrais durante a fase aguda da toxoplasmose após infecção oral em camundongos também já foi observada em outros trabalhos (Liesenfeld et al. 1996, Smiley et al. 2005, Djurković-Djaković et al. 2006, Mordue et al. 2011, Dubey et al. 2012). Por ser um local imunologicamente privilegiado, acredita-se que o cérebro seja o último órgão a ser atingido pelos taquizoítos. A barreira hematoencefálica atrasa o influxo de células infectadas, mediadores de inflamação e anticorpos ao cérebro, que passa a ter maior importância patológica na fase crônica da infecção (Frenkel 1988, Dubey et al. 2012)

### **6.3. Infectividade da cepa TgCTBr16 pela via intraperitoneal e suscetibilidade dos bradizoítos à digestão péptica**

Os resultados obtidos em camundongos inoculados com a cepa TgCTBr16 demonstraram que essa cepa apresenta características biológicas distintas das demais. Enquanto todos os animais inoculados com as cepas TgCTBr5 e TgCTBr9 se infectaram por *T. gondii* – comprovada pela mortalidade, sorologia ou presença de cistos nos sobreviventes após 30 dias –, curiosamente, os animais sobreviventes após 30 dias infectados com a cepa TgCTBr16 não apresentaram cistos teciduais no cérebro e apenas um entre os dezesseis sobreviventes avaliados por ELISA (6,25%) apresentou

sorologia positiva para IgG anti-*T. gondii* (Tabela 5). Além disso, nos estudos de histopatologia, apenas um BALB/c e dois C57BL/6, dentre os seis de cada linhagem avaliados em dois experimentos, apresentaram acometimento tecidual. Esses resultados em conjunto demonstraram, portanto, uma baixa infectividade da cepa TgCTBr16.

Para avaliar se essa baixa infectividade foi devida à rota oral de infecção, foram realizados novos experimentos com inoculações pelas vias oral e intraperitoneal em animais de ambas as linhagens com a mesma dose de 10 cistos teciduais. Metade dos camundongos C57BL/6 e 25% de animais BALB/c se infectaram com inóculo intraperitoneal, comprovados por mortalidade, pesquisa de parasitos e ELISA. Nenhum animal se infectou com inóculo oral, comprovado por sorologia e bioensaios negativos, além de ausência de parasitos no cérebro, após 30 dias (Tabela 6). Esses resultados demonstraram que, apesar de ambas as rotas terem apresentado baixa infectividade na infecção, a rota intraperitoneal se mostrou mais infectiva do que a oral.

Sabe-se que, quando ingeridos, os cistos teciduais de *T. gondii* sofrem ação ácida de enzimas digestivas que rompem a parede cística e liberam os bradizoítos. Segundo Jacobs et al. (1960), a parede cística se dissolve imediatamente após digestão ácida por pepsina, porém os bradizoítos podem sobreviver por até 90 minutos. Sendo assim, para saber se os bradizoítos da cepa TgCTBr16 possuem baixa resistência à digestão ácida, camundongos de ambas as linhagens foram inoculados via i.p. com dez cistos da cepa TgCTBr16, os quais sofreram tratamento prévio *in vitro* por 60 minutos com pepsina em meio ácido (Dubey 1997b).

Nenhum animal de ambas as linhagens apresentou positividade para infecção por *T. gondii*, seja por mortalidade, sorologia ou presença do parasito, após inóculo i.p. com cistos da cepa TgCTBr16 tratados pela pepsina. Esses resultados sugerem que

bradizoítos desta cepa são, pelo menos em parte, suscetíveis à digestão por pepsina, uma vez que a taxa de infecção foi maior nos inóculos i.p. com cistos sem tratamento enzimático em meio ácido.

Fux et al (2007), relacionaram a baixa infectividade de algumas cepas de *T. gondii* pela via oral à inabilidade da cepa formar cistos grandes e em grande número, devido a uma baixa capacidade de resposta em ambientes de estresse, tais como durante a resposta imunológica do hospedeiro, o que explicaria baixa transmissão entre hospedeiros intermediários. Essa hipótese corrobora nossos resultados, uma vez que em todos os animais sobreviventes após 30 dias não foram encontrados cistos teciduais da cepa TgCTBr16 (Tabelas 5 e 6).

