



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós- Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Infecção experimental de *Calomys callosus* pelas cepas brasileiras TgChBrUD1 ou TgChBrUD2  
de *Toxoplasma gondii* e avaliação da toxoplasmose congênita em fêmeas cronicamente infectadas  
com a cepa ME-49

PRISCILA SILVA FRANCO

UBERLÂNDIA

Novembro – 2014



Novembro – 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós- Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Infecção experimental de *Calomys callosus* pelas cepas brasileiras TgChBrUD1 ou TgChBrUD2  
de *Toxoplasma gondii* e avaliação da toxoplasmose congênita em fêmeas cronicamente infectadas  
com a cepa ME-49

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de  
Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas como requisito parcial para obtenção  
do título de Doutor.

PRISCILA SILVA FRANCO

Orientadora: Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

UBERLÂNDIA

Novembro – 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

F825i Franco, Priscila Silva, 1985-  
2014 Infecção experimental de *Colomys callosus* por cepas brasileiras  
TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 de *Toxoplasma gondii* e avaliação da  
toxoplasmose congênita em fêmeas cronicamente infectadas com a cepa  
ME-49 / Priscila Silva Franco. – 2014.

100 f. : il.

Orientadora: Eloisa Amália Vieira Ferro.

Coorientador: José Roberto Mineo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de  
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Toxoplasmose congênita - Teses. 3. Infecção -  
Teses. I. Ferro, Eloisa Amália Vieira. II. Mineo, José Roberto. III.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017



Priscila Silva Franco

“Infecção experimental de *Calomys callosus* pelas cepas brasileiras TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 de *Toxoplasma gondii* e avaliação da toxoplasmose congênita em fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 28 de novembro de 2014.

Profa. Dra. Idessania Nazareth da Costa  
UEL

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia  
UEL

Profa. Dra. Neide Maria da Silva  
ICBIM/UFU

Dra. Angelica de Oliveira Gomes  
PÓS-DOC/UFU

Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro – orientadora  
ICBIM/UFU

### *Dedicatória*

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Edriane Silva Costa Franco** e **Marcelo Teixeira Franco**, aos meus tios **Eder Silva Costa** e **Elilian Costa Silva Malta**, ao meu namorado **Henrique Tomaz Gonzaga** e à minha orientadora **Eloisa Amália Vieira Ferro**. Pessoas essenciais nesta trajetória tão importante da minha vida. Obrigada pela dedicação, paciência, ensinamentos, confiança, carinho e cuidado. A elas, toda a minha gratidão!*

*“Se queremos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova.” (Mahatma*

*Gandhi)*

*“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”*

*(Isaac Newton)*

### *Agradecimentos*

***Sobretudo a Deus, por minha vida, pela proteção e por Ele ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho***

À minha orientadora, **Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro**, pela oportunidade e confiança de trabalhar no seu laboratório durante todos esses anos. Muito obrigada pela autonomia que sempre me deu para desenvolver este trabalho, por participar da minha formação acadêmica e me proporcionar tantas conquistas.

Ao meu co-orientador, **Profº Dr. José Roberto Mineo**, pelas sugestões, correções e ajuda na concretização do doutorado Sanduíche nos Estados Unidos.

À **Profa. Dra. Idessania Nazareth da Costa**, pelos ensinamentos e amizade.

Ao **Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo** pela indicação do Prof. Dr. Chunlei Su para ser meu orientador no doutorado Sanduíche;

À **Profº Dra. Neide Maria da Silva e Deise Aparecida de Oliveira Silva**, pela colaboração e disponibilidade em me ajudar.

Ao **Dr. Lourenço Faria Costa** pela ajuda com as reações de PCR.

Ao **Prof. Dr. Chunlei Su** por ter me recebido em seu laboratório e ter me ensinado a técnica de genotipagem de *T. gondii*.

Aos meus avós pelo carinho, dedicação e incentivo.

Aos meus pais pelo exemplo de vida e educação. Obrigada por me proporcionar o estudo e por me incentivar em todos os momentos.

Aos meus tios, **Eder Silva Costa e Elilian Costa Silva Malta**, por sempre me incentivarem a estudar e terem contribuído para a minha formação acadêmica. Muito obrigada!

Ao meu namorado **Henrique Tomaz Gonzaga** pela paciência, amor, apoio e exemplo. São muitos anos juntos e de aprendizado pessoal. Obrigada por estar sempre comigo!

À minha irmã **Polliana Silva Franco** e minha prima **Laís Costa Malta** pelo apoio e companheirismo. Obrigada por estarem sempre presentes!

À minha tia **Dalva Barbosa da Costa** e minha sogra, **Maria Helena Tomaz Gonzaga**, pelo carinho, orações e ajuda constante.

Às minhas queridas amigas **Andressa da Silva Castro e Lourdes Maria Campos Corrêa** pelo atenção, cuidado e carinho. Vocês me ajudaram muito no período que estive fora. Muito obrigada!

À **Angelica de Oliveira Gomes, Bellisa de Freitas Barbosa, Mariana Bodini Angeloni, Letícia de Souza Castro Filice, Pâmela Mendonça Guirelli, Mayara Ribeiro, Janice Buiate Lopes Maria, Rafaela José da Siva, Celene Maria de Oliveira Simões Alves, Karine Cristine de Almeida, Renata Lima de Miranda** pela amizade, ajuda e sugestões. Muito mais que “companheiras de laboratório”, vocês se tornaram grandes amigas.

Aos meus amigos que fiz nos EUA, **Flávia Pereira Vieira, Shirley Mesquita, Luiz Daniel Barros, e Lauren Michaels** pela, companhia, convivência e aprendizado. Vocês foram a minha família em Knoxville.

Às secretárias da pós-graduação, **Luceleide de Freitas Queiroz Damasio e Lucélia da Costa Assi**, pelo apoio e atenção dedicados a mim.

À **CAPES, FAPEMIG e CNPq**, pelo apoio financeiro, em especial à **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2. Cepas e polimorfismo genético de <i>Toxoplasma gondii</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Toxoplasmose.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4 Toxoplasmose congênita.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5. Resposta imune.....</b>	<b>23</b>
<b>1.6. Transmissão vertical de <i>Toxoplasma gondii</i> em gestantes imunocompetentes.....</b>	<b>25</b>
<b>1.7. <i>Calomys callosus</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Animais e aspectos éticos.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Manutenção da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3. Manutenção das cepas RH, TgChBrUD1 (UD1) e TgChBrUD2 (UD2) de <i>T. gondii</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4. Grupos experimentais.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.1. Avaliação da infecção com a cepa UD1 ou UD2 em machos e fêmeas de <i>Calomys callosus</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.2. Avaliação da reinfecção com a cepa UD1 ou UD2 em fêmeas cronicamente infectadas pela cepa ME-49.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.3. Avaliação da reinfecção com a cepa UD1 ou UD2 em fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5. Imunohistoquímica.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6. Bioensaio.....</b>	<b>34</b>
<b>3.7. Extração de DNA.....</b>	<b>34</b>
<b>3.8. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) .....</b>	<b>35</b>
<b>3.9. Reação em Cadeia pela Polimerase-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP).....</b>	<b>36</b>
<b>3.9.1. Multiplex PCR (1<sup>a</sup> PCR).....</b>	<b>36</b>

<b>3.9.2. Nested PCR (2<sup>a</sup> PCR).....</b>	<b>37</b>
<b>3.9.3. RFLP.....</b>	<b>37</b>
<b>3.10. Ensaio Imunoenzimático.....</b>	<b>37</b>
<b>3.10.1. ELISA indireto.....</b>	<b>38</b>
<b>3.10.2. ELISA tipo sanduíche.....</b>	<b>38</b>
<b>3.11. Análise estatística.....</b>	<b>40</b>
<b>3.12. Normas de Biossegurança e manipulação de animais.....</b>	<b>40</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Susceptibilidade de machos e fêmeas à infecção com a cepa UD1 ou UD2.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.1. Mortalidade.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.2. Alteração do peso corporal.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.3. Morbidade.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.4. Parasitismo tecidual no fígado, baço e cérebro de machos e fêmeas infectados com a cepa UD1 ou UD2.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2. Susceptibilidade de fêmeas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfetadas com a cepa UD1 ou UD2.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3. Susceptibilidade de fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfetadas com a cepa UD1 ou UD2.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3.1. Mortalidade e morbidade.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3.2. Resultado da gestação.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4. Transmissão vertical de <i>T. gondii</i> em fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfetadas com a cepa UD1 ou UD2.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5. Parasitismo tecidual em fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e/ou reinfetadas com a cepa UD1 ou UD2.....</b>	<b>45</b>
<b>4.6. Genotipagem de <i>T. gondii</i> em tecidos infectados de fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e/ou reinfetadas com a cepa UD1 ou UD2.....</b>	<b>46</b>
<b>4.7. 5.7. Resposta imune celular – dosagem de citocinas.....</b>	<b>47</b>
<b>4.8. Resposta imune humoral.....</b>	<b>48</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>

<b>7. FIGURAS.....</b>	<b>59</b>
<b>8. TABELAS.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIA .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>100</b>

## Resumo

Existe uma diversidade genética significativa de cepas e isolados de *Toxoplasma gondii* no Brasil. Em Uberlândia, Minas Gerais, recentemente, foram encontradas duas cepas em amostras provenientes de galinhas e então denominadas TgChBrUD1 e TgChBrUD2. A toxoplasmose congênita resulta, principalmente da infecção materna primária durante a gestação, mas pode ocorrer em casos de reinfecção. *Calomys callosus* é um bom modelo experimental para estudar diferentes aspectos da infecção por *T. gondii*. O presente estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade de *C. callosus* quando infectados com as cepas brasileiras TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 de *T. gondii*, determinar a susceptibilidade de fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com as cepas brasileiras e verificar a transmissão vertical do parasito após a reinfecção. Para avaliação da sobrevivência, machos e fêmeas foram infectados, intraperitonealmente, com 100 taquizoítas das cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 e monitorados diariamente. Ensaios de imuno-histoquímica e qPCR foram realizados para determinar o parasitismo no fígado, baço e cérebro. Machos e fêmeas foram susceptíveis à infecção, porém as fêmeas foram mais susceptíveis à cepa TgChBrUD1 e os machos à cepa TgChBrUD2. Para avaliação da sobrevivência em fêmeas cronicamente infectadas após a reinfecção, *C. callosus* foram infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com as cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 e monitoradas para avaliar a sobrevivência. Todas as fêmeas sobreviveram após a reinfecção. A transmissão vertical foi analisada em fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 no primeiro dia de gestação. No 19º dia de gestação, placenta, útero e fetos, foram processados para a detecção de parasitos. Avaliou-se a reabsorção fetal, resposta imune celular e humoral. Parasitos foram detectados nas placenta e fetos após reinfecção com ambas as cepas brasileiras. As fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD2 apresentaram maior número de reabsorção fetal. Estes animais apresentaram também altos níveis de citocinas próinflamatórias, IL-10 e anticorpos IgG2a. Em conclusão, nossos resultados mostraram que *C. callosus* são suscetíveis à ambas as cepas brasileiras de *T. gondii*. Além disso, a reinfecção causou a reativação da infecção pela cepa ME-49 e a resposta imune desenvolvida na primoinfecção não foi capaz de proteger contra a toxoplasmose congênita após a reinfecção com as cepas brasileiras TgChBrUD1 ou TgChBrUD2.

Palavras-chave: *Calomys callosus*, toxoplasmose congênita, reinfecção, cepas brasileiras

## Abstract

There is a significant genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Two parasite strains were recently isolated from chicken in Uberlândia city, Minas Gerais state, which were named TgChBrUD1 and TgChBrUD2. Congenital toxoplasmosis results mainly from primary maternal infection during pregnancy, but can be occasionally caused by reinfection. *Calomys callosus* is a suitable experimental model to study different features of *T. gondii* infection. The present study aimed to evaluate the *C. callosus* susceptibility when infected with Brazilian *T. gondii* strains, determine whether females chronically infected with ME-49 strain is susceptible to reinfection with Brazilian strain and if reinfection may cause vertical transmission of the parasite. Male and female were intraperitoneally infected with TgChBrUD1 or TgChBrUD2 tachyzoites and monitored to evaluate the survival. Immunohistochemical assay and qPCR were performed to determine the parasitism in liver, spleen and brain. Males and females are susceptible to infection, but the females were more susceptible to TgChBrUD1 strain and the males to TgChBrUD2 strain. Non-pregnant females were chronically infected with ME-49 and reinfected with TgChBrUD1 or TgChBrUD2 strain and monitored to evaluate the survival. All non-pregnant females survived after reinfection. The vertical transmission was analyzed by reinfection with TgChBrUD1 or TgChBrUD2 strain in the first day of pregnancy in chronically infected females with ME-49. At 19<sup>th</sup> day of pregnancy, placentas, uterus and fetuses, were processed for detection of the parasite and fetal resorption. Blood samples were collected for antibodies and cytokines analyses. In pregnant females, parasites were detected in placenta and fetuses after reinfection with both Brazilian strains. TgChBrUD2 reinfected females showed more impaired pregnancy outcomes presenting higher number of animals with aborted fetuses and resorption rate. In addition, they presented higher pro-inflammatory cytokines and IgG2a antibody. In conclusion, our results showed that *C. callosus* are susceptible to both *T. gondii* Brazilian strains. Therefore, the reinfection reactivated the ME-49 latent infection and the protection against *T. gondii* can be breached after reinfection with parasites belonging to different genotypes and promote the congenital toxoplasmosis.

Keywords: *Calomys callosus*, congenital toxoplasmosis, reinfection, Brazilian strains

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. *Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório, com ampla distribuição no mundo, e é capaz de infectar aves e mamíferos, inclusive humanos, com capacidade de se multiplicar na maioria das células dos hospedeiros (DUBEY; BEATTIE, 1988; CARRUTHERS, 2002; HILL; DUBEY, 2013). Este protozoário foi descrito simultaneamente no Brasil por Splendore, em coelho (*Oryctolagus cuniculus*), e por Nicole e Manceaux, no Norte da África, em um roedor (*Ctenodactylus gundi*), ambos em 1908. Pertence ao Filo Apicomplexa, à Classe Sporozoa, à Subclasse Coccidia, à Ordem Eucoccidida, à Família Sarcocystidae (LEVINE *et al.*, 1980; LEVINE, 1988; Rey, 2001).

*Toxoplasma gondii* é caracterizado pela presença do complexo apical composto de organelas secretórias especializadas, como: roptrias, micronemas e grânulos densos; e de elementos do citoesqueleto, dentre eles, o conoide, anéis polares e microtúbulos subpeliculares (SOLDATI; MEISSNER, 2004; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Outra estrutura típica do parasito é uma organela denominada apicoplasto, envolta por cinco membranas e localizada na região anterior ao núcleo. Embora esta organela tenha sido identificada, morfologicamente, desde a década de 1960, apenas na década de 90 do século XX descobriu-se tratar-se de um plastídeo (KOHLER *et al.*, 1997; DE ROCHER *et al.*, 2000; MCFADDEN, 2011).

O parasita *T. gondii* possui três formas evolutivas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010). Os taquizoítas representam a forma de multiplicação rápida do parasito na célula hospedeira e são as formas predominantes na fase aguda da infecção. Nessa fase da doença, os parasitos são disseminados pelo sistema circulatório e têm a capacidade de infectar vários tecidos e órgãos (DUBEY, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005). A invasão celular é ativa e leva cerca de 15 a 20 segundos e depende de interações de moléculas presentes na superfície do parasito com moléculas presentes na membrana da célula hospedeira (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; SHARMA; CHITNIS, 2013; WALKER *et al.*, 2014).

A rápida disseminação dos parasitos está vinculada à capacidade destes em infectar células migratórias do sistema imune como monócitos, linfócitos e células dendríticas (LAMBERT *et al.*, 2006; SIBLEY, 2011). Por meio destas células, o parasito

é capaz de disseminar-se por vários tecidos e atravessar barreiras biológicas como placenta, barreira hematoencefálica e a hematoretiniana (BARRAGAN; SIBLEY, 2003; UNNO *et al.*, 2008).

Os bradizoítas representam as formas de replicação lenta do parasito e são típicos da fase crônica da infecção (LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002). Nessa fase, a maioria dos parasitos torna-se encistada no interior das células (na forma de bradizoítas). Cistos contendo bradizoítas são distribuídos em tecidos do hospedeiro, porém são mais frequentes nos músculos esquelético e cardíaco, tecido nervoso e região ocular (DUBEY, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; COWPER; MATTHEWS; TOMLEY, 2012; KAMERKAR; DAVIS, 2012). Não havendo distúrbios no sistema imunológico, esta fase pode se estender por toda a vida do hospedeiro (ELSHEIKHA, 2008).

Já os esporozoítas (contidos dentro dos oocistos imaturos liberados nas fezes de felídeos) correspondem às formas infectantes oriundas do processo de reprodução sexuada do parasito e são encontrados no meio ambiente, podendo contaminar água, solos e alimentos (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010). Entre os três estágios infecciosos de *T. gondii*, o oocisto é o mais virulento, quando comparado com taquizoítos ou bradizoítos em hospedeiros não felinos (DUBEY; BEATTIE, 1988).

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxeno facultativo e foi descrito em 1970. Os hospedeiros definitivos são os membros da Família Felidae e os hospedeiros intermediários, provavelmente, todos os animais homeotérmicos (mamíferos e aves) inclusive seres humanos (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Os felídeos podem se contaminar ao ingerirem cistos teciduais, oocistos maduros ou taquizoítas (DABRITZ; CONRAD, 2010; ELMORE *et al.*, 2010; SCHLUTER *et al.*, 2014). Assim, inicia-se o desenvolvimento de múltiplas gerações de ciclos sexuais e assexuais de *T. gondii* (DUBEY; FRENKEL, 1972). Os parasitos se multiplicam assexuadamente nas células do epitélio intestinal, dando origem aos esquizontes (esquizogonia) (FRANCIA; STRIEPEN, 2014; WILHELM; YAROVINSKY, 2014). Dos esquizontes são liberados merozoítos, que, após várias gerações, se diferenciam em macrogametas e microgametas que se fundem, dando origem ao zigoto, que, posteriormente, dará origem ao oocisto (gametogonia), completando o ciclo sexuado (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005). Os felídeos eliminam em suas fezes oocistos imaturos, não esporulados, que, em condições

ambientais propícias, como temperatura, umidade e oxigenação ideais, esporulam e se tornam infectantes. Após a esporogonia, cada oocisto esporulado de *T. gondii* possui, em seu interior, dois esporocistos, cada um contendo quatro células haploides denominadas esporozoítos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Os oocistos maduros sobrevivem por meses ou até anos, desde que não sejam expostos à luz solar direta e umidade relativa do ar muito baixa (HILL; DUBEY, 2002; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; TORREY; YOLKEN, 2013).

Os hospedeiros intermediários (mamíferos e aves) podem adquirir a infecção por *T. gondii* por meio da ingestão de oocistos maduros presentes no solo, água e alimentos; ingestão de cistos teciduais em carnes cruas ou mal cozidas; ingestão de taquizoítas em líquidos orgânicos como leite, e saliva; transplante de órgãos e acidentes laboratoriais (DUMETRE *et al.*, 2008; CENCI-GOGA *et al.*, 2011; HILL; DUBEY, 2013; SCHLUTER *et al.*, 2014). Outra importante forma de infecção por *T. gondii* ocorre pela via transplacentária, pela qual os taquizoítas são capazes de atravessar a barreira placentária e promover a transmissão vertical do parasito para os tecidos embrionários ou fetais. A transmissão transplacentária está relacionada com a ocorrência de abortamentos, natimortos, debilidade e mortalidade neonatal, tanto no homem como em outros animais (ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009; BOJAR; SZYMANSKA, 2010; KODJIKIAN, 2010; LINDSAY; DUBEY, 2011; CHAUDHRY; GAD; KOREN, 2014).

## **1.2. Cepas e polimorfismo genético de *Toxoplasma gondii***

A diversidade genética das cepas de *T. gondii* é amplamente estudada e, durante as últimas décadas, os métodos moleculares facilitaram a detecção, diagnóstico e genotipagem deste importante patógeno (KHAN *et al.*, 2005; DUBEY *et al.*, 2008; MINOT *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2012; SHWAB *et al.*, 2014).

Análises moleculares de cepas, encontradas principalmente na Europa e Estados Unidos, mostram que a maioria apresenta um padrão genético clonal e pertence a um dos três genótipos designados como tipo I, II e III (HOWE; SIBLEY, 1995; SU *et al.*, 2012; SHWAB *et al.*, 2014). Essa estrutura clonal está acompanhada de uma pequena divergência genética entre as três linhagens, de, aproximadamente, 2% (DARDÉ, 2008).

A estrutura clonal das cepas de *T. gondii* pode ser explicada pela capacidade de transmissão do parasita entre hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos, sem passar pelo hospedeiro definitivo e sofrer meiose e recombinação

sexual (SU *et al.*, 2003). Pode ocorrer também por macrogametas do parasito que permanecem infertilizados, que, por meio da partenogênese, são capazes de formar oocistos no intestino dos felídeos (FERGUSON, 2002). Outra possibilidade é a raridade de infecção simultânea nos felídeos com diferentes tipos de cepas. A recombinação ocorreria se os hospedeiros definitivos fossem infectados simultaneamente com diferentes cepas de *T. gondii*. Contudo é um evento raro de ocorrer na natureza, uma vez que os felídeos teriam que se alimentar de uma presa que albergasse uma infecção mista ou se ingerissem duas presas, cada uma com uma cepa diferente em um curto intervalo de tempo. O fato de *T. gondii* ser haploide contribui para a estrutura clonal, pois o hospedeiro definitivo infectado com apenas um tipo de cepa produz oocistos contendo progêneres geneticamente idênticas à amostra infectante original (AJZENBERG *et al.*, 2004).

A virulência de cepas de *T. gondii* é bem caracterizada no modelo murino. Sabe-se que algumas espécies de hospedeiros são parcialmente susceptíveis, enquanto outras sucumbem à infecção, e que até mesmo o gênero pode interferir na evolução da infecção (HOWE; SIBLEY, 1995; ROBERTS; CRUICKSHANK; ALEXANDER, 1995; FAVORETO-JUNIOR *et al.*, 1998). Os principais critérios para a determinação do grau de virulência de uma cepa baseia-se na taxa de mortalidade e no tempo de mortalidade de camundongos infectados com inóculos graduais crescentes de parasitos (KAUFMAN; REMINGTON; JACOBS, 1958). As cepas de *T. gondii* são definidas como virulentas, não virulentas ou de virulência intermediária, dependendo da análise destes parâmetros (HOWE; SIBLEY, 1995).

As cepas do tipo I, tais com RH, BK e VEL, apresentam alta virulência e causam uma rápida mortalidade em camundongos (HOWE; SIBLEY, 1995). Em humanos, esta cepa pode causar doenças oculares graves (VALLOCHI *et al.*, 2005; COMMODARO *et al.*, 2009). As cepas tipo II e III são consideradas avirulentas, levando à infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos (HOWE; SIBLEY, 1995). Em humanos, as cepas do tipo II, tais como ME-49 e M3, são predominantes em isolados de pacientes HIV positivos e/ou encefalite toxoplásica. Também se relacionam aos casos de reativação da infecção crônica e infecções congênitas (AJZENBERG *et al.*, 2002; SIBLEY *et al.*, 2009). As cepas do tipo III, tais como VEG e M-7741, associam-se às infecções animais, responsável por infecções brandas e assintomáticas (KIM; WEISS, 2004; SIBLEY *et al.*, 2009).

A cepa RH foi isolada, em 1939, de uma criança com quadro letal de encefalite toxoplásmtica (KHAN *et al.*, 2009), sendo utilizada como padrão na comparação entre cepas e considerada altamente virulenta. Em camundongos, é letal com uma dose mínima de taquizoítas (DUBEY *et al.*, 1999; DARDÉ, 2008). A cepa ME-49 foi, originalmente, isolada da musculatura de carneiro em 1965. É cistogênica ou de baixa virulência (SUZUKI *et al.*, 1988). Em camundongos, certas linhagens são mais suscetíveis que outras à infecção por esta cepa, levando a variações da patogenicidade pelo uso da mesma cepa. Nos camundongos BALB/c, é possível encontrar cistos no cérebro, caracterizando, assim, a fase crônica da infecção. Por outro lado, camundongos C57BL/6 infectados com a cepa ME-49 desenvolvem uma meningoencefalite progressiva com elevada taxa de mortalidade após doze semanas de infecção (GAZZINELLI *et al.*, 1993). Estudos utilizando o roedor *Calomys callosus* (família Cricetidae) mostraram que estes animais apresentam elevada susceptibilidade à cepa RH de *T. gondii* (FAVORETO-JUNIOR *et al.*, 1998). Por outro lado, essa espécie é resistente à cepa ME-49 (PEREIRA *et al.*, 1999).

Uma quarta linhagem clonal, conhecida como tipo 12, foi recentemente descrita na América do Norte, onde é comumente encontrada em animais selvagens. Cepas do tipo 12 foram inoculadas em camundongos e algumas delas registraram alto níveis de virulência (KHAN *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, estudos sobre os polimorfismos genéticos e caracterização genotípica em diferentes isolados de *T. gondii* originados tanto de material humano, quanto animal, demonstram a existência de diversidade genética nesse parasito (DUBEY *et al.*, 2007b; PENA *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2011; DUBEY *et al.*, 2012; SHWAB *et al.*, 2014). Para a genotipagem dos isolados de *T. gondii*, a maioria dos estudos utiliza a técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA, gerados por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP) (HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG; DUMETRE; DARDÉ, 2005; PENA *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2012). A PCR-RFLP é um método de tipificação baseado no polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição sobre produtos amplificados pela PCR. As enzimas de restrição reconhecem uma sequência específica de quatro a oito bases e são classificadas de acordo com a estrutura, atividades e sítios de reconhecimento e clivagem de DNA. O método consiste em clivar o DNA em pontos específicos, resultando em fragmentos de massas

moleculares diferentes, sendo assim, possível diferenciar os tipos de cepas (HOWE; SIBLEY, 1995; HOWE *et al.*, 1997; KHAN, A. *et al.*, 2005).

Estudos de genotipagem de *T. gondii* são embasados principalmente na pesquisa em 11 *loci* gênicos (SAG1, 5'+3'SAG2, SAG3, SAG2 alt, BTUB, GRA6, c22-8, c292, L358, PK1, Apico) (SU; ZHANG; DUBEY, 2006a). Pela análise PCR-RFLP *multilocus*, os isolados encontrados na América do Norte e Europa apresentam alelos típicos das cepas tipo I, II e III, e a cepa predominante é do tipo II (SU *et al.*, 2012). Porém, quando isolados oriundos de outras regiões do mundo, além de Europa e Estados Unidos, foram analisados, observou-se alta porcentagem de diferentes genótipos, sugerindo que a população de *T. gondii* seria altamente diversa nessas regiões (PENA *et al.*, 2008; MINOT *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2012). Estes resultados corroboram os dados encontrados por Dubey e colaboradores, que demonstraram que as cepas de *T. gondii* do Brasil e Colômbia são biológica e geneticamente diferentes daquelas da América do Norte e Europa (DUBEY *et al.*, 2007a). Experimentos realizados com parasitos isolados de frangos assintomáticos do Brasil revelaram que estes parasitos são mais patogênicos para camundongos que os isolados típicos da Europa ou Estados Unidos, independente do genótipo. Estudos realizados com isolados de *T. gondii*, obtidos em Erechim, no estado do Rio Grande do Sul (KHAN *et al.*, 2006), em isolados provenientes de pacientes HIV positivos com toxoplasmose cerebral (FERREIRA *et al.*, 2008), em pacientes com toxoplasmose ocular (DUBEY *et al.*, 2007a), e isolados de sangue de recém-nascidos em Minas Gerais (CARNEIRO *et al.*, 2013) demonstraram uma alta taxa de polimorfismo genético.

Além desses trabalhos com amostras humanas do Brasil, vários estudos de genotipagem por RFLP-PCR *multilocus* foram realizados em isolados de origem animal, como em galinhas (DUBEY *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2011), gatos (PENA *et al.*, 2008), porcos (FRAZAO-TEIXEIRA *et al.*, 2011) e até mesmo animais silvestres (PENA *et al.*, 2011). Todos os trabalhos apontaram resultados semelhantes, mostrando alta diversidade genotípica dos isolados brasileiros. Um estudo com isolados de porcos provenientes do Rio de Janeiro mostrou uma grande variabilidade de genótipos, sugerindo que diferentes cepas de *T. gondii* circulam em suínos destinados ao consumo humano. Além disso, foi verificado que as cepas provenientes dos porcos eram distintas das cepas previamente isoladas de gatos e galinhas (FRAZAO-TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Por outro lado, estudos com ovinos de diversas partes do Brasil (DA SILVA *et al.*, 2011) e galinhas provenientes da ilha de Fernando de Noronha (DUBEY *et al.*, 2010)

demonstraram, pela primeira vez, a presença de cepa clonal do tipo II no Brasil. O arquétipo tipo III e outras cepas/isolados também foram verificados, indicando que *T. gondii* presente na ilha de Fernando de Noronha é constituído de diferentes genótipos, bem como genótipos clonais que são dominantes na Europa e América do Norte (DUBEY *et al.*, 2010).

