



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mário Endsfelz Camargo”



PATRÍCIO DA SILVA CARDOSO BARROS

**Análise estrutural e funcional de proteínas de grânulos densos de *Toxoplasma gondii*
através da edição gênica por CRISPR/CAS9**

Uberlândia-MG

Julho-2018

PATRÍCIO DA SILVA CARDOSO BARROS

**Análise estrutural e funcional de proteínas de grânulo denso de *Toxoplasma gondii*
através da edição gênica por CRISPR/CAS9**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Coorientador: Prof. Dr. Jeroen Saeij

Uberlândia-MG

Julho-2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B277a
2018 Barros, Patrício da Silva Cardoso, 1989
 Análise estrutural e funcional de proteínas de grânulo denso de
Toxoplasma gondii através da edição gênica por CRISPR/CAS9 [recurso
eletrônico] / Patrício da Silva Cardoso Barros. - 2018.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.

Coorientador: Jeroen Saeij.

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

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.479>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. *Toxoplasma gondii*. 3. Piroptose. 4. . I. Mineo,
Tiago Wilson Patriarca, (Orient.). II. Saeij, Jeroen, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Patrício da Silva Cardoso Barros

“Análise estrutural e funcional de proteínas de grânulos densos de *Toxoplasma gondii* através da edição gênica por CRISPR/CAS9”

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, 27 de julho de 2018.

Prof. Dra. Andrea Rodrigues Avila
FIOCRUZ/PR

Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira
UFTM

Dr. Murilo Vieira da Silva - UFU
UFU

Prof. Dr. José Roberto Mineo
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo – orientador
ICBIM/UFU

Agradecimentos:

Às minhas mães, Maria Socorro e Maria Micaela, e à minha esposa Marina Medalha, por serem o meu conforto, minha fonte inesgotável de inspiração e o meu tesouro maior. Por me tornarem consciente de que tenho absolutamente tudo de essencial e necessário para uma vida digna e respeitável e que qualquer outra conquista será uma mera adição e jamais poderá substituir o amor.

À minha irmã Patrícia, por todo o amor, carinho, compreensão e momentos inesquecíveis.

Aos meus queridos sogros Veralucia e Kleber e ao meu cunhado Gilberto, por me permitirem fazer parte daquilo que é um exemplo de família, onde se prega o amor, o respeito e a amizade.

Ao meu querido orientador Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, por ter me recebido em seu laboratório e ter me oferecido as oportunidades necessárias para a realização desse trabalho. Por todas as discussões científicas, ensinamentos, motivação e orientação. Pelo exemplo de ética e compromissivo com o dever.

Ao Dr. José Roberto Mineo, por compartilhar da sua vasta experiência, pela orientação e por ter me proporcionado, juntamente com o Tiago, a oportunidade e alçar voos maiores.

Ao meu coorientador, Dr. Jeroen Saeij, por ter me recebido com tanto carinho em seu laboratório. Por todo o ensinamento, motivação e pela oportunidade de crescimento científico.

Aos meus amigos: Neto, Gabi, Luísa, Fred, Silas, Fabrício pela amizade sincera e pelo companheirismo.

Aos queridos amigos e também colegas de laboratório: Yifan, Shruthi, Lamba, Tatiana, David, Debanjan, Dan, Vanessa M, Vanessa R, Flávia, Carol M, Carol R, Heber, Marley, Zilda, Cristina, Fernanda Santiago, Ana Claudia, Murilo, Mylla, Jacqueline, Mariana, Eliezer, Tamires, Fernando pelo compartilhamento de conhecimentos, pela amizade e momentos de alegria.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

Resumo:

Os patógenos membros do filo apicomplexa são uma grande ameaça para a saúde humana e animal no mundo. O *Toxoplasma gondii* é um dos protozoários pertencente a esse filo, capaz de infectar qualquer célula nucleada. Por ser um protozoário intracelular obrigatório, a entrada na célula hospedeira é um processo fundamental para a sua sobrevivência. A invasão é um processo ativo durante a qual o parasito recruta parte da membrana da célula hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (VP). Apesar da importância da VP em proteger o parasito da eliminação pelas células hospedeiras, a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) forma uma barreira que priva o parasito de uma vasta fonte de nutrientes do sistema endocítico e exocítico do hospedeiro. Para contornar esse problema, o parasito secreta proteínas que se associam a MVP, alterando a sua permeabilidade, possibilitando assim a difusão passiva, bidirecional, de moléculas pequenas, através de poros na membrana do VP. Por outro lado, as células hospedeiras são capazes de reconhecer moléculas parasitárias em contato com suas membranas ou que são lançadas para dentro de seu citoplasma, induzindo a ativação de mecanismos cruciais para a sua resistência frente a infecção. Até o momento, as bases moleculares da formação do poro hipotético ainda não foram relatadas, bem como há pouco conhecimento sobre as moléculas do parasito que são agonistas de receptores inatos, sendo estes os objetivos centrais de investigação deste trabalho. Em uma primeira abordagem, GRA17 foi identificada como uma proteína secretada para a MVP que medeia o transporte de pequenas moléculas através da MVP, sendo que sua deleção induz lenta proliferação parasitária e queda abrupta de virulência em camundongos. Apesar da predição de múltiplas estruturas alfa (α)-hélice na composição de GRA17, esses ainda não foram funcionalmente caracterizados. No primeiro capítulo deste trabalho, predizemos oito domínios α -hélices para GRA17, que foram individualmente truncados utilizando o sistema *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR/ CRISPR associated protein 9-CAS9* (CRISPR/CAS9), com o intuito de se caracterizar funcionalmente esses domínios. Por meio desta abordagem, demonstramos que, com exceção do motivo α -8, todos os demais são indispensáveis para ação, localização proteica e estabilidade do VP. O truncamento desses 7 motivos resulta em falhas na localização de GRA17 na MVP e surgimento de vacúolos parasitóforo aberrantes. Além disso, a deleção das 7 sequências α -hélices resulta em uma drástica diminuição na proliferação e sobrevivência do parasito, nos levando a conclusão de que as estruturas α -hélice de GRA17 são cruciais para função proteica e conseqüente viabilidade do parasito. Por outro lado, buscamos

compreender os mecanismos de resistência do hospedeiro decorrentes da liberação de antígenos durante o processo de replicação. Com tal intenção, utilizamos modelo estabelecido em ratos da linhagem Lewis, que resulta na total eliminação do parasito. Estudos anteriores demonstraram que essa resistência é mediada pela ativação do receptor inato citoplasmático NLRP1, que resulta na rápida morte da célula hospedeira através da piroptose, limitando a replicação parasitária. Até o momento, não foram identificados os alvos antigênicos envolvidos na ativação de NLRP1. Para identificar os genes parasitários que induzem a ativação desta via, utilizamos um ensaio de mutagênese química que nos levou a identificar três proteínas secretadas de grânulos densos, TGGT1_226380 (GRA35), TGGT1_237015 e TGGT1_236870, que individualmente estão envolvidas na ativação de NLRP1 e indução de piroptose. A deleção dessas proteínas por CRISPR/CAS9 resulta na inibição da piroptose em macrófagos oriundos de rato Lewis. Uma busca mais detalhada dos clones gerados pelo ensaio de mutagênese revela que fatores adicionais podem estar envolvidos na indução de piroptose. Como a família da GRA35 é composta por três outros genes (TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970), decidimos investigar o envolvimento dessas proteínas na indução de piroptose. A deleção desses genes em *T. gondii* não alteram a taxa de viabilidade de BMDMs de Lewis em comparação com a cepa WT, o que demonstra que, diferentemente da GRA35, essas proteínas não estão envolvidas na ativação do inflamassoma de NLRP1 e indução de piroptose. Em conclusão, demonstramos que as proteínas de grânulos densos são parte essencial dos mecanismos de sobrevivência dentro do vacúolo parasitóforo, controlando o transporte de moléculas através da membrana do VP, bem como são reconhecidas pelos sensores inatos do hospedeiro, iniciando a montagem de uma resposta de controle contra o protozoário, mediada pela ativação do inflamassoma e indução de piroptose.

Palavras-chave: *T. gondii*, CRISPR/CAS9, GRA17, α -hélice, Rato Lewis, BMDMs inflamassoma, piroptose, GRA35, TGGT1_237015, TGGT1_236870, TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970.

Abstract

Apicomplexan pathogens are the greatest threats to human and animal health in the world. *Toxoplasma gondii* is one of the protozoa belonging to this phylum, capable of infecting any nucleated cell. As an obligate intracellular protozoan, entry into the host cell is a crucial event to its survival. The host cell invasion is an active process in which the parasite recruits part of the host cell membrane to form the parasitophorous vacuole (PV). Whereas the PV helps protect the parasite from host cell elimination, the PV membrane (PVM), forms a physical barrier which deprives parasites of an abundant source of nutrients from the host's endocytic and exocytic system. To overcome this problem the parasite secretes proteins that associate with the PVM, modulating its permeability allowing bidirectional diffusion of small molecules, probably through pores in the PVM. On the other hand, the host cells are able to recognize parasitic molecules in contact with their membranes or that are released into their cytoplasm, inducing the activation of crucial mechanisms for their resistance to infection. However, so far, the molecular basis of this hypothetical pore has not been reported, as well as there is little knowledge about the parasite agonists of innate receptors, being these the central goals of investigation in this work. In a first approach, GRA17 was identified as a protein secreted to the PVM that mediates passive transport of small molecules across the PVM, and its deletion induces slow parasitic proliferation and abrupt decline in virulence. Besides strongly predicted α -helices in the GRA17 composition, these were not functionally characterized. In the first chapter, we predict eight α -helix domains in the secondary structure of GRA17, which were individually truncated using the system Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR/ CRISPR associated protein 9-CAS9 (CRISPR/CAS9), in order to functionally characterize them. Through this approach, we show that with the exception of α -8, all the others predicted α -helices are required for GRA17 normal function, localization and PV stability. The truncation of these 7 motifs results in GRA17 mislocalization on the PVM and an aberrant PV morphology. Furthermore, GRA17 truncated parasites proliferate slowly and shows a decrease viability, leading us to the conclusion that the 7 α -helix structures of GRA17 are crucial for protein function and consequent viability of the parasite.

Furthermore, we sought to understand the mechanisms of host resistance, arising from the antigens release during the replication process. We use Lewis rats that was identified to be completely resistant to *Toxoplasma* infection. Previous findings have established that this resistance is mediated by the activation of the cytosolic sensor NLRP1, which results in the rapid host cell death through pyroptose, limiting parasitic replication. However, the targets involved in NLRP1 activation were not identified. To identify the parasite genes involved in the activation of this pathway, we used a chemical mutagenesis screen, which led us to identify three proteins secreted from dense granules, TGGT1_226380 (GRA35), TGGT1_237015 e TGGT1_236870, which are individually involved in NLRP1 inflammasome activation and pyroptosis induction. Deletion of these proteins (by CRISPR/CAS9) results in significantly less pyroptosis in Lewis macrophages. A more detailed search of the clones generated by the mutagenesis assay reveals that additional factors may be involved in the induction of pyroptosis. As GRA35 family is composed by three other genes (TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970) we decided to test the involvement of these proteins in pyroptosis induction. Deletion of these genes in *T. gondii* does not alter the viability of Lewis BMDMs compared to WT strain, which shows that, unlike GRA35, these proteins are not involved in the activation of NLRP1 inflammasome and induction of pyroptosis. In conclusion, we demonstrate that dense granule proteins are an essential part for the parasite survival within the parasitophorous vacuole, controlling the transport of molecules through the PV membrane, as well as for being recognized by the host innate sensors, initiating a response that control the protozoan, through inflammasome activation and pyroptosis induction.

Keywords: *T. gondii*, CRISPR/CAS9, GRA17, α -helix, Rat Lewis, BMDMs inflammasome, pyroptosis, GRA35, TGGT1_237015, TGGT1_236870, TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970.