Também não pode ser descartada a possibilidade de que a cepa TgCTBr16, após 2 a 3 meses de infecção, continue a produzir preferencialmente grupos de taquizoítos no cérebro de camundongos infectados, ao invés de cistos teciduais com bradizoítos. Estes taquizoítos resultariam em baixa infectividade via oral por serem destruídos pela digestão. Experimentos adicionais de imunistoquímica utilizando marcadores específicos para taquizoítos (anticorpo anti-SAG1) e para bradizoítos (anticorpo anti-BAG1) poderão auxiliar na elucidação dessa questão.

Su et al (2003) sugerem que a infectividade oral por cistos teciduais entre hospedeiros intermediários é um caráter recente na evolução de *T. gondii* e que garantiu vantagem seletiva às cepas que o adquiriram. Os autores, testando inoculações orais de cistos teciduais em diferentes cepas, obtiveram variada taxa de infectividade oral (0 a 100%) com cepas atípicas e, somadas a estudos de taxa de frequência de polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs), concluíram que cepas pouco infectantes são ancestrais às linhagens clonais que apresentam, em geral, 100% de infectividade pela via oral. Os

autores concluem que cepas de genótipos clonais adquiriram esse caráter recentemente na evolução por meio de intercruzamentos com cepas ancestrais que, combinando polimorfismos, possibilitaram a transmissão do parasito entre os hospedeiros intermediários, fator primordial que possibilitou a expansão desses genótipos clonais, predominantes no Hemisfério Norte. Além disso, o fato de que outros Coccídios próximos evolutivamente de *T. gondii*, tais como os protozoários dos gêneros *Hammondia* e *Neospora*, também não apresentam infectividade entre hospedeiros intermediários (Dubey 2009), corrobora o caráter recente desse traço, inexistentes em algumas cepas de genótipos atípicos que mantiveram traços ancestrais.

Mesmo não sendo possível afirmar que a baixa infectividade da cepa TgCTBr16 pela via oral em camundongos possa se repetir em outros hospedeiros intermediários como humanos e, mesmo sabendo que a capacidade de infecção pela rota oral existe para esta cepa (apesar de baixa), pensamos ser relevante a hipótese de que, provavelmente, a gestante se infectou pela ingestão de oocistos em água ou alimento contaminado. Em seguida, teria ocorrido ruptura da barreira transplacentária pelos taquizoítos e contaminação da criança da qual essa cepa foi isolada. Essa suposição encontra suporte no fato de que no Brasil, os hospedeiros estão mais expostos a oocistos do que em outros países (Dubey & Su 2009).

## 7. CONCLUSÕES

- Camundongos C57BL/6 apresentam maior suscetibilidade do que animais pertencentes à linhagem BALB/c à infecção por cepas atípicas de *T. gondii*;
- Lesões histopatológicas após infecção com baixa dose de cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* apresentam maior acometimento tecidual durante a segunda semana do que nos primeiros sete dias;
- Fígado e pulmão são os órgãos mais afetados após infecções experimentais em camundongos BALB/c e C57BL/6 com cepas atípicas de *T. gondii* e suas lesões estão provavelmente associadas à morte dos animais;
- As lesões teciduais encontradas em animais de experimentação têm correspondência com lesões já descritas em humanos;
- Cistos teciduais da cepa TgCTBr16 apresentam baixa infectividade em camundongos e a rota oral de transmissão se mostrou menos infectiva do que a intraperitoneal.
- A estrutura genética da cepa de *T. gondii* tem papel fundamental na indução de lesões inflamatórias intestinais.
- Cepas de *T. gondii* pertencentes a genótipos atípicos induzem lesões teciduais em camundongos isogênicos similares às aquelas encontradas em animais infectados com cepas de genótipos clonais.
- Mesmo apresentando mesmo genótipo, cepas de *T. gondii* podem apresentar diferenças biológicas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières MH, Thulliez P, Filisetti D, Pelloux H, Marty P, Dardé ML 2002. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 186(5): 684-9.

Arantes RM, Nogueira AM 1997. Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell Tissue Res* 290(1): 61-9.