Acredita-se que a amplitude geográfica, a grande biodiversidade da fauna do Brasil e as diferenças na rota de infecção possam contribuir para essa maior variabilidade genética das cepas brasileiras de *T. gondii*. Além disso, a maioria dos isolados encontrados no Brasil não é clonal (DARDÉ, 2008; DUBEY; SU, 2009; KHAN *et al.*, 2009). Embora a população de *T. gondii* seja altamente diversificada em nosso país, alguns genótipos clonais circulam nos hospedeiros. Quatro genótipos identificados como BrI, BrII, BrIII e BrIV, foram considerados clonais no Brasil (PENA *et al.*, 2008). Segundo 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 grandes áreas geográficas. A análise de virulência em camundongos infectados evidenciou que o tipo BrI é altamente virulento, os tipos BrII e BrIV revelaram virulência intermediária e o tipo BrIII é considerado avirulento (PENA *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado em Uberlândia, Minas Gerais, foram encontradas duas cepas em amostras provenientes de coração de galinhas, denominados TgChBrUD1 e TgChBrUD2. A genotipagem desses isolados mostrou que TgChBrUD1 pertence ao tipo BrII (genótipo #11 no ToxoDB PCR-RFLP) e TgChBrUD2 ao tipo BrI (genótipo #6 no ToxoDB PCR-RFLP) (SALOMÃO *et al.*, 2007). Para a genotipagem dos isolados, foram utilizados doze primers diferentes, verificando-se que as cepas TgChBrUD1 e TgChBrUD2 são o resultado de recombinações genéticas das três linhagens clonais de *T. gondii*, além de alelos não comuns às cepas tradicionais do parasito. Enquanto TgChBrUD1 possui cinco marcadores genéticos da cepa tipo I, dois para tipo II e cinco para tipo III, TgChBrUD2 apresenta nove marcadores para o tipo I, um para tipo II e um para tipo III, além de um alelo atípico daqueles encontrados nos tipos I, II e III do parasito, denominado c22-8 (SALOMÃO *et al.*, 2007).

As duas cepas diferem em relação ao tempo necessário para romper a célula hospedeira e a formação de cistos teciduais (SALOMÃO *et al.*, 2007). Os parasitos da cepa TgChBrUD1 replicam mais lentamente no interior de células fibroblásticas da linhagem HFF, enquanto os parasitos da cepa TgChBrUD2 são capazes de replicar e

romper as células hospedeiras em menor intervalo de tempo. A infecção *in vivo*, utilizando modelos experimentais roedores, resultou em baixa taxa de sobrevivência dos animais, o que demonstra semelhanças de ambas as cepas brasileiras com cepas virulentas de *T. gondii* (SALOMÃO *et al.*, 2007). Estudos com células trofoblásticas da linhagem BeWo infectadas com estas cepas brasileiras mostraram que células BeWo são mais susceptíveis à infecção pela cepa TgChBrUD1 do que pela cepa TgChBrUD2 e que o tratamento com azitromicina foi mais eficiente em controlar a infecção e replicação do parasito do que os tratamentos convencionais utilizados (RIBEIRO *et al.*, 2013). Além disso, existem diferenças na capacidade de indução de morte celular por apoptose, além da susceptibilidade e indução de resposta imune, indicando possíveis graus diferenciados de virulência entre os parasitos das cepas TgChBrUD1 e TgChBrUD2 obtidas após infecção experimental de *Callomys callosus* ou de parasitos mantidos apenas em cultura celular (LOPES-MARIA *et al.*, 2013).

### **1.3. Toxoplasmose**

A toxoplasmose é a protozoonose causada por *T. gondii* e é uma das zoonoses com maior difusão mundial (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SEPULVEDA-ARIAS *et al.*, 2014). A doença é um problema de saúde pública, pois desenvolve um quadro preocupante em pacientes imunocomprometidos e em casos de infecção congênita. Excluindo tais ocasiões, a doença, geralmente, cursa de forma assintomática ou benigna em cerca de 90% dos casos e raramente é necessário o tratamento da doença (DUMETRE *et al.*, 2008; CENCI-GOGA *et al.*, 2011; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SEPULVEDA-ARIAS *et al.*, 2014). A prevalência da infecção por *T. gondii* em humanos é alta, com estimativas de infecção crônica em indivíduos adultos, variando de 10% a 90%, dependendo da região geográfica e do hábito alimentar da população (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). No Brasil, de maneira geral, a prevalência varia entre 50% a 80% (GALISTEU *et al.*, 2007; DUBEY *et al.*, 2012).

O curso da doença se dá em dois estágios: fase aguda e fase crônica. O período inicial da infecção caracteriza a fase aguda da toxoplasmose em que os taquizoítas se multiplicam rapidamente em diferentes tipos de células. Algumas manifestações clínicas como febre, dor de garganta, mialgia, cefaleia e coriorretinite podem ocorrer. Durante essa fase proliferativa, a toxoplasmose pode causar a morte do hospedeiro (principalmente em fetos ou indivíduos imunossuprimidos). Porém, em casos de indivíduos imunocompetentes, com o desenvolvimento da resposta imune, a

multiplicação dos taquizoítas é interrompida e ocorre a formação de cistos teciduais contendo bradizoítas, o que caracteriza a fase crônica da infecção sem sintomatologia significante no hospedeiro (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; GROSS; HOLPERT; GOEBEL, 2004; HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; CENCI-GOGA *et al.*, 2011; SEPULVEDA-ARIAS *et al.*, 2014). O mecanismo dessa permanência indefinida dos cistos nos tecidos dos hospedeiros não é muito bem compreendido, entretanto, alguns pesquisadores acreditam que, periodicamente, alguns cistos se rompem, liberando os bradizoítas que se diferenciam em taquizoítas, invadindo novas células formando assim novos cistos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

Em pacientes imunocomprometidos (HIV positivos, pacientes em tratamento quimioterápico, indivíduos transplantados ou indivíduos com doenças autoimunes), a manifestação da doença, quase sempre, está relacionada com a reativação de cistos pré-existentes. Neste contexto, os bradizoítas voltam ao estágio de taquizoítas, podendo levar o paciente a óbito (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; MUÑOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A presença de *T. gondii* pode ser diagnosticada indiretamente por métodos sorológicos ou diretamente por meio de bioensaio, cultura celular, imuno-histoquímica ou pelo diagnóstico molecular por PCR em sangue, líquido amniótico ou placenta (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; RORMAN *et al.*, 2006; TALABANI *et al.*, 2010). A identificação direta do parasito por cultura celular ou isolamento por meio do bioensaio é considerada padrão ouro para a identificação da infecção, mas são métodos relativamente demorados e laboriosos (KOMPALIC-CRISTO *et al.*, 2007; ABDUL-GHANI, 2011).

A sorologia é um dos principais métodos a que se recorre para estabelecer o diagnóstico da toxoplasmose. Baseia-se na pesquisa de anticorpos de diferentes classes de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, e mais raramente, IgE) anti-*T. gondii*. De acordo com o perfil sorológico, pode-se determinar a fase da infecção (aguda ou crônica). Os testes sorológicos mais comumente utilizados são a Imunofluorescência Indireta (IFI); o Teste de Aglutinação Modificada (MAT); o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) convencional, de captura (IgM ou IgA) ou de avidez para IgG; o *Immunosorbent Agglutination Assay* (ISAGA) e Imunoblotting (IB) (KOTRESHA; NOORDIN, 2010; ABDUL-GHANI, 2011; BONYADI; BASTANI, 2013).

Técnicas moleculares também são empregadas para a realização do diagnóstico da toxoplasmose congênita. A amplificação de segmentos específicos pela PCR permite a identificação de *T. gondii* em amostras clínicas, quando o parasito está presente em pequeno número (ABDUL-GHANI, 2011). O diagnóstico molecular é mais comumente realizado em líquido amniótico, sangue de cordão umbilical, em líquido cefalorraquidiano, material de biópsia cerebral e lavagem bronco-alveolar e, em alguns casos, no sangue periférico do recém-nascido (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; ABDUL-GHANI, 2011). A realização da PCR como diagnóstico para a toxoplasmose é uma boa opção por ser uma técnica relativamente rápida, revelando alta especificidade e sensibilidade (ABDUL-GHANI, 2011).

A prevenção da toxoplasmose é baseada por programas de educação e saúde pública. É recomendando, principalmente às gestantes, que evitem contato com materiais potencialmente contaminados, como carnes cruas, frutas e verduras com higienização deficiente e caixas de areia com dejetos de gatos (BOJAR; SZYMANSKA, 2010; OPSTEEGH *et al.*, 2014; SEPULVEDA-ARIAS *et al.*, 2014).

#### **1.4. Toxoplasmose congênita**

A forma congênita da toxoplasmose ocorre em razão da passagem transplacentária das formas taquizoítas do parasito durante a gestação, alcançando, assim, a circulação e os tecidos fetais (KODJIKIAN, 2010; CARLIER *et al.*, 2012). No entanto, a transmissão congênita do parasito não é obrigatória, equivalendo de 20 a 33% dos casos de primoinfecção materna humana (CARLIER *et al.*, 2012). A probabilidade de haver infecção fetal quando a primoinfecção materna ocorre no período preconcepção é de 1%; entretanto, se a gestante adquire a infecção no primeiro ou segundo trimestre gestacional, a possibilidade da transmissão vertical é de 6% e entre 22–40%, respectivamente. Caso a infecção ocorra no terceiro trimestre, a possibilidade da infecção fetal varia entre 58–72 % (MONTOYA; REMINGTON, 2008; RABILLOUD; WALLON; PEYRON, 2010). A toxoplasmose congênita pode causar lesões irreversíveis ao feto (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; KODJIKIAN, 2010; CHAUDHRY; GAD; KOREN, 2014). A frequência e a gravidade da doença dependem da idade gestacional. Infecção materna, no primeiro trimestre de gestação, pode causar toxoplasmose congênita grave, resultando em morte do feto no útero ou abortamento espontâneo. Os casos mais graves podem ocasionar a Tétrade de Sabin, em que o feto apresenta corioretinite em 90% dos casos; calcificações cerebrais em 69%;

perturbações neurológicas com retardamento psicomotor em 60% e alterações no volume craniano (macro e microcefalia) em 50% (KAWAZOE, 1995; REMINGTON *et al.*, 2001). Em contraste, a infecção materna tardia (terceiro trimestre), usualmente, resulta em recém-nascidos aparentemente normais, porém estes podem apresentar sequelas tardivamente (BLANCO-LAGO *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 2010). Podem também manifestar alguns sintomas, como hepatoesplenomegalia, icterícia, danos oculares e neurológicos. A frequência absoluta de infecções subclínicas em recém-nascidos com toxoplasmose congênita é de 85%. As infecções que passam despercebidas ou, se não tratadas, causam doença ocular grave (coriorretinite) ou atraso no desenvolvimento mental na segunda ou terceira década de vida da criança (HOHLFELD *et al.*, 1994; REMINGTON *et al.*, 2001; GILBERT, 2004). Em países desenvolvidos, a doença afeta de 1 a 10 entre 10.000 recém-nascidos (CARLIER *et al.*, 2012). No Brasil, a ocorrência de toxoplasmose congênita afeta de 3 a 10 entre 10.000 (LAGO *et al.*, 2007). Em Minas Gerais há alta prevalência da infecção, 13 casos em cada 10.000 recém-nascidos e a desigualdade social está relacionada com as taxas de prevalência da infecção (CARELLOS *et al.*, 2014a; CARELLOS *et al.*, 2014b).

Em gestantes, pacientes que iniciam o pré-natal com presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e ausência de anticorpos IgM anti-*T. gondii* são consideradas imunes e sem riscos de toxoplasmose congênita. A exceção é para as pacientes HIV positivas ou com outra imunossupressão, que podem ter reativação da doença (REMINGTON *et al.*, 2001; GILBERT, 2004). Em pacientes em que se detecta sorologia positiva, é realizado o teste de avidez, que foi desenvolvido para determinar se a infecção foi contraída no passado distante ou recentemente. Os resultados são baseados na medida da avidez ou afinidade funcional dos anticorpos da classe IgG específicos para *T. gondii* (LIESENFELD *et al.*, 2001; BONYADI; BASTANI, 2013). Em casos de pacientes em que o resultado de avidez é duvidoso, a associação com outros testes laboratoriais, como a técnica da PCR em líquido amniótico e sangue é recomendada. Isso permite a identificação dos fetos infectados, possibilitando que a terapia antiparasitária se inicie precocemente, ainda na gestação (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; DELHAES *et al.*, 2013). A ultrassonografia tem importância fundamental no acompanhamento e na avaliação do prognóstico dos fetos portadores de toxoplasmose, pois permite identificar aqueles sem sinais de infecção congênita (COUTO; LEITE, 2004).

A infecção ocular pode fazer parte do quadro de uma infecção congênita ou ocorrer em infecção adquirida pós-natal, tanto em casos de infecção aguda ou de reativação da doença (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; THIEBAUT *et al.*, 2007). A manifestação ocular mais comum é a retinocoroidite granulomatosa necrotizante, sendo a lesão de coloração branco-amarelada e com margens mal definidas (GLASNER *et al.*, 1992; MONTOYA; REMINGTON, 1996). Os sintomas incluem diminuição da visão, inflamação, necrose retiniana e opacidades no campo visual, hiperemia conjutival e ciliar, dor e fotofobia. Recidivas da doença ocorrem em função da ruptura dos cistos e liberação dos bradizoítas (AMATO NETO *et al.*, 1995).

O diagnóstico da toxoplasmose congênita no recém-nascido é feito pela demonstração da presença de anticorpos IgM ou IgA contra o parasita. O diagnóstico não pode ser feito apenas pela demonstração de anticorpos IgG, já que estes são transferidos passivamente da mãe para o feto. Entretanto, deve-se ter cautela na interpretação dos resultados de IgM e IgA no recém-nascido, pois a transmissão de IgM e/ou IgA materna pode ocorrer durante o nascimento. Devido à meia vida curta destes anticorpos (IgM e IgA), os testes positivos devem ser confirmados e repetidos do segundo ao quarto dia de vida (IgM) e no décimo dia de vida (IgA) (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004).

A prevenção da toxoplasmose congênita se divide em três etapas: prevenção primária, secundária e terciária (ELSHEIKHA, 2008). A prevenção primária é baseada em programas de educação em saúde pública pelos quais a gestante é orientada a tomar medidas preventivas, identificando quais são os fatores de risco para a toxoplasmose durante a gestação. A prevenção secundária consiste na tentativa de evitar a transmissão transplacentária de *T. gondii*. Para isso, faz-se a triagem pré-natal, que se baseia no diagnóstico da toxoplasmose aguda em gestantes, seguido de tratamento específico das mesmas. Normalmente este diagnóstico é efetuado por meio da detecção de anticorpos IgM, soroconversão de IgG e avidez de IgG específicos anti-*T. gondii*, em amostras sanguíneas das mães. Esta estratégia se justifica pela possibilidade de tratamento precoce para prevenir a transmissão do parasita para o feto (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; SENSINI, 2006; BESSIERES *et al.*, 2009; OPSTEEGH *et al.*, 2014). Por fim, a prevenção terciária tem como objetivo a realização de um diagnóstico precoce no recém-nascido no propósito de prevenir ou minimizar sequelas futuras.

O tratamento da mãe/feto durante a gestação é controverso, pois se sabe que, além dos efeitos adversos do tratamento, somente os taquizoítas são sensíveis aos

medicamentos e que a parasitemia materna tem curta duração, cessando com o surgimento da resposta imune específica (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). Sendo assim, para um tratamento eficaz, é de suma importância mensurar a soroconversão da gestante, que é uma difícil tarefa, mesmo quando são realizados exames mensais (GILBERT, 2009). Os recém-nascidos infectados por *T. gondii* e diagnosticados pela triagem neonatal são, rotineiramente, tratados por 3 meses a 1 ano, dependendo do centro médico onde está sendo efetivado o tratamento. A terapêutica, geralmente, constituída de sulfonamidas + pirimetamina + ácido folínico, tem por objetivo reduzir o risco de aparecimento de novas lesões inflamatórias no cérebro e no olho, com consequente déficit neurológico e visual (GILBERT, 2009).

### **1.5. Resposta imune**

A resposta imune mediada por células é considerada a mais relevante no mecanismo de regulação da infecção por *T. gondii*, uma vez que este é um parasita intracelular obrigatório. Vários componentes da resposta imune inata e adaptativa participam do mecanismo de defesa contra o parasito (MILLER *et al.*, 2009; VILLARINO; SCHMIDT, 2013; GERLIC; MASTERS, 2014; YAROVINSKY, 2014).

No início da infecção, *T. gondii* estimula macrófagos, células dendríticas e neutrófilos a liberar interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral α (TNF-α). A IL-12, por sua vez, induz células *Natural Killer* (NK) a produzir interferon gamma (IFN-γ), que age sinergicamente com TNF-α, aumentando a atividade microbicida dos macrófagos pela produção de óxido nítrico (NO), permitindo uma ação tóxica contra o parasito. Além disso, induzem a proliferação de linfócitos auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), que produzem ainda mais IFN-γ. Altos níveis de IFN-γ estimulam macrófagos e células dendríticas a liberar mais IL-12, amplificando, assim, a resposta imune (ABOU-BACAR *et al.*, 2004; MILLER *et al.*, 2009; MUÑOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011; DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012; YAROVINSKY, 2014). Outro mecanismo de defesa contra o parasito induzido por IFN-γ é a produção da enzima indoleamina (IDO), a qual leva à degradação do triptofano, aminoácido essencial para o desenvolvimento do parasito (PFEFFERKORN; ECKEL; REBHUN, 1986; SILVA *et al.*, 2002).

Embora os mecanismos mediados por IFN-γ sejam potentes, não são completamente efetivos na eliminação dos parasitos (YAP; SHER, 1999). Alguns deles

escapam do controle imunológico e sobrevivem no hospedeiro por longos períodos, continuando a sua proliferação pelo organismo, caracterizando a fase crônica da infecção (ALIBERTI, 2005; SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

As células T CD8<sup>+</sup> são essenciais na resistência, durante a fase ativa da infecção, e desempenham a principal função efetora contra *T. gondii* (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011). Estudos demonstraram que a ausência das células T CD8<sup>+</sup>, mas não de células T CD4<sup>+</sup>, acelera a mortalidade em camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*, comprovando a função desse tipo celular no controle do parasito durante a fase crônica da infecção (GAZZINELLI *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 1992).

Apesar de uma resposta imunológica eficiente, *T. gondii* é capaz de induzir mudanças na transcrição gênica do hospedeiro como forma de evasão da resposta imune. Assim, o sucesso da infecção ou do combate ao parasito está associado com o balanço entre a resposta imune do hospedeiro e os mecanismos de evasão utilizados pelas diferentes cepas de *T. gondii* (MILLER *et al.*, 2009; MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011).

Durante o período gestacional, o organismo materno passa por algumas alterações fisiológicas, e o sistema imune, normalmente é induzido a um estado de tolerância aos抗ígenos fetais (KRAVETZ, 2010; ROBINSON; KLEIN, 2012). Muitos hormônios, mais notavelmente estrógenos e progesterona, estão amplamente aumentados e esta condição gera alterações no balanço de citocinas de perfil Th1/Th2 (MIYaura; IWATA, 2002; ROBINSON; KLEIN, 2012). Assim, há uma tendência materna à conversão para o perfil imunológico do tipo Th2, com produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, e fator de transformação do crescimento β (TGF-β), as quais são sintetizadas na interface maternofetal, principalmente por células da decídua em todo o período gestacional (MILLER *et al.*, 2009; DENNEY *et al.*, 2011).

A maior susceptibilidade de gestantes à toxoplasmose pode estar relacionada à maior produção de citocinas anti-inflamatórias, que são mais expressas durante a gestação. Neste caso, observa-se uma situação de “imunossupressão”, uma vez que hormônios como estrógeno e progesterona modulam a reatividade das células T e a produção de citocinas de perfil Th2 (VARGAS-VILLAVICENCIO; DE LEON-NAVA; MORALES-MONTOR, 2009; ROBINSON; KLEIN, 2012). Assim, a influência hormonal no sistema imunológico com a produção de citocinas anti-inflamatórias, para evitar a rejeição ao feto, acaba influenciando a maior susceptibilidade à infecção parasitária, e, consequentemente, o risco de infecção placentária e transmissão congênita

(SANTOS *et al.*, 2008; KRAVETZ, 2010; MUÑOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

O fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) possui inúmeras funções e também atua como citocina, sendo um regulador chave da imunidade inata e adquirida, importante na indução da resposta inflamatória a vírus e bactérias (CALANDRA *et al.*, 1995) e tem a propriedade de ativar macrófagos e promover a morte de parasitos intracelulares, como *T. gondii* (BERNHAGEN; CALANDRA; BUCALA, 1998; DE OLIVEIRA GOMES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2014). MIF é produzido por diferentes tipos celulares, tais como linfócitos T, macrófagos, monócitos, células dendríticas, eosinófilos e células trofoblásticas (LUE *et al.*, 2002; FERRO *et al.*, 2008) e tem capacidade de sobrepor o efeito imunossupressivo de hormônios glicocorticoides na expressão de outras citocinas próinflamatórias (CALANDRA *et al.*, 1995).

Os anticorpos desempenham um papel secundário no controle da infecção por *T. gondii*, no entanto são importantes no estabelecimento de diagnóstico sorológico para a doença (PETERSEN, 2007; SERRANTI; BUONSENTO; VALENTINI, 2011). Anticorpos IgM podem ser encontrados após 7 dias de infecção, alcançando um título máximo em poucas semanas e declinando gradualmente. A infecção via oral, em alguns hospedeiros, pode induzir a formação de anticorpos IgA (DE PASCHALE *et al.*, 2008). Anticorpos IgG, geralmente, aparecem uma a duas semanas após a infecção, alcançando títulos máximos em seis semanas, podendo declinar em alguns meses ou anos, com títulos baixos permanecendo por toda a vida (ELSHEIKHA, 2008; TALABANI *et al.*, 2010).

Em casos de reinfecção, ocorre uma reação imune intensa, frequentemente, manifestada pela elevação dos níveis de IgG e pelo aparecimento de anticorpos IgM. Em gestantes imunocompetentes com perfil sorológico de infecção latente (sem anticorpos IgM e IgA, e níveis baixos de IgG), os indicadores de toxoplasmose aguda (presença de IgM e/ou IgA e altos níveis de IgG) sugerem reinfecção, que pode resultar em transmissão do parasito para o feto (GAVINET *et al.*, 1997; ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009; VALDES *et al.*, 2011).

## **1.6. Transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em gestantes imunocompetentes**

Além da infecção toxoplásmtica primária, pode ocorrer transmissão transplacentária do parasito por reativação da doença materna crônica ou em casos de

reinfecção (ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2010; LINDSAY; DUBEY, 2011; VALDES *et al.*, 2011). Infecções anteriores à gestação oferecem pequena possibilidade de infecção fetal, caso ocorram, no mínimo, três meses antes da concepção (MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Uma gestante imunocompetente e com infecção crônica não apresenta risco significativo de transmitir a infecção para o feto, uma vez que o sistema imune materno já possui mecanismos de defesa contra o parasito (SENSINI, 2006; BOJAR; SZYMANSKA, 2010). A reinfecção pode ser associada com a exposição a um grande número de parasitas, a uma cepa mais virulenta ou a um parasito de genótipo diferente (LINDSAY; DUBEY, 2011).

Recentemente, infecção e reinfecção, naturalmente, mistas, resultantes de exposição a cepas de diferentes genótipos foram observadas em humanos, embora ainda não esteja claro se a proteção causada pela infecção primária é genótipo-específica (SILVEIRA *et al.*, 2003; KODJIKIAN *et al.*, 2004; LEBAS *et al.*, 2004; ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2010). Estudos relataram casos de toxoplasmose transmitida por mães cronicamente infectadas e com a infecção congênita diagnosticada no período neonatal. Os autores sugerem a ocorrência de reinfecção por uma cepa diferente do parasito (ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2010).

Na França e em outros países da Europa, a toxoplasmose congênita causada pela reinfecção materna durante a gravidez é rara. Nesses países, a imunidade adquirida na infecção primária, normalmente, protege o organismo materno contra a reinfecção, pois, na Europa, geralmente, apenas um genótipo (tipo II) circula em humanos e no ambiente (AJZENBERG *et al.*, 2002; DUMÈTRE *et al.*, 2006). No entanto, em outras áreas, como na América do Sul, onde a diversidade genética de *T. gondii* é maior, é provável que a reinfecção com genótipos diferentes ocorra com mais frequência (DUBEY *et al.*, 2012).

A hipótese de que a infecção primária por *T. gondii* promove uma memória imunológica capaz de prevenir a transmissão vertical durante a reinfecção é questionada por diversos autores usando modelos murinos (FERRO *et al.*, 2002; FREYRE *et al.*, 2006; PEZERICO *et al.*, 2009; FRANCO *et al.*, 2011). Alguns estudos demonstraram que a transmissão vertical de *T. gondii* é impedida em casos de reinfecções com a mesma cepa da infecção primária (FERRO *et al.*, 2002) ou com cepas clonais (PEZERICO *et al.*, 2009; FRANCO *et al.*, 2011). Por outro lado, Freyre e colaboradores (2006) mostraram a transmissão vertical em casos de infecção e reinfecção com cepas clonais de *T. gondii*. Desta forma, alguns autores discutem que a dinâmica da transmissão

vertical de *T. gondii* em murinos, em casos de reinfeção, depende do tipo de cepa envolvida na infecção prévia e reinfecção, da via de inoculação, do número de parasitos inoculados, da forma infectante e da susceptibilidade dos hospedeiros a *T. gondii* (FREYRE *et al.*, 2006; FREYRE *et al.*, 2008; PEZERICO *et al.*, 2009; FRANCO *et al.*, 2011).

### **1.7. *Calomys callosus***

*Calomys callosus* (Renger, 1830) é um roedor da família Cricetidae com ampla distribuição no território brasileiro e etologia bastante estudada (MELLO, 1984). São comumente encontrados em moradias humanas e seus anexos, especialmente, em regiões rurais. Possui importância epidemiológica por ser reservatório natural de *Trypanosoma cruzi* (SANTOS *et al.*, 2008). Esses animais também são susceptíveis às doenças infecciosas e parasitárias como leishmaniose, doença de Chagas (MELLO; TEIXEIRA, 1984; SANTOS *et al.*, 2008; TANIWAKI *et al.*, 2011) e toxoplasmose (FERRO *et al.*, 2002; BARBOSA *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2011), o que proporciona excelente modelo biológico para o estudo de tais doenças.

Favoreto-Júnior e colaboradores (1998) mostraram que esta espécie possui elevada susceptibilidade à cepa RH de *T. gondii*, com ocorrência de óbito dos animais no oitavo dia de infecção pelo inóculo intraperitoneal de 100 taquizoítas. Por outro lado, Pereira e colaboradores (1999) mostraram que *C. callosus*, são menos susceptíveis à cepa ME-49, inoculados oralmente com 20 cistos teciduais, permitindo assim estudos sobre a transmissão vertical da toxoplasmose nestes. Fêmeas de *C. callosus*, infectadas com cepa RH, apresentam infecção de células trofoblásticas, tão logo iniciado o processo de implantação embrionária. A morte prematura desses animais, após infecção com esta cepa, não permitiu avaliar a formação da placenta, impossibilitando a investigação das vias de passagens transplacentárias em *C. callosus* (FERRO *et al.*, 1999). Entretanto, com o uso da cepa ME-49 de *T. gondii*, Ferro e colaboradores (2002) verificaram a cinética da infecção em diferentes compartimentos da placenta, bem como definiram que a transmissão congênita só ocorre durante a fase aguda da doença, semelhante ao que ocorre na espécie humana.

Estudos anteriores mostraram que o período de aquisição de resistência materna de *C. callosus* à transmissão vertical do parasito ocorre com, aproximadamente, 60 dias (BARBOSA *et al.*, 2008) e que fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e

reinfetadas pela mesma cepa não são capazes de transmitir verticalmente o parasito (FERRO *et al.*, 2002). Esse resultado sugere que a existência de antígenos específicos de determinada cepa pode promover imunização na infecção primária, impedindo, assim, a reinfecção pela cepa de mesmo genótipo. Outro estudo mostrou que fêmeas de *C. callosus* cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e desafiadas com a cepa RH também foram capazes de impedir a transmissão vertical do parasito, sugerindo que a infecção primária pela cepa ME-49 conferiu proteção ao feto. Além disso, este estudo demonstrou que o desafio com a cepa RH não causou a morte desses animais (FRANCO *et al.*, 2011).