Lista de abreviaturas

Amino-terminal - **N-terminal**

Ausente no melanoma 2 - **AIM2**

Carboxi-terminal - **C-terminal**

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR/ CRISPR associated protein 9-CAS9 - **CRISPR/CAS9**

Complexo de membrana interna - **IMC**

Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos - **NOD**

Domínio pirina - **PYD**

Domínios de ativação e recrutamento de caspases – **CARD**

Família de proteínas inibidoras de kB - **IkB**

Fator de diferenciação mieloide - **MyD88**

Fator nuclear *kappa* B - **NF-kB**

Gene de interesse - **GOI**

Genes estimulados por interferon - **ISGs**

GTPases relacionadas à imunidade - **IRGs**

guide RNA - **gRNA**

Indolamina 2,3-dioxigenase - **IDO**

Junção de movimento - **MJ**

Locus de características quantitativas - **QTL**

Macrófagos derivados a medula óssea - **BMDMs**

Membrana do vacúolo parasitóforo - **MVP**

Óxido nítrico sintase induzida - **iNOS**

Padrões moleculares associados a danos - **DAMPs**

Padrões moleculares associados a patógenos - **PAMPs**

Peptídeo sinal - **PS**

Plasmepsina V - **PM5**

Plasmodium export element – **PEXEL**

Plasmodium translocon of exported proteins - **PTEX**

Polimorfismo de nucleotídeo único - **SNP**

Polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição - **RFLP**

Proteína de grânulo denso - **GRA**

Proteína de micronema - **MIC**

Proteína exportada 2 - **EXP2**

Proteína de bulbo de roptria - **ROP**

Proteína de pescoço de roptria - **RON**

Proteínas exportadas PEXEL-negativas - **PNEPs**

Proteínas ligantes de guanilato - **GBPs**

Reação em cadeia da polimerase - **PCR**

Receptores de reconhecimento padrão - **PRRs,**

Receptores semelhantes a NOD - **NLRs**

Receptores semelhantes a *toll* - **TLR**

Rede intravacuolar - **IVN**

Reparo dirigido por homologia - **HDR**

Repetição rica em leucina - **LRR**

Speck-like associada à apoptose contendo um CARD - **ASC/PYCARD**

Tampão fosfato-salino - **PBS**

Transdutor de sinal e ativador da transcrição - **STAT**

União de extremidade não homólogas - **NHEJ**

Vacúolo parasitóforo - **VP**

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	13
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.1. Identificação e classificação taxonômica	14
1.2. Morfologia e ultraestrutura básica dos estágios infecciosos	15
1.3. Ciclo biológico	18
1.4. Vias de transmissão	21
1.5. Diversidade genética e estrutura populacional.....	23
1.6. Diferença na patogenicidade das cepas	25
1.7. Interação patógeno hospedeiro.....	26
1.7.1. Invasão e ciclo lítico.....	26
1.7.2. Resposta imune contra <i>T. gondii</i>	29
1.7.3. Moléculas efetoras de <i>T. gondii</i> que modulam a expressão gênica do hospedeiro e mecanismos de evasão	31
2. Objetivos.....	35
2.1. Objetivo Geral:.....	35
2.2. Objetivos Específicos:.....	35
Capítulo I.....	36
1. Introdução	37
2. Objetivos	42
2.1. Objetivo geral.....	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. Materiais e Métodos	43
3.1. Cultura de células e parasitos	43
3.2. Identificação e anelamento dos oligos utilizados como gRNA.....	43
3.3. Digestão do plasmídeo CRISPR (pSS013) e inserção de oligos.....	44
3.4. Transformação dos plasmídeos pSS013 recombinantes em células competentes e isolamento de colônias positivas.....	44
3.5. Purificação dos plasmídeos recombinantes (Maxi kit)	45
3.6. Amplificação do construto utilizado na truncação das sequências α -hélices por PCR..	45
3.7. Transfecção e seleção dos clones	46
3.8. Western blot	47
3.9. Ensaio de placa.....	48

3.10. Imunofluorescência	48
3.11. Análise estatística.....	49
4. Resultados.....	50
4.1. A Predição <i>in silico</i> da estrutura secundária da GRA17 revela a presença de oito domínios alfa hélice	50
4.2. Análise estrutural e funcional dos domínios α -hélices da porção C-terminal da GRA17	53
4.2.1. Com a exceção do domínio α -8 (GRA17 $\Delta^{224-239/HA}$) todos os domínios C terminal da GRA17 são importantes para estabilidade do VP e função proteica.....	53
4.2.2. O domínio α -8 (Δ 224-239) não atua na função transportadora de GRA17.....	53
4.2.3. O truncamento dos domínios α -8 e α -7 (Δ 188-239) compromete a função da GRA17 e resulta na instabilidade do VP.....	54
4.2.4. O truncamento conjunto dos três últimos domínios (α -6-8) da porção C-terminal de GRA17 (Δ 156-239) resulta em falha na locação na MVP e instabilidade do VP.....	55
4.3. Análise estrutural e funcional dos domínios N terminal da GRA17.....	59
4.3.1. Todos os domínios N-terminal da GRA17 são indispensáveis para estabilidade e função proteica.....	59
4.3.2. O truncamento dos domínios α -1 e α -2 resulta em alterações parcial na localização proteica e instabilidade do VP.....	60
4.3.3. O clone com as sequências α -1, α -2 e α -3 truncada apresenta defeito parcial na localização de GRA17 e instabilidade do VP	61
4.4. Diagnóstico dos clones modificados geneticamente comprovam a truncação de cada domínio α -hélice.....	65
4.5. O truncamento na porção N-terminal da GRA17 é mais deletério para o crescimento e viabilidade do parasito em comparação a porção C-terminal.	71
5. Discussão	74
6. Tabela 1.....	81
Capítulo II.....	84
1. Introdução	85
1.1. Utilização de ratos como modelo de estudo para <i>T. gondii</i>	87
2. Objetivos.....	89
2.1. Objetivo geral.....	89
2.2. Objetivos específicos.....	89
3. Materiais e métodos	90
3.1. Diferenciação de Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs).....	90

3.2. Ensaio de mutagênese química e seleção de clones incapazes de ativar o inflamassoma	91
3.3. Geração de cepas <i>knockout</i> e complementação gênica	91
3.4. Ensaio de viabilidade celular.....	92
3.5. Ensaio de placas	92
3.6. Análise estatística.....	92
4. Resultados	93
4.1. Ensaio de mutagênese resulta em clones que falham na ativação do inflamassoma ..	93
4.2. Identificação de genes com mutação.....	95
4.3. Uma triagem adicional revela que outros fatores do parasito podem estar envolvidos na ativação do inflamassoma e indução de piroptose	96
4.4. Deleção de três outros membros da família GRA35 demonstra que estes não participam na indução de piroptose em BMDMs de rato Lewis.....	97
5. Discussão	99
6. Conclusão Geral:.....	102
7. Referências Bibliográficas	103

INTRODUÇÃO GERAL

1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um patógeno intracelular, membro do filo Apicomplexa, capaz de infectar qualquer célula nucleada, estabelecendo cistos teciduais que permanecem infectantes pelo tempo de vida de seus hospedeiros. O filo é composto por mais de 5000 parasitos cujo hospedeiros abrangem, praticamente, todo o reino animal. Diversos patógenos pertencentes ao mesmo destacam-se pela grande importância médica e veterinária, como *Plasmodium* spp (causador da malária), *Cryptosporidium* spp (diarréia) *Neospora caninum* (aborto em bovinos) e *Eimeria* spp (coccidiose) (HUNTER; SIBLEY, 2012; CHECKLEY et al., 2015; HAKIMI; OLIAS; SIBLEY, 2017).

Patógenos do filo Apicomplexa representam uma das maiores ameaças à saúde humana e animal no mundo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Dados da Organização Mundial da Saúde demonstram que cerca da metade da população mundial vive em áreas de risco para a transmissão da malária e, apenas em 2015, cerca de meio milhão de pessoas morreram por causa dessa infecção. A malária é causada pelo protozoário *Plasmodium*, que é o mais letal patógeno humano pertencente ao filo Apicomplexa (DE KONING-WARD et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). No entanto, a importância e o sucesso de um patógeno não deve ser determinado apenas pela sua letalidade, pois a eliminação do hospedeiro na maioria das vezes significa a eliminação do próprio patógeno. A capacidade de infectar o máximo de hospedeiros possível, preferencialmente, garantindo a integridade desses hospedeiros é mais vantajoso para o parasito, pois garante uma maior distribuição e perpetuação da espécie.

Diferentemente do *Plasmodium*, *T. gondii* causa uma infecção assintomática em seres humanos imunocompetentes. Como resultado, cerca de 2 bilhões de pessoas estão cronicamente infectadas por esse protozoário (JONES; DUBEY, 2012; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Por outro lado, a toxoplasmose é potencialmente letal em indivíduos imunocomprometidos (ROBERT-GANGNEUX; BELAZ, 2016; WANG et al., 2017a). Na ausência de uma resposta imune eficiente, o parasito é capaz de romper a parede do cisto liberando bradizoítos que reativam

a infecção, o que pode ser letal sem a intervenção adequada (WATTS et al., 2015; SINAI et al., 2016).

A inexistência de uma opção terapêutica eficaz, capaz de eliminar a infecção, é um forte agravante para esse cenário. A carência de tratamento é resultado da excelência do parasito em reprogramar a sua expressão gênica, o que acarreta na interconversão de estágio de vida. Como resultado, antígenos e proteínas de superfície são substituídos, dificultando o uso de opções terapêuticas convencionais. *T. gondii* também consegue modular a expressão gênica de seus hospedeiros, o que resulta na alteração da resposta imune e consequente falha na eliminação do parasito (CROKEN et al., 2014; LUDER; RAHMAN, 2017).

Com o aumento progressivo do número de pessoas acometidas pelo câncer (PARKIN, 2001; TORRE et al., 2016), entre outras condições que exigem a indução de um estado de imunossupressão (como o transplante de órgãos) (KOWALSKI et al., 2003; WOLFE; ROYS; MERION, 2010), bem como pessoas afetadas por doenças que naturalmente causam uma imunossupressão (exemplo, AIDS) (MCCUTCHAN, 2006; HEMELAAR et al., 2011), se faz necessário o desenvolvimento de fármacos e/ou imunobiológicos para o controle da toxoplasmose.

1.1. Identificação e classificação taxonômica

T. gondii foi descoberto há mais de 100 anos, simultaneamente por Nicolle e Manceaux, em 1908, na Tunísia e por Splendore, no mesmo ano, no Brasil. Nicolle e Manceaux encontram esse protozoário no tecido do roedor *Ctenodactylus gundi*, que era utilizado na pesquisa da leishmaniose no laboratório de Nicolle, no instituto Pasteur na Tunísia. Inicialmente acreditaram que o parasito era *Leishmania*, mas, posteriormente, perceberam que tinham descoberto um novo organismo e o nomearam *Toxoplasma gondii*, baseado na sua morfologia (*Toxo* = arco e *plasma* = vida) e no seu hospedeiro (a princípio também identificado erroneamente como *Ctenodactylus gundi*) (NICOLLE; MANCEAUX, 1908). Em retrospecto, o nome correto do parasito seria *T. gondii*, caso Nicolle e Manceaux identificassem corretamente o hospedeiro (DUBEY, 2008).

Splendore identificou o mesmo parasito em um coelho, no Instituto Oswaldo Cruz, no Brasil e também erroneamente o nomeou como *Leishmania*, não o corrigindo posteriormente (SPLENDORE, 1908). Apesar da existência de inúmeras cepas, com uma distribuição mundial e

possivelmente a mais ampla gama de hospedeiros de que qualquer outro parasito, existe apenas uma espécie, *Toxoplasma gondii*, no gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 2008).

Quanto a classificação taxonômica, *T. gondii* pertence ao:

- Reino: Protista
- Filo: Apicomplexa
- Classe: Conoidasida
- Subclasse: Coccidiasina
- Ordem: Eucoccidiorida
- Subordem: Eimeriorina
- Família: Sarcocystidae
- Subfamília: Toxoplasmatinae
- Gênero: *Toxoplasma*
- Espécie: *Toxoplasma gondii*

1.2. Morfologia e ultraestrutura básica dos estágios infecciosos

Existem três estágios infecciosos de *T. gondii*. Os taquizoítos são formas de rápida multiplicação, capazes de invadir qualquer célula nucleada e são responsáveis pela manifestação clínica da doença. Durante a invasão, os taquizoítos recrutam parte da membrana plasmática da célula hospedeira e formam uma vesícula intracelular denominado vacúolo parasitóforo (VP) (SUSS-TOBY; ZIMMERBERG; WARD, 1996). Durante a formação do VP a maioria das proteínas associadas a membrana (de origem hospedeira) são eliminadas impedindo a fusão do VP

com vesículas intracelulares, incluindo os lisossomos, responsáveis pela degradação e eliminação de corpos estranhos (MORDUE et al., 1999).