Barragan A, Sibley D 2003. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 11(9): 426-30.

Blackwell JM, Roberts CW, Alexander J 1993. Influence of genes within the MHC on mortality and brain cysts development in mice infected with *Toxoplasma gondii*: kinetics of immune regulation in BALB H-2 congenic mice. *Parasite Immunol.* 15(6): 317-24.

Boothroyd JC, Grigg ME 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 5(4): 438-42.

Boyle JP, Saeij JP, Boothroyd JC 2007. *Toxoplasma gondii*: inconsistent dissemination patterns following oral infections in mice. *Exp Parasitol* 116(3): 302-5.

Brandão GP, Melo MN, Gazzinelli RT, Caetano BC, Ferreira AM, Silva LA, Vitor RW 2009. Experimental reinfection of BALB/c mice with diferente recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: involvement of INF-gamma and IL-10. *Mem Inst Oswald Cruz* 104(2): 241-5.

Brandão GP, Melo MN, Caetano BC, Carneiro CM, Silva LA, Vitor RW 2011. Susceptibility to re-infection in C57BL/6 mice with recombinant strains of *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol.* 128(4): 433-7.

Brown CR, McLeod R 1990. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol.* 145(10): 3438-41.

Buzoni-Gatel D, Debbai H, Mennechet FJ, Martin V, Lepage AC, Schwartzman JD, Kasper LH 2001. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120(4): 914-24.

Carneiro AC, Andrade GM, Costa JG, Pinheiro BV, Vasconcelos-Santos DV, Ferreira AD, Su C, Januário JN, Vitor RW 2013. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii*

revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 51: 3901-7.

Chai JY, Lin A, Shin EH, Oh MD, Han ET, Nan HW, Lee SH 2003. Laboratory passage and characterization of an isolate of *Toxoplasma gondii* from an ocular patient in Korea. *Korean J Parasitol* 41(3): 147-54.

Clementino Andrade MM, Pinheiro BV, Cunha MM, Carneiro AC, Andrade Neto VF, Vítor RW 2013. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. *Res Vet Sci* 94(3): 587-9.

Dardé ML Villena I, Pinon JM, Bequinet I 1998. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guyana. *J Clin Microbiol* 36(1): 324.

Dardé ML 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanità*, 40(1): 57-63.

Djurković-Djaković O, Klun I, Khan A, Nikolic A, Knezevic-Usaj S, Bobic B, Sibley LD 2006. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes Infect* 8(8): 2206-12.

Dobrowolski JM, Sibley LD 1996. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 22;84(6): 933-9.

Dubey JP, Beattie CP 1988. *Toxoplasmosis of animal and humans*. Boca Raton. FL: CRC Press. 220p.

Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OC, Blixt JA. 1997a. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Journal of Parasitology* 83, 870–882.

Dubey JP 1997b. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 44(6): 592-602.

Dubey JP, Sundar N, Hill D, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OC, Majumdar D, Su, C 2008. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int J Parasitol* 38(8-9): 999-1006.

Dubey JP 2009. The evolution of the knowledge of cat and dog coccidian. *Parasitology* 136, 1469–1475.

Dubey JP 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2<sup>nd</sup> Edn. Boca Raton. FL: CRC Press.

Dubey JP, Velmurugan GV, Rajendran C, Yabsley MJ, Thomas NJ, Beckmen KB, Sinnott D, Ruid D, Hart J, Fair PA, McFee WE, Shearn-Bochsler V, Kwok OCH,