A circulação de múltiplos genótipos na América do Sul possibilita a ocorrência de infecção mista de cepas e casos de reinfecções podem ser frequentes. De maneira geral, em gestantes imunocompetentes e cronicamente infectadas por *T. gondii* apresentam baixo risco de transmitir verticalmente o parasito para o embrião ou feto. Entretanto existem relatos de gestantes cronicamente infectadas com cepas clonais típicas do hemisfério Norte que podem transmitir verticalmente o parasito, quando reinfectadas com cepas encontradas na América do Sul e continente africano.

*Calomys callosus* é menos suscetível à cepa ME-49 (clonal do tipo II), porém suscetível à cepa RH (clonal do tipo I) de *T. gondii*. Além disso, semelhante ao que acontece na espécie humana, as fêmeas só transmitem verticalmente o parasito durante a fase aguda da infecção, e fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a mesma cepa ou com a cepa RH não transmitem verticalmente *T. gondii*.

Considerando a existência de cepas com diferentes genótipos no Brasil, que são mais patogênicas para camundongos que as cepas clonais da Europa ou Estados Unidos e que *C. callosus* é um bom modelo experimental para o estudo da toxoplasmose humana, torna-se relevante a avaliação da susceptibilidade desse modelo murino infectado com cepas brasileiras, bem como a transmissão vertical deste parasito em fêmeas cronicamente infectadas com cepas clonais e reinfectadas com as cepas brasileiras. Além disso, pela avaliação do genótipo de *T. gondii* em tecidos placentários e fetais, será possível estabelecer o efeito da reinfecção na reativação de uma infecção crônica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Caracterizar a infecção de cepas brasileiras TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 de *Toxoplasma gondii* em *Calomys callosus* e verificar se a infecção crônica com a cepa clonal ME-49 confere proteção contra transmissão vertical das cepas brasileiras TgChBrUD1 ou TgChBrUD2.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade de machos e fêmeas de *Calomys callosus* à infecção com as cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2;
- Quantificar *T. gondii* nos órgãos periféricos de machos e fêmeas infectados com as cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2;
- Avaliar a susceptibilidade de fêmeas não grávidas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com as cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2;
- Avaliar a susceptibilidade de fêmeas grávidas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com as cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2;
- Avaliar a possível transmissão vertical de *T. gondii* em fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com as cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2;
- Quantificar *T. gondii* nos órgãos periféricos maternos e tecidos placentários e fetais;
- Caracterizar genótipos de *T. gondii* (cepa ME-49 e/ou TgChBrUD1 ou TgChBrUD2) nos órgãos maternos e tecidos placentários e fetais;
- Avaliar a resposta imune celular pela análise de padrão de secreção de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e Th2 (IL-10 e TGF- $\beta$ ) de fêmeas grávidas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com as cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2;
- Avaliar a resposta imune humoral pela mensuração de anticorpos IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) de fêmeas grávidas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com as cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais e aspectos éticos**

Neste estudo foram utilizados machos e fêmeas de *C. callosus* de 2 a 3 meses de idade mantidos no biotério de *C. callosus* do setor de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Além disso, foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da UFU. Todos os animais foram mantidos em ciclos de 12 horas luz/escuro e com livre acesso à ração e água filtrada. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU sob o protocolo de número 049/11 (ANEXO I).

#### **3.2. Manutenção da cepa ME-49 de *T. gondii***

A cepa ME-49 foi mantida no encéfalo de *C. callosus* machos no biotério de *C. callosus* do setor de Histologia da (UFU), por meio do inóculo de 20 cistos de *T. gondii* em 0,2 ml de solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS) 0,01M, pH 7,2, estéril por via oral. Após período de 30 a 45 dias estes animais foram anestesiados com uma associação de 16mg/kg de cloridrato xilazina 2% e 50 mg/ml de cloridrato cetamina (Syntec do Brasil Ltda, São Paulo) e sacrificados. Os encéfalos foram coletados, macerados com auxílio de pistilo e cadiño e homogeneizados por aspiração em seringa de 5 ml e agulha de 25X7 mm em 1 ml de PBS. O material foi ressuspensão em 10 ml de PBS estéril e submetido à centrifugação a 720 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente, por duas vezes. Após lavagem, foi adicionado 2 ml de PBS estéril e feita a contagem de cistos pela adição de uma alíquota de 20 µl de suspensão entre lâmina e lamínula (24 X 24 mm) e observação ao microscópio de luz em objetiva de 10X. A concentração da suspensão foi ajustada, com PBS, para inóculo final de 20 cistos a cada 0,2 ml. Alíquotas foram usadas para inóculos de machos para manutenção da cepa ou de fêmeas para condução dos experimentos (BARBOSA *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2011).

#### **3.3. Manutenção das cepas RH, TgChBrUD1 (UD1) e TgChBrUD2 (UD2) de *T. gondii***

As cepas RH, UD1 e UD2 foram mantidas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss no CEBEA/UFU. Foi realizada inoculação intraperitoneal nos camundongos, por

meio de passagens seriadas em intervalos de 48-72 horas de inóculo com  $1 \times 10^6$  taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal dos camundongos infectados (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980).

Os exsudatos peritonais de camundongos previamente infectados foram obtidos por meio de lavagens da cavidade abdominal com PBS 0,01M estéril pH 7,2 e, em seguida, as suspensões parasitárias foram centrifugadas a 720 x g por 5 minutos. Os taquizoítas resultantes na fração *pellet* foram ressuspenso em 0,5 ml de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) mantidos em fibroblasto humano (HFF) em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da UFU. As células com os parasitos foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> (Ciencor Scientific, Brasil) em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cutilab, Brasil) e 1% de antibióticos (10.000U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) (Cutilab, Brasil), L-glutamina, aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio e 2β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, USA) em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

O repique dos parasitos foi realizado a cada três dias da seguinte maneira: o sobrenadante contendo os taquizoítas foi coletado e transferido para tubos de 15 ml e centrifugados a 720 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* contendo parasitos foi ressuspenso em 1 ml de meio com soro, acima descrito, e distribuído em dois novos frascos de cultura contendo células HFF ou foi utilizado nos experimentos. A contagem dos parasitos em microscópio de luz foi feita em câmara de Neubauer utilizando-se 20 µl do *pellet* contendo os taquizoítas com 20 µl de azul de Tripan.

### **3.4. Grupos experimentais**

#### *3.4.1. Avaliação da infecção com a cepa UD1 ou UD2 em machos e fêmeas de *Calomys callosus**

Machos (n=6) e fêmeas (n=6) de *C. callosus*, com idade entre 2 e 3 meses, foram infectados por via intraperitoneal com 100 taquizoítas da cepa UD1 ou UD2. Os animais foram monitorados por 15 dias para avaliar a mortalidade, mudança de peso corporal e morbidade. A avaliação da morbidade foi estabelecida utilizando um sistema baseado em escores como previamente descrito com modificações (BARTLEY *et al.*, 2006). Os

seguintes critérios foram adotados: (0) pelo normal, animal ativo; (1) pelo arrepiado; animal apático; (2) pelo muito arrepiado, animal apático e relutante a se mover.

Em um segundo experimento, os animais de ambos os sexos (machos: n=6; fêmeas: n=6) foram infectados como descrito acima e sacrificados após 8 dias de infecção. O exsudato peritoneal dos animais foi examinado ao microscópio para confirmar a infecção por *T. gondii*. Baço, fígado e cérebro foram coletados para avaliação do parasitismo tecidual por imuno-histoquímica e PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

#### *3.4.2. Avaliação da reinfecção com a cepa UD1 ou UD2 em fêmeas cronicamente infectadas pela cepa ME-49*

Fêmeas virgens de *C. callosus* (n=15), com idade entre 2 e 3 meses, foram infectadas por via oral, com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. As fêmeas foram divididas randomicamente em três grupos de 5 animais. Após 60 dias de infecção, foi realizada a reinfecção pelo inóculo intraperitoneal de 100 taquizoítas da cepa RH, UD1 ou UD2 de *T. gondii*. A reinfecção com a cepa RH foi utilizada como controle, uma vez que fêmeas de *C. callosus* cronicamente infectadas com a cepa ME-49 são resistentes à reinfecção pela cepa RH (FRANCO *et al.*, 2011). A confirmação da infecção primária foi verificada pela detecção de anticorpos IgG em amostras de soro das fêmeas 5 dias antes da reinfecção pelo ensaio ELISA. As fêmeas foram observadas diariamente quanto à mortalidade, alterações de peso corporal e morbidade durante 25 dias após a reinfecção. A avaliação da morbidade foi estabelecida utilizando o sistema baseado em escores como descrito anteriormente.

#### *3.4.3. Avaliação da reinfecção com a cepa UD1 ou UD2 em fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49*

Fêmeas virgens de *C. callosus* (n=28), com idade entre 2 e 3 meses, foram divididas randomicamente em 4 grupos de 7 animais: grupo 1 (fêmeas não infectadas); grupo 2 (fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 de *T. gondii*); grupo 3 (fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 de *T. gondii*) e grupo 4 (fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD2 de *T. gondii*). Fêmeas dos grupos 2, 3 e 4 foram infectadas, por via oral, com 20 cistos da cepa ME-49, como descrito. A confirmação da infecção primária

foi verificada pela detecção de anticorpos específicos no soro das fêmeas, após 55 dias (fase crônica) de infecção pelo ensaio ELISA.

Após 60 dias de infecção, os animais foram colocados para acasalar em gaiolas separadas, na proporção de duas fêmeas para cada macho. Pela manhã, as fêmeas foram observadas e o acasalamento foi constatado pela presença da rolha vaginal (mistura de sêmen e secreção vaginal). O dia da detecção da rolha vaginal foi considerado o 1º dia de gestação. Neste dia, as fêmeas foram inoculadas, intraperitonealmente, com 100 taquizoítas a cepa UD1 (grupo 3) ou UD2 (grupo 4). As fêmeas dos grupos 1 e 2 foram inoculadas, intraperitonealmente, com PBS estéril como controle do inóculo (SALOMÃO *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2011).

Para cada grupo experimental, as fêmeas foram observadas diariamente quanto à mortalidade e morbidade até o 19º dia de gestação. Neste dia, as fêmeas foram anestesiadas como descrito anteriormente, sangradas via plexo retro-orbital, para obtenção de amostras de soro para posterior análise, e depois foram sacrificadas. Os úteros foram examinados e os sítios de implantação foram quantificados. Sítios de implantação normal e sítios de reabsorção foram identificados visualmente. Sítios de implantação com placenta e embrião pequenos, com aparência hemorrágica e coloração marrom ou sem cor foram definido como um sítio de reabsorção (ZENCLUSSEN *et al.*, 2002; KUSAKABE *et al.*, 2008). A taxa de perda embrionária foi calculada pela porcentagem de sítios de reabsorção em relação ao número total de implantações (JOACHIM *et al.*, 2001). Os órgãos periféricos (fígado, baço e pulmão), bem como útero, placenta e fetos, foram coletados para ensaios de imuno-histoquímica, qRT-PCR e PCR-RFLP. Placentas e fetos foram utilizados para bioensaios em camundongos Swiss. Os soros provenientes das amostras de sangue coletadas das fêmeas de *C. callosus* e dos camundongos Swiss utilizados no bioensaio foram obtidos à centrifugação (3000 x g, 5 minutos) e armazenados a -20 °C até serem utilizados nos testes de ELISA para detecção de citocinas e anticorpos.

### **3.5. Imuno-histoquímica**

Para a imunolocalização dos parasitos ao microscópio de luz, amostras foram fixadas em formol 10% em PBS para inclusão em parafina. Cortes de 4 µm foram depositados em lâminas previamente recobertas com solução aderente de Poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinados, hidratados em álcool etílico de concentrações

decrecentes e por fim em água corrente. Após hidratação, os cortes foram incubados em solução de ácido acético 5%, lavados em água corrente e em solução salina tamponada com TRIS (*Tris-buffered saline*, TBS). Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, o material foi incubado com soro normal de cabra a 2% em TBS e em seguida recebeu anticorpo policlonal de camundongo anti-*T. gondii* (1:100) (*in-house*). Após lavagens em TBS, as lâminas foram incubadas com IgG biotinilado de cabra anti-IgG de camundongo (1:600) (Sigma-Aldrich, USA). A reação foi amplificada pelo complexo avidina/biotina (ABC)-fosfatase alcalina (ABC kit, PK-4000; Vector Laboratories, USA) e a revelação da enzima fosfatase alcalina foi feita com *fast red-naftol* (Sigma-Aldrich, USA), seguida da contra-coloração com hematoxilina de Mayer. As lâminas foram montadas em glicerina e o material analisado e fotografado em microscópio de luz (BARBOSA *et al.*, 2008).

### **3.6. Bioensaio**

Placentas das fêmeas grávidas e o fígado e encéfalo dos fetos foram removidos, homogeneizados em 1ml de PBS estéril e inoculados intraperitonealmente em camundongos Swiss com sorologia negativa para *T. gondii*. Dois animais receberam o inóculo com o homogeneizado das placenta e outros dois animais receberam o inóculo com o homogeneizado dos órgãos fetais (500 µl/animal). Estes animais foram observados diariamente quanto à mortalidade até o 35º dia de infecção. Os animais que sobreviveram foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas para posterior análise de anticorpos pelo ensaio ELISA. Além disso, os cérebros destes animais foram coletados para a detecção do parasito por PCR e PCR-RFLP.

### **3.7. Extração de DNA**

O DNA dos parasitos presentes nas amostras de tecido foi extraído pelo kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, USA) conforme instruções do fabricante. Os tecidos foram macerados através de congelamento utilizando nitrogênio líquido e o peso normalizado para 20 mg. A quantidade de DNA total extraído foi determinada por absorbâncias em NanoDrop (ND1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA) no comprimento de onda 260 e 280 nm. O grau de pureza das extrações foi determinado pela razão entre as leituras em

densidade óptica (DO) 260/DO 280 nm. As amostras foram consideradas puras quando o valor da razão foi entre 1,8 e 2,0.

As amostras de tecidos das fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2 foram enviadas para o *Molecular Parasitology and Pathogenesis Laboratory* na University of Tennessee, Knoxville, USA e as reações de qPCR e a genotipagem por PCR-RFLP foram orientadas pelo Prof. Dr. Chunlei Su.

### **3.8. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)**

A detecção de *T. gondii* e a determinação da carga parasitária nas amostras de tecido foram determinadas por qRT-PCR. Para esta análise no grupo experimental de machos e fêmeas infectados com a cepa UD1 ou UD2, foi utilizado o *StepOnePlus® Real Time PCR System* (Applied Biosystems, USA) com corante fluorescente de ligação ao DNA do kit *Go Taq® qPCR Master Mix* (Promega Corporation, USA). As condições de termociclagem bem como os oligonucleotídeos foram realizados conforme descrito por Wahab e colaboradores em 2010 (WAHAB *et al.*, 2010). Os primers a serem utilizados para amplificação do DNA foi correspondente ao gene repetitivo de 529 pares de base: *forward*, 5'-CACAGAAGGGACAGAAAGT-3' e *reverse*, 5'-TCGCCTTCATCTACAGTC-3'. Os dados foram analisados usando o software *Data Analysis and Technical Graphics* (Origin version 6.0; Microcal Software, Inc., USA).

Para a análise nos grupos experimentais das fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2, foi utilizado a sonda TaqMan visando a sequência ITS1 (GenBank # AY143141). Os primers para amplificação por PCR foram ITS1-Fx:AGCGAAGGGGCTCAATTCT e ITS1-Rx: TGAAATAACGGTGTGGGAAA, que amplificam uma sequência de 117 pares de bases. A sonda ITS1 utilizada foi a 6-FAM/CGTGTCTCTGTTGGGATACTGATTCCAGG/BHQ-1, com a extremidade 5' marcado com 6-Fluorescein Amidite (FAM) e a extremidade 3' marcada com Black Hole Quencher-1 (BH-1) (Hill *et al.*, 2012) (Eurofins Scientific, USA). Para a preparação do mix, foram adicionados 17,74 µl de H<sub>2</sub>O; 2,5 µl de tampão PCR 10x contendo MgCl<sub>2</sub> (20 mM); 2,0 µl de dNTP (2,5 mM); 0,13 µl dos primers ITS1-Fx e ITS1-Rx (50 mM); 0,2 µl da sonda ITS1 (50 mM) e 0,3 µl de Faststart Taq DNA polymerase (5 U/µl) (Roche Applied Science, USA) em um volume final de 23 µl. Após

a preparação do *mix*, foi adicionado 3,0 µl de DNA das amostras. A reação foi realizada pelo iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) nas seguintes condições: 94 °C por 60 segundos, 45 ciclos de 92 °C por 15 segundos, 52 °C por 30 segundos e 72 °C por 40 segundos. O valor do *threshold cycle* (Ct) de cada amostra foi comparado com a curva padrão e a concentração relativa de parasitos foi analisada.

### **3.9. Reação em Cadeia pela Polimerase-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP)**

A PCR-RFLP foi realizada com o DNA extraído dos tecidos do grupo experimental das fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2. Também foram incluídas, como controles, amostras de DNA das cepas clonais tipo I (GT1), tipo II (PTG) e tipo III (CTG); de referência (MAS e TgCatBr5) (possuem alelos diferentes das clonais) e das cepas TgCatBr1 e TgCatBr2, que possuem o mesmo genótipo de UD1 e UD2, respectivamente (**Tabela 1**). Pelo fato de serem conhecidos os tipos de cepas analisadas, foram utilizados seis marcadores (SAG1, alt. SAG2, SAG3, BTUB, L358, PK1). Tais marcadores são capazes de distinguir, sem ambiguidade, as três linhagens clonais após a amplificação do DNA-alvo e tratamento com as enzimas de restrição (SU; ZHANG; DUBEY, 2006a; PENA *et al.*, 2008). Os *primers* e as enzimas de restrição utilizados estão descritos em detalhes na **Tabela 2**.

#### *3.9.1. Multiplex PCR (1<sup>a</sup> PCR)*

Para as reações de multiplex PCR foi utilizado o Kit *Fast Start DNA Polymerase* (Roche Applied Science, USA). Para a preparação do *mix*, foram adicionados 16,5 µl de H<sub>2</sub>O; 2,5 µl de tampão PCR 10x livre de MgCl<sub>2</sub>; 2,0 µl de dNTP 2,0 mM; 2,0 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 0,15 µl do *mix* dos oligonucleotídeos iniciadores externos dos marcadores SAG1, SAG3, BTUB, L358, PK1, alt. SAG2 (Eurofins Scientific, USA) (**Tabela 2**) *forward* (25 µM); 0,15 µl do *mix* dos oligonucleotídeos iniciadores externos *reverse* (25 µM) e 0,20 µl de FastStart Taq (5 U/µl) em um volume final de 23,5 µl. Após a preparação do *mix*, foi adicionado 1,5 µl de DNA das amostras. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos.

### 3.9.2. Nested PCR (2<sup>a</sup> PCR)

Para as reações de *Nested*-PCR foi utilizado o Kit Paq5000 *DNA Polymerase* (Agilent Technologies, USA). Para a preparação do *mix*, foram adicionados 18,5 µl de H<sub>2</sub>O; 2,5 µl de tampão PCR 10x livre de MgCl<sub>2</sub>; 2,0 µl de dNTP 2,5 mM; 2,0 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 0,15 µl do *mix* dos oligonucleotídeos iniciadores internos dos marcadores SAG1, SAG3, BTUB, L358, PK1, alt. SAG2 (**Tabela 2**) *forward* (25 µM); 0,15 µl do *mix* dos oligonucleotídeos iniciadores internos *reverse* (25 µM) e 0,20 µl de Paq 5000 polymerase (5 U/µl) em um volume final de 23,5 µl. Após a preparação do *mix*, foi adicionado 1,5 µl de produto da *multiplex* PCR. A *Nested*-PCR foi realizada com uma desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 60 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minutos e 30 segundos.

### 3.9.3. RFLP

A fim de investigar o padrão de RFLP de cada amostra, 3 µl de cada produto da *Nested* PCR foram misturados a 17 µl do *mix* da reação de digestão contendo 14,6 µl de tampão NEB (10x); 0,2 µl de BSA (100x); 0,1 µl de cada enzima de restrição. As amostras foram incubadas na temperatura indicada pelo fabricante (**Tabela 2**) (New England BioLabs, USA) Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose a 2,5% contendo 0,5 µg de brometo de etídio, em cuba horizontal com solução tampão borato de sódio (SB), juntamente com o marcador de peso molecular. As bandas foram analisadas sob luz ultravioleta, utilizando-se um analisador de imagem (Foto/Analyst Investigator Fotodyne Incorporated, USA).

## 3.10. Ensaio Imunoenzimático

Para os ensaios imunoenzimáticos ELISA, experimentos pilotos realizados mostraram que os protocolos descritos abaixo para a detecção das citocinas IFN-  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$  e de IgG total e subclasses anti-*T. gondii* utilizando anticorpo secundário para camundongo são adequados para a detecção das citocinas e dos anticorpos de *C. callosus* devido ao fenômeno da reatividade cruzada.

### 3.10.1. ELISA tipo sanduíche

Para avaliar o perfil de resposta Th1/Th2 pelas fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfectadas com o isolado UD1 ou UD2, foi realizado o teste ELISA tipo sanduíche para a detecção de citocinas. Foram utilizados *kits* desenvolvidos para camundongos, mas sensíveis também para *C. callosus*, das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  (OpTEIA, BD Bioscience, USA) e IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  (Duoset R&D Systems, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações das citocinas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão de citocinas murinas recombinantes.

Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporate Costar®, USA) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura por 18 horas à temperatura ambiente ou a 4 °C. Após lavagem das placas com PBS-T e bloqueio com soluções bloqueadoras específicas para cada análise, as amostras de soro foram adicionadas. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas murinas recombinantes foram realizadas em diluições duplas seriadas. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinilados por 2 horas à temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático ( $H_2O_2$  a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm (Thermo Fisher Scientific, USA) e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/ml de acordo com a curva padrão, utilizando-se o software Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA). O limite de detecção foi de 31,3 pg/ml para o IFN- $\gamma$ , 15,6 pg/ml para o TNF- $\alpha$ , 31,3 pg/ml para o IL-10 e 15,6 pg/ml para o TGF- $\beta$ . Os coeficientes de variação intra e interensaio ficaram abaixo de 20% e 10%, respectivamente.

### 3.10.2. ELISA indireto

Para confirmar a soroconversão das fêmeas infectadas com a cepa ME-49 ou dos camundongos Swiss infectados no bioensaio, foi realizado o teste ELISA indireto para detectar a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii*. Além disso, foi realizado o mesmo teste para avaliar a produção de anticorpos IgG total e suas subclasses (IgG1 e IgG2a)

pelas fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2.

Para a análise de IgG total, placas de poliestireno de baixa afinidade (Kartell SPA, Novigilio, Milan, Italy) foram sensibilizadas com o antígeno solúvel de *T. gondii* a uma concentração proteica de 10 µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato de sódio a 0,06M, pH 9,6 por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween® 20 (Biotec, Brasil) a 0,05% (PBS-T). Foi adicionado 50 µl/ poço das amostras de soros provenientes dos animais analisados, diluídas a 1:64 em PBS com 5% leite desnatado em pó (PBS-TM) em duplicata. Paralelamente, foram adicionados soros controles positivos e negativos nas mesmas diluições. Após incubação por 1 hora a 37 °C, as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T. O anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de camundongo) marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado na diluição de 1:1000 em PBS-TM e as placas foram incubadas por uma hora a 37 °C (BARBOSA *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2011).

Para a análise das subclasses IgG1 e IgG2a, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar, USA) também foram sensibilizadas com o antígeno solúvel de *T. gondii* (10 µg/ml) por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas e foi adicionado 50 µl/ poço das amostras de soros provenientes das fêmeas, diluídas a 1:32 em PBS-TM, em duplicata. Paralelamente, foram adicionados soros controles positivos e negativos nas mesmas diluições. Após incubação por 1 hora a 37 °C, as placas foram lavadas três vezes em PBS-T. O anticorpo secundário de cabra anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado na diluição de 1:1000 em PBS-TM e as placas foram incubadas por uma hora a 37 °C. As placas foram lavadas para posterior adição do substrato enzimático constituído de peróxido de hidrogênio a 0,03% em tampão cromógeno ortofenilenodiamina (OPD) (Merck, Germany) diluídos em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0. Após adição da solução reveladora, as placas foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, em câmara escura. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µl de solução de ácido sulfúrico 2 N. A densidade óptica foi determinada a 492nm em leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific, USA).

Os resultados foram expressos por índice ELISA (IE) como se segue IE = DO amostra/*cut-off*. O ponto de corte foi estabelecido como a média dos valores da DO dos soros controle negativo acrescido de 3 desvios padrão. Valores de IE > 1,2 foram considerados resultados positivos.

### **3.11. Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando o *software Graph Pad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, EUA). Os dados foram expressos como média±desvio padrão dos grupos experimentais. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para estimar a porcentagem de animais sobreviventes após infecção e/ou reinfecção e as curvas de sobrevida foram comparadas usando os testes *Log rank*. Diferenças entre os grupos na análise de escores de morbidade, alterações de peso corporal, carga parasitária, dosagem de anticorpos e de citocinas foram analisadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, quando apropriado, utilizando o teste de comparação múltipla de Dunn, para examinar comparações entre pares de grupos selecionados. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de  $p < 0,05$ .

### **3.12. Normas de Biossegurança e manipulação de animais**

Todos os procedimentos e manuseio do material biológico, dos reagentes, utilização dos equipamentos bem como conduta com os animais foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO *et al.*, 2005). Os procedimentos com os animais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Susceptibilidade de machos e fêmeas à infecção com a cepa UD1 ou UD2

Após a infecção com 100 taquizoítas da cepa UD1 ou UD2, machos e fêmeas de *C. callosus* foram observados diariamente para avaliar a mortalidade, mudança de peso corporal e morbidade por 15 dias.

#### 4.1.1. Mortalidade

Machos infectados com a cepa UD1 morreram a partir do 9º dia, alcançando 100% de mortalidade no 12º dia após a infecção (**Figura 1A**). Os machos infectados com a cepa UD2 também morreram a partir 9º dia, mas alcançaram 100% de mortalidade no 10º dia após a infecção (**Figura 1A**), apresentando menor taxa de sobrevivência em comparação com os machos infectados com a cepa UD1 ( $p = 0,0423$ ) (**Figura 1A**).

As fêmeas infectadas começaram a morrer a partir do 8º dia, alcançando 100% de mortalidade no 9º dia após a infecção com a cepa UD1 e no 13º dia após a infecção com a cepa UD2 (**Figura 1B**). Quando comparadas, não foi observada diferença significativa entre as curvas de sobrevivência (**Figura 1B**).

A comparação entre machos e fêmeas infectados com a cepa UD1 mostrou que as fêmeas morreram antes que os machos com média de sobrevivência de 9,0 e 10,5 dias, respectivamente ( $p=0,0038$ ) (**Figura 1C**). Por outro lado, machos e fêmeas infectados com a cepa UD2 apresentaram a mesma média de sobrevivência (9,5 dias), sem diferença estatística significante entre as curvas de sobrevivência (**Figura 1D**).

#### 4.1.2. Alteração do peso corporal

Machos infectados apresentaram pouca alteração no peso corporal nos primeiros dias de infecção com a cepa UD1 ou UD2, mas a partir do 6º dia de infecção começaram a perder peso (**Figura 2A**). Observou-se perda significativa de peso nos machos infectados com a cepa UD1 em comparação com os machos infectados com a cepa UD2 (**Figura 2A**).

As fêmeas infectadas com a cepa UD1 apresentaram aumento do peso corporal, enquanto as fêmeas infectadas com a cepa UD2 apresentaram flutuações no peso corporal até o 7º dia após a infecção quando começaram a perder peso (**Figura 2B**).

Observou-se perda significativa de peso nas fêmeas infectadas com a cepa UD2 em comparação com as fêmeas infectadas com a cepa UD1 (**Figura 2B**).

A comparação entre machos e fêmeas infectadas com a cepa UD1 mostrou que as fêmeas ganharam peso, enquanto os machos perderam peso ( $p < 0,001$ ) (**Figura 2C**). Por outro lado, machos e fêmeas infectados com a cepa UD2 apresentaram perda de peso a partir do 7º dia após a infecção ( $p < 0,001$ ) (**Figura 2D**). Além disso, foi observado que no 8º e 9º dia após a infecção, as fêmeas apresentaram perda significativa de peso em comparação com os machos (**Figura 2D**).

#### *4.1.3. Morbidade*

Os machos infectados tanto com a cepa UD1, quanto com a cepa UD2 não apresentaram mudanças nos escores de morbidade nos primeiros dias após a infecção, mas começaram a apresentar pelo arrepiado e mostram-se apáticos no 6º e 7º dia após a infecção com as cepas UD1 e UD2, respectivamente (**Figura 3A**). No 8º dia após a infecção, os machos infectados com a cepa UD1 apresentaram maiores escores de morbidade em comparação com os machos infectados com a cepa UD2 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 3A**).