Os bradizoítos são formas de multiplicação lenta, resultantes da conversão de taquizoítos em um estágio de latência, e são encontrados no interior de cistos teciduais. O formato dos cistos varia de acordo com a sua localização, sendo esferoidais nas células cerebrais ou alongadas nas células musculares. O tamanho do cisto varia de 10 μm para cistos novos (contendo apenas dois bradizoítos), até 100 μm para cistos mais velhos (contendo centenas ou milhares de bradizoítos). Os bradizoítos desempenham um papel crucial na infecção, pois os cistos contendo essa forma de latência são dinâmicos e se rompem esporadicamente. Nos indivíduos imunocompetentes, a pressão imunológica induz o re-encistamento sem manifestações clínicas. Porém, em situações de imunossupressão do hospedeiro, os bradizoítos liberados dos cistos se convertem em taquizoítos, reativando a infecção. Essa é a maior causa da manifestação clínica da toxoplasmose (ROBERT-GANGNEUX; BELAZ, 2016; TEGEGNE et al., 2016).

Os esporozoítos são formas encontradas no interior de oocistos esporulados e são responsáveis pela contaminação ambiental. Os oocistos são estruturas ovóides com 12-13 μm , formados nas células epiteliais intestinais de felídeos, e liberados nas fezes na forma não esporulada. No ambiente, sofrem a esporulação (2-5 dias após a liberação), gerando oocistos esporulados, contendo dois esporocistos (cada um medindo de 8 μm x 6 μm), e cada esporocisto contendo quatro esporozoítos (JONES; DUBEY, 2010; JONES; DUBEY, 2012).

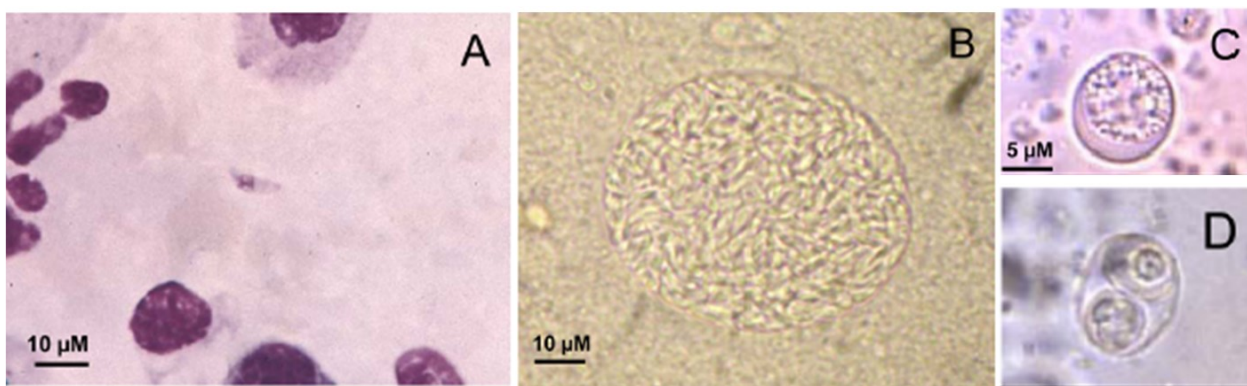


Figura 1. Os três estágios infecciosos de *Toxoplasma gondii*. (A) Taquizoítos em amostras de líquido broncoalveolar coradas com Giemsa. (B) Bradizoítos no interior de um cisto proveniente

do cérebro de um camundongo infectado. (C) Oocisto não esporulado e (D) oocisto esporulado contendo dois esporocistos.

Fonte: Adaptado de Robert-Gangneux e Dardé (2012)

Todos os estágios infecciosos possuem a mesma morfologia básica, com apenas pequenas variações. Apresentam um formato semelhante a um arco, com cerca de 8 μm de comprimento e 2 μm de largura, com uma extremidade apical afilada e uma extremidade posterior arredondada. Eles são revestidos por um complexo trimembranar denominada película. A película é composta por uma membrana externa contínua (plasmalema), que envolve completamente o organismo e um complexo de membrana interna (IMC), composta por duas camadas de membrana incompletas, intimamente associadas ao citoesqueleto. A associação da película com os elementos do citoesqueleto permite que *T. gondii* se locomova (processo conhecido como *gliding*) e infecte células ativamente, mesmo na ausência de cílios, flagelos ou a emissão de pseudópodos.

O complexo de membrana interna é interrompido por aberturas circulares na extremidade apical (anel polar externo), onde o conóide se projeta, no microporo e na extremidade posterior. O conóide em associação com outras estruturas especializadas como, anéis polares, organelas secretoras incluindo roptrias e micronemas, formam o complexo apical. Espalhada no citoplasma se encontra uma terceira classe de organela secretora conhecida como grânulos densos. Além disso, são encontradas diversas organelas típicas de células eucarióticas (núcleo, ribossomos, complexo de Golgi, retículo endoplasmático), organelas de origem endossimbiótica (mitocôndria e apicomplasto) e estruturas específicas (acidocalcissomos) (HU; ROOS; MURRAY, 2002; HALONEN; WEISS, 2013; FRENAL et al., 2017).

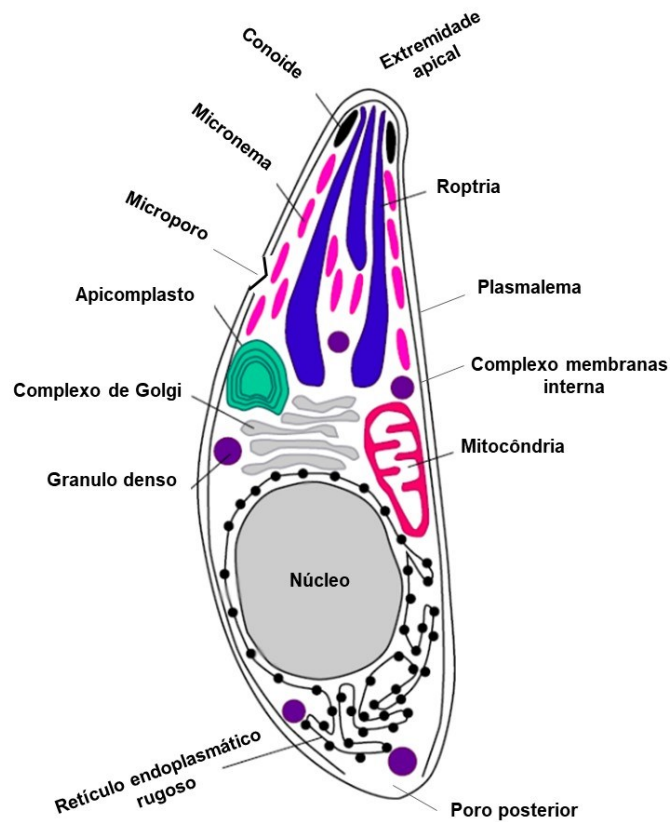


Figura 2. Representação esquemática da ultraestrutura do estágio taquizoíta. Nesse esquema está representado a morfologia básica e as principais organelas presentes no estágio taquizoíta. A estrutura básica é compartilhada entre as formas infectantes, com apenas pequenas variações.

Fonte: Adaptado de Ajioka, et al. 2001.

1.3. Ciclo biológico

T. gondii é um dos mais bem estudado membros do grupo de coccídios entéricos formadores de cistos (CHAPMAN et al., 2013). Esse grupo de organismos possuem um ciclo de vida heteróxico, que alterna entre a reprodução sexuada no epitélio intestinal de seus hospedeiros definitivos e replicação assexuada, que ocorre nos hospedeiros intermediários. Apesar da grande diversidade de hospedeiros intermediários (todos os vertebrados de sangue quente), os felinos são os únicos hospedeiros em que a reprodução sexuada de *T. gondii* acontece (FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970; BEHNKE; DUBEY; SIBLEY, 2016).

A reprodução sexual se inicia com a ingestão de cistos teciduais (contendo bradizoítos) e oocistos (contendo esporozoítos). A ação da pepsina e outros componentes do suco gástrico,

permite a liberação de bradizoítos e esporozoítos que infectam os enterócitos e se diferenciam em cinco tipos morfológicamente distintos de esquizontes, nomeadas de A- E (DUBEY; FRENKEL, 1972). Após 48 horas de infecção dos enterócitos e da progressão através dos cinco estágios surgem os merozoítos, o primeiro estágio sexual. Esse estágio é caracterizado pela limitada replicação (entre 2-4) e sua imediata diferenciação em macrogametas e microgametas. O macrogameta se funde com o microgameta originando oocistos diploides, que desenvolvem paredes espessas impermeáveis (confere resistência a condições adversas do ambiente externo) e são excretados nas fezes. Os gatos são capazes de excretar entre 2-20 milhões de oocistos por dia, entre 3-10 dias após a infecção. Em condições ótimas de oxigenação, temperatura e umidade, ocorre a esporogonia, gerando oocistos esporulados, contendo dois esporocistos, e cada esporocisto contendo quatro esporozoítos. Os oocistos de *T. gondii* são estáveis por mais de um ano sob diversas condições ambientais (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970; YILMAZ; HOPKINS, 1972; HEHL et al., 2015).

A reprodução assexuada ocorre pela ingestão de oocistos esporulados presentes em alimentos e água contaminadas, ou pela ingestão de cistos teciduais, após a ingestão de carne crua ou mal cozida (DUBEY, 1997b; DUBEY et al., 1997; SPEER; DUBEY, 1998). Após a liberação dos esporozoítos e bradizoítos, os mesmos se convertem rapidamente em taquizoítos que infectam células migratórias como macrófagos e células dendríticas, disseminando-se por todo o organismo (DUBEY, 1997a; PITTMAN; KNOLL, 2015). A rápida propagação dos taquizoítos, desencadeia uma forte resposta inflamatória que culmina na destruição tecidual e é responsável pelas manifestações clínicas da doença. A pressão exercida pela resposta imune induz a conversão dos taquizoítos em bradizoítos (estágio de latência e replicação lenta). Os bradizoítos residem em células de vida longa, incluindo os neurônios e células musculares esqueléticas, onde secretam proteínas responsáveis pela impermeabilização da membrana do vacúolo parasitóforo, resultando na formação de cistos teciduais. A capacidade de estabelecer cistos teciduais que persistem durante o tempo de vida do hospedeiro enquanto mantêm a infecciosidade, se consumido, é provavelmente o principal fator no sucesso global deste parasito. O ciclo se completa quando felinos não infectados ingerem hospedeiros intermediários cronicamente infectados (DUBEY, 1997b; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; WATTS et al., 2015).