- Ferreira LR, Choudhary S, Faria EB, Zhou H, Felix TA, Su C 2011. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int J Parasitol.* 41(11): 1139-47.
- Dubey JP, Ferreira LR, Martins J, McLeod R 2012. Oral oocysts-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitology* 139(1): 1-13.
- Dunay IR, Damatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, Colonna M, Sibley LD 2008. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29(2): 306-17
- Egan CE, Maurer KJ, Cohen SB, Mach M, Simpson KW, Denkers EY 2011. Synergy between intraepithelial lymphocytes and lamina propria T cells drives intestinal inflammation during infection. *Mucosal Immunol* 4(6): 658-70.
- Elsheikha HM 2008. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. *Public Health* 122(4): 335-53.
- Evans TG, Schwartzman JD 1991. Pulmonary toxoplasmosis. *Semin Respir Infect* 6(1): 51-7.
- Fentress SJ, Steinfeldt T, Howard JC, Sibley LD 2012. The arginine-rich N-terminal domain ROP18 is necessary for vacuole targeting and virulence of *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol* 14(12): 1921-33
- Ferreira AM, Vitor RW, Gazzinelli RT, Melo MN 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 6(1): 22-31.
- Frenkel JK 1988. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today* 4(10): 273-8.
- Fux B, Rodrigues CV, Portela RW, Silva NM, Su C, Sibley D, Vitor RW, Gazzinelli RT 2003. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 71(11): 6392-401.
- Fux B, Nawas J, Khan A, Gill DB, Su C, Sibley LD 2007. *Toxoplasma gondii* strains defective in oral transmission are also defective in developmental stage differentiation. *Infect Immun.* 75(5): 2580-90.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A 1994. *J Immunol* 153(6): 2533-43.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Scharon-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A 1996. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely

infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. J Immunol. 157(2): 798-805.

Gilbert R 2009. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(2): 305-311.

Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP 2001. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. J Infect Dis 184(5): 633-9.

Guiton R, Vasseur V, Charron S, Arias MT, Van Langendonck N, Buzoni-Gatel D, Ryffel B, Dimier-Poisson I 2010. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. J Infect Dis, 202(3): 427-35.

Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, Niebergall J, Jahn HK, Dunay IR, Moter A, Gescher DM, Schumann RR, Göbel UB, Liesenfeld O 2006. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol 177(12): 8785-95.

Hill D, Chirukandoth S, Dubey JP 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev. 6(10). 41-61 Review.

Howe DK, Sibley LD 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages, correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis, 172(6): 1561-1566.

Hunter CA, Sibley LD 2012. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. Nat Rev Microbiol. 10 (11): 768-78.

Jones J, Lopez A, Wilson M 2003. Congenital Toxoplasmosis. Am Fam Physician 15;67(10): 2131-8.

Kaneko Y, Takashima Y, Xuan X, Igarashi I, Nagasawa H, Mikami T. Natural IgM antibodies in sera from various animals but not the cat kill *Toxoplasma gondii* by activating the classical complement pathway. Parasitology 2004; 128(2): 123-9.

Kaufman HE, Hemington JS, Jacobs L 1958. Toxoplasmosis: the nature of virulence. Am J Ophthalmol. 46 (5 Part 2): 255-60.

Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, Moretto M, Khan IA 2005. Interleukin-17/interleukin 17 receptor-mediated signaling is important for generation an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. Infect Immun, 73(1): 617-21.

Kim SK, Fouts AE, Boothroyd JC 2007. *Toxoplasma gondii* disregulates INF-gamma-inducible gene expression in human fibroblast: insights from a genome-wide transcriptional profiling. J Immunol. 178(8): 5154-65.

Levine ND 1988. The protozoan phylum apicomplexa. CRC Press, 2v. ISBN 0-8493-4652-5.

- Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y 1996. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 184(2): 597-607.
- Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nquyen TA, Parkhe CV, Watanabe H, Abo T, Sher A, Remington JS, Suzuki Y 1999. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 21(7): 365-76.
- Liu T, Mastsuguchi T, Tsuboi N, Yajima T, Yoshikai Y 2002. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect Immun.* 70(12): 6638-45.
- Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-75.
- Luft BJ, Conley F, Remington JS, Laverdiere M, Wagner KF, Levine JF, Craven PC, Strandberg DA, File TM, Rice N, Meunier-Carpentier F 1983. Outbreak of central-nervous system toxoplasmosis in western Europe and North America. *Lancet* 1(8328): 781-4.
- McLeod R, Estes RG, Mack DG, Cohen H 1984. Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of toxoplasma infection acquired by ingestion. *J Infect Dis.* 149(2): 234-44.
- Melo MB, Jensen KD, Saeij JP 2011. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol* 27(11): 787-95.
- Minns LA, Menard LC, Foureau DM, Darche S, Ronet C, Mielcarz DW, Buzoni-Gatel D, Kasper LH 2006. TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 176(12): 7589-97.
- Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *Seminars.* 363:1965-76.
- Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med* 190(12): 1783-92.
- Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD 2001. Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. *J Immunol.* 15; 167 (8): 4574-84.
- Pacheco-Soares C, de Souza W 2000. Labeled probes inserted in the macrophage membrane are transferred to the parasite surface and internalized during cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 86(1): 11-7.

- Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 38: 561-69.
- Peng HJ, Chen XG, Lindsay DS 2011. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *J Parasitol* 97(4): 620-8.
- Pfefferkorn ER 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(3): 908-12.
- Rachinel N, Buzoni-Gatel D, Dutta C, Mennechet FJ, Minns LA, Grigg ME, Tomavo S, Boothroyd JC, Kasper LH 2004. The induction of acute ileitis by a single microbial antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 173(4): 2725-35.
- Reiner SL, Locksley RM 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol.* 13: 151-77.
- Resende MG, Fux B, Caetano BC, Mendes EA, Silva NM, Ferreira AM, Melo MN, Vitor RWA, Gazzinelli RT 2008. The role of MHC haplotypes H2d/H2b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. *An Acad Bras Cienc.* 80(1): 85-99.
- Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley LD 2004. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J Immunol* 172(6) 3686-94.
- Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Giser RA, Jensen KD, Saeij JP 2011. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J Exp Med* 208(1): 195-212.
- Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol* 21(10): 476-81.
- Saeij JP, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC 2005. Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infect Immun* 73(2): 695-702.
- Saeij, Saeij JP, Coller S, Boyle JP, Jerome ME, White MW, Boothroyd JC 2007. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445, 324–327.
- Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A 1997. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med* 185(7): 1261-73.

- Schreiner M, Liesenfeld O 2009. Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: review of 70 reports from the literature. Mem Inst Oswaldo Cruz 104(2): 221-33.
- Silva NM, Vieira JC, Carneiro CM, Tafuri WL 2009. *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. Exp Parasitol 123(1): 65-72.
- Silva RC, Langoni H, Su C, Silva, AV 2011. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. Vet Parasitol. 175(1-2): 173-7.
- Smiley ST, Lanthier PA, Couper KN, Szaba FM, Boyson JE, Chen W, Johnson LL 2005. Exacerbated susceptibility to infection-stimulated immunopathology in CD1d-deficient mice. J Immunol. 174(12): 7904-11.
- Steinfeldt T, Könen-Waisman S, Tong L, Pawlowski N, Lamkemeyer T, Sibley LD, Hunn JP, Howard JC 2010. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. PLoS Biol 8(12): e1000576.
- Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD 2003. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. Science. 299(5605): 414-6.
- Su C, Zhang X, Dubey JP 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. Int J Parasitol. 36(7): 841-8.
- Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. Parasitology 137(1): 1-11.
- Suzuki Y, Sher A, Yap G, Park D, Neyer LE, Liesenfeld O, Fort M, Kang H, Gufwoli E 2000. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol 164(10): 5372-82.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiis ML 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 30: 1217-58.
- Unno A, Kachi S, Batanova TA, Ohno T, Elhawary N, Kitoh K, Takashima Y 2013. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-infected peripheral blood mononuclear cells are enriched in lungs and liver. Exp Parasitol. 134(2): 160-4.
- Velumurugan GV, Su C, Dubey JP 2009. Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in United States. J Parasitol 95(1): 95-9.

## ANEXO



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 266 / 2012, relativo ao projeto intitulado “Caracterização biológica de três isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de casos humanos de toxoplasmose congênita: análise histopatológica”, que tem como responsável RICARDO WAGNER DE ALMEIDA VITOR, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 08/11/2012. Este certificado espira-se em 08/11/2017.

### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 266 / 2012, related to the Project entitled “Biological characterization of three strains of *Toxoplasma gondii* obtained from human cases of congenital toxoplasmosis: histological analysis”, under the supervision of RICARDO WAGNER DE ALMEIDA VITOR, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 08/11/2012. This certificate expires in 08/11/2017.

**FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS**

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 08/11/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

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

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