As fêmeas infectadas com a cepa UD1 apresentaram maiores escores de morbidade no 6º, 7º e 8º dia após a infecção em comparação com as fêmeas infectadas com a cepa UD2 (**Figura 3B**). Relutância a se mover foi observada tanto em machos, quanto em fêmeas infectadas com a cepa UD1 ou UD2 um dia antes de morrerem.

A comparação entre machos e fêmeas mostrou que as fêmeas infectadas com a cepa UD1 apresentaram maior média dos escores de morbidade, com diferença significativa no 6º, 7º e 8º dia após a infecção (**Figura 3C**). Por outro lado, os machos infectados com a cepa UD2 apresentaram maior média dos escores de morbidade, com diferença significativa no 7º, 8º e 9º dia após a infecção (**Figura 3D**).

#### *4.1.4. Parasitismo tecidual no fígado, baço e cérebro de machos e fêmeas infectados com a cepa UD1 ou UD2*

O parasitismo tecidual foi quantificado por qPCR e detectado por imuno-histoquímica. As fêmeas infectadas com a cepa UD2 apresentaram maior número de parasitos no fígado e baço em comparação com as fêmeas infectadas com a cepa UD1 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 4A e B**), mas não apresentaram diferença significativa no número de

parasitos no cérebro (**Figura 4C**). Também não foi observada diferença significativa no número de parasitos no fígado, baço e cérebro entre os machos infectados com a cepa UD1 ou UD2, bem como entre machos e fêmeas infectadas com ambas as cepas (**Figura 4A-C**).

A comparação entre os órgãos mostrou maior número de parasitos no fígado em comparação com o cérebro de machos e fêmeas infectadas com a cepa UD1 ou UD2 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 5A-D**). A imuno-histoquímica confirmou a presença de *T. gondii* no fígado, baço e cérebro (**Figura 6A-C**). Além disso, a análise por microscopia de luz revelou a presença de taquizoítas no fluido peritoneal tanto dos machos, quanto das fêmeas após 8 dias de infecção (dia do sacrifício) com a cepa UD1 ou UD2 (**Figura 6D**).

#### **4.2. Susceptibilidade de fêmeas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2**

Fêmeas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa RH UD1 ou UD2 foram observadas diariamente para avaliar a mortalidade, mudança de peso corporal e morbidade por 25 dias. Foi observado que todas as fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 sobreviveram à reinfecção com a cepa RH, UD1 ou UD2 (**Figura 7A**). Além disso, estas fêmeas não apresentaram alterações significativas de peso e morbidade (**Figura 7B e C**).

#### **4.3. Susceptibilidade de fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2**

Fêmeas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2 no primeiro dia de gestação foram observadas diariamente para avaliar a mortalidade, morbidade e o resultado da gestação por 19 dias.

##### *4.3.1. Mortalidade e morbidade*

Foi observado que todas as sete fêmeas dos grupos 1, 2, 3 e cinco fêmeas do grupo 4 sobreviveram até o 19º dia de gestação (**Tabela 3 e Figura 8A**). A comparação entre os grupos mostrou menor taxa de sobrevivência no grupo 4 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 8A**). Não foi observado mudança na média dos escores de morbidade nas fêmeas dos grupos 1, 2, 3 (**Figura 8B**). No entanto, as fêmeas do grupo 4 apresentaram maior média dos escores

de morbidade em comparação com os outros grupos, em que observou-se o pêlo arrepiado e apatia dessas fêmeas a partir do 11º dia de gestação e escores máximos no final do período de observação ( $p < 0,05$ ) (Figura 8B).

#### *4.3.2. Resultado da gestação*

No 19º dia de gestação, todas as fêmeas do grupo 1 apresentaram fetos normais e três fêmeas apresentaram reabsorção fetal (42,8%). Foi observado o total de 28 sítios de implantação e três sítios de reabsorção, com taxa de perda embrionária de 10,7% (Tabela 3, Figura 9A).

No grupo 2, todas as fêmeas apresentaram fetos normais e três fêmeas apresentaram fetos reabsorvidos (42,8%). Foi observado o total de 30 sítios de implantação e três sítios de reabsorção, com taxa de perda embrionária de 10% (Tabela 3, Figura 9B).

No grupo 3, cinco fêmeas apresentaram fetos normais e quatro fêmeas apresentaram fetos reabsorvidos (57,1%). Considerando as quatro fêmeas que apresentaram fetos reabsorvidos, duas delas apresentaram apenas os sítios de implantação com processos de reabsorção (Tabela 3, Figura 9C). Foi observado o total de 34 sítios de implantação e 11 sítios de reabsorção, com taxa de perda embrionária de 32,3% (Tabela 3).

No grupo 4, apenas uma fêmea apresentou fetos normais e quatro fêmeas apresentaram fetos reabsorvidos (80%). Nas fêmeas com fetos reabsorvidos, apenas sítios de implantação com processos de reabsorção foram observados (Tabela 3, Figura 9D). O total de 23 sítios de implantação e 19 sítios de reabsorção resultou na taxa de perda embrionária de 82,6% (Tabela 3).

#### **4.4. Transmissão vertical de *T. gondii* em fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2**

A transmissão vertical de *T. gondii* foi avaliada por imuno-histoquímica, bioensaio, ELISA e qPCR. Foi observado que não houve transmissão vertical do parasito em fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49, enquanto nas fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2 foi observado parasitos em tecidos fetais.

Observou-se a marcação dos parasitos por imuno-histoquímica nos tecidos placentários e fetais das fêmeas do grupo 3 e em apenas tecidos placentários da fêmea do grupo 4 (**Figura 10A-C**).

A detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi observada em camundongos que receberam o inóculo com o homogeneizado de placenta e fetos das fêmeas do grupo 3 (**Figura 10D**). Além disso, alguns camundongos morreram entre o 7º e 10º dia após receberem o inóculo com o homogeneizado de placenta e fetos das fêmeas do grupo 3 e o inóculo com o homogeneizado de placenta da fêmea do grupo 4 (**Tabela 4**). Não foi observada a soroconversão dos camundongos inoculados com o homogeneizado de fetos da fêmea do grupo 4 (**Figura 10D**).

O DNA de *T. gondii* foi detectado em tecidos placentários em quatro fêmeas do grupo 2, em cinco fêmeas do grupo 3 e na fêmea do grupo 4 (**Tabela 4**). Em tecidos fetais, o DNA do parasito foi detectado em apenas uma das fêmeas do grupo 3 e não foi detectado em tecidos fetais de fêmeas dos grupos 2 e 4 (**Tabela 4**). Quando os cérebros dos camundongos utilizados no bioensaio foram analisados, foi observado o DNA de *T. gondii* em todos os camundongos inoculados com o homogeneizado de tecidos placentários de três fêmeas do grupo 3 (**Tabela 4**). Os camundongos que receberam o inóculo com o homogeneizado de tecidos placentários das outras duas fêmeas do grupo 3 e da fêmea do grupo 4 morreram entre o 7º e 10º dia após o inóculo (**Tabela 4**). Além disso, foi detectado DNA de *T. gondii* no cérebro dos camundongos inoculados com o homogeneizado de tecidos fetais de uma das fêmeas do grupo 3 e da fêmea do grupo 4 (**Tabela 4**). Foi observado a morte dos camundongos, entre o 7º e 10º dia após o inóculo, que receberam o inóculo com o homogeneizado de tecidos fetais de uma das fêmeas do grupo 3 (**Tabela 4**).

#### **4.5. Parasitismo tecidual em fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e/ou reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2**

O parasitismo foi avaliado por imuno-histoquímica e qPCR no útero, placenta, feto, fígado, baço e pulmão das fêmeas dos grupos 2, 3 e 4.

O DNA de *T. gondii* foi detectado no útero das duas fêmeas do grupo 3 e das quatro fêmeas do grupo 4 que apresentaram apenas os sítios de implantação com processos de reabsorção (**Tabela 4**). Foi observado que as fêmeas do grupo 4 apresentaram maior concentração relativa de parasitos no útero em comparação com as

fêmeas do grupo 3 (**Figura 11A**). Fotomicrografias representativas do tecido uterino das fêmeas do grupo 3 e 4 infectado com *T. gondii* estão demonstradas nas **figuras 11B e 11C**, respectivamente.

Na placenta, não foram observadas diferenças significativas na concentração relativa de parasitos entre os grupos 2, 3 e 4 (**Figura 12A**). Nos tecidos fetais, foi possível avaliar o parasitismo em apenas tecidos fetais de uma das fêmeas do grupo 3, e por isso não foi possível fazer a análise comparativa entre os grupos (**dados não apresentados**).

Foi observado que as fêmeas do grupo 4 apresentaram maior concentração relativa de parasitos no fígado, baço e pulmão em comparação com as fêmeas do grupo 2 (**Figura 12B-D**) e maior concentração relativa de parasitos no baço em comparação com as fêmeas do grupo 3 (**Figura 12C**). A comparação entre os órgãos das fêmeas pertencentes ao mesmo grupo mostrou que não houve diferença significativa na concentração relativa de parasitos (**Figura 13A-C**).

#### **4.6. Genotipagem de *T. gondii* em tecidos infectados de fêmeas grávidas cronicamente infectadas pela cepa ME-49 e/ou reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2**

A genotipagem dos parasitos encontrados nos tecidos das fêmeas dos grupos 2, 3 e 4 foi avaliada pela PCR-RFLP. As amostras foram analisadas de acordo com as bandas visualizadas no gel de agarose e então comparadas com as cepas controles (**Figura 14A e B**). Foi observado que nos dois úteros das fêmeas do grupo 3, um deles apresentou a cepa ME-49 e o outro a cepa UD1 (**Tabela 5**). No grupo 4, os quatro úteros analisados apresentaram parasitos pertencentes à cepa UD2 (**Tabela 5**).

Nas placenta de todas as fêmeas do grupo 2, foi encontrada a cepa ME-49 (**Tabela 5**). No grupo 3, três fêmeas apresentaram a cepa ME-49, enquanto duas fêmeas apresentaram a cepa UD1 nas placenta (**Tabela 5**). No grupo 4, as placenta da única fêmea grávida apresentaram a cepa UD2 (**Tabela 5**).

Foi observado a cepa UD1 nos tecidos fetais da fêmea do grupo 3 em que foi detectado o DNA do parasito (**Tabela 4 e 5**).

A cepa ME-49 foi encontrada em cinco fígados, três baços e quatro pulmões das fêmeas do grupo 2 (**Tabela 5**). No grupo 3, quatro fêmeas apresentaram a cepa UD1 no fígado, enquanto apenas uma fêmea apresentou infecção mista nesse mesmo órgão. No

baço, apenas uma fêmea apresentou a cepa ME-49 e quatro fêmeas apresentaram a cepa UD1. Quando o pulmão foi analisado, foi observado que duas fêmeas apresentaram a cepa ME-49 e três fêmeas apresentaram a cepa UD1 (**Tabela 5**). No grupo 4, cinco fêmeas apresentaram a cepa UD2 no fígado e quatro fêmeas apresentaram a cepa UD2 no baço. Quando o pulmão foi analisado, foi observado a cepa UD2 em quatro fêmeas, enquanto apenas uma fêmea apresentou infecção mista (**Tabela 5**).

Quando os cérebros dos camundongos utilizados no bioensaio foram analisados, foi observado a cepa ME-49 nos camundongos inoculados com o homogeneizado de tecidos placentários das três fêmeas do grupo 3 (**Tabela 5**). A cepa ME-49 também foi observada nos camundongos inoculados com o homogeneizado de tecidos fetais da fêmea do grupo 3 em que foi detectado o DNA do parasito (**Tabela 5**). A genotipagem dos parasitos no cérebro dos camundongos inoculados com o homogeneizado de tecidos placentários da única fêmea grávida do grupo 4 não foi realizada devido a morte dos mesmos entre o 7º e 10º dia após o inóculo. A cepa UD2 foi observada nos camundongos inoculados com o homogeneizado de tecidos fetais da fêmea grávida do grupo 4 (**Tabela 5**).

#### **4.7. Resposta imune celular – dosagem de citocinas**

Para determinar se a reinfecção com a cepa UD1 ou UD2 de *T. gondii* no primeiro dia de gestação poderia interferir na resposta tipo Th1 ou Th2 das fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49, os níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  foram analisados pelo teste ELISA.

Os níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 foram significativamente maiores no soro das fêmeas do grupo 3 e 4 em comparação com o grupo 1 (**Figura 15A-C**). Foi observado menores níveis de TGF- $\beta$  no soro das fêmeas do grupo 2, 3 e 4 em comparação com as fêmeas do grupo 1 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 15D**).

Quando comparados com o grupo 2, os grupos 3 e 4 apresentaram maiores níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) (**Figura 15A e B**). Os níveis de IL-10 foram significativamente maiores no soro das fêmeas do grupo 3 em comparação com as fêmeas do grupo 2 (**Figura 15C**). Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de IL-10 na comparação entre as fêmeas do grupo 2 e grupo 4 (**Figura 15C**) e nos níveis de TGF- $\beta$  entre as fêmeas do grupo 2 e 3 ou 4 (**Figura 15D**).

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  entre as fêmeas do grupo 3 e 4 (**Figura 15A-D**).

#### 4.8. Resposta imune humoral

Para verificar se a reinfecção poderia alterar os níveis dos anticorpos IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2a, as amostras de soro das fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2 no primeiro dia de gestação foram submetidas ao teste ELISA. As amostras de soro foram coletadas em dois momentos: após 55 dias de infecção com cepa ME-49, caracterizando o período antes da gestação; e após 19 dias de gestação/reinfecção, caracterizando o período durante a gestação.

Foi observado que a soroconversão ocorreu antes da gestação, aos 55 dias após a infecção pela cepa ME-49 nos grupos 2, 3 e 4 (**Figura 16A**). Não foi observada diferença significativa na comparação entre os níveis de IgG total antes e durante a gestação nas fêmeas do grupo 2, 3 e 4 (**Figura 16A**). Além disso, não foi observada diferença significativa nos níveis de IgG total nos soros das fêmeas do grupo 2 em comparação com as fêmeas do grupo 3 ou 4 durante a gestação (**Figura 16A**).

Em todos os grupos analisados foram observados baixos níveis de IgG1 e IgG2a tanto antes da gestação, quanto durante a gestação (dados não mostrados). A razão IgG2a/IgG1 antes e durante a gestação não mostrou diferença significativa para as fêmeas do grupo 2 e 4, enquanto as fêmeas do grupo 3 mostraram menor razão entre IgG2a/IgG1 durante a gestação ( $p < 0,05$ ) (**Figura 16B**).

## 5. DISCUSSÃO

*Toxoplasma gondii* tem um ciclo de vida complexo, envolvendo diversos hospedeiros intermediários e estágios intracelulares obrigatórios (CENCI-GOGA *et al.*, 2011). A susceptibilidade e o desenvolvimento da fase aguda da infecção são extremamente variáveis entre os hospedeiros. Apesar de *T. gondii* ser reconhecido como a única espécie do gênero, existe uma grande variação de virulência entre as diferentes cepas e isolados deste parasito e que podem ser associados com infecções mais graves (HOWE; SIBLEY, 1995; DUBEY *et al.*, 2008; BECK *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2013). Estudos analisaram a virulência de cepas de *T. gondii* obtidas de animais domésticos nos estados de Minas Gerais e São Paulo, e observaram grande número de amostras de alta e intermediária virulência (BRANDAO *et al.*, 2006; PENA *et al.*, 2008).

Além do tipo de cepa ou isolado, a virulência em camundongos depende de vários fatores, incluindo o estágio do parasito utilizado para a infecção, a via de infecção, a dose inoculada e a linhagem do camundongo (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011; DUBREMETZ; LEBRUN, 2012; MELO *et al.*, 2013). *C. callosus* é suscetível à infecção pela cepa RH de *T. gondii*, mas é resistente à cepa ME-49 com formações de cistos teciduais (FAVORETO-JUNIOR *et al.*, 1998; PEREIRA MDE *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 1999). No presente estudo, foi observado que tanto os machos, quanto as fêmeas de *C. callosus* foram susceptíveis às cepas brasileiras UD1 e UD2. Nossos resultados mostraram que os machos e as fêmeas morreram durante a fase aguda da infecção, entre o 9º e 13º dia após a infecção, independente da cepa inoculada. Além disso, a presença de taquizoítas no fluido peritoneal, a perda de peso e os sinais clínicos mais graves dias antes da morte dos animais foram observados. Em camundongos, a fase aguda da infecção com proliferação dos taquizoítas pode ser observada até 21 dias após a infecção. Com o início da resposta imune, os taquizoítas são erradicados, porém alguns deles convertem-se em bradizoítas, formando os cistos teciduais (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Desta forma, o presente estudo foi o primeiro a avaliar a susceptibilidade de *C. callosus* utilizando as cepas brasileiras UD1 e UD2, mostrando que estas são altamente virulentas para este modelo experimental.

É conhecido que esteroides sexuais regulam uma variedade de funções, como o crescimento, reprodução e diferenciação celular. Alguns estudos já mostraram que o gênero também pode ter uma importante função na susceptibilidade às doenças infecciosas (ROBERTS; CRUICKSHANK; ALEXANDER, 1995; ROBERTS *et al.*,

2001; NAVA-CASTRO *et al.*, 2012). A habilidade dos parasitas em afetar, diferencialmente, a fêmea ou o macho da mesma espécie pode ser decorrente da regulação da resposta imune por hormônios sexuais (ROBERTS *et al.*, 2001).

Os hormônios sexuais podem alterar a susceptibilidade à infecção parasitária, estimulando ou suprimindo o sistema imune ou influenciando o crescimento e desenvolvimento do parasito no hospedeiro. Muitos parasitas alteraram a concentração de hormônios esteroides em hospedeiros infectados (DUNEAU; EBERT, 2012). Um estudo com camundongos da linhagem C57BL/6 mostrou que as fêmeas infectadas por *T. gondii* morreram significativamente mais cedo do que os machos, um efeito associado a um maior número de taquizoítas e necrose no intestino delgado das fêmeas. Em contraste, o tratamento com testosterona nas fêmeas reduziu o número de parasitos intestinais, bem como a patologia associada à infecção (LIESENFELD *et al.*, 2001). Outro estudo, com camundongos da geração F1 do cruzamento entre fêmeas da linhagem BALB/c e machos da linhagem C57BL/6, mostrou diminuição dos níveis de testosterona nos machos e nas fêmeas infectados, quando comparados com os animais não infectados, indicando que a infecção por *T. gondii* induziu uma alteração no metabolismo da testosterona (KANKOVA; KODYM; FLEGR, 2011).

Curiosamente, as diferenças no curso da infecção entre machos e fêmeas também são dependentes do tipo de parasita. Um estudo com *C. callosus* infectados com *Trypanosoma cruzi* mostrou que os machos apresentaram maior percentual de positividade para o parasita em comparação com as fêmeas. Estes dados indicam que a testosterona pode influenciar a resposta imune em *C. callosus*, refletindo uma maior susceptibilidade dos machos para a infecção por *T. cruzi* (LOURENÇO *et al.*, 2008). Além disso, em *C. callosus* orquiectomizados, foi observado um menor número de parasitos no sangue em comparação com os machos não orquiectomizados, apontando que a ablação gonadal de esteroides influenciou a resposta imune e tornou esses machos mais resistentes contra a infecção por *T. cruzi* (PINTO *et al.*, 2010).

No presente estudo, foi observado que as fêmeas de *C. callosus* morreram significativamente mais cedo do que os machos, quando infectadas com a cepa UD1. Por outro lado, não observamos diferença significativa na mortalidade entre os machos e as fêmeas após a infecção com a cepa UD2. Além disso, os machos infectados com a cepa UD2 morreram significativamente mais cedo do que os machos infectados pela cepa UD1. Quando o peso dos animais foi analisado, foi observado que os machos tiveram perda de peso, independentemente do tipo da cepa, porém a perda de peso foi

significativamente maior nos machos infectados com a cepa UD1 em comparação com os machos infectados com a cepa UD2. Em contraste, as fêmeas infectadas com a cepa UD1 tiveram ganho de peso, enquanto aquelas infectadas com UD2 registraram perda de peso. Esses resultados mostram que a cepa UD2 induziu a perda de peso tanto nos machos, quanto nas fêmeas, mas a cepa UD1 provocou efeitos opostos no peso corporal de acordo com o gênero de *C. callosus*. Quando os escores de morbidade foram avaliados, a cepa UD1 provocou maior morbidade nas fêmeas do que machos, enquanto que a cepa UD2 causou maior morbidade nos machos comparados com as fêmeas. Além disso, a cepa UD1 causou maior morbidade nos machos e nas fêmeas, em comparação com a cepa UD2. Estes resultados mostram que o dimorfismo sexual e o tipo de cepa influenciaram no curso da infecção em *C. callosus*, sendo as fêmeas mais susceptíveis à cepa UD1 e os machos mais susceptíveis à cepa UD2.

A análise do parasitismo tecidual revelou maior número de parasitos no fígado e no baço das fêmeas infectadas com a cepa UD2, em comparação com as fêmeas infectadas com a cepa UD1. Por outro lado, não observamos diferença significativa no parasitismo tecidual entre os machos infectados com a cepa UD1 e UD2, como também entre os machos e as fêmeas infectados com a cepa UD1 ou UD2. O maior número de parasitos observado nos tecidos das fêmeas infectadas com a cepa UD2 pode ser explicado pela capacidade de cepas virulentas se evadirem dos mecanismos de imunidade do hospedeiro (HUNTER; SIBLEY, 2012). Os fatores de virulência específicos aos tipos de cepas de *T. gondii* interferem de formas diferentes na resposta imune e podem estar associados com a capacidade que o parasito desenvolveu de diminuir a morte celular do hospedeiro, bem como modular a produção de citocinas (LUDER *et al.*, 2009; HUNTER; SIBLEY, 2012; ANGELONI *et al.*, 2013). Um estudo com macrófagos infectados por cepas de *T. gondii* do tipo I (cepas de alta virulência) apresentou menor produção de IL-12 e diminuição na eliminação do parasito. No entanto, macrófagos infectados com as cepas do tipo II (cepas de moderada virulência) registraram maior produção de IL-12 e aumento na eliminação do parasito (KIM *et al.*, 2006). Além disso, estudos recentes estão mostrando a importância das proteínas *immunity-related GTPases* (IRGs) na resposta imune contra diferentes tipos de cepas de *T. gondii* (ZHAO *et al.*, 2009; KHAMINETS *et al.*, 2010; BEHNKE *et al.*, 2012; REESE; SHAH; BOOTHROYD, 2014). IRG são proteínas do grupo das GTPases (enzimas que hidrolizam o GTP), que são recrutadas para a membrana do vacúolo parasitóforo e causam a sua ruptura, facilitando a eliminação dos parasitos por células do

sistema imunológico (TAYLOR *et al.*, 2000). Quando foi analisado o recrutamento destas proteínas após infecção por *T. gondii*, observou-se que as cepas do tipo II (ME-49) induziram maior recrutamento de proteínas IRG em comparação com as cepas do tipo I (RH) (ZHAO *et al.*, 2009; STEINFELDT *et al.*, 2010). Alguns fatores de virulência estão relacionados com esta diferença e acredita-se que a ROP5 e ROP18 sejam as responsáveis pela inibição das proteínas IRG em cepas virulentas (BEHNKE *et al.*, 2012; REESE; SHAH; BOOTHROYD, 2014).

Com o estabelecimento da susceptibilidade dos machos e das fêmeas de *C. callosus* infectados pelas cepas UD1 e UD2, foi investigada a susceptibilidade de fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfetadas com as cepas UD1 ou UD2, para confirmarmos a possibilidade de avaliar a transmissão vertical de *T. gondii* em casos de reinfecção. Nós observamos que as fêmeas cronicamente infectadas com cepa ME-49 sobreviveram por mais de 21 dias após a reinfecção. Além disso, não percebemos mudanças no peso corporal e nos sinais clínicos durante os 21 dias de infecção. Corroborando nossos resultados, um estudo com fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c mostrou que a infecção primária com a cepa ME-49 conferiu proteção contra a reinfecção com as cepas virulentas CH3 e EGS (SILVA *et al.*, 2012). Desta forma, nossos resultados sugerem que a infecção primária por *T. gondii* em *C. callosus* provoca uma resposta imune adaptativa capaz de proteger os animais imunocompetentes contra as cepas virulentas utilizadas na reinfecção, possibilitando, assim, o estudo da toxoplasmose congênita após uma reinfecção.

A toxoplasmose congênita em gestantes imunocompetentes cronicamente infectadas é considerada um evento raro, sendo atribuída à reativação da infecção ou à reinfecção (SILVEIRA *et al.*, 2003; ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009; POMARES *et al.*, 2011; VALDES *et al.*, 2011). Casos de reinfecção podem estar associados com a exposição a um grande número de parasitos, uma cepa mais virulenta ou parasitos pertencentes a diferentes genótipos (ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009; LINDSAY; DUBEY, 2011; CARLIER *et al.*, 2012), uma vez que os taquizoítas de cepas virulentas têm uma maior capacidade de invadir as células e atravessar barreiras biológicas, como a placenta (BARRAGAN; SIBLEY, 2003; ROBBINS *et al.*, 2012).

Acreditava-se que a imunidade adquirida pela infecção primária por *T. gondii* era capaz de prevenir a transmissão vertical do parasito durante a reinfecção (ROBERTS; ALEXANDER, 1992; ABOU-BACAR *et al.*, 2004; PFAFF *et al.*, 2007). No entanto casos de toxoplasmose congênita foram relatados em crianças nascidas de mães

imunocompetentes que tinham sido infectadas com o parasito antes da concepção, sugerindo a ocorrência de reinfecção materna durante a gravidez (ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009). Assim, a hipótese de que a imunidade adquirida pela infecção primária por *T. gondii* é capaz de prevenir transmissão vertical do parasito durante a reinfecção tem sido questionada por diversos autores usando modelos murinos (FERRO *et al.*, 2002; FREYRE *et al.*, 2006; PEZERICO *et al.*, 2009; FRANCO *et al.*, 2011). Alguns estudos mostraram que a proteção completa contra a toxoplasmose congênita, em casos de reinfecção, é possível quando a infecção primária e a reinfecção ocorrem com a mesma cepa do parasito ou com cepas clonais (FERRO *et al.*, 2002; PEZERICO *et al.*, 2009; FRANCO *et al.*, 2011). Entretanto, em um estudo com ratas Sprague-Dawley, cronicamente infectadas com a cepa clonal RH (tipo I) e desafiadas com a cepa clonal M3 (cepa do tipo II), foi observado uma quantidade considerável de parasitas em tecidos fetais (FREYRE *et al.*, 2006).

Assim como em gestantes saudáveis com infecção crônica, a transmissão vertical de *T. gondii* ocorre apenas durante a fase aguda da infecção em *C. callosus* (FERRO *et al.*, 2002; BARBOSA *et al.*, 2008). Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a transmissão vertical do parasito não ocorre em fêmeas cronicamente infectadas com cepa ME-49 e reinfectadas com a mesma cepa ou reinfectadas com a cepa RH (FERRO *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2011). No presente estudo, nós observamos a transmissão vertical de *T. gondii* em fêmeas de *C. callosus* cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2. Além disso, nossos dados confirmaram que a transmissão vertical do parasito não ocorre em fêmeas de *C. callosus* cronicamente infectadas com cepa ME-49 (BARBOSA *et al.*, 2008). Nossos dados também mostraram que as fêmeas reinfectadas com a cepa UD2 foram mais suscetíveis à infecção durante a gestação. Este grupo de fêmeas revelou menor sobrevivência, e a reinfecção induziu a maiores escores de morbidade. Além disso, as fêmeas reinfectadas com UD2 apresentaram alta taxa de perda embrionária. Quando o parasitismo foi analisado, as fêmeas reinfectadas com UD2 apresentaram maior carga parasitária no útero em comparação com as fêmeas reinfectadas com UD1.

A toxoplasmose congênita em gestantes imunocompetentes pode ocorrer em consequência de uma reativação da infecção, tendo, assim, os parasitos uma origem endógena, ou devido a uma reinfecção, tendo os parasitos uma origem exógena (ABOU-BACAR *et al.*, 2004). Recentemente, infecções mistas naturais com parasitos de diferentes genótipos foram observadas em humanos, fato que comprova que a proteção

desencadeada pela infecção primária pode ser genótipo-específico (ANDRADE *et al.*, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2013). Além de avaliar o DNA de *T. gondii* em tecidos das fêmeas reinfetadas, analisamos também a participação das cepas no processo de reinfecção por meio da genotipagem dos parasitos. Observamos o parasitismo no útero das duas fêmeas reinfetadas com UD1, e a genotipagem mostrou que em um deles havia parasitos pertencentes à cepa ME-49 e, no outro, parasitos pertencentes à cepa UD1. Já nos úteros das fêmeas reinfetadas com a cepa UD2, apenas parasitos desta cepa foram detectados.