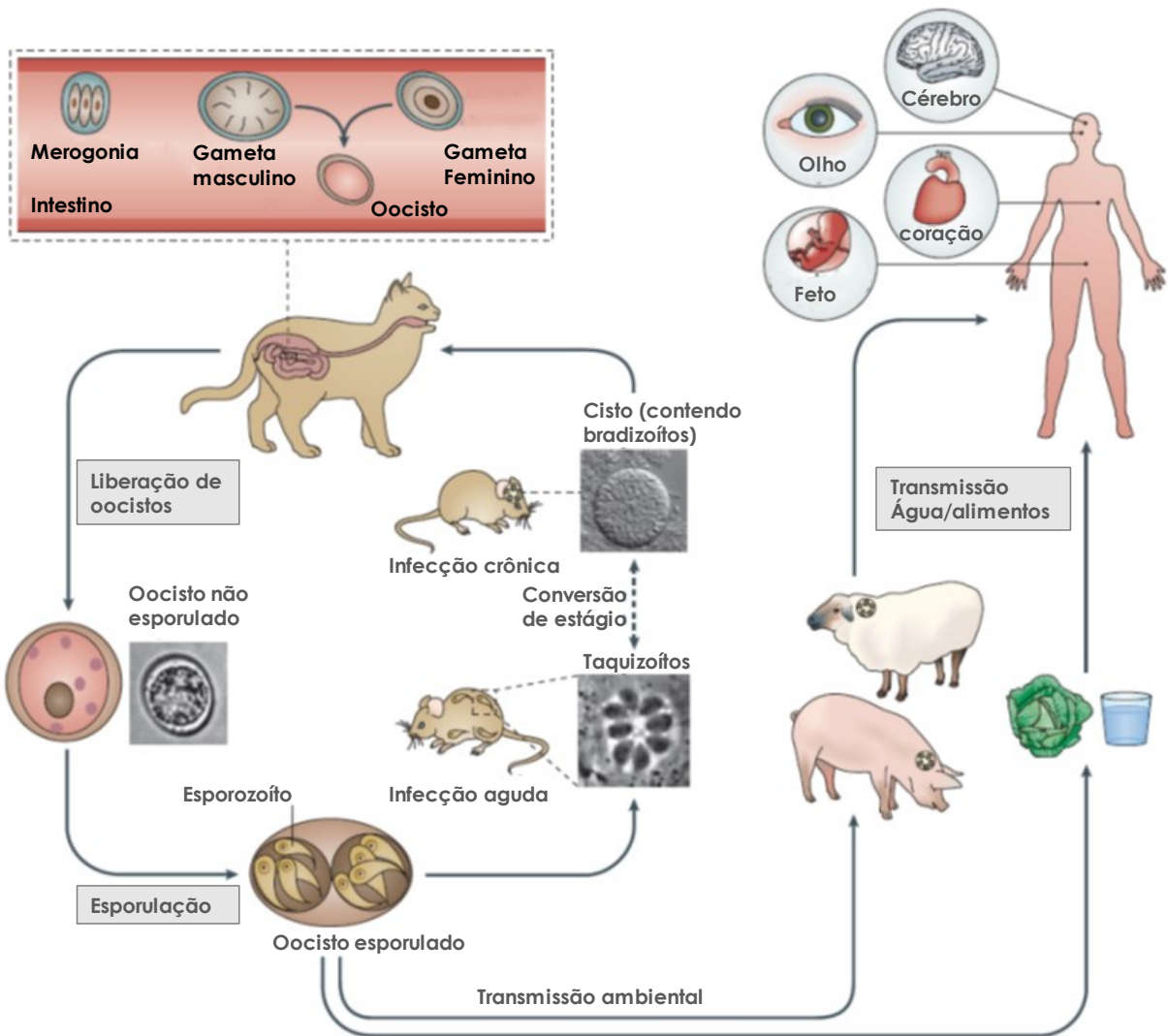


Figura 3. O complexo ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. A imagem representa a diversidade de hospedeiros, vias de contaminação e estágio de vida de *T. gondii*.

Fonte: Adaptado de Hunter e Sibley, 2012.

1.4. Vias de transmissão

O mecanismo de transmissão de *T. gondii* permaneceu um mistério até a completa elucidação do seu ciclo de vida em 1970 (FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970). Logo após a identificação deste protozoário descobriu-se que *C. gundi* não tinha se infectado na natureza, mas que tinha contraído a infecção no laboratório de Nicolle. Mas a via de contaminação do roedor era desconhecida. Inicialmente, surgiram especulações sobre a transmissão por artrópodes, mas isso nunca foi provado (FRENKEL, 1970; FRENKEL, 1973).

Os humanos são hospedeiros acidentais que podem contrair a infecção por diferentes vias. A infecção congênita foi inicialmente descrita em uma criança por Wolf e colaboradores (WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B., 1939; WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. H., 1939) e posteriormente foi descoberto que ocorria em muitas espécies de animais, particularmente ovelhas, cabras e roedores (BEVERLEY, 1959). Nos humanos, via de regra, a transmissão vertical resulta na infecção congênita quando a mãe soronegativa sofre a primeira infecção durante a gestação (SCHWARTZMAN; MAFFIA; ET AL., 1948; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Durante a toxoplasmose aguda, os taquizoítos presentes no sangue, ou colonizando os tecidos placentários, podem atravessar a placenta e infectar o feto (MONTROYA; REMINGTON, 2008; HALONEN; WEISS, 2013). Mulheres soropositivas antes da concepção, geralmente não transmitem a infecção para o feto. Porém, há relatos de transmissão congênita, em que as mães adquiriram a infecção antes da gestação. Apesar da rara ocorrência, a transmissão congênita durante a fase crônica da infecção, pode acontecer em situações de imunossupressão, como em gestantes HIV⁺, sob uso de drogas imunossupressoras, ou quimioterapia (DESMONTS; COUVREUR, 1984; MITCHELL et al., 1990; KODJIKIAN et al., 2004; ANDRADE et al., 2010). A toxoplasmose congênita é considerada uma das mais importantes manifestações da toxoplasmose em seres humanos, pois pode resultar em consequência graves para o feto (PFAFF et al., 2007; ROBERT-GANGNEUX, 2014).

Entretanto, a transmissão congênita ocorre muito raramente para explicar a infecção generalizada em humanos e animais, no mundo inteiro. Em 1954, Weinman e Chandler sugeriram que a transmissão também poderia ocorrer através da ingestão de carne mal cozida (WEINMAN; CHANDLER, 1954). Essa teoria foi reforçada por Jacobs e colaboradores, que demonstraram que

apesar das enzimas proteolíticas do estômago serem capazes de romper a parede do cisto, os bradizoítos liberados sobrevivem por tempo suficiente para infectar o hospedeiro (JACOBS; REMINGTON; MELTON, 1960). Esta hipótese de transmissão através da ingestão de carne infectada foi experimentalmente testada em um sanatório de crianças em Paris. Foi comparada a taxa de aquisição de *T. gondii* em crianças, antes e depois da admissão no sanatório. A taxa anual de aquisição subiu de 10% para 50%, após a introdução de duas porções de carne bovina ou de cavalo mal cozida à dieta diária e a uma taxa de 100%, após a adição de carne de cordeiro mal cozida (DESMONTS et al., 1965). Como a prevalência de *T. gondii* é muito maior em ovelhas do que em cavalos e gado, isso ilustrou a importância do carnivorismo na transmissão de *T. gondii*.

Enquanto a transmissão congênita e o carnivorismo explicam parte do ciclo de transmissão, essas não explicam a infecção em vegetarianos e herbívoros. Um estudo realizado em Bombay, Índia, demonstrou que a prevalência de *T. gondii* é similar entre vegetarianos e não-vegetarianos (RAWAL, 1959). Esse fenômeno pode ser explicado pela contaminação de verduras e água, com oocistos liberados no ambiente. Os felídeos são considerados espécies chave nessa via de transmissão, por serem os únicos hospedeiros onde ocorre o desenvolvimento sexual, com excreção de oocistos nas fezes (JANITSCHKE; WERNER, 1972; JEWELL et al., 1972; MILLER; FRENKEL; DUBEY, 1972). Existe uma série de surtos de toxoplasmose documentadas na Colômbia Britânica (BOWIE et al., 1997) e em diferentes regiões do Brasil (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DE MOURA et al., 2006), que foram causadas pela contaminação da água. Além de surtos de origem hídrica, existe relatos de infecções por oocistos causadas pela exposição a aerossol (TEUTSCH et al., 1979) e contaminação de vegetais (JONES et al., 2006). O conhecimento desta via de transmissão provavelmente explica como *C. gundi* foi infectado no laboratório de Nicolle. Pelo menos um gato infectado estava presente no instituto Pasteur na Tunísia (DUBEY, 1977).

A transmissão ainda pode ocorrer através do transplante de órgãos contendo cistos teciduais, de um doador infectado para um receptor soronegativo. O risco de toxoplasmose em pacientes transplantados depende principalmente do grau de imunossupressão, do tropismo do parasito pelo tecido enxertado e da soroprevalência na população geral. Embora os receptores de transplante com toxoplasmose tenham uma alta taxa de mortalidade, não há recomendações bem definidas nem um consenso para o manejo desta doença nesses pacientes (DARD et al., 2018).

Apesar da existência de diferentes vias de transmissão, *T. gondii* se adaptou de modo a ser transmitido de forma mais eficiente através do carnivorismo (felídeos) e pela rota fecal-oral (outras espécies). Um único oocisto é capaz de causar infecção em porcos, camundongos e humanos (DUBEY et al., 1996), enquanto 100 oocistos podem não infectar um gato (DUBEY, 1996). Após a ingestão de um único bradizoíto, o gato pode liberar milhões de oocistos, enquanto 100 bradizoítos podem não infectar um camundongo via oral (DUBEY, 2001; DUBEY, 2006). Essas informações têm se mostrado úteis na realização de estudos epidemiológicos (DUBEY et al., 2005).

1.5. Diversidade genética e estrutura populacional

Os primeiros estudos sobre a diversidade genética de *T. gondii* surgiram no começo de 1990. Inicialmente esses estudos se basearam na análise de isoenzimas (DARDE; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1988; DARDE; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992) e em poucos marcadores de polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLP) (SIBLEY et al., 1992; HOWE; SIBLEY, 1995). Posteriormente, a genotipagem foi aprimorada com a introdução de novos marcadores de PCR-RFLP (SU; ZHANG; DUBEY, 2006) e por análise de microssatélites (AJZENBERG et al., 2002; AJZENBERG; DUMETRE; DARDE, 2005; AJZENBERG et al., 2010).

Apesar da presença de um ciclo sexual e uma distribuição mundial, a estrutura populacional desse parasito foi inicialmente descrita como sendo altamente clonal. Entretanto, essa foi apenas a conclusão do estudo da diversidade genética em isolados da Europa e dos Estados Unidos, que são semelhantes. As amostras de animais e humanos infectados revelaram três principais linhagens clonais, tipo I, II e III (SIBLEY; AJIOKA, 2008), que apresentam uma baixa variação genética entre si (~1-2% de divergência na sequência de DNA entre as linhagens) (DARDE; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1988; DARDE; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002).

Foram feitas análises da frequência de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), em *loci* gênicos neutros, entre as três cepas clonais, para extrapolar o mais recente ancestral comum entre si. Os resultados indicam que essas linhagens clonais surgiram a cerca de 10.000 anos, após um único cruzamento genético (SU et al., 2003). Esta estimativa é notavelmente curta, considerando o

intervalo de tempo, relativamente longo, que os parasitos do filo apicomplexa evoluem com os seus hospedeiros vertebrados, estimada em 400 milhões de anos (BERNEY; PAWLOWSKI, 2006). Esse padrão sugere que um drástico fenômeno genético denominado “*bottleneck*” é o responsável pela existência das três linhagens clonais na Europa e na América do Norte, que se originaram de poucas recombinações genéticas (BOYLE et al., 2006).

O surgimento do ancestral comum das cepas clonais de *T. gondii* coincide com a domesticação de animais, como gatos e a invasão de camundongos como pragas (DRISCOLL et al., 2007; ROSENTHAL, 2009). Aparentemente, a maior interação entre o hospedeiro definitivo e hospedeiros intermediários, proporcionou condições favoráveis para a transmissão e oportunidades para o desenvolvimento de infecções de caráter zoonótico. Uma variedade de animais e patógenos de humanos apresentaram uma diminuição na diversidade genética com o surgimento da agricultura. Esse padrão pode ser um reflexo da baixa variedade genética dos animais domesticados, que selecionam patógenos específicos e adaptados para tais hospedeiros (ROSENTHAL, 2009). É difícil determinar a razão da existência de apenas três linhagens clonais na Europa e na América do Norte, mas é possível que essas linhagens tenham se beneficiado de alguma vantagem seletiva. Uma característica compartilhada entre as linhagens clonais é a semelhança do cromossomo 1a, que tem sido associado ao aumento na transmissão em gatos domésticos (KHAN et al., 2006a; KHAN et al., 2007; KHAN et al., 2011b; KHAN et al., 2014). Além dessas três linhagens clonais, estudos recentes identificaram uma nova linhagem clonal na América do Norte, chamada tipo IV. Curiosamente, cepas do tipo IV são mais frequentemente encontradas em animais silvestres, e mostram evidências de trocas genéticas recentes com cepas do tipo II (KHAN et al., 2011a).