Quando as placenta foram analisadas, notamos a presença de parasitos em todas as placenta das cinco fêmeas reinfetadas com a cepa UD1 e nas placenta da única fêmea grávida do grupo de fêmeas reinfetadas com UD2. Quando os fetos foram analisados, apenas uma das fêmeas reinfetadas com a cepa UD1 apresentou fetos infectados e estes apresentaram parasitos com genótipo da cepa UD1. Pela análise da PCR no cérebro dos camundongos do bioensaio, foram observados parasitos pertencentes à cepa ME-49. Já a fêmea grávida, reinfetada com a cepa UD2, revelou fetos não infectados, porém a análise por PCR no cérebro dos camundongos do bioensaio confirmou a presença de parasitos nos tecidos fetais pertencentes à cepa UD2. Pela genotipagem, verificamos parasitos pertencentes à cepa ME-49 ou UD1 nas placenta das fêmeas reinfetadas com a cepa UD1, enquanto apenas parasitos pertencentes à cepa UD2 foram detectados nas placenta da fêmea reinfetada com a cepa UD2. A infecção mista foi observada apenas no fígado e no pulmão das fêmeas reinfetadas com UD1 e UD2, respectivamente. Os resultados obtidos pela genotipagem em que foram detectados apenas parasitos pertencentes a uma das cepas não exclui a possibilidade da presença das outras cepas analisadas em cada grupo, uma vez que a baixa concentração de DNA do parasito pode não ser detectada pela PCR-RFLP. Estes dados em conjunto nos permitem concluir que a reinfecção causou a reativação da infecção da cepa ME-49, já que parasitos pertencentes a esse genótipo foram encontrados em tecidos placentários e fetais. Além disso, a existência da cepa ME-49 ou UD1/UD2 em tecidos placentários e fetais mostra que existe diferença na dinâmica da transmissão vertical em cada sítio de implantação. Além disso, a detecção ou não de parasitos nos tecidos placentários e fetais nos métodos utilizados (imuno-histoquímica, bioensaio e qPCR) é justificado pela utilização de diferentes placenta e fetos da mesma fêmea.

As cepas UD1 e UD2 possuem genótipos similares aos isolados pertencentes ao tipo BrII e BrI, respectivamente. Estes genótipos são predominantes no Brasil, enquanto a cepa ME-49 pertence ao grupo das cepas clonais tipo II, frequentemente, encontradas na Europa e nos Estados Unidos (SU; ZHANG; DUBEY, 2006a; PENA *et al.*, 2008). As diferenças observadas entre estas cepas são, provavelmente, devidas à predominância de genótipos mais virulentos do parasita no Brasil. Assim, nossos resultados corroboram a hipótese de que a imunidade adquirida contra cepas clonais não é capaz de evitar a toxoplasmose congênita nos casos de reinfecção com cepas de genótipos diferentes (FREYRE *et al.*, 2006; ELBEZ-RUBINSTEIN *et al.*, 2009).

A gravidade da infecção por cepas não clonais pode ser explicada, em parte, por uma má adaptação do sistema imunológico contra esses genótipos “atípicos” de *T. gondii*. A infecção causada por *T. gondii* induz uma resposta imune do tipo Th1 com a produção da citocina proinflamatória IL-12, que é produzida por macrófagos e células dendríticas em resposta ao reconhecimento dos抗ígenos do parasito pelos receptores *Toll-like* (TLR) (YAROVINSKY, 2014). IL-12, por sua vez, ativa as células T e NK a secretarem IFN- $\gamma$ , que desempenham um papel importante na diminuição da proliferação de taquizoítas durante a fase aguda da infecção (ABOU-BACAR *et al.*, 2004; MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011; DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012). Esta citocina ativa mecanismos efetores para a eliminação intracelular de *T. gondii*, incluindo a ativação das proteínas IRG, indução de intermediários reativos de oxigênio, a degradação do triptofano e autofagia (ZHAO *et al.*, 2009; MELO; JENSEN; SAEIJ, 2011; GAZZINELLI *et al.*, 2014).

A infecção por *T. gondii* durante a gestação, pode prejudicar o equilíbrio imunológico maternofetal por induzir a produção de citocinas proinflamatórias, tais como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que são, potencialmente, prejudiciais à gestação (SHIONO *et al.*, 2007). Neste estudo, as fêmeas de *C. callosus* cronicamente infectadas com a ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2 mostraram altos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 em comparação com as fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49. Por outro lado, detectamos baixos níveis de TGF- $\beta$  em fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 ou reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2, em comparação com as fêmeas não infectadas. Um estudo com camundongos C57BL/6 também demonstrou altos níveis de IFN- $\gamma$ , quando as fêmeas foram infectadas com a cepa RH na fase inicial da gestação, e esse fenômeno foi relacionado à alta taxa de reabsorção nos locais de implantação. O alto nível de IFN- $\gamma$  produzido sugeriu ativação da resposta imune do tipo Th1, mas

também foi observado um aumento de IL-10, sugerindo que a resposta anti-inflamatória foi ativada (GE *et al.*, 2008). Assim, nossos resultados sugerem que a alta produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  induzida pela reinfecção pelas cepas UD1 e UD2, pode ser a responsável pelo maior número de sítios de reabsorção. Além disso, mesmo com a forte resposta imunológica próinflamatória, esta não foi suficiente para controlar a infecção, o que possibilitou a transmissão vertical do parasito, bem como alta concentração de parasitos nas placenta, fígado, baço e pulmão das fêmeas reinfectadas.

Ambos componentes celulares e humorais do sistema imunológico desempenham um papel na resistência à infecção secundária. A reinfecção é acompanhada por uma resposta imune forte, muitas vezes manifestada pela elevação dos níveis de IgG e a produção de anticorpos IgM (GAVINET *et al.*, 1997). Neste estudo, verificamos níveis mais elevados de IgG no soro das fêmeas grávidas e reinfectadas em comparação com os níveis de IgG destas mesmas fêmeas antes da gestação e reinfecção, confirmando a capacidade de *T. gondii* induzir uma resposta imune humoral após a reinfecção. As fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa UD1 apresentaram menor razão entre IgG2a e IgG1 durante a gestação, em comparação com a razão entre IgG2a e IgG1 antes da gestação, sugerindo o estabelecimento de uma resposta imune humoral do tipo Th2. O perfil imunológico do tipo Th2 é caracterizado pela ativação de células T CD4 $^{+}$  produtoras de IL-4 e por uma produção preferencial de anticorpos IgG1, independente do complemento. Já o perfil imunológico Th1 é caracterizado pela ativação de células T CD4 $^{+}$  produtoras de IFN- $\gamma$  e produção de anticorpos IgG2a dependentes do complemento (MOSMANN *et al.*, 1997). Assim, os nossos resultados indicam que a resposta imunológica desenvolvida pelas fêmeas de *C. callosus* reinfectadas com a cepa UD1, durante a gestação, pode ser associada com o aumento na produção das citocinas próinflamatórias e dos anticorpos IgG1, em que podemos atribuir ao balanço da resposta imunológica do tipo Th1 e Th2 com os melhores resultados gestacionais deste grupo de fêmeas reinfectadas. Por outro lado, as fêmeas reinfectadas com a cepa UD2 registraram alta produção de citocinas próinflamatórias e anticorpos IgG2a, o que sugere a predominância de uma resposta do perfil Th1, sendo uma das causas do maior número de sítios de reabsorção neste grupo de fêmeas.

Juntos, nossos resultados mostraram que tanto os machos, quanto as fêmeas de *C. callosus* são susceptíveis à infecção pelas cepas UD1 e UD2 de *T. gondii* e que mudanças no peso corporal e nos sinais clínicos, após a infecção, são variáveis,

dependendo do gênero. Além disso, as fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 sobreviveram após a reinfecção com as cepas UD1 ou UD2 e, quando grávidas, ocorreu a transmissão vertical do parasito. Por fim, a reinfecção causou a reativação da infecção da cepa ME-49 e as fêmeas reinfectadas produziram altos níveis de citocinas proinflamatórias durante a gestação, que pode ter resultado em prejuízos gestacionais.

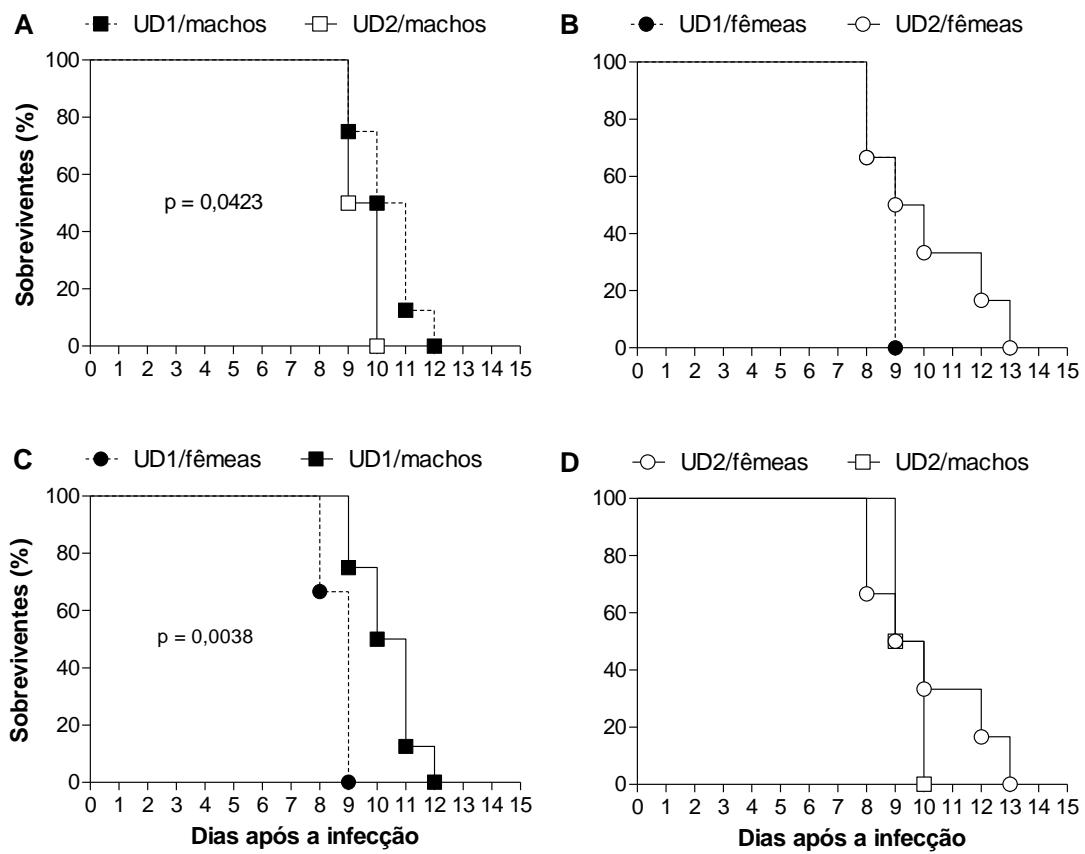
## 6. CONCLUSÕES

- Machos e fêmeas de *C. callosus* foram susceptíveis à infecção pela cepa TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 de *T. gondii*;
- As fêmeas infectadas com a cepa TgChBrUD2 apresentaram maior número de parasitos no fígado e no baço;
- A infecção primária de *C. callosus* com a cepa ME-49 foi capaz de conferir proteção contra reinfecção com a cepa TgChBrUD1 ou TgChBrUD2;
- A cepa ME-49 não conferiu proteção contra a transmissão vertical da cepa TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 na reinfeção;
- As fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD2 apresentaram maior parasitismo no fígado, baço e pulmão;
- As fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD1 apresentaram parasitos pertencentes à cepa ME-49 ou TgChBrUD1 nos tecidos placentário e fetais, ao contrário das fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD2 que apresentaram apenas parasitos pertencentes à cepa TgChBrUD2 nestes tecidos;
- As fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 mostraram altos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10;
- As fêmeas reinfectadas com a cepa UD1 apresentaram menor razão entre IgG2a e IgG1 durante a gestação.

## **7. FIGURAS**

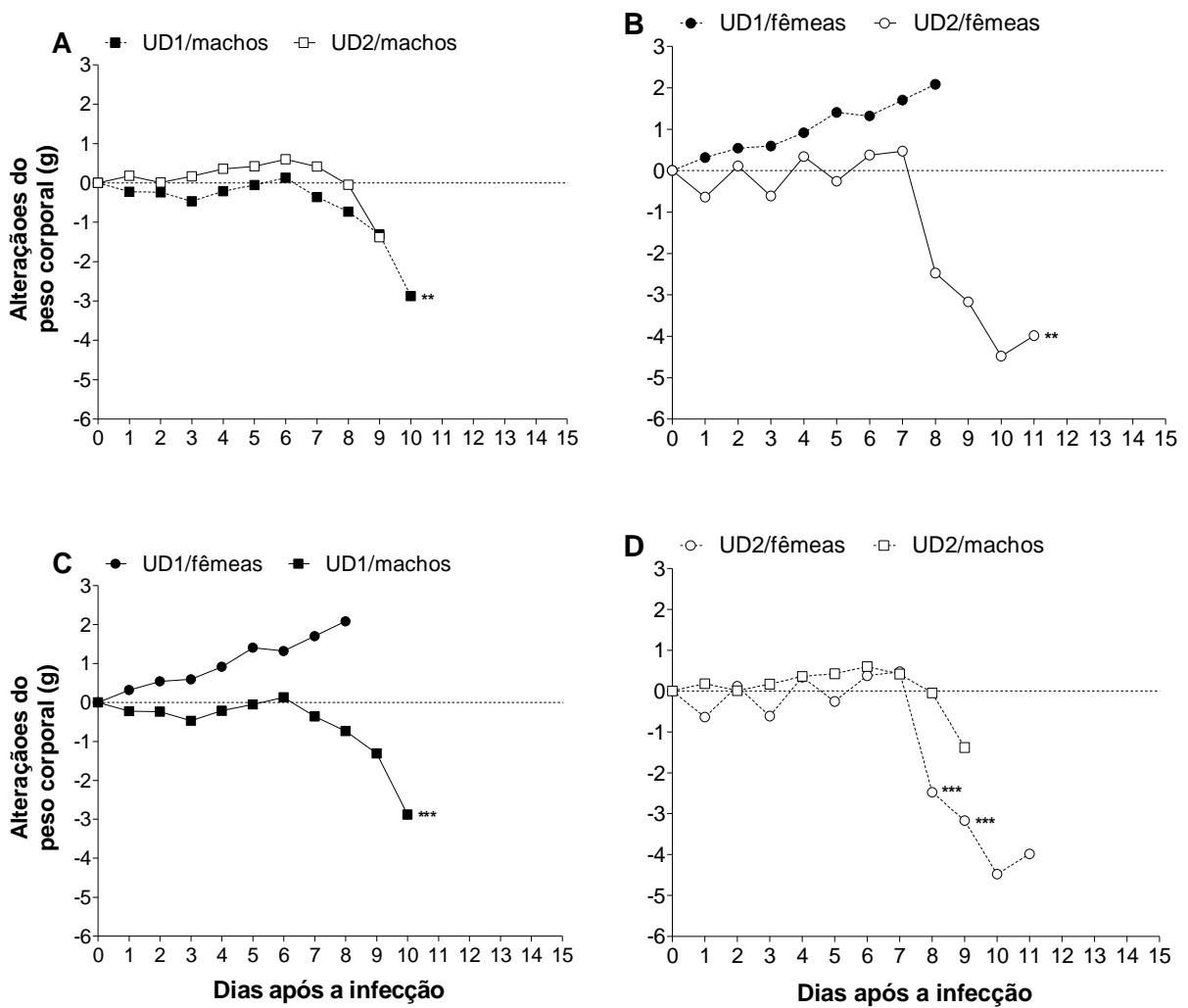
**Figura 1:** Curva de sobrevivência de *Calomys callosus* após a infecção com a cepa TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2) de *Toxoplasma gondii*. Machos e fêmeas (n=6) foram infectados intraperitonealmente com 100 taquizoítas da cepa UD1 ou UD2 e monitorados por 15 dias (A) Comparação entre machos infectados com a cepa UD1 ou UD2; (B) Comparação entre fêmeas infectadas com a cepa UD1 ou UD2; (C) Comparação entre machos e fêmeas infectados com a cepa UD1; (D) Comparação entre machos e fêmeas infectados com a cepa UD2. \*p < 0,05 (Teste *Log-rank*).

**Figura 1**



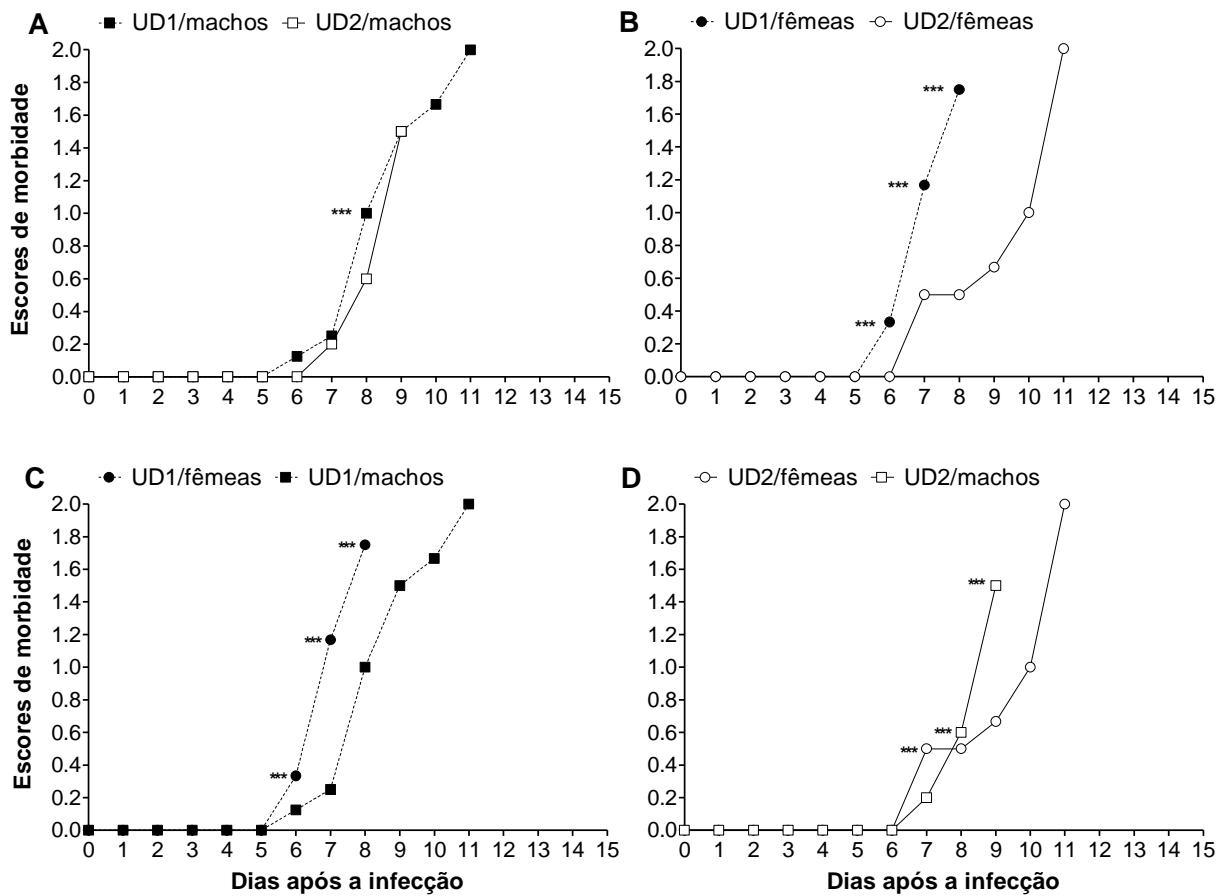
**Figura 2:** Alterações de peso corporal (em média) de *Calomys callosus* após a infecção com a cepa TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2) de *Toxoplasma gondii*. Machos e fêmeas (n=6) foram infectados intraperitonealmente com 100 taquizoítas da cepa UD1 ou UD2 e monitorados por 15 dias (A) Comparação entre machos infectados com a cepa UD1 ou UD2; (B) Comparação entre fêmeas infectadas com a cepa UD1 ou UD2; (C) Comparação entre machos e fêmeas infectados com a cepa UD1; (D) Comparação entre machos e fêmeas infectados com a cepa UD2. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 (Teste Mann-Whitney).

**Figura 2**



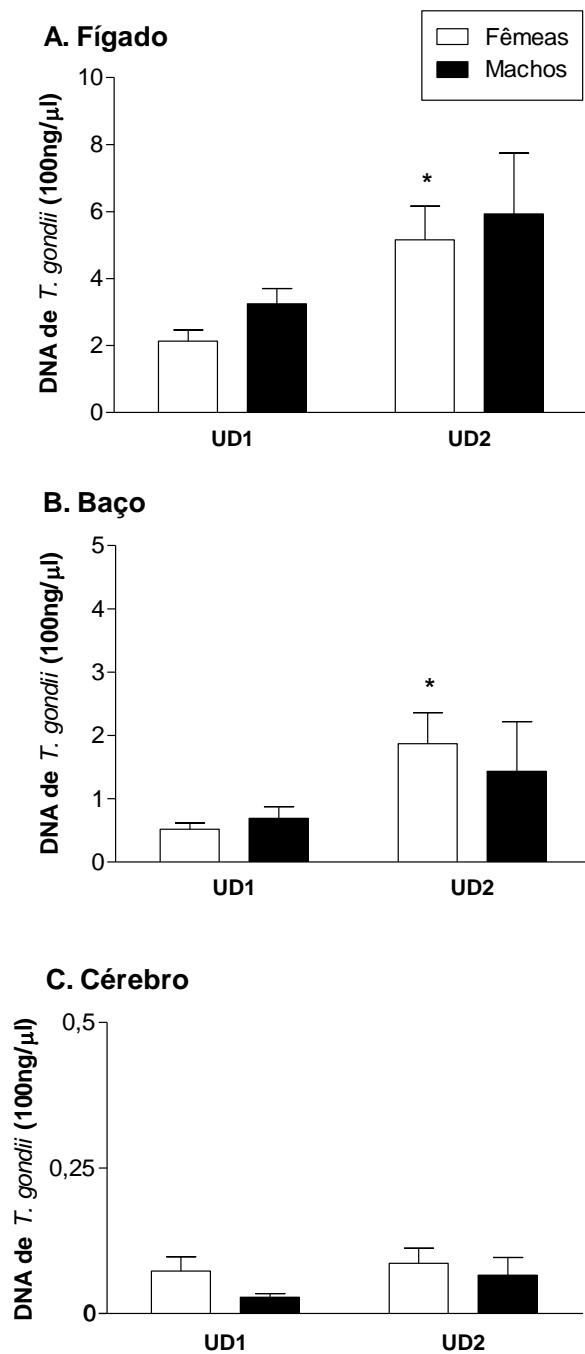
**Figura 3:** Escores de morbidade de *Calomys callosus* após a infecção com a cepa TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2) de *Toxoplasma gondii*. Machos e fêmeas (n=6) foram infectados intraperitonealmente com 100 taquizoítas da cepa UD1 ou UD2 e monitorados por 15 dias (A) Comparação entre machos infectados com a cepa UD1 ou UD2; (B) Comparação entre fêmeas infectadas com a cepa UD1 ou UD2; (C) Comparação entre machos e fêmeas infectados com a cepa UD1; (D) Comparação entre machos e fêmeas infectados com a cepa UD2. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 (Teste Mann-Whitney).

**Figura 3**



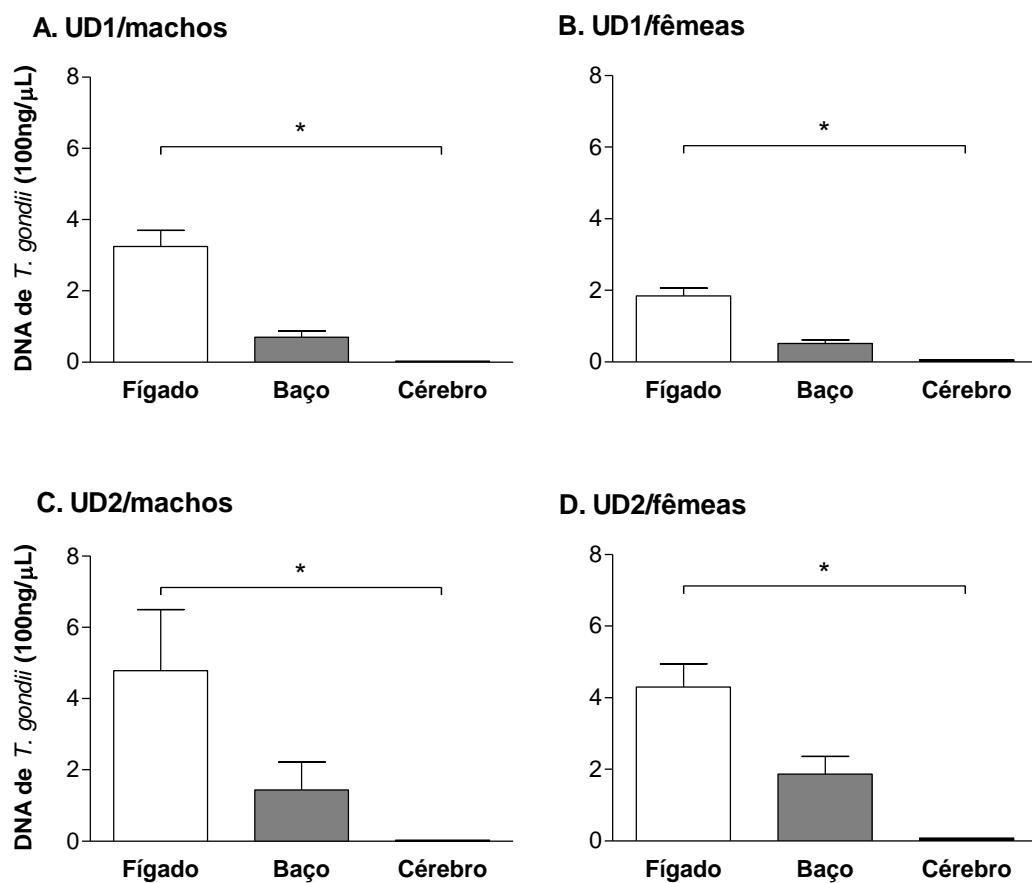
**Figura 4:** Carga parasitária no fígado (A), baço (B) e cérebro (C) de *Calomys callosus* após a infecção com a cepa TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2) de *Toxoplasma gondii*. Machos e fêmeas (n=6) foram infectados intraperitonealmente com 100 taquizoítas da cepa UD1 ou UD2. Os animais foram eutanasiados após 8 dias de infecção e os órgãos coletados para análise por qPCR. \*Comparação entre fêmeas infectadas com a cepa UD1 e UD2. \* $p < 0,05$  (Teste Mann-Whitney).

**Figura 4**



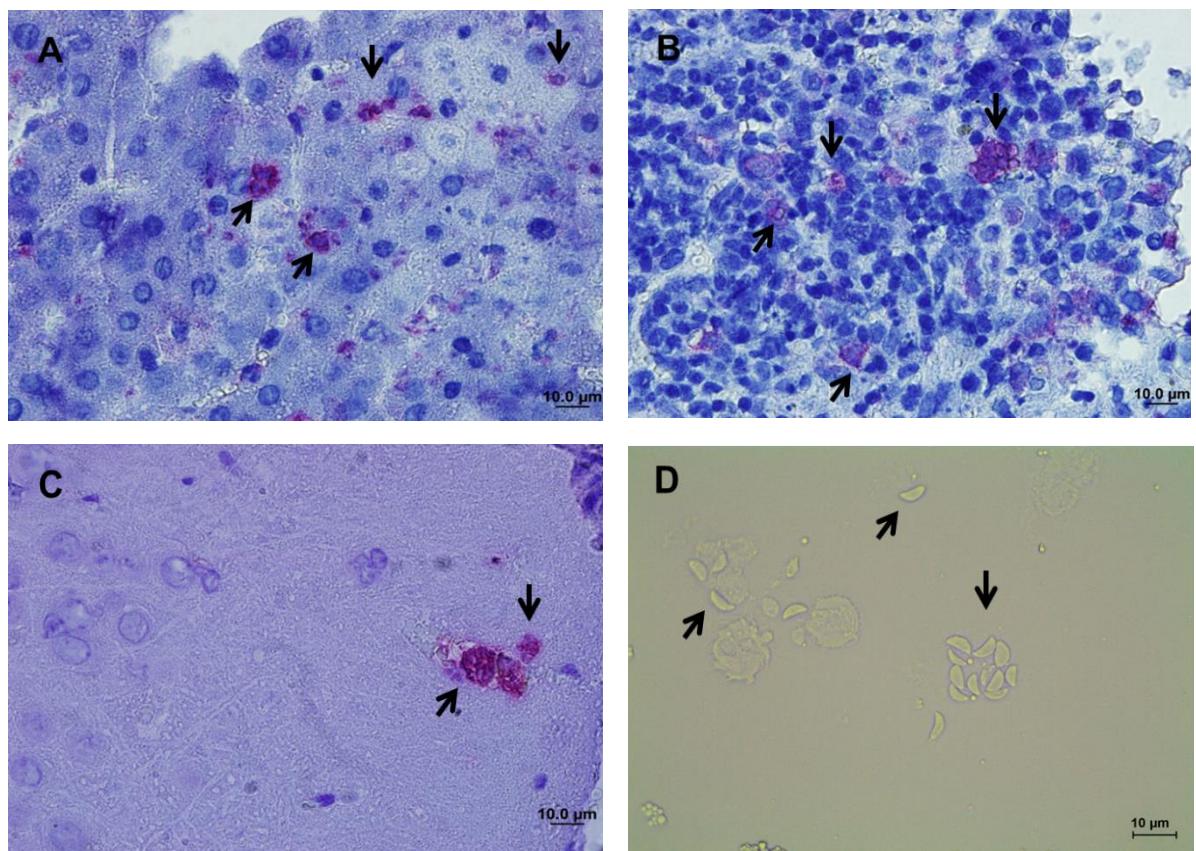
**Figura 5:** Comparação da carga parasitária entre fígado, baço e cérebro de *Calomys callosus* após a infecção com a cepa TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2) de *Toxoplasma gondii*. Machos e fêmeas (n=6) foram infectados intraperitonealmente com 100 taquizoítas da cepa UD1 ou UD2. Os animais foram eutanasiados após 8 dias de infecção e os órgãos coletados para análise por qPCR. (A) Machos infectados com a cepa UD1; (B) Fêmeas infectadas com a cepa UD1; (C) Machos infectados com a cepa UD2; (D) Fêmeas infectadas a cepa UD2. \*p < 0,05 (Teste Kruskal-Wallis).

**Figura 5**



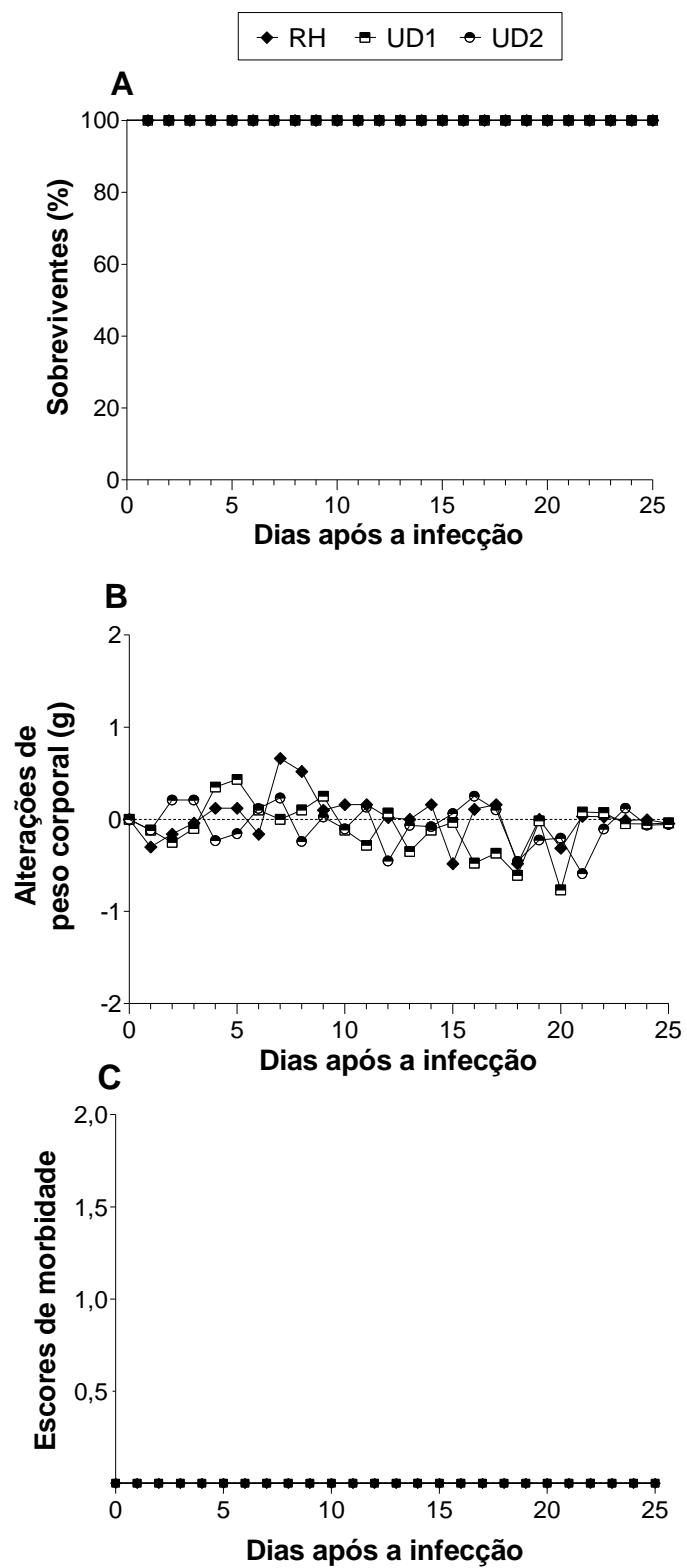
**Figura 6:** Fotomicrografia representativa do fígado, baço e cérebro de *Calomys callosus* após a infecção com a cepa TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2) de *Toxoplasma gondii*. Machos e fêmeas (n=6) foram infectados intraperitonealmente com 100 taquizoítas da cepa UD1 ou UD2. Os animais foram eutanasiados após 8 dias de infecção. Foi realizado o lavado peritoneal e os órgãos foram coletados para análise por imuno-histoquímica. Setas indicam parasitos no interior de vacúolos parasitóforos no (A) fígado, (B) baço, (C) e (D) no lavado intraperitoneal de fêmeas infectadas com a cepa UD2.

**Figura 6**



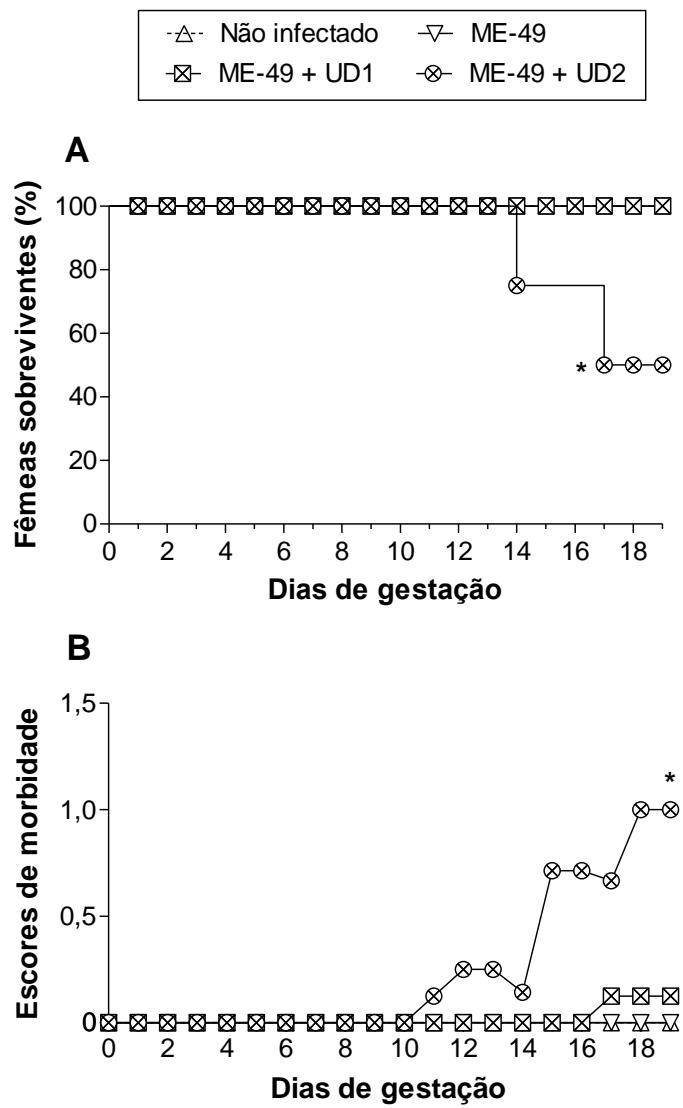
**Figura 7:** (A) Curva de sobrevivência, (B) Alterações de peso corporal (em média) e (C) Escores de morbidade de fêmeas de *Calomys callosus* cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa RH, TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2) de *Toxoplasma gondii*. As fêmeas (n=5) foram infectadas oralmente com 20 cistos da cepa ME-49 e após 60 dias foram reinfectadas intraperitonealmente com 100 taquizoítas da cepa RH ou UD1 ou UD2 e monitoradas por 25 dias. (A) Teste Log-rank; (B e C) Mann-Whitney.

**Figura 7**



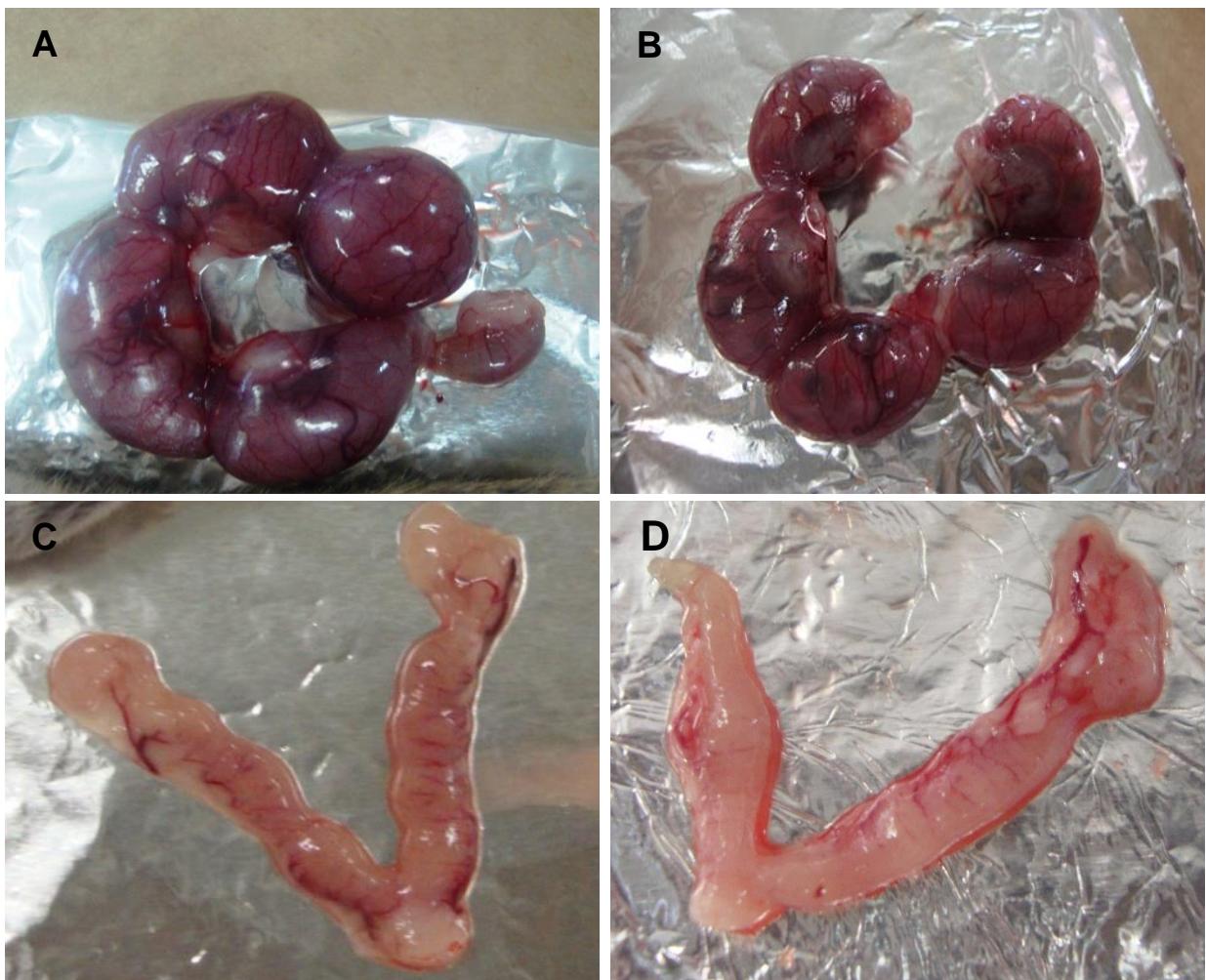
**Figura 8:** (A) Curvas de sobrevivência e (B) Escores de morbidade de fêmeas de *Calomys callosus* cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2) no primeiro dia de gestação. As fêmeas (n=7) foram monitoradas até o 19º dia de gestação. \*Comparação entre a curva de sobrevivência do grupo 4 com a curva de sobrevivência do grupo 1, 2 e 3. \*p < 0,05 (A) Teste *Log-rank*; (B) Teste Wilcoxon.

**Figura 8**



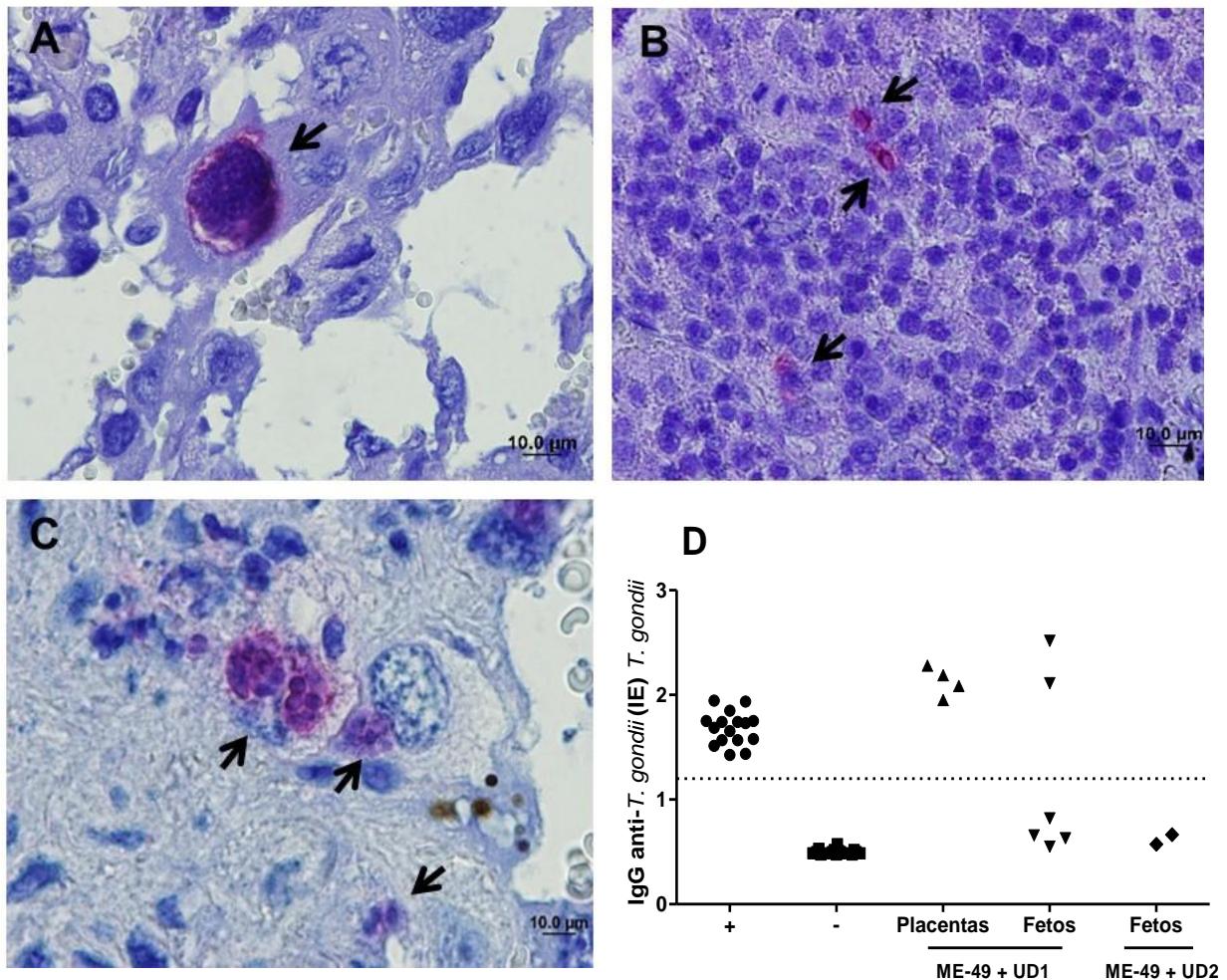
**Figura 9:** Foto representativa de placenta e fetos das fêmeas de *Calomys callosus* (**A**) não infectadas e (**B**) fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49. Foto representativa do útero das fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e (**C**) reinfectadas com a cepa TgChBrUD1 (UD1) e (**D**) reinfectadas com a cepa TgChBrUD2 (UD2) no primeiro dia de gestação. As fêmeas foram eutanasiadas no 19º dia de gestação e placenta, útero e fetos analisados macroscopicamente.

**Figura 9**



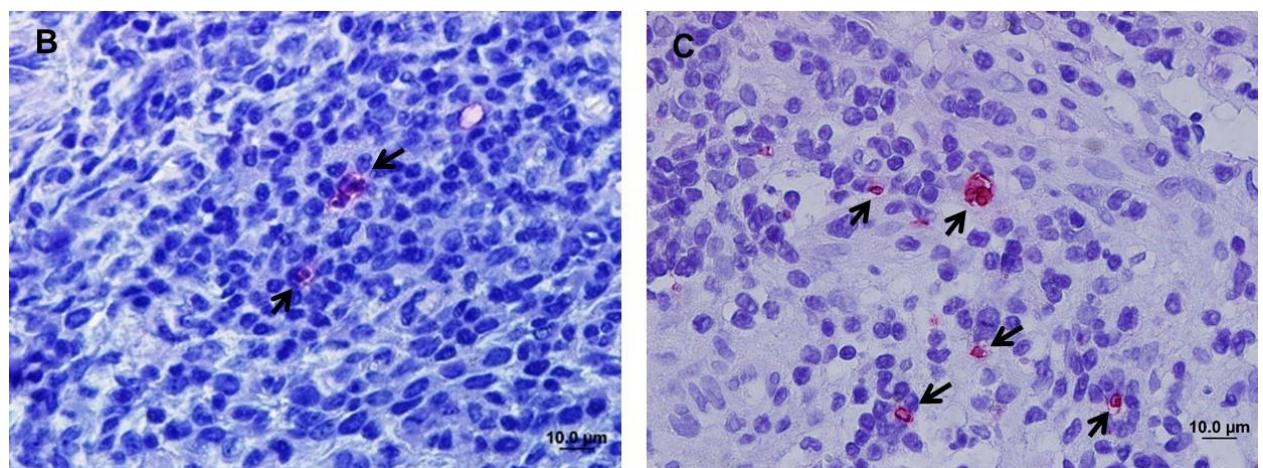
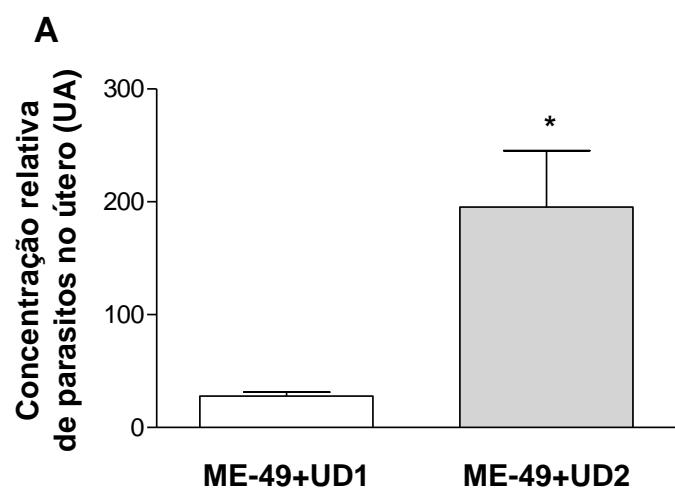
**Figura 10:** Fotomicrografia representativa de **(A)** placenta e **(B)** fígado de fetos das fêmeas de *Calomys callosus* cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com a cepa TgChBrUD1 (UD1). **(C)** Placentas de fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD2 (UD2). As fêmeas ( $n=7$ ) foram eutanasiadas no 19º dia de gestação e as placenta e fetos coletados para análise por imuno-histoquímica. Setas indicam parasitos no interior de vacúolos parasitóforos. **(D)** Análise da soroconversão de camundongos Swiss sobreviventes após inoculo com macerado de tecidos placentários ou fetais das fêmeas reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2. O nível de anticorpos foi mensurado por ELISA e expresso pelo índice ELISA (IE). Linha pontilhada no *cut-off* (IE = 1,2).

**Figura 10**



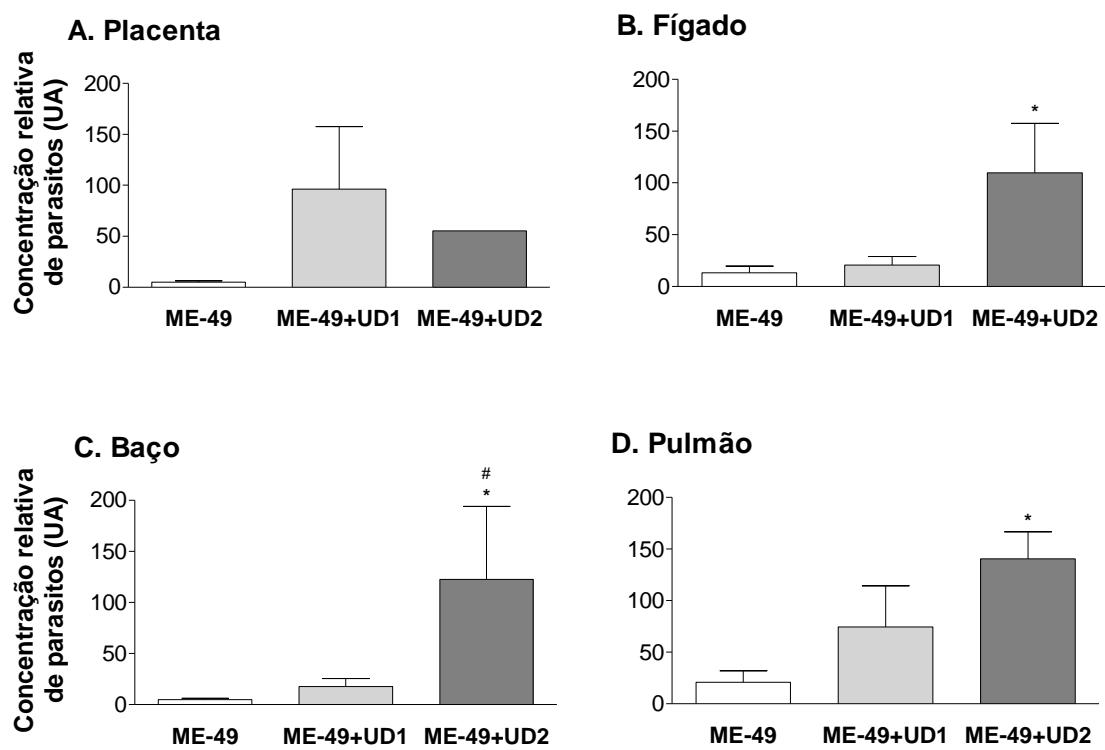
**Figura 11:** (A) Comparação da carga parasitária no útero das fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2).  $^*p < 0,05$  (Teste Mann-Whitney). UA: Unidades arbitrárias. Eletromicrografias representativas (B) do útero das fêmeas reinfectadas com a cepa UD1 e (C) do útero das fêmeas reinfectadas com a cepa UD2. Setas indicam parasitos no interior de vacúolos parasitóforos. As fêmeas foram eutanasiadas no 19º dia de gestação e os órgãos coletados para análise por imunohistoquímica e qPCR.

**Figura 11**



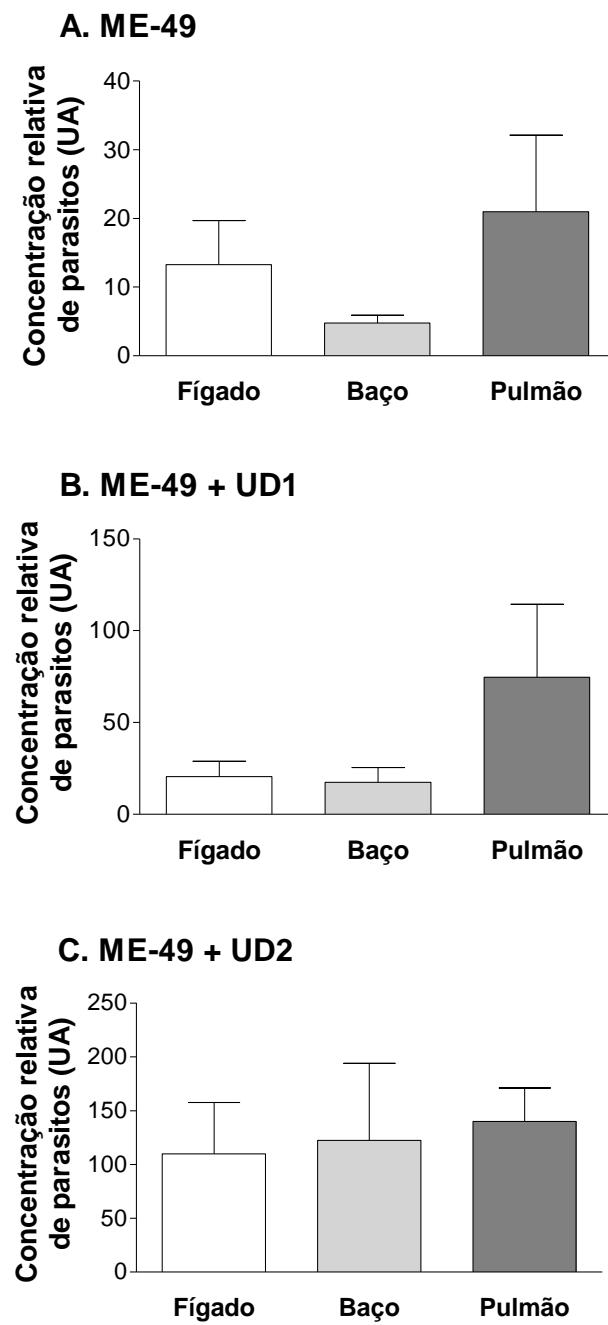
**Figura 12:** Comparação da carga parasitária na **(A)** placenta, **(B)** fígado; **(C)** baço e **(D)** pulmão entre as fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49, fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD1 (UD1) e fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD2 (UD2). As fêmeas ( $n=7$ ) foram eutanasiadas no 19º dia de gestação e os órgãos coletados para análise por qPCR. \*Comparação entre fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e fêmeas reinfectadas com UD1 ou UD2 (teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). #Comparação entre as fêmeas reinfectadas com a cepa UD1 e fêmeas reinfectadas com a cepa UD2 (Teste Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). UA: Unidades arbitrárias.