Em comparação com as cepas da América do Norte e da Europa, as cepas da América do Sul apresentam uma maior diversidade genética, não possuem uma estrutura populacional clonal e aparentam sofrer maiores taxas de recombinação gênica (LEHMANN et al., 2006; PENA et al., 2008). Genotipagens iniciais das cepas da América do Sul, utilizando marcadores RFLP desenvolvidas para cepas do Norte, revelaram que esses eram semelhantes as cepas do tipo I ou a cepas híbridas (FERREIRA ADE et al., 2004; BELFORT-NETO et al., 2007), devido ao fato de compartilharem as mesmas SNPs ancestrais com as linhagens do Norte (KHAN et al., 2007). Análises mais profundas dos padrões SNPs revelaram que as cepas da América do Sul

compreendem linhagens distintas, que não são encontradas no Norte (KHAN et al., 2007). Os padrões de nucleotídeos compartilhados estabelecem uma ancestralidade comum de 1-2 milhões de anos (KHAN et al., 2007).

Análise da estrutura populacional revelaram 6 principais clados, com ~16 haplogrupos (SU et al., 2012). Esses haplogrupos apresentam padrões geográficos distintos, com alguns predominando na América do Norte e Europa, outras sendo exclusivas da América do Sul e Ásia, e pelo menos um mostrando uma distribuição global (SU et al., 2012). Análises de redes e estruturas populacionais das relações entre essas linhagens sugerem um fluxo gênico esporádico entre elas em diferentes épocas de um passado recente (SU et al., 2012). Essa conclusão é suportada por dados resultantes da análise de SNP do genoma inteiro, usando o sequenciamento de transcriptoma (RNA-Seq) (MINOT et al., 2012) e sequenciamento do genoma inteiro de mais de 60 linhagem diferentes (LORENZI et al., 2016).

Embora os estudos tenham enriquecido a nossa visão sobre a estrutura populacional de *T. gondii*, muitas regiões do mundo ainda não foram analisadas adequadamente (por exemplo, África e Ásia). Sugerindo que estudos futuros provavelmente revelarão uma maior diversidade populacional (LORENZI et al., 2016).

1.6. Diferença na patogenicidade das cepas

A severidade da infecção é influenciada por fatores ambientais, genética do hospedeiro, cepa de *T. gondii*, rota e o estágio do parasito utilizado na infecção. A virulência é experimentalmente determinada pela inoculação intraperitoneal de um determinado número de taquizoítos, utilizando camundongos como modelo. O Camundongo é hospedeiro natural e, portanto, é um excelente modelo para o estudo da imunidade contra *T. gondii* (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012; YAROVINSKY, 2014). Apesar de não ser a via natural da infecção, a inoculação intraperitoneal de taquizoítos possui a vantagem de ser quantificável e reprodutível, permitindo a comparação entre as cepas.

As cepas do tipo I são letais em todas as linhagens de camundongos de laboratórios. Um único parasito desta cepa é capaz de causar 100% de letalidade (DL₁₀₀) em camundongos, independentemente da linhagem. As cepas do tipo II e 12 possuem virulência intermediária (DL₅₀

~10³) e as cepas do tipo III são avirulentas (DL₅₀ ~ 10⁵) (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; SU et al., 2002). O advento da genética direta e reversa, vinculada à capacidade de sofrer recombinação genética (cruzamento entre as diferentes cepas no gato), permitem mapear genes que determinam a diferença na virulência durante a fase aguda da infecção (KHAN et al., 2005). Tais fatores atuam na modulação da resposta imune do hospedeiro, resultando nos diferentes fenótipos observados entre as cepas de *T. gondii* (HUNTER; SIBLEY, 2012; BEHNKE; DUBEY; SIBLEY, 2016).

1.7. Interação patógeno hospedeiro

1.7.1. Invasão e ciclo lítico

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório, e a entrada na célula hospedeira é um processo fundamental para a sua sobrevivência. A invasão de células hospedeiras por *T. gondii* é um processo ativo, fundamentalmente diferente da fagocitose ou endocitose induzida por patógenos intracelulares como vírus, bactérias ou outros protozoários (FINLAY; COSSART, 1997; SIBLEY; ANDREWS, 2000). Os mecanismos de invasão parecem ser altamente conservados entre os membros do filo Apicomplexa, o que significa que os resultados obtidos com um organismo podem ser extrapolados para outros membros do filo. No entanto, *T. gondii* possui duas peculiaridades, quando comparado a outros membros do filo. Primeiro, quase não possui especificidade de hospedeiro, sendo capaz de invadir todos os tipos de células, desde mamíferos, peixes e até mesmo células de insetos. Segundo, contrastando com a maioria dos outros membros do filo Apicomplexa, que se multiplicam pela esquizogonia, os taquizoítos de *T. gondii* proliferam por endodiogenia, contornando o estágio de desdiferenciação celular, que ocorre nos esquizontes. O processo de invasão é composto por múltiplas etapas que incluem o egresso de células hospedeiras infectadas, motilidade dependente de substrato, adesão às células hospedeiras, reorientação para formar a junção de movimento (MJ), penetração das células hospedeiras/formação do vacúolo parasitóforo, selagem da membrana do vacúolo parasitóforo e replicação intracelular dentro do vacúolo parasitóforo (MINEO et al., 1993; MINEO; KASPER, 1994; CARRUTHERS; SIBLEY, 1997; SIBLEY, 2010; RUGARABAMU et al., 2015).

A adesão inicial à membrana da célula hospedeira é um pré-requisito para a invasão. O parasito secreta proteínas de micronemas (MICs), que são proteínas transmembranas que

expressam diferentes domínios adesinas. As MICs se agregam formando complexos, que são depositadas na superfície do parasito. Essas proteínas são redistribuídas sobre toda a superfície do parasita e interagem com a matriz extracelular do hospedeiro, para mediar a motilidade, e com receptores de células hospedeiras para fixação e penetração. Especificamente, o complexo MIC2-M2AP está envolvido na mobilidade (*gliding*) (HUYNH et al., 2003; HUYNH; CARRUTHERS, 2006), o complexo MIC6-MIC1-MIC4 na fixação e invasão (CEREDE et al., 2005), o complexo MIC8 está associado à secreção de roptrias (KESSLER et al., 2008) e a associação entre AMA1 e proteínas do pescoço de roptrias (RONs) se unem na superfície do parasito originando o MJ.

O processo de invasão ocorre em menos de 20 segundos. A MJ resultante da forte associação entre a extremidade apical do parasito e a membrana da célula hospedeira, move-se da extremidade apical para a extremidade posterior do parasita, levando a invaginação da membrana plasmática do hospedeiro e internalização do parasita em um vacúolo parasitóforo. Durante esse processo de internalização, *T. gondii* recruta parte da membrana da célula hospedeira para formar a membrana do vacúolo parasitóforo, com exclusão das proteínas de membrana do hospedeiro. O VP fornece um ambiente estável para a multiplicação do parasito, pois não se funde com outras estruturas da célula hospedeira, incluindo os lisossomos, evitando a sua acidificação.

Durante os estágios iniciais de invasão as proteínas do bulbo das roptrias (ROPs) são injetados na célula hospedeira acopladas a pequenas vesículas (*evacuoles*), que se fundem com o VP nascente, decorando a face citosólica da MVP e impedindo a sua destruição por proteínas efetoras do hospedeiro. Algumas ROPs são secretadas para o citoplasma e para o núcleo da célula hospedeira, onde exercem várias funções, incluindo o recrutamento de organelas, como retículo endoplasmático e mitocôndrias, e alterações na expressão gênica da célula hospedeira (EL HAJJ et al., 2007; LALIBERTE; CARRUTHERS, 2008; TARDIEUX; BAUM, 2016). A onda final de secreção ocorre com a liberação de proteínas de grânulos densos (GRAs) após a invasão, muitas das quais ocupam o lúmen do vacúolo e decoram um arranjo elaborado de túbulos membranosos chamado de rede intravacuolar (IVN), enquanto outras se inserem na MVP. As GRAs atuam na remodelação e maturação da MVP, bem como na formação da IVN, que confere a característica morfologia de rosetas do VP e facilitam a aquisição de nutrientes e outros metabólitos.

Para sobreviver no interior da célula hospedeira, *T. gondii* deve adquirir nutrientes de seu hospedeiro. *T. gondii* é auxotrófico para o triptofano (PFEFFERKORN, 1984; PFEFFERKORN; ECKEL; REBHUN, 1986; DAI et al., 1994), arginina (FOX; GIGLEY; BZIK, 2004; GAIL; GROSS; BOHNE, 2004), poliaminas (SEABRA et al., 2004), purinas (SCHWARTZMAN; PFEFFERKORN, 1982; CHAUDHARY et al., 2004), colesterol (COPPENS; SINAI; JOINER, 2000; COPPENS; JOINER, 2003), ferro (DIMIER; BOUT, 1998; GAIL; GROSS; BOHNE, 2004) e outros nutrientes essenciais (CHARRON; SIBLEY, 2002). Apesar da importância da MVP em proteger o parasito da eliminação pelas células hospedeiras, o seu estado de não fusão, forma uma barreira que priva o parasito de uma vasta fonte de nutrientes do sistema endocítico e exocítico do hospedeiro.

Para contornar esse problema, o parasito utiliza as proteínas inseridas na MVP para alterar a sua permeabilidade, permitindo assim a difusão passiva, bidirecional, de pequenas moléculas. Essa permeabilidade é seletiva, permitindo o acesso apenas de pequenos metabólitos solúveis (<1300-1900Da), como glicose, aminoácidos, nucleotídeos e íons (SCHWAB; BECKERS; JOINER, 1994). Da mesma forma, os resíduos catabólicos gerados pelo parasita são descartados no citosol hospedeiro. Além da participação nos processos de aquisição e exclusão de metabólitos, as proteínas da MVP estão envolvidas, no recrutamento e interação com organelas hospedeiras, incluindo mitocôndrias e ER, reestruturação dos filamentos intermediários e microtúbulos ao redor do PV e modulação de certos processos da célula hospedeira (SCHWAB; BECKERS; JOINER, 1994; MARTIN et al., 2007; LALIBERTE; CARRUTHERS, 2008).

No interior do vacúolo parasitóforo, os taquizoítos se replicam a cada 6-9 horas, por endodiogenia, em que duas células filhas são formadas dentro da célula-mãe, após cada ciclo de replicação do DNA. Após alguns ciclos de multiplicação, ocorre o egresso, por um processo ativo, dependente de cálcio intracelular. O parasito secreta moléculas que facilitam o rompimento da MVP e da membrana celular, liberando os taquizoítos no ambiente extracelular. Os taquizoítos livres podem reiniciar o ciclo lítico, infectando novas células (LOURIDO et al., 2010; BLADER et al., 2015).

1.7.2. Resposta imune contra *T. gondii*

O uso de animais como modelos experimentais têm desempenhado um papel importante na elucidação de vias inatas de reconhecimento de patógenos humanos. No caso do protozoário *T. gondii*, o camundongo é o principal modelo utilizado no estudo de infecções, com base no fato de que os roedores são hospedeiros naturais (SHER; TOSH; JANKOVIC, 2017). Na fase inicial da infecção, o parasito se dissemina rapidamente do sítio do inóculo para diferentes tecidos do corpo (DUBEY et al., 1997; DUBEY, 1998). O reconhecimento de patógenos invasores é fundamental para a eficiência da resposta imune. A imunidade inata é um sistema evolutivamente conservada que fornece a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores. Esse sistema atua na manutenção da homeostase, regulando processos endógenos como inflamação e morte celular. Tais processos são estimulados por uma variedade de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), geralmente vitais para os patógenos e ausentes nas células hospedeiras. Além disso, os PRRs reconhecem padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que são liberadas mediante condições de estresse, destruições teciduais e morte celular (YAROVINSKY, 2014; SASAI; PRADIPTA; YAMAMOTO, 2018).