**Figura 12**



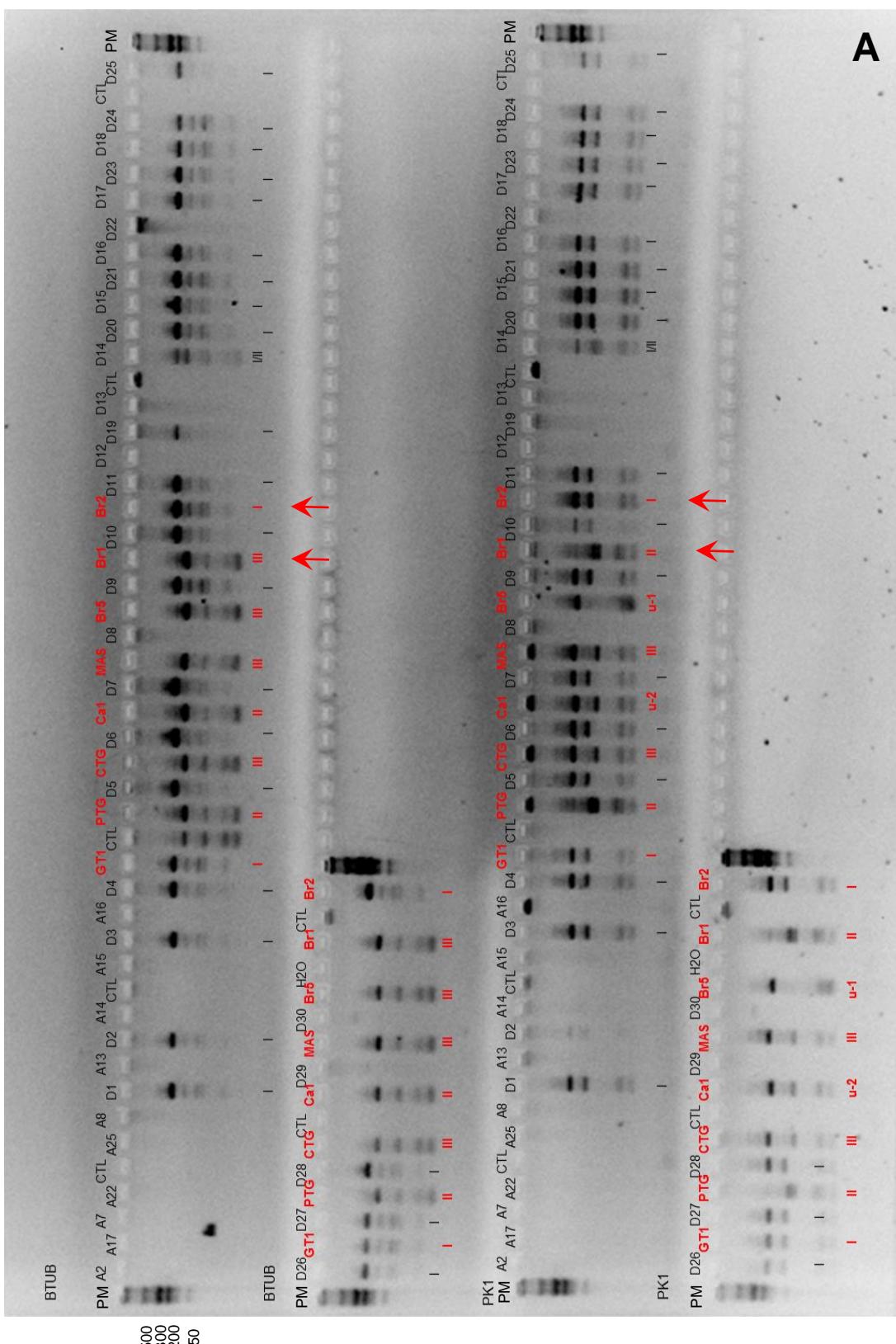
**Figura 13:** Comparação da carga parasitária entre fígado, baço e pulmão das fêmeas de *Calomys callosus* (**A**) cronicamente infectadas com a cepa ME-49; (**B**) fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD1 (UD1); e (**C**) fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD2 (UD2) de *Toxoplasma gondii*. As fêmeas foram (n=7) eutanasiadas no 19º dia de gestação e os órgãos coletados para análise por qPCR. (Teste Kruskal-Wallis). UA: Unidades arbitrárias.

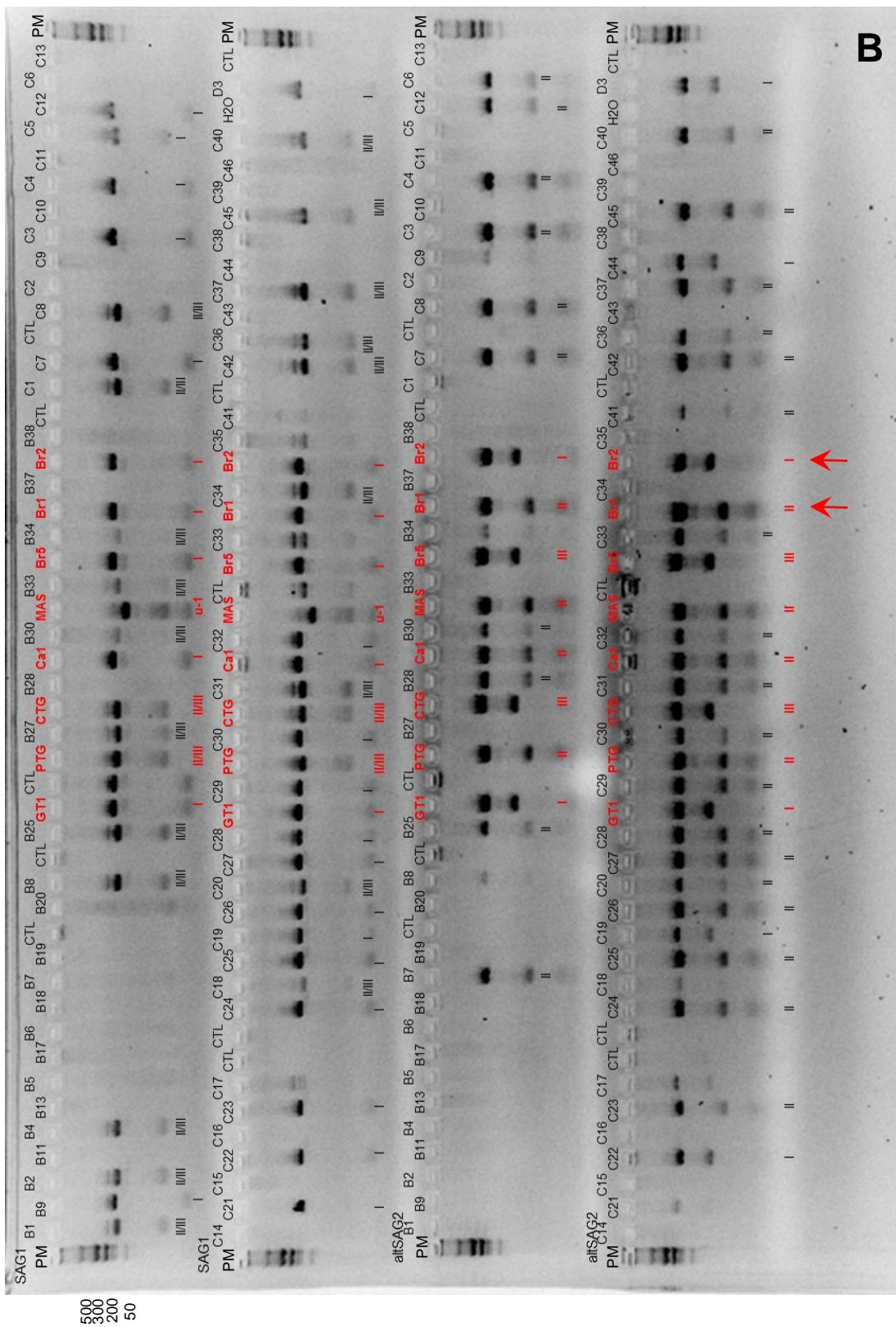
**Figura 13**



**Figura 14:** Foto representativa dos geis de agarose. **(A)** Análise das amostras para os marcadores BTUB e PK1. Amostras das fêmeas não infectadas estão representadas pela letra A e as amostras das fêmeas reinfetadas com a cepa TgChBr2 (UD2) estão representadas pela letra D (exceto D30). A2/A7: placenta; A8/A13: feto; A14/A17: fígado; A15: baço; A16/A22/A25: pulmão. D1: placenta; D2-D7: útero; D8: feto; D9/D12/D15/D18/D21/D24/D27: fígado; D10/D13/D16/D19/D22/D25/D28: baço; D11/D14/D17/D20/D23/D26/D29: pulmão. D30: cérebro de camundongo Swiss inoculado com macerado de feto. **(B)** Análise das amostras para os marcadores SAG1 e alt. SAG2. As amostras das fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 estão representadas pela letra B e as amostras das fêmeas reinfetadas com a cepa TgChBr1 (UD1) estão representadas pela letra C (exceções indicadas). B1-B9: placenta; B11/B13/B17-B19: feto; B20/B38: fígado; B27/B30/B33: baço; B25/B28/B34/B37: pulmão. C1-C6: placenta; C7-C8: útero; C9-C15: feto; C16/C19/C22/C25/C28/C31/C34/C37: fígado; C17/C20/C23/C26/C29/C32/C35/C38: baço; C18/C21/C24/C27/C30/C33/C36/C39: pulmão; C40/C42/C45: cérebro de camundongo Swiss inoculado com macerado de placenta; C41/C43/C44/C46: cérebro de camundongo Swiss inoculado com macerado de feto). As cepas controle de *T. gondii* (GT1, PTG, CTG, Ca1, MAS, Br3, Br1 e Br2) estão marcadas em vermelho. Algarismos romanos (I, II e III) e u-1 correspondem ao padrão de genotipagem *multilocus*, conforme detalhado na Tabela 1. Setas indicam as cepas TgCatBr1 (Br1) e TgCatBr2 (Br2), que possuem o mesmo genótipo de UD1 e UD2 e diferentes tipos de bandas para os marcadores BTUB, PK1e alt.SAG2. CTL: controle negativo e H2O: controle com a água do mix.

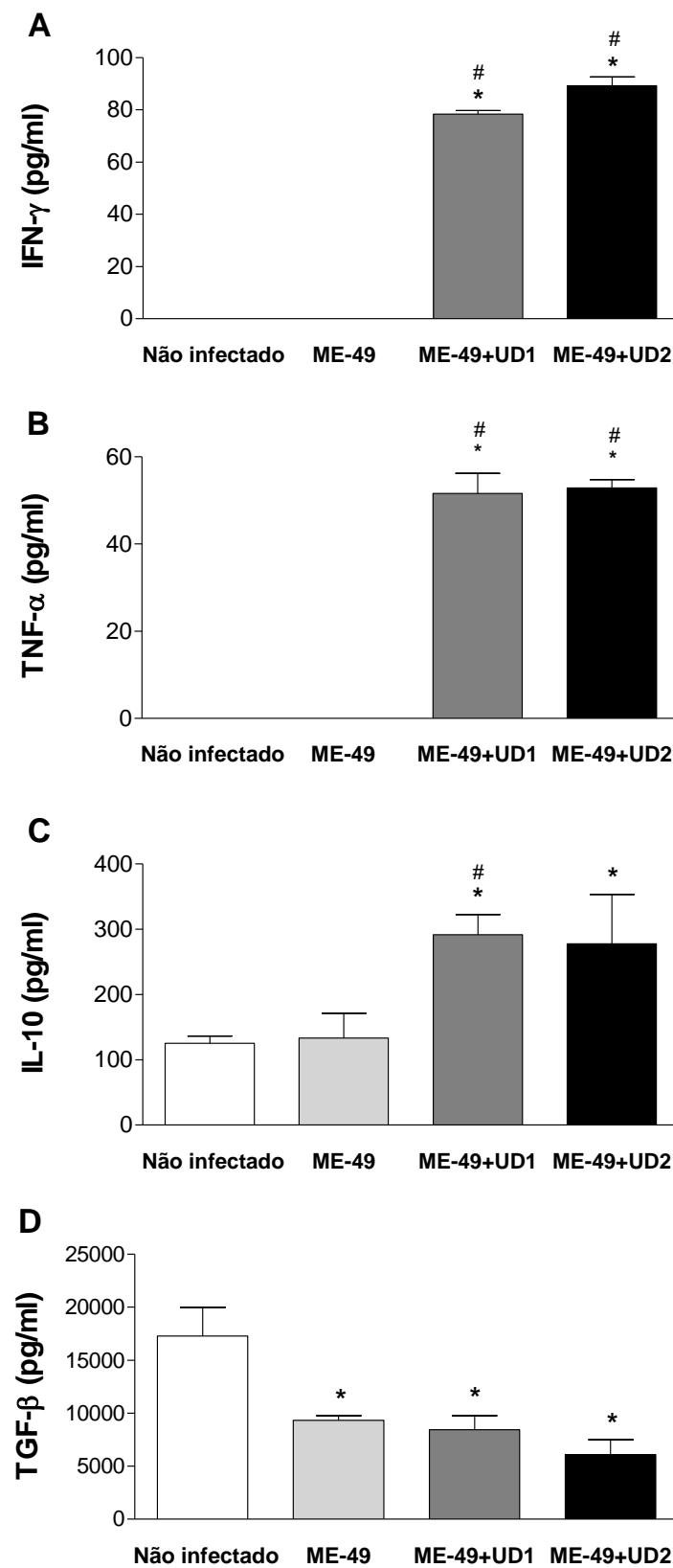
**Figura 14**





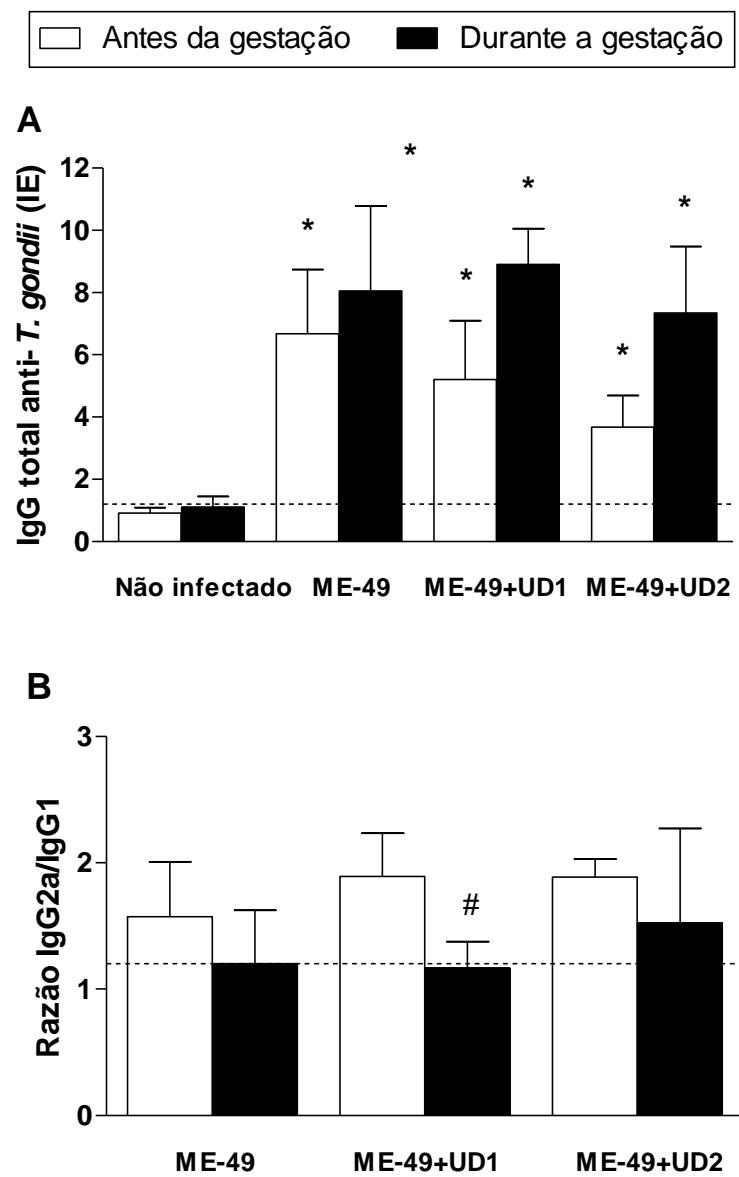
**Figura 15:** Produção de (A) IFN- $\gamma$ , (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-10 e (D) TGF- $\beta$  por fêmeas reinfectadas com as cepas TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2). Os níveis de citocinas foram determinados por ELISA. \*Comparação entre fêmeas não infectadas com fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e fêmeas reinfectadas com a cepa UD1 ou UD2. #Comparação entre fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 com fêmeas reinfectadas com a cepa UD1 ou TgChBrUD2 (Teste Kruskal-Wallis, p < 0,05).

**Figura 15**



**Figura 16:** Níveis de (A) IgG total e (B) razão de IgG2a/IgG1 anti-*T. gondii* em amostra de soro das fêmeas reinfetadas com a cepa TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2). Os níveis de anticorpos foram determinados por ELISA e expressos como índice ELISA.  
\*Comparação entre fêmeas não infectadas com fêmeas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e fêmeas reinfetadas com a cepa UD1 ou UD2 antes ou durante a gestação.  
#Comparação entre fêmeas reinfetadas com a cepa UD1 antes ou durante a gestação (Teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). A linha pontilhada indica o valor de *cut-off* ( $IE = 1,2$ ).

**Figura 16**



## **9. Tabelas**

**Tabela 1**

Genotipagem *multilocus* das amostras clonais tipos I, II e III, das amostras de referência e das cepas brasileiras de *T. gondii* utilizadas como controles.

Cepas	Marcadores PCR-RFLP							Genótipo correspondente
	SAG1*	alt. SAG2†	SAG3	BTUB	L358	PK1		
GT1 (type I)	I	I	I	I	I	I		Tipo I
PTG (type II)	II ou III	II	II	II	II	II		Tipo II
CTG (type III)	II ou III	III	III	III	III	III		Tipo III
MAS	u-1 <sup>#</sup>	II	III	III	I	III		Referência
TgCatBr5	I	III	III	III	I	u-1 <sup>#</sup>		Referência
TgCatBr1	I	II	III	III	I	II		Cepa UD1
TgCatBr2	I	I	III	I	I	I		Cepa UD2

\* No locus SAG1, os tipos II e III são indistinguíveis.

† Novo marcador SAG2 baseado na terminação 5' da sequência do gene.

# u-1 é um alelo diferente do alelo clonal.

**Tabela 2**

Informações referentes aos marcadores genéticos, *primers* e as enzimas de restrição utilizados na PCR-RFLP *multilocus* para a genotipagem da(s) cepa(s) de *T. gondii*.

Marcadores	Primers Externos ( <i>Multiplex PCR</i> )	Primers Internos ( <i>Nested PCR</i> )	<i>Nested PCR</i> (bp)	Enzimas de restrição, Tampões NEB, temperatura e tempo	Referências
SAG1	SAG1-Fext: TTCTAACCACGACCCCTGAG SAG1-Rext2: AGAGTGGGAGGCTCTGTGA	SAG1-S2: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC SAG1-Rext: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau96I + HaeII (dupla digestão), NEB4, BSA - 37 °C por 1 h, gel de 2.5%	GRIGG et al., 2001
alt. SAG2	alt. SAG2-Fext: GGAACCGGAACAAATGAGTTT alt. SAG2-Rext: GCACTGTTGCCAGGGTTTT	SAG2-Fa: ACCCATCTGCGAAGAAAACG SAG2-Ra: ATTCGACCAGCAGGGAGCAC	546	HinfI + TaqI, NEB3, BSA - 37 °C por 30 min e 65 °C por 30 min, gel de 2.5%	KHAN et al., 2005 SU et al., 2006
SAG3	SAG3-Fext: CAACTCTACCATTCCACCC SAG3-Rext: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	P43S2: TCTTGTGGGTGTTCACTCA P43AS2: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	225	NciI, NEB4, BSA - 37 °C por 1 h, gel de 2.5%	GRIGG et al., 2001
BTUB	BTUB -Fext: TCCAAAATGAGAGAAATCGT BTUB -Rext: AAATTGAAATGACGGAAGAA	Btub-F: GAGGTCACTCGGACGAACA BtubR: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	BsiEI + TaqI (dupla digestão), NEB4, BSA - 60 °C por 1 h, gel de 2.5%	GRIGG et al., 2001
L358	L358-Fext: TCTCTGACTTCGCCCTTTC L358-Rext: GCAATTCCCTCGAACAGACAGG	L358-F2: AGGAGGGCGTAGCGCAAGT L358-R2: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	HaeIII + NlaIII (dupla digestão), NEB4, BSA - 37 °C por 1 h, gel de 2.5%	SU et al., 2006 GRIGG et al., 2001
PK1	PK1-Fext: GAAAGCTGTCCACCCCTGAAA PK1-Rext: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	PK1-F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT PK1-R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	AvaI + RsaI (dupla digestão), NEB4, BSA - 37 °C por 1 h, gel de 2.5%	SU et al., 2006 GRIGG et al., 2001

**Tabela 3**

Resultados de sobrevivência e da gestação de fêmeas de *Calomys callosus* cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e reinfectadas com as cepas TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2) de *Toxoplasma gondii* no primeiro dia de gestação.

Gestantes							
Grupos	Cepas	Sobrevivência	Fêmeas com fetos normais	Fêmeas com fetos reabsorvidos	Sítios de implantação/sítios de reabsorção <sup>a</sup>	Fêmeas com fetos reabsorvidos (%)	Taxa de perda embrionária <sup>b</sup> (%)
1	-	7/7	7/7	7/3	28/3	42.8%	10.7%
2	ME-49	7/7	7/7	7/3	30/3	42.8%	10%
3	ME-49 + UD1	7/7	7/5	7/4	34/11	57.1%	32.3%
4	ME-49 + UD2	7/5	5/1	5/4	23/19	80%	82.6%

<sup>a</sup> Sítios de reabsorção foram identificados visualmente. Sítios de implantação com placenta e embrião pequenos, com aparência hemorrágica e coloração marrom ou sem cor foram definidos como sítio de reabsorção

<sup>b</sup> A taxa de perda embrionária foi calculada pela porcentagem de sítios de reabsorção em relação ao número total de implantações.

**Tabela 4**

Resultados da reação de PCR para *Toxoplasma gondii* realizada em placenta, úteros e fetos das fêmeas grávidas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e/ou reinfectadas com as cepas TgChBrUD1(UD1) ou TgChBrUD2 (UD2). Resultados da reação de PCR para *Toxoplasma gondii* no cérebro de camundongos Swiss utilizados no bioensaio.

Grupos	Cepas	Placentas/Úteros/ Fetos <sup>a</sup>	Gestantes		PCR nº- nº+ <sup>b</sup>	PCR do cérebro de camundongos Swiss	
			Placentas	Fetos		Placentas	Fetos
1	-	7/0/7	7-	7-			
2	ME-49	7/0/7	3- 4+	7-			
3	ME-49 + UD1	5/2/5	5+	4- 1+	2+	3+ 2†	3- 1+ 1†
4	ME-49 + UD2	1/4/1	1+	1-	4+	1†	1+

<sup>a</sup> Quantidade de placenta, úteros e fetos avaliados em cada condição experimental

<sup>b</sup> Número de amostras negativas (-) e positivas (+)

†Os animais morreram entre o 7º e 10º dia após o inóculo

**Tabela 5**

Genotipagem de *Toxoplasma gondii* presentes na placenta, feto, útero, fígado, baço e pulmão das fêmeas grávidas cronicamente infectadas com a cepa ME-49 e/ou reinfetadas com as cepas TgChBrUD1 (UD1) ou TgChBrUD2 (UD2). Genotipagem de *Toxoplasma gondii* nos cérebros de camundongos Swiss utilizados no bioensaio.

Grupos	Cepas	Placentas	Fetos	Úteros	Genotipagem			Cérebros dos camundongos Swiss	Placentas	Fetos
					Fígado	Baço	Pulmão			
1	-									
2	ME-49	(4) ME-49			(5) ME-49	(3) ME-49	(4) ME-49			
3	ME-49 + UD1	(3) ME-49 (2) UD1	(1) UD1	(1) ME-49 (1) UD1	(4) UD1 (1) ME-49 e UD1	(1) ME-49 (4) UD1	(2) ME-49 (3) UD1	(3) ME-49	(1) ME-49	
4	ME-49 + UD2	(1) UD2		(4) UD2	(5) UD2	(4) UD2	(4) UD2 (1) ME-49 e UD2		(1) UD2	

## Referências

- ABDUL-GHANI, R. Polymerase chain reaction in the diagnosis of congenital toxoplasmosis: more than two decades of development and evaluation. **Parasitol Res**, v. 108, p. 505-512, 2011.
- ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A. W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infect Immun**, v. 72, p. 1397-1401, 2004.
- AJZENBERG, D.; COGNE, N.; PARIS, L.; BESSIERES, M. H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDE, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **J Infect Dis**, v. 186, p. 684-689, 2002.
- AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; SU, C.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDE, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 34, p. 1185-1196, 2004.
- AJZENBERG, D.; DUMETRE, A.; DARDE, M. L. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 1940-1943, 2005.
- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nat Rev Immunol**, v. 5, p. 162-170, 2005.
- AMATO NETO, V.; MEDEIROS, E. S. A.; LEVI, G. C.; DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4. São Paulo: Sarvier, 1995.
- ANDRADE, G. M.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; CARELLOS, E. V.; ROMANELLI, R. M.; VITOR, R. W.; CARNEIRO, A. C.; JANUARIO, J. N. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. **J Pediatr (Rio J)**, v. 86, p. 85-88, 2010.
- ANGELONI, M. B.; GUIRELLI, P. M.; FRANCO, P. S.; BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; CASTRO, A. S.; SILVA, N. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; MINEO, T. W.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. **Placenta**, v. 34, p. 973-982, 2013.
- BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A.; COSTA, I. N.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clin Exp Immunol**, v. 151, p. 536-545, 2008.
- BARBOSA, B. F.; PAULESU, L.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; GOMES, A. O.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W.; FERRO, E. A. Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via

ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta**, v. 35, p. 152-162, 2014.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiol**, v. 11, p. 426-430, 2003.

BARTLEY, P. M.; WRIGHT, S.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. **Parasitology**, v. 133, p. 421-432, 2006.

BECK, H. P.; BLAKE, D.; DARDE, M. L.; FELGER, I.; PEDRAZA-DIAZ, S.; REGIDOR-CERRILLO, J.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M.; PUTIGNANI, L.; SHIELS, B.; TAIT, A.; WEIR, W. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. **Int J Parasitol**, v. 39, p. 175-189, 2009.

BEHNKE, M. S.; FENTRESS, S. J.; MASHAYEKHI, M.; LI, L. X.; TAYLOR, G. A.; SIBLEY, L. D. The polymorphic pseudokinase ROP5 controls virulence in *Toxoplasma gondii* by regulating the active kinase ROP18. **PLoS Pathog**, v. 8, p. e1002992, 2012.

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; BUCALA, R. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. **J Mol Med (Berl)**, v. 76, p. 151-161, 1998.

BESSIERES, M. H.; BERREBI, A.; CASSAING, S.; FILLAUX, J.; CAMBUS, J. P.; BERRY, A.; ASSOULINE, C.; AYOUBI, J. M.; MAGNAVAL, J. F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 389-392, 2009.

BLANCO-LAGO, R.; GARCIA-PENAS, J. J.; CONEJO-MORENO, D.; CANTARIN-EXTREMERA, V.; LEON, M.; DUAT-RODRIGUEZ, A. [Congenital toxoplasmosis and cortical development malformation: an infrequent association]. **Rev Neurol**, v. 50, p. 253-254, 2010.

BOJAR, I.; SZYMANSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*--state of the art. **Ann Agric Environ Med**, v. 17, p. 209-214, 2010.

BONYADI, M. R.; BASTANI, P. Modification and Evaluation of Avidity IgG Testing for Differentiating of *Toxoplasma gondii* Infection in Early Stage of Pregnancy. **Cell J**, v. 15, p. 238-243, 2013.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Curr Opin Microbiol**, v. 5, p. 438-442, 2002.

BRANDAO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, p. 143-149, 2006.

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; METZ, C. N.; SPIEGEL, L. A.; BACHER, M.; DONNELLY, T.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. **Nature**, v. 377, p. 68-71, 1995.

CARELLOS, E. V.; CAIAFFA, W. T.; ANDRADE, G. M.; ABREU, M. N.; JANUARIO, J. N.; GROUP, U. C. T. B. Congenital toxoplasmosis in the state of Minas Gerais, Brazil: a neglected infectious disease? **Epidemiol Infect**, v. 142, p. 644-655, 2014a.

CARELLOS, E. V.; DE ANDRADE, G. M.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; JANUARIO, J. N.; ROMANELLI, R. M.; ABREU, M. N.; DA SILVA, F. M.; LOURES, I. R.; DE ANDRADE, J. Q.; CAIAFFA, W. T.; GROUP, U. C. T. B. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. **PLoS One**, v. 9, p. e88588, 2014b.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Trop**, v. 121, p. 55-70, 2012.

CARNEIRO, A. C.; ANDRADE, G. M.; COSTA, J. G.; PINHEIRO, B. V.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; FERREIRA, A. M.; SU, C.; JANUARIO, J. N.; VITOR, R. W. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 51, p. 901-907, 2013.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, p. 83-89, 2007.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Trop**, v. 81, p. 111-122, 2002.

CENCI-GOGA, B. T.; ROSSITTO, P. V.; SECHI, P.; MCCRINDLE, C. M.; CULLOR, J. S. *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, p. 751-762, 2011.

CHAUDHRY, S. A.; GAD, N.; KOREN, G. Toxoplasmosis and pregnancy. **Can Fam Physician**, v. 60, p. 334-336, 2014.

COMMODOARO, A. G.; BELFORT, R. N.; RIZZO, L. V.; MUCCIOLO, C.; SILVEIRA, C.; BURNIER JR, M. N.; BELFORT JR, R. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 345-350, 2009.

COUTO, J. C. F.; LEITE, J. M. Sinais Ultra-sonográficos em fetos portadores de toxoplasmose congênita. . **RBGO**, v. 26, p. 377-382, 2004.