Diferentes classes de PRRs medeiam a interação entre células da imunidade inata, moléculas parasitárias e sinais relacionados a danos teciduais. A principal via de sinalização consiste no reconhecendo da profilina de *T. gondii* pelos receptores semelhantes a *toll* (TLR) 11 e TLR12, resultando na produção de IL-12, pelas subclasses de células dendríticas (CD) CD8 α ⁺ (REIS E SOUSA et al., 1997; MASHAYEKHI et al., 2011) e CD plasmocitóides (BIERLY et al., 2008; PEPPER et al., 2008), macrófagos (ROBBEN et al., 2004) e neutrófilos (BLISS; BUTCHER; DENKERS, 2000). A importância dos TLRs é demonstrada pela susceptibilidade de camundongos que não possuem MyD88, principal proteína adaptadora envolvida na via de sinalização das TLR, durante a infecção por *T. gondii* (SCANGA et al., 2002) e *N. caninum* (MINEO et al., 2009).

A citocina IL-12 estimula a produção de IFN- γ , inicialmente por células NK (GAZZINELLI et al., 1993; HUNTER et al., 1994) e posteriormente por linfócitos TCD4 (GAZZINELLI et al., 1994) e TCD8 (WILSON; MATTHEWS; YAP, 2008). A via que resulta na produção de IL-12/IFN- γ é crucial para o controle da infecção, como é demonstrado pelo aumento

da susceptibilidade de camundongos deficientes para IL-12 e IFN- γ (SCHARTON-KERSTEN et al., 1996; YAP; SHER, 1999; YAP; PESIN; SHER, 2000). A via de sinalização de IFN- γ é dependente da fosforilação e translocação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1) para o núcleo e consequente indução de genes estimulados por interferon (ISGs) que eliminam o parasito por diferentes mecanismos (DARNELL; KERR; STARK, 1994).

Coletivamente, IFN- γ altera o metabolismo celular, induzindo a expressão de indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), que degrada o triptofano (aminoácido essencial para o crescimento parasitário) (PFEFFERKORN, 1984). IFN- γ aumenta a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que gera a produção de óxido nítrico (metabólito altamente tóxico para o parasito) degradando arginina (outro aminoácido crucial para a sobrevivência do parasito) (MURRAY et al., 1985; ADAMS et al., 1990). Recentemente, um dos tópicos de maior relevância na defesa do hospedeiro contra a infecção por *T. gondii* tem sido a análise de mecanismos efetores induzidos por IFN- γ . Em camundongos, a família de proteínas ligantes de guanilato (GBPs) e GTPases relacionadas à imunidade (IRGs) estão entre os genes mais fortemente regulados (MACMICKING, 2012; SASAI; PRADIPTA; YAMAMOTO, 2018).

As IRGs são um grupo de proteínas de 47-48 kDa, composta por Irgm3 (TAYLOR et al., 1996), Irgm1 (SORACE et al., 1995), Irgd (GILLY; WALL, 1992), Irgb6 (CARLOW et al., 1995; LAFUSE et al., 1995), Irga6 e Irgm2 (BOEHM et al., 1998). Todas as IRGs possuem um domínio de ligação a GTP e como outras GTPases, as IRGs alternam entre estados inativos (ligados a GDP) e ativos (ligados a GTP) (PAPIC et al., 2008). Normalmente, as IRGs são sequestradas pela proteína IrgM, que atuam como estabilizadores, impedindo a dissociação do GDP e, assim, impedindo a sua ativação (HUNN et al., 2008). Após o reconhecimento de um vacúolo contendo patógeno, as IRGs se oligomerizam e são recrutados para a membrana vacuolar causando a sua destruição. A perda da membrana do vacúolo resulta na morte rápida dos taquizoítos liberados (MARTENS et al., 2005; ZHAO, Y. O. et al., 2009). O segundo grupo de efetores da imunidade que também são regulados em resposta a IFN- γ é a grande família de GTPases conhecida como GBPs. Em camundongos a família das GBPs é composta por 11 membros. Deleções da GBP1 (SELLECK et al., 2013), GBP2 (DEGRANDI et al., 2013), ou de um *locus* no cromossomo 3 que contém um conjunto de seis GBPs (YAMAMOTO et al., 2012), compromete o controle de *T. gondii* em células tratadas com IFN- γ e aumenta a suscetibilidade de camundongos a infecção por

um defeito na destruição da MVP. A diferença na virulência das diferentes cepas de *T. gondii*, em camundongo, é causada pela susceptibilidade das cepas a destruição por IRGs e GBPs.

1.7.3. Moléculas efectoras de *T. gondii* que modulam a expressão gênica do hospedeiro e mecanismos de evasão

- Complexo ROP5/17/18

O cruzamento entre as cepas GT-1 (Tipo I- alta virulência) e CTG (Tipo III- avirulenta) resultou no mapeamento gênico de um único *locus* de características quantitativas (QTL) no cromossomo VIIa, codificando uma proteína serina/treonina (S/T) quinase chamada ROP18 (TAYLOR et al., 2006). Essa proteína é membro de uma grande família de proteínas S/T quinase localizadas na organela secretória roptria (PEIXOTO et al., 2010). ROP18 é uma proteína polimórfica e o seu nível de expressão varia entre as cepas, sendo alta nas cepas do tipo-I/II e baixa em cepas do tipo-III. A expressão de ROP18 do tipo-I/II em cepas do tipo-III (consideradas avirulentas) aumenta drasticamente a sua virulência. Esse fato confirma que essa proteína é uma das principais responsável na diferença de virulência entre as cepas do tipo-I (alta virulência) e cepas do tipo-III (avirulentas) (TAYLOR et al., 2006) e entre as cepas do tipo II (virulência intermediárias) e cepas do tipo III (SAEIJ et al., 2006). Comparação no perfil de expressão de ROP18, revela que as cepas do tipo-III expressão ~100 vezes menos essa proteína. O baixo nível de expressão de ROP18 nas cepas do tipo-III é atribuída a presença de região de ~2kb localizada antes da sequência codificadora da ROP18, essa região não está presente nas cepas do tipo-I e II (SAEIJ et al., 2006; TAYLOR et al., 2006; KHAN et al., 2009). ROP18 possui vários alvos na célula hospedeira, incluindo as proteínas IRGs e GBPs.

Essas proteínas induzidas por IFN- γ são importantes fatores de resistência do hospedeiro contra patógenos que residem em vacúolos, como *Toxoplasma*, *Chlamydia* e *Mycobacterium* (FENTRESS; SIBLEY, 2011; KIM et al., 2012). O recrutamento de IRGs para a MVP de cepas de *T. gondii* susceptíveis, resulta na destruição da MVP e consequente eliminação do parasito (ZHAO, Y. et al., 2009; ZHAO, Y. O. et al., 2009; KHAMINETS et al., 2010). A ROP18 de cepas do tipo-I é capaz de fosforilar resíduos de treonina específicos no domínio GTPase das IRGs, através da interação entre a hidroxila da treonina e o grupo fosfato da GTP (GHOSH et al., 2004). A mutação

desta treonina por alanina impede a hidrólise da GTP e bloqueia a oligomerização e ligação das IRGs na MVP (FENTRESS et al., 2010; STEINFELDT et al., 2010; STEINFELDT et al., 2015).

Portanto, alta expressão de ROP18, impede o recrutamento e o acoplamento das IRGs na MVP, o que garante a sobrevivência do parasito. Enquanto, baixa expressão de ROP18, permite o recrutamento de IRGs e eliminação do parasito. Assim, ROP18 determina a resistência dos parasitos do tipo-I e a susceptibilidade de cepas do tipo-III, na dependência de IRGs. Apesar de ROP18 do tipo-I e II aumentarem a virulência quando expressas na cepa do tipo-III, as cepas do tipo-II são susceptíveis ao recrutamento de IRGs (ZHAO, Y. et al., 2009; ZHAO, Y. O. et al., 2009; KHAMINETS et al., 2010), indicando que fatores adicionais, compartilhado entre as cepas do tipo-I e III são importantes para a virulência na fase aguda.

Mapeamento gênico da cepa resultante do cruzamento das cepas GT-1 (tipo I) e ME49 (tipo II) identificou um novo QTL no cromossomo XII e mapeamentos subsequentes revelaram um conjunto de genes repetidos que codificam uma pseudo quinase polimórfica, denominada ROP5 (BEHNKE et al., 2012). As cepas do tipo-I e III compartilham uma sequência similar de alelos ROP5 importantes para a virulência, enquanto, as cepas do tipo-II possuem um repertório distinto de ROP5, que está associada a baixa virulência (BEHNKE et al., 2011; REESE; BOOTHROYD, 2011). A ROP5 atua no aumento da atividade quinase da ROP18 (BEHNKE et al., 2012) e na ligação do substrato Irga6 (REESE; SHAH; BOOTHROYD, 2014), mantendo-a numa conformação que evita a sua ancoragem e que facilita a sua fosforilação. A combinação dos alelos dos locus ROP5/ROP18 explica a alta virulência das cepas do tipo-I (ambas sequências, ROP5 e ROP18, são de alta virulência), a virulência intermediária nas cepas do tipo-II (ROP18 virulenta e ROP5 avirulenta) e a baixa virulência nas cepas do tipo-III (baixa expressão de ROP18 e ROP5 de alta virulência, mas que sozinho não é suficiente para aumentar a virulência).

No entanto, a diferença no fenótipo entre cepas do tipo I *knockout* para ROP18 (Δ ROP18), que é apenas ligeiramente atenuada e Δ ROP5, que é completamente avirulenta, mesmo em altas doses (BEHNKE et al., 2011; REESE; BOOTHROYD, 2011) sugere que ROP5 possui outras funções. Abordagem bioquímica para identificar ligantes da ROP5, por purificação de afinidade em tandem (TAP), adição de *tag* e espectrometria de massa (SM), confirmou a formação de complexo com a ROP18, uma quinase ativa denominada ROP17 (ETHERIDGE et al., 2014).

Semelhante à ROP18, ROP17 atua na fosforilação de IRGs (BEHNKE et al., 2012; ETHERIDGE et al., 2014), com uma sutil diferença no substrato fosforilado entre essas duas quinases. ROP17 possui afinidade pela treonina 102 localizada na região de troca I (SWI), enquanto ROP18 possui afinidade pela treonina 108. Essa preferência da ROP17 pela treonina 102 e da ROP18 pela treonina 108 é altamente conservada em vários membros da família IRG (ETHERIDGE et al., 2014).

O complexo ROP5/17/18 ainda recruta a proteína de granulo denso 7 (GRA7), que também atua na inibição das IRGs (ALAGANAN et al., 2014). GRA7 é uma proteína transmembrana que se localiza na MVP, onde interage com diferentes proteínas (ALAGANAN et al., 2014). GRA7 pode se ligar diretamente às IRGs, acelerando a hidrólise de GTP, *in vitro* (ALAGANAN et al., 2014). ROP18 e ROP5 também atuam na resistência às GBPs em camundongos (SELLECK et al., 2013). ROP18 ainda tem como alvo o fator de transcrição ATF6 β , que atua na resposta às proteínas mal enoveladas, o que resulta na diminuição da apresentação de antígenos por células dendríticas (CDs) às células T CD8⁺ em camundongos (YAMAMOTO et al., 2011).

Vale ressaltar, que a ROP18 desempenha um papel de maior importância na virulência, em isolados naturais do tipo-I do que na cepa de laboratório RH. Infecção de camundongos CD1 com RH Δ ROP18 demonstra que a deleção deste gene causa apenas uma sutil atenuação na virulência do parasito, retardando o óbito entre 2-3 dias, quando desafiados com 300 taquizoítos. Em contraste, 70% dos animais sobrevivem ao desafio com a cepa GT1 Δ ROP18, após a injeção de 3000 taquizoítos (SHEN et al., 2014). Apesar da importância do complexo ROP5-ROP18-ROP17 em bloquear a imunidade inata em macrófagos de camundongos ativado pelo IFN- γ essas proteínas efetoras parecem desempenhar pouca importância nas células humanas. Coletivamente, essas proteínas atuam em diferentes etapas para bloquear a polimerização de IRGs e GBPs na membrana protegendo assim as cepas virulentas de *T. gondii* da depuração em células murinas ativadas por IFN- γ .