COWPER, B.; MATTHEWS, S.; TOMLEY, F. The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. **Mol Biochem Parasitol**, v. 186, p. 1-10, 2012.

DA SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SU, C.; DA SILVA, A. V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Vet Parasitol**, v. 175, p. 173-177, 2011.

DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and Toxoplasma: implications for public health. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 34-52, 2010.

DARDÉ, M. L. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, p. 366-371, 2008.

DE OLIVEIRA GOMES, A.; DE OLIVEIRA SILVA, D. A.; SILVA, N. M.; DE FREITAS BARBOSA, B.; FRANCO, P. S.; ANGELONI, M. B.; FERMINO, M. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BECHI, N.; PAULESU, L. R.; DOS SANTOS, M. C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. **Am J Pathol**, v. 178, p. 2792-2801, 2011.

DE PASCHALE, M.; AGRAPPI, C.; BELVISI, L.; CAGNIN, D.; CERULLI, T.; CLERICI, P.; MIRRI, P.; MANCO, M. T.; CAVALLARI, S.; VIGANO, E. F. Revision of the positive predictive value of IgM anti-Toxoplasma antibodies as an index of recent infection. **New Microbiol**, v. 31, p. 105-111, 2008.

DE ROCHER, A.; HAGEN, C. B.; FROEHLICH, J. E.; FEAGIN, J. E.; PARSONS, M. Analysis of targeting sequences demonstrates that trafficking to the *Toxoplasma gondii* plastid branches off the secretory system. **J Cell Sci**, v. 113 ( Pt 22), p. 3969-3977, 2000.

DELHAES, L.; YERA, H.; ACHE, S.; TSATSARIS, V.; HOUFFLIN-DEBARGE, V. Contribution of molecular diagnosis to congenital toxoplasmosis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 76, p. 244-247, 2013.

DENNEY, J. M.; NELSON, E. L.; WADHWA, P. D.; WATERS, T. P.; MATHEW, L.; CHUNG, E. K.; GOLDENBERG, R. L.; CULHANE, J. F. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. **Cytokine**, v. 53, p. 170-177, 2011.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. **J Am Vet Med Assoc**, v. 157, p. 1767-1770, 1970.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **J Protozool**, v. 19, p. 155-177, 1972.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animal and man**. Boca Raton. Florida: CRC Press, 1988.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 28, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; FRENKEL, J. K. Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. **J Parasitol**, v. 85, p. 657-662, 1999.

DUBEY, J. P.; APPLEWHAITE, L.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. A.; KWOK, O. C.; HILL, R.; SU, C. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology**, v. 134, p. 1559-1565, 2007a.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H.; FARIAS, N. A.; RUAS, J. L.; DOS SANTOS, T. R.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Vet Parasitol**, v. 143, p. 182-188, 2007b.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOICKALINGAM, A.; PENA, H. F.; DE OLIVEIRA, L. N.; LEIFER, C. A.; GENNARI, S. M.; BAHIA OLIVEIRA, L. M.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 157, p. 299-305, 2008.

DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 190-195, 2009.

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C.; QU, D.; SU, C.; MARVULO, M. F.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **J Parasitol**, v. 96, p. 709-712, 2010.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, p. 1375-1424, 2012.

DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect**, v. 14, p. 1403-1410, 2012.

DUMETRE, A.; LE BRAS, C.; BAFFET, M.; MENECEUR, P.; DUBEY, J. P.; DEROUIN, F.; DUGUET, J. P.; JOYEUX, M.; MOULIN, L. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Vet Parasitol**, v. 153, p. 209-213, 2008.

DUMÈTRE, A.; AJZENBERG, D.; ROZETTE, L.; MERCIER, A.; DARDE, M. L. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. **Vet Parasitol**, v. 142, p. 376-379, 2006.

DUNEAU, D.; EBERT, D. Host sexual dimorphism and parasite adaptation. **PLoS Biol**, v. 10, p. e1001271, 2012.

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol**, v. 34, p. 793-813, 2012.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDE, M. L.; COHEN, R.; DUMETRE, A.; YERA, H.; GONDON, E.; JANAUD, J. C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **J Infect Dis**, v. 199, p. 280-285, 2009.

ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends Parasitol**, v. 26, p. 190-196, 2010.

ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public Health**, v. 122, p. 335-353, 2008.

FAVORETO-JUNIOR, S.; FERRO, E. A.; CLEMENTE, D.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 103-107, 1998.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends Parasitol**, v. 18, p. 355-359, 2002.

FERREIRA, I. M.; VIDAL, J. E.; COSTA-SILVA, T. A.; MEIRA, C. S.; HIRAMOTO, R. M.; PENALVA DE OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Exp Parasitol**, v. 118, p. 221-227, 2008.

FERRO, E. A.; BEVILACQUA, E.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A.; MORTARA, R. A.; MINEO, J. R. *Calomys callosus* (Rodentia : Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitol Res**, v. 85, p. 647-654, 1999.

FERRO, E. A.; SILVA, D. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infect Immun**, v. 70, p. 7089-7094, 2002.

FERRO, E. A.; MINEO, J. R.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D. A.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L. R. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **Am J Pathol**, v. 172, p. 50-58, 2008.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Super Sanita**, v. 40, p. 71-80, 2004.

FRANCIA, M. E.; STRIEPEN, B. Cell division in apicomplexan parasites. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, p. 125-136, 2014.

FRANCO, P. S.; SILVA, D. A.; COSTA, I. N.; GOMES, A. O.; SILVA, A. L.; PENA, J. D.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. **Placenta**, v. 32, p. 116-120, 2011.

FRAZAO-TEIXEIRA, E.; SUNDAR, N.; DUBEY, J. P.; GRIGG, M. E.; DE OLIVEIRA, F. C. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. **Vet Parasitol**, v. 175, p. 33-39, 2011.

FREYRE, A.; FALCON, J.; MENDEZ, J.; RODRIGUEZ, A.; CORREA, L.; GONZALEZ, M. *Toxoplasma gondii*: partial cross-protection among several strains of the parasite against congenital transmission in a rat model. **Exp Parasitol**, v. 112, p. 8-12, 2006.

FREYRE, A.; FALCON, J.; MENDEZ, J.; GONZALEZ, M. *Toxoplasma gondii*: an improved rat model of congenital infection. **Exp Parasitol**, v. 120, p. 142-146, 2008.

GALISTEU, K. J.; MATTOS, C. B.; LELIS, A. G. L.; OLIVEIRA, M. P.; SPEJORIM, L. F.; JORDÃO, P.; ZAGO, A. P.; CURY, P. M.; MATTOS, L. C.; ROSSIT, A. R. B.; CAVASINI, C. E.; MACHADO, R. L. D. Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. **Rev. Panam. Infectol**, v. 9, p. 24-29, 2007.

GAVINET, M. F.; ROBERT, F.; FIRTION, G.; DELOUVRIER, E.; HENNEQUIN, C.; MAURIN, J. R.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. **J Clin Microbiol**, v. 35, p. 1276-1277, 1997.

GAZZINELLI, R.; XU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 149, p. 175-180, 1992.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **J Immunol**, v. 146, p. 286-292, 1991.

GAZZINELLI, R. T.; ELTOUM, I.; WYNN, T. A.; SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **J Immunol**, v. 151, p. 3672-3681, 1993.

GAZZINELLI, R. T.; MENDONCA-NETO, R.; LILUE, J.; HOWARD, J.; SHER, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell Host Microbe**, v. 15, p. 132-138, 2014.

GE, Y. Y.; ZHANG, L.; ZHANG, G.; WU, J. P.; TAN, M. J.; HU, E.; LIANG, Y. J.; WANG, Y. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4+CD25+ -regulatory T cells. **Parasite Immunol**, v. 30, p. 471-481, 2008.

GERLIC, M.; MASTERS, S. L. A healthy appetite for *Toxoplasma* at the cellular level. **Immunol Cell Biol**, v. p. 2014.

GILBERT, R. Screening option in the management of congenital toxoplasmosis. *Clin Lab Intern.* 28: 8-12 p. 2004.

GILBERT, R. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 305-311, 2009.

GLASNER, P. D.; SILVEIRA, C.; KRUSZON-MORAN, D.; MARTINS, M. C.; BURNIER JUNIOR, M.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M. E.; NUSSENBLATT, R. B.; KASLOW, R. A.; BELFORT JUNIOR, R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*, v. 114, p. 136-144, 1992.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. *Ann Ist Super Sanita*, v. 40, p. 65-70, 2004.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*, v. 8, p. 634-640, 2002.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*, v. 6, p. 41-61, 2005.

HILL, D. E.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *Int J Parasitol*, v. 43, p. 107-113, 2013.

HOHLFELD, P.; DAFFOS, F.; COSTA, J. M.; THULLIEZ, P.; FORESTIER, F.; VIDAUD, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med*, v. 331, p. 695-699, 1994.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HOWE, D. K.; HONORE, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, v. 35, p. 1411-1414, 1997.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol*, v. 10, p. 766-778, 2012.

JOACHIM, R. A.; HILDEBRANDT, M.; ODER, J.; KLAPP, B. F.; ARCK, P. C. Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8+ TNF-alpha+ decidual cells via substance P. *Am J Reprod Immunol*, v. 45, p. 303-309, 2001.

JONES, J. L.; KRUEGER, A.; SCHULKIN, J.; SCHANTZ, P. M. Toxoplasmosis prevention and testing in pregnancy, survey of obstetrician-gynaecologists. *Zoonoses Public Health*, v. 57, p. 27-33, 2010.

KAMERKAR, S.; DAVIS, P. H. *Toxoplasma* on the brain: understanding host-pathogen interactions in chronic CNS infection. *J Parasitol Res*, v. 2012, p. 589295, 2012.

KANKOVA, S.; KODYM, P.; FLEGR, J. Direct evidence of *Toxoplasma*-induced changes in serum testosterone in mice. **Exp Parasitol**, v. 128, p. 181-183, 2011.

KAUFMAN, H. E.; REMINGTON, J. S.; JACOBS, L. Toxoplasmosis: the nature of virulence. **Am J Ophthalmol**, v. 46, p. 255-260; discussion 260-251, 1958.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: (Ed.). **Parasitologia Médica**. 9. São Paulo: Atheneu, 1995. p.174-187.

KHAMINETS, A.; HUNN, J. P.; KONEN-WAISMAN, S.; ZHAO, Y. O.; PREUKSCHAT, D.; COERS, J.; BOYLE, J. P.; ONG, Y. C.; BOOTHROYD, J. C.; REICHMANN, G.; HOWARD, J. C. Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. **Cell Microbiol**, v. 12, p. 939-961, 2010.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C.; MACKEY, A. J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; PAULSEN, I. T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J. C.; PFEFFERKORN, E. R.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; ROOS, D. S.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Res**, v. 33, p. 2980-2992, 2005.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C.; MACKEY, A. J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; PAULSEN, I. T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J. C.; PFEFFERKORN, E. R.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; ROOS, D. S.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucl. Acids Res.**, v. 33, p. 2980-2992, 2005.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFORT, R., JR.; VITOR, R. W.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L. D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 12, p. 942-949, 2006.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Selection at a single locus leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. **PLoS Genet**, v. 5, p. e1000404, 2009.

KHAN, A.; DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **Int J Parasitol**, v. 41, p. 645-655, 2011.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **Int J Parasitol**, v. 34, p. 423-432, 2004.

KIM, L.; BUTCHER, B. A.; LEE, C. W.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. **J Immunol**, v. 177, p. 2584-2591, 2006.

KODJIKIAN, L.; HOIGNE, I.; ADAM, O.; JACQUIER, P.; AEBI-OCHSNER, C.; AEBI, C.; GARWEG, J. G. Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. **Pediatr Infect Dis J**, v. 23, p. 272-274, 2004.

KODJIKIAN, L. [Toxoplasmosis and pregnancy]. **J Fr Ophtalmol**, v. 33, p. 362-367, 2010.

KOHLER, S.; DELWICHE, C. F.; DENNY, P. W.; TILNEY, L. G.; WEBSTER, P.; WILSON, R. J.; PALMER, J. D.; ROOS, D. S. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. **Science**, v. 275, p. 1485-1489, 1997.

KOMPALIC-CRISTO, A.; FROTTA, C.; SUAREZ-MUTIS, M.; FERNANDES, O.; BRITTO, C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. **Parasitol Res**, v. 101, p. 619-625, 2007.

KOTRESHA, D.; NOORDIN, R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. **APMIS**, v. 118, p. 529-542, 2010.

KRAVETZ, J. Congenital toxoplasmosis. **Clin Evid (Online)**, v. 2010, p. 2010.

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Prevention of toxoplasmosis in pregnancy: knowledge of risk factors. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 13, p. 161-165, 2005.

KUSAKABE, K.; NAKA, M.; ITO, Y.; EID, N.; OTSUKI, Y. Regulation of natural-killer cell cytotoxicity and enhancement of complement factors in the spontaneously aborted mouse placenta. **Fertil Steril**, v. 90, p. 1451-1459, 2008.

LAGO, E. G.; NETO, E. C.; MELAMED, J.; RUCKS, A. P.; PRESOTTO, C.; COELHO, J. C.; PARISE, C.; VARGAS, P. R.; GOLDBECK, A. S.; FIORI, R. M. Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. **Paediatr Perinat Epidemiol**, v. 21, p. 525-531, 2007.

LAMBERT, H.; HITZIGER, N.; DELLACASA, I.; SVENSSON, M.; BARRAGAN, A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. **Cell Microbiol**, v. 8, p. 1611-1623, 2006.

LEBAS, F.; DUCROCQ, S.; MUCIGNAT, V.; PARIS, L.; MEGIER, P.; BAUDON, J. J.; GOLD, F. [Congenital toxoplasmosis: a new case of infection during pregnancy in an previously immunized and immunocompetent woman]. **Arch Pediatr**, v. 11, p. 926-928, 2004.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R., 3RD; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the protozoa. **J Protozool**, v. 27, p. 37-58, 1980.

LEVINE, N. D. **The protozoan phylum apicomplexa.** Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988.

LIESENFELD, O.; NGUYEN, T. A.; PHARKE, C.; SUZUKI, Y. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **J Parasitol**, v. 87, p. 1491-1493, 2001.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 138, p. 1829-1831, 2011.

Lopes-Maria, J. B. Modulação da apoptose em células BeWo infectadas por cepas atípicas (Udi1CH-05 e Udi2CH-05) de *Toxoplasma gondii* – , **Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 2013.** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

LOURENÇO, A. M.; LEVY, A. M.; CAETANO, L. C.; CARRARO ABRAHAO, A. A.; PRADO, J. C., JR. Influence sexual dimorphism on the persistence of blood parasites in infected *Calomys callosus*. **Res Vet Sci**, v. 85, p. 515-521, 2008.

LUWER, C. G.; STANWAY, R. R.; CHAUSSEPIED, M.; LANGSLEY, G.; HEUSSLER, V. T. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. **Int J Parasitol**, v. 39, p. 163-173, 2009.

LUE, H.; KLEEMANN, R.; CALANDRA, T.; ROGER, T.; BERNHAGEN, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. **Microbes Infect**, v. 4, p. 449-460, 2002.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol**, v. 18, p. 198-201, 2002.

MCFADDEN, G. I. The apicoplast. **Protoplasma**, v. 4, p. 641-650, 2011.

MELLO, D. A. [ *Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia-Cricetidae): its characterization, distribution, biology, breeding and management of a laboratory strain]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 37-44, 1984.

MELLO, D. A.; TEIXEIRA, M. L. [Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) with Leishmania donovani chagasi (Laison, 1982)]. **Rev Saude Publica**, v. 18, p. 337-341, 1984.

MELO, M. B.; JENSEN, K. D.; SAEIJ, J. P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends Parasitol**, v. 27, p. 487-495, 2011.

MELO, M. B.; NGUYEN, Q. P.; CORDEIRO, C.; HASSAN, M. A.; YANG, N.; MCKELL, R.; ROSOWSKI, E. E.; JULIEN, L.; BUTTY, V.; DARDE, M. L.; AJZENBERG, D.; FITZGERALD, K.; YOUNG, L. H.; SAEIJ, J. P. Transcriptional analysis of murine macrophages infected with different *Toxoplasma* strains identifies novel regulation of host signaling pathways. **PLoS Pathog**, v. 9, p. e1003779, 2013.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 39, p. 23-39, 2009.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infect Immun**, v. 27, p. 283-287, 1980.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273.

MINOT, S.; MELO, M. B.; LI, F.; LU, D.; NIEDELMAN, W.; LEVINE, S. S.; SAEIJ, J. P. Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, p. 13458-13463, 2012.

MIYaura, H.; IWATA, M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. **J Immunol**, v. 168, p. 1087-1094, 2002.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. **Clin Infect Dis**, v. 23, p. 277-282, 1996.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin Infect Dis**, v. 47, p. 554-566, 2008.

MOSMANN, T. R.; LI, L.; HENGARTNER, H.; KAGI, D.; FU, W.; SAD, S. Differentiation and functions of T cell subsets. **Ciba Found Symp**, v. 204, p. 148-154; discussion 154-148, 1997.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunol Rev**, v. 240, p. 269-285, 2011.

NAVA-CASTRO, K.; HERNANDEZ-BELLO, R.; MUNIZ-HERNANDEZ, S.; CAMACHO-ARROYO, I.; MORALES-MONTOR, J. Sex steroids, immune system, and parasitic infections: facts and hypotheses. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1262, p. 16-26, 2012.

OPSTEEGH, M. M.; KORTBEEK, T. L.; HAVELAAR, A. A.; VAN DER GIESSEN, J. J. Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. **Clin Infect Dis**, v. p. 2014.

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **Int J Parasitol**, v. 38, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F.; MARVULO, M. F.; HORTA, M. C.; SILVA, M. A.; SILVA, J. C.; SIQUEIRA, D. B.; LIMA, P. A.; VITALIANO, S. N.; GENNARI, S. M. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey

(*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 175, p. 377-381, 2011.

PEREIRA MDE, F.; SILVA, D. A.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. Acquired and congenital ocular toxoplasmosis experimentally induced in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 103-114, 1999.

PEREIRA, M. D. E. F.; SILVA, D. A.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. Acquired and congenital ocular toxoplasmosis experimentally induced in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 103-114, 1999.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 12, p. 214-223, 2007.

PEZERICO, S. B.; LANGONI, H.; DA SILVA, A. V.; DA SILVA, R. C. Evaluation of *Toxoplasma gondii* placental transmission in BALB/c mice model. **Exp Parasitol**, v. 123, p. 168-172, 2009.

PFAFF, A. W.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; VILLARD, O.; SENEGRAS, A.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. **Parasitology**, v. 134, p. 1895-1902, 2007.

PFEFFERKORN, E. R.; ECKEL, M.; REBHUN, S. Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. **Mol Biochem Parasitol**, v. 20, p. 215-224, 1986.

PINTO, A. C.; CAETANO, L. C.; LEVY, A. M.; FERNANDES, R. D.; SANTOS, C. D.; DO PRADO, J. C., JR. Experimental Chagas' disease in orchietomized *Calomys callosus* infected with the CM strain of *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, v. 124, p. 147-152, 2010.

POMARES, C.; AJZENBERG, D.; BORNARD, L.; BERNARDIN, G.; HASSEINE, L.; DARDE, M. L.; MARTY, P. Toxoplasmosis and horse meat, France. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 1327-1328, 2011.

RABILLOUD, M.; WALLON, M.; PEYRON, F. In utero and at birth diagnosis of congenital toxoplasmosis: use of likelihood ratios for clinical management. **Pediatr Infect Dis J**, v. 29, p. 421-425, 2010.

REESE, M. L.; SHAH, N.; BOOTHROYD, J. C. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 is an allosteric inhibitor of the immunity-related GTPases. **J Biol Chem**, v. p. 2014.

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: (Ed.). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. Philadelphia: WB Saunders, v.5, 2001. p.205-346.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 941-945, 2004.

REY,L. Parasitologia. 3º ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan S.A., 2001.856p.

RIBEIRO, M. Ação de azitromicina, espiramicina e da associação de sulfadiazina e pirimetamina na infecção por cepas atípicas (Udi1-CH05 e Udi2-CH05) de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo) -, Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 2013. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

ROBBINS, J. R.; ZELDOVICH, V. B.; POUKCHANSKI, A.; BOOTHROYD, J. C.; BAKARDJIEV, A. I. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun**, v. 80, p. 418-428, 2012.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, p. 264-296, 2012.

ROBERTS, A.; HEDMAN, K.; LUYASU, V.; ZUFFEREY, J.; BESSIERES, M. H.; BLATZ, R. M.; CANDOLFI, E.; DECOSTER, A.; ENDERS, G.; GROSS, U.; GUY, E.; HAYDE, M.; HO-YEN, D.; JOHNSON, J.; LECOLIER, B.; NAESENS, A.; PELLOUX, H.; THULLIEZ, P.; PETERSEN, E. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 20, p. 467-474, 2001.

ROBERTS, C. W.; ALEXANDER, J. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. **Parasitology**, v. 104 Pt 1, p. 19-23, 1992.

ROBERTS, C. W.; CRUICKSHANK, S. M.; ALEXANDER, J. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. **Infect Immun**, v. 63, p. 2549-2555, 1995.

ROBINSON, D. P.; KLEIN, S. L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. **Horm Behav**, v. 62, p. 263-271, 2012.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis--prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reprod Toxicol**, v. 21, p. 458-472, 2006.

SALOMÃO, C. L.; SILVA, N. M.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; SU, C.; SILVA, D. A. O.; GENNARI, S. M.; MINEO, J. R. **Isolamento e caracterização genotípica de cepas de Toxoplasma gondii de galinhas caipiras (Gallusgallusdomesticus)da cidade de Uberlândia, MG. 2007. f. (no formato de artigo científico) – , Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 2007.** 2007. 30 (Monografia ). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

SANTOS, C. D.; TOLDO, M. P.; LEVY, A. M.; PRADO, J. C., JR. *Trypanosoma cruzi*: effects of social stress in *Calomys callosus* a natural reservoir of infection. **Exp Parasitol**, v. 119, p. 197-201, 2008.

SCHLUTER, D.; DAUBENER, W.; SCHARES, G.; GROSS, U.; PLEYER, U.; LUDER, C. Animals are key to human toxoplasmosis. **Int J Med Microbiol**, v. p. 2014.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, p. 504-512, 2006.

SEPULVEDA-ARIAS, J. C.; GOMEZ-MARIN, J. E.; BOBIC, B.; NARANJO-GALVIS, C. A.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O. Toxoplasmosis as a travel risk. **Travel Med Infect Dis**, v. p. 2014.

SERRANTI, D.; BUONSENKO, D.; VALENTINI, P. [Congenital toxoplasmosis treatment]. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 15, p. 193-198, 2011.

SHARMA, P.; CHITNIS, C. E. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. **Curr Opin Microbiol**, v. 16, p. 432-437, 2013.

SHIONO, Y.; MUN, H. S.; HE, N.; NAKAZAKI, Y.; FANG, H.; FURUYA, M.; AOSAI, F.; YANO, A. Maternal-fetal transmission of *Toxoplasma gondii* in interferon-gamma deficient pregnant mice. **Parasitol Int**, v. 56, p. 141-148, 2007.

SHWAB, E. K.; ZHU, X. Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, p. 453-461, 2014.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, p. 2749-2761, 2009.

SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunol Rev**, v. 240, p. 72-91, 2011.

SILVA, J. C.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M.; AMAJONES, V. R.; MAGNABOSCO, C.; YAI, L. E.; FERREIRA-NETO, J. S.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic cats from Guarulhos and Sao Paulo, Brazil. **J Parasitol**, v. 88, p. 419-420, 2002.

SILVA, L. A.; BRANDAO, G. P.; PINHEIRO, B. V.; VITOR, R. W. Immunosuppression with cyclophosphamide favors reinfection with recombinant *Toxoplasma gondii* strains. **Parasite**, v. 19, p. 249-257, 2012.

SILVEIRA, C.; FERREIRA, R.; MUCCIOLI, C.; NUSSENBLATT, R.; BELFORT, R., JR. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. **Am J Ophthalmol**, v. 136, p. 370-371, 2003.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol Res**, v. 107, p. 253-260, 2010.

SOARES, R. M.; SILVEIRA, L. H.; DA SILVA, A. V.; RAGOZO, A.; GALLI, S.; LOPES, E. G.; GENNARI, S. M.; DE JESUS PENA, H. F. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Vet Parasitol**, v. 178, p. 29-34, 2011.

SOLDATI, D.; MEISSNER, M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, p. 32-40, 2004.

STEINFELDT, T.; KONEN-WAISMAN, S.; TONG, L.; PAWLOWSKI, N.; LAMKEMEYER, T.; SIBLEY, L. D.; HUNN, J. P.; HOWARD, J. C. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. **PLoS Biol**, v. 8, p. e1000576, 2010.

SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, p. 414-416, 2003.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **Int J Parasitol**, v. 36, p. 841-848, 2006a.

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

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDE, M. L.; ZHU, X. Q.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, p. 5844-5849, 2012.

SULLIVAN, W. J., JR.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, p. 717-733, 2012.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, p. 516-518, 1988.

TALABANI, H.; MERGEY, T.; YERA, H.; DELAIR, E.; BREZIN, A. P.; LANGSLEY, G.; DUPOUY-CAMET, J. Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review. **Parasite**, v. 17, p. 177-182, 2010.

TANIWAKI, N. N.; GONCALVES, V. M.; ROMERO, J. K.; DA SILVA, C. V.; DA SILVA, S.; MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi* strains in the *Calomys callosus*: parasitemia and reaction of intracellular forms with stage-specific antibodies in the acute and chronic phase of infection and after immunosuppression. **Parasitol Res**, v. 109, p. 431-440, 2011.

TAYLOR, G. A.; COLLAZO, C. M.; YAP, G. S.; NGUYEN, K.; GREGORIO, T. A.; TAYLOR, L. S.; EAGLESON, B.; SECREST, L.; SOUTHON, E. A.; REID, S. W.; TESSAROLLO, L.; BRAY, M.; MCVICAR, D. W.; KOMSCHLIES, K. L.; YOUNG, H. A.; BIRON, C. A.; SHER, A.; VANDE WOUDE, G. F. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene IGTP. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, p. 751-755, 2000.

- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.
- THIEBAUT, R.; LEPROUST, S.; CHENE, G.; GILBERT, R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. **Lancet**, v. 369, p. 115-122, 2007.
- TORREY, E. F.; YOLKEN, R. H. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. **Trends Parasitol**, v. 29, p. 380-384, 2013.
- UNNO, A.; SUZUKI, K.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. **Parasitol Int**, v. 57, p. 515-518, 2008.
- VALDES, V.; LEGAGNEUR, H.; WATRIN, V.; PARIS, L.; HASCOET, J. M. [Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy]. **Arch Pediatr**, v. 18, p. 761-763, 2011.
- VALLOCHI, A. L.; MUCCIO, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R., JR.; RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **Am J Ophthalmol**, v. 139, p. 350-351, 2005.
- VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; DE LEON-NAVA, M. A.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine mechanisms associated with resistance or susceptibility to parasitic diseases during pregnancy. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, p. 114-121, 2009.
- VILLARINO, N.; SCHMIDT, N. W. CD8 T Cell Responses to and Intracellular Parasites. **Curr Immunol Rev**, v. 9, p. 169-178, 2013.
- WAHAB, T.; EDVINSSON, B.; PALM, D.; LINDH, J. Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. **J Clin Microbiol**, v. 48, p. 591-592, 2010.
- WALKER, D. M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; MCGWIRE, B. S.; DREW, M. E.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, p. 1245-1263, 2014.
- WILHELM, C. L.; YAROVINSKY, F. Apicomplexan infections in the gut. **Parasite Immunol**, v. 36, p. 409-420, 2014.
- YAP, G. S.; SHER, A. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. **Immunobiology**, v. 201, p. 240-247, 1999.
- YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nat Rev Immunol**, v. 14, p. 109-121, 2014.
- ZENCLUSSEN, A. C.; JOACHIM, R.; HAGEN, E.; PEISER, C.; KLAPP, B. F.; ARCK, P. C. Heme oxygenase is downregulated in stress-triggered and interleukin-12-mediated murine abortion. **Scand J Immunol**, v. 55, p. 560-569, 2002.

ZHAO, Y. O.; ROHDE, C.; LILUE, J. T.; KONEN-WAISMAN, S.; KHAMINETS, A.; HUNN, J. P.; HOWARD, J. C. *Toxoplasma gondii* and the Immunity-Related GTPase (IRG) resistance system in mice: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 234-240, 2009.

#### ANEXO I: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -  
Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:[ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br);  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

#### ANÁLISE FINAL Nº 101/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 049/11

Projeto Pesquisa: "Avaliação da transmissão vertical de *Toxoplasma gondii* em *Calomys callosus* cronicamente infectados pela cepa ME-49 e reinfectados com isolados Udi-1 CH-05 e Udi-2CH-05".

Pesquisador Responsável: Eloisa Amália Vieira Ferro

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 05 de julho de 2011