- ROP16, GRA15, GRA16 e GRA24

Cruzamento genético entre cepas do tipo-II e III levou a identificação da principal proteína responsável pela diferença na ativação de fatores de transcrição do hospedeiro, observada entre essas duas cepas (SAEIJ et al., 2007). A ROP16 é uma proteína secretada durante o processo de

invasão e migra para o núcleo das células hospedeiras, 10 minutos após a iniciação deste processo. Após a invasão nuclear, **ROP16** causa a fosforilação e ativação do STAT3 e STAT6. A fosforilação destes fatores de transcrição estimula a produção de IL-4, que antagoniza a produção de IL-12 (citocina chave para a eliminação do parasito) (SAEIJ et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2009; BUTCHER et al., 2011; YAMAMOTO et al., 2011; JENSEN et al., 2013).

Ao contrário das cepas do tipo-I que desencadeiam uma supressão da resposta imune, as cepas do tipo-II expressam uma versão da proteína **GRA15** capaz de estimular a produção de IL-12. Esta produção é dependente da ativação e translocação nuclear dos heterodímeros p50 (NF- κ B1) e p65 (RelA) do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Os componentes do complexo NF- κ B são mantidos, inativos, no citoplasma celular pela família de proteínas inibidoras de κ B (I κ B). A ativação de NF- κ B é iniciada pela degradação de I κ B através da ativação das quinases I κ B (IKKs), que causa a fosforilação de dois resíduos de serina, localizados no domínio regulador da I κ B. Esta fosforilação é responsável pela ubiquitinação de I κ B e sua subsequente degradação proteossomal, libertando o complexo NF- κ B que entra no núcleo e induz a expressão de genes que possuem sítios de ligação para NF- κ B nos seus promotores (ROSOWSKI et al., 2011).

GRA16 é uma proteína secretada capaz de atravessar a MVP e migrar, juntamente com o complexo de alto peso molecular que liga a fosfatase hospedeira (PP2A-B55) e a protease específica de ubiquitina associada ao vírus do herpes (HAUSP), para núcleo da célula hospedeira. GRA16 modula positivamente a expressão de genes do hospedeiro envolvidos no metabolismo, progressão do ciclo celular e a via supressora de tumor p53 (BOUGDOUR et al., 2013). Assim como GRA16, **GRA24** é uma proteína secretada capaz de atravessar a MVP e migrar para o núcleo da célula hospedeira onde regula a expressão gênica. GRA24 funciona como um agonista do parasito que causa a fosforilação da via proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e auto fosforilação prolongada de p38 α , formando um complexo capaz de ativar os fatores de transcrição EGR1 e c-Fos. Semelhante à GRA15, GRA24 é capaz de desencadear uma forte resposta inflamatório, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo CCL2, MCP-1 e IL-12, que aumentam a atividade inflamatória no sítio da infecção e estimula os mecanismos que induzem a formação de cisto (BRAUN et al., 2013).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar o papel de proteínas de grânulos densos no transporte de moléculas através da membrana do vacúolo parasitóforo e na ativação do inflamassomo.

2.2. Objetivos Específicos:

- Caracterização estrutural e funcional dos domínios α -hélices da proteína GRA17 de *Toxoplasma gondii*, um dos componentes do poro formado na membrana do vacúolo parasitóforo para a passagem de pequenas moléculas;

- Identificar genes de *T. gondii* envolvidos na ativação de NLRP1 e indução de piroptose em BMDMs de rato Lewis.

Capítulo I

Caracterização molecular e funcional da estrutura secundária da proteína GRA17 de *Toxoplasma gondii*

1. Introdução

Ao contrário de muitos patógenos que são fagocitados, os parasitos do filo apicomplexa como *Toxoplasma gondii*, invadem ativamente as células hospedeiras, o que resulta no estabelecimento do parasito invasor no interior do VP. O VP de *T. gondii*, é um compartimento altamente dinâmico e permissivo à replicação dos taquizoítos (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1997; CARRUTHERS, 2002). A membrana que delimita esse compartimento (MVP), é cada vez mais reconhecida como uma "organela" especializada única, uma vez que reside fora do próprio limite do organismo (MARTIN et al., 2007). Nos últimos anos, a complexidade e diversidade de atividades associadas à MVP estão se tornando evidentes, o que tem estimulado o interesse na biologia da mesma. No entanto, existem várias limitações para o seu estudo sistemático. A primeira delas é que a membrana é formada apenas em células infectadas, limitando assim a quantidade de material necessária para a análise bioquímica detalhada. Outra grande limitação, consiste no isolamento dessa membrana. Ao contrário de outras organelas celulares, que muitas vezes podem ser purificados por abordagens convencionais, a MVP não pode ser purificado isoladamente das organelas da célula hospedeira (SINAI; JOINER, 1997).

Viver como um organismo intracelular obrigatório é tomado como evidência de que o microrganismo deve adquirir, da célula hospedeira, os nutrientes que não podem ser obtidos a uma taxa satisfatória do meio externo. Existe um número limitado de estratégias pelas quais os patógenos intracelulares podem desviar nutrientes de seus hospedeiros. Tais mecanismos dependem, em parte, do compartimento intracelular ocupado pelo microrganismo. Para patógenos que vivem livremente no citosol hospedeiro, a aquisição pode ocorrer por difusão/transporte ou endocitose de moléculas presentes no citoplasma. Para patógenos que residem em compartimentos endocíticos intracelulares, a fusão de organelas endocíticas do hospedeiro com o vacúolo do patógeno, fornece nutrientes para o espaço vacuolar, de onde eles podem ser absorvidos pelos mecanismos descritos acima (COPPENS et al., 2006; ZUZARTE-LUIS; MOTA, 2018).

No entanto, a forma de aquisição desses nutrientes é um enigma no caso de *T. gondii*. Isso porque, esse protozoário reside no interior de um vacúolo, que não interage com outras organelas intracelulares. Sabendo que para sobreviver, *T. gondii* precisa adquirir nutrientes de seu hospedeiro, a existência de um mecanismo alternativo para isso é inquestionável. As primeiras evidências desse

mecanismo enigmático de transporte surgiram de estudos que demonstram que a MVP de *T. gondii* é seletivamente permeável, permitindo a difusão passiva, de moléculas pequenas, provavelmente através da formação de poros na membrana do VP. No entanto, a base molecular desse poro hipotético não foi relatada, e seus substratos permanecem desconhecidos.

Embora a difusão passiva possa fornecer alguns nutrientes, outros são encontradas em baixas concentrações no citosol, ligadas a proteínas grandes, ou são insolúveis, limitando assim a aquisição por difusão (SCHWAB; BECKERS; JOINER, 1994; DESAI; ROSENBERG, 1997; WERNER-MEIER; ENTZEROTH, 1997). Por essa razão, o transporte ativo é necessário tanto na membrana plasmática do parasita quanto na membrana do VP. Após a exclusão das proteínas hospedeiras da MVP durante o processo de invasão, *T. gondii* secreta proteínas que são inseridas na MVP e desempenham um papel importante na patogênese do parasito, modulando vias de sinalização do hospedeiro e criando um ambiente hospitaleiro no interior do PV. Muitas dessas proteínas associadas a MVP, estão envolvidas no transporte através da membrana e na obtenção de nutrientes (KEMP; YAMAMOTO; SOLDATI-FAVRE, 2013; HAKIMI; OLIAS; SIBLEY, 2017). Porém, o estudo do transporte de moléculas através da MVP em *T. gondii*, é uma área relativamente nova e pouco explorada. A compreensão molecular atual da exportação além do PV é proveniente de estudos com *Plasmodium*.

O *Plasmodium* infecta os eritrócitos que, em termos de componentes intracelulares, são praticamente um deserto. Para sobreviver nessas células, *Plasmodium* exporta até 10% dos produtos gênicos, que medeiam remodelações complexas na célula hospedeira, caracterizadas por mudanças na permeabilidade, rigidez e aderência. As proteínas exportadas trafegam pela via secretora e são exportadas para o lúmen vacuolar antes de atravessar a membrana do VP (SPILLMAN; BECK; GOLDBERG, 2015). A maioria dessas proteínas possuem um peptídeo sinal que endereça a proteína para o retículo endoplasmático, seguida por uma sequência conservada (RxLxE/Q/D), tipicamente localizada a aproximadamente 35 resíduos do PS, denominada "*Plasmodium export element* (PEXEL)". Esse motivo PEXEL é reconhecido por uma aspartil protease denominada plasmepsina V (PM5), que o cliva após a leucina (RXL↓XE/Q/D), antes da acetilação N-terminal. Após essa modificação pós-tradicional, essas proteínas apresentam todos os atributos necessários para serem alvos do translocon do parasito, localizado na membrana plasmática, conhecida como "*Plasmodium translocon of exported proteins* (PTEX)." Porém,

muitas proteínas exportadas através da MVP não possuem o motivo PEXEL (proteínas exportadas PEXEL-negativas, PNEPs), mas são capazes de utilizar o complexo PTEX para atravessar a MVP. Geralmente as proteínas PNEPs possuem um domínio transmembrana, que permite que os mesmos se acoplem a membrana do parasito e sejam exportadas para o lúmen do VP (SPILLMAN; BECK; GOLDBERG, 2015; DE KONING-WARD et al., 2016).

Entretanto, antes de serem transportadas do VP para o citoplasma da célula hospedeira, as proteínas exportadas precisam ser desenoveladas no PV e enoveladas no citosol hospedeiro, na dependência de ATP. Considerando as exigências, PTEX foi descrito como um complexo multiproteico, formado por três componentes essenciais: proteína de choque térmico 101-HSP101 (uma ATPase da superfamília AAA+, que atua como fonte de energia); PTEX150 (função estrutural) e uma única proteína de membrana chamada proteína exportada 2 -EXP2 (forma um canal proteico condutor, também conhecido como poro). Dois outros componentes auxiliares, aparentemente não essenciais também foram identificados: tiorredoxina 2-TRX2 (reduz as ligações dissulfureto) e PTEX88 (função desconhecida). Como PTEX pode acomodar diferentes cargas proteica sob diferentes condições ambientais, esse complexo pode recrutar proteínas adaptadoras adicionais para ajudar na translocação (DE KONING-WARD et al., 2009; DE KONING-WARD et al., 2016; ELSWORTH et al., 2016).

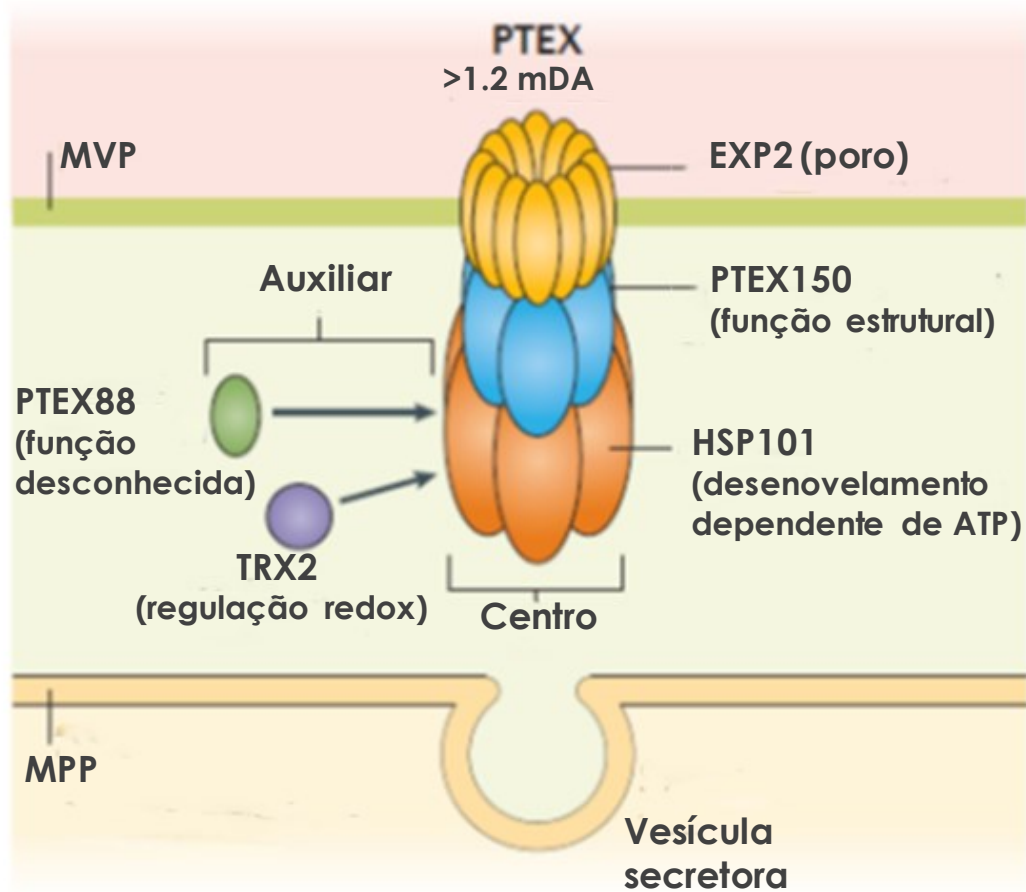


Figura 1. Modelo do complexo de translocação (PTEX). Para entrar na célula hospedeira, as proteínas secretadas devem cruzar a MVP através do PTEX. Na figura se encontram os principais componentes do PTEX e suas respectivas funções. MPP- membrana plasmática do parasito.

Fonte: Adaptado a partir de DE KONING-WARD et al., 2016.

Acredita-se que EXP2 seja o componente do PTEX que estabelece o contato entre o complexo proteico e a MVP, para a formação de poros na membrana. Embora EXP2 não tenha segmentos transmembranares canônicos, ele é fortemente associado ao PVM (DE KONING-WARD et al., 2009; ELSWORTH et al., 2016), muito provavelmente por adotar uma conformação semelhante à hemolisina E (HlyE), uma toxina de *Escherichia coli* que forma poros dodecaméricos na membrana da célula hospedeira (DE KONING-WARD et al., 2009). Curiosamente, apenas os parasitos do filo apicomplexa, que residem no interior do VP, possuem um gene ortólogo à EXP2 (GOLD et al., 2015; DE KONING-WARD et al., 2016). A análise filogenética revelou que o *T.*

gondii codifica duas proteínas análogas à EXP2, denominadas GRA17 e GRA23, que também são secretadas pelos grânulos densos e se localizam na PVM (GOLD et al., 2015). A inserção dessas proteínas em oócitos de *Xenopus laevis* resulta na formação de grandes poros na membrana com aumento na condutância da mesma. A deleção de GRA17 e GRA23 não altera a exportação das proteínas GRA16 e GRA24 para o núcleo da célula hospedeira. Em vez disso, resulta em alterações na permeabilidade da MVP a moléculas pequenas, alterações na morfologia do VP (que adquire a aparência de uma bolha), diminuição na proliferação, *in vitro*, e a virulência em camundongos (GOLD et al., 2015). Curiosamente, a complementação da cepa Δ GRA17 com EXP2 de *Plasmodium*, resgata todos os fenótipos observados após a deleção de GRA17. Os achados sugerem a possibilidade intrigante de que a EXP2 possa ter uma dupla função, no transporte de proteínas e de moléculas pequenas (GOLD et al., 2015; DE KONING-WARD et al., 2016).

Apesar da alta predição de motivos α -hélices em sua estrutura, esses não foram funcionalmente caracterizados. No trabalho, fizemos a predição de oito domínios α -hélices que compõem a GRA17 e utilizamos a ferramenta CRISPR/CAS9 para o truncamento e caracterização funcional desses domínios. Demonstramos que com exceção do motivo α -8, todos os demais são indispensáveis para ação e localização adequada da proteína, estabilidade do VP, proliferação e viabilidade dos taquizoítos. O truncamento desses motivos resulta em falhas na localização de GRA17 na MVP e surgimento de vacúolos parasitóforo aberrantes (vacúolos bolhas). Além disso, a deleção das sequências α -hélices resulta em uma drástica diminuição na proliferação e sobrevivência do parasito.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterização estrutural e funcional dos domínios α -hélices da GRA17.

2.2. Objetivos específicos

- Predição e análise, *in silico*, da estrutura secundária da GRA17.
- Truncamento dos domínios α -hélices C-terminal da GRA17 por CRISPR/CAS9.
- Truncamento dos domínios α -hélices N-terminal da GRA17 por CRISPR/CAS9.
- Determinar os efeitos do truncamento C e N-terminal na localização da proteína.
- Avaliar a morfologia do vacúolo parasitóforo dos clones expressando a proteína truncada.
- Avaliar a taxa de proliferação e a viabilidade dos clones expressando diferentes combinações da proteína GRA17 truncada.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultura de células e parasitos

Human Foreskin Fibroblasts (HFF) foram mantidas em meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (HyClone), 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de penicilina e estreptomicina e 20 µg/ml de gentamicina (Gibco). As células foram cultivadas em garrafas de cultura (25 cm²) até a confluência. Todas as cepas de *T. gondii* utilizado neste trabalho são derivadas da linhagem RH (tipo I). Taquizoítos da cepa parental RHΔ*KU80*Δ*HXGPRT* e todas as cepas modificadas geneticamente foram mantidas pela passagem sucessiva em monocamadas de HFF. De forma sucinta, as células foram infectadas com os taquizoítos e mantidas por passagem seriada em meio DMEM contendo 2% de SFB, a 37°C e 5% de CO₂, a cada 48-72 horas. Para a realização da transfecção e dos experimentos, foram escolhidas as garrafas infectadas contendo cerca de 80% dos parasitos no interior de vacúolos e 20% extracelulares. A monocamada remanescente foi removida com o auxílio de *cell scraper*, purificada pela passagem forçada através de agulhas (27G e 30G) e centrifugada a 1700 rpm x 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em tampão fosfato-salino (PBS). Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% (Sigma, EUA).

3.2. Identificação e anelamento dos oligos utilizados como gRNA

Utilizamos o servidor online E-CRISP para identificar sequências *guide* RNA (gRNA) que têm por alvo o nosso gene de interesse (GOI). Cada sequência de oligo, *forward* (F) e *reverse* (R) utilizado como gRNA, para o truncamento dos domínios C-terminal e N-terminal da GRA17 (Tabela. 1) foi ressuspensa, na concentração final [50 µM]. Em um tubo *ependorf* 1,5 ml, foi misturado:

- 5 µl de cada oligo F (IDT, EUA)
- 5 µl de cada oligo R (IDT, EUA)
- 5 µl do tampão de anelamento (Qiagen, EUA)

- 35 µl de H₂O MQ para completar o volume final da reação (50 µl).

A mistura foi incubada em um banho seco a 95°C por 5 minutos, em seguida, o banho seco foi desligado e as amostras permaneceram na plataforma por 1 hora, esfriando lentamente. Após o anelamento dos oligos, esses foram armazenados a -20°C.

3.3. Digestão do plasmídeo CRISPR (pSS013) e inserção de oligos

6 µg do plasmídeo pSS013, expressando *CAS9-3xFlag* (SIDIK et al., 2014), foram digeridos com 1,5 µl da enzima de restrição *BsaI-HF* (NEB, EUA), na presença de 5 µl do tampão *cut smart* 10X e 37,5 µl de H₂O MQ. A reação foi incubada a 37°C *overnight*. O diagnóstico da digestão foi feito através da comparação das bandas do plasmídeo circular (controle) e do plasmídeo linear (digerido) em gel de agarose. O plasmídeo digerido foi purificado com o kit QIA Gel extraction (Qiagen), seguindo todas as instruções do fabricante. Para a ligação das sequências dos gRNAs no plasmídeo CRISPR, foram utilizados 0,5 µl da enzima T4 DNA ligase (NEB), 1 µl do tampão T4 DNA ligase 10X, 0,5 µl de pSS013 digerido/purificado (na concentração 68,5 ng/µl) e um 1 µl de cada gRNA anelado. A reação de ligação foi realizada no gelo por 20 minutos.

3.4. Transformação dos plasmídeos pSS013 recombinantes em células competentes e isolamento de colônias positivas

Foram incubados 5 µl de cada produto resultante da ligação, com 25 µl da célula competente de alta eficiência DH5α (NEB), por 30 minutos, no gelo. A transformação foi realizada por choque térmico, por exatamente 30 segundos a 42°C. Em seguida, as amostras foram incubadas no gelo por 3 minutos e 250 µl do meio SOC (NEB) foi adicionado à mistura. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora, sob agitação (250 rpm). Após o período de incubação as amostras foram espalhadas em placas de petri, contendo meio *Luria broth* (LB), com 100 µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C *overnight*. As colônias isoladas foram pinçadas com o auxílio de uma ponteira de 10 µl e utilizadas diretamente como *template* na reação da PCR, para a confirmação da inserção das sequências utilizadas como gRNA no plasmídeo pSS013. Foram geradas três diferentes recombinações do plasmídeo pSS013 (pSS013-GRA17_gRNA_A8;

pSS013-GRA17_gRNA_A7; pSS013-GRA17_gRNA_A6) para a truncação da porção C-terminal e três recombinações (pSS013-GRA17_gRNA_A2; pSS013-GRA17_gRNA_A3; pSS013-GRA17_gRNA_A6) para a truncação da porção N-terminal.

3.5. Purificação dos plasmídeos recombinantes (Maxi kit)

Os plasmídeos foram purificados utilizando o kit *QIAGEN® Plasmid Plus Maxi Kit*, seguindo todas as recomendações do fabricante. Resumidamente, foi utilizado 50 ml de meio LB líquido com ampicilina na concentração de 100 µg/ml, para o crescimento de cada plasmídeo recombinante. Após 18 horas de incubação a 37°C, sob agitação (250 rpm), a cultura foi centrifugada a 6000 x g por 15 minutos a 4°C. Foi adicionado 5 ml do tampão de ressuspensão, 5 ml do tampão de lise e a amostra foi gentilmente homogeneizada por inversão e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente (T. A.). Foi adicionado 5 ml do tampão de neutralização à mistura e gentilmente homogeneizada, até a formação do precipitado. Em seguida, a mistura foi transferida para o filtro, para exclusão do precipitado. Foi adicionado 5 ml do tampão de ligação à solução, que foi transferida para a coluna de purificação. A amostra foi centrifugada a 13000 rpm x 1 minuto. Em seguida, foi lavada 2x, pela adição de 700 µl do tampão de lavagem e centrifugada a 13000 rpm x 1. A coluna foi transferida para um tubo novo e 400 µl do tampão de eluição foi adicionado no centro da coluna. Após 3 minutos de incubação à T. A, a coluna foi centrifugada a 13000 rpm x 1 minuto e o plasmídeo purificado foi armazenado a -20°C.

3.6. Amplificação do construto utilizado na truncação das sequências α -hélices por PCR

Foram realizadas duas reações de PCR (PCR1 e PCR2) para a geração do construto que foi utilizado como DNA de reparo, na truncação C-terminal e na adição de um *tag* endógeno de hemaglutinina (*tag*-HA) na GRA17. Na primeira reação, os primers P1-F e P1-R (tabela 1) foram utilizados para a aplicação do gene de resistência *HGXPRT* utilizando como template o plasmídeo PTKO-att (ROSOWSKI et al., 2011). No primer antisense utilizado nessa amplificação, foi adicionado a sequência codificadora do *tag*-HA, de modo que o construto amplificado possua a sequência do *tag*-HA na sua extremidade. Na segunda reação de (PCR2) foram utilizadas

diferentes combinações de primers, para adição de uma sequência de homologia em cada extremidade do construto amplificado na PCR1, de modo que o construto possa ser flanqueado aos domínios α -hélice da região C-terminal da GRA17. Dessa forma, após a quebra na fita dupla de DNA pela CAS9, esses construtos podem ser integrados no genoma por recombinação homóloga. Os primers P2-F e P2R foram utilizados na reação da PCR2 para adicionar uma região de 25 pb de homologia, em cada extremidade do construto, permitindo que o construto fosse utilizado para adicionar um de tag-HA, imediatamente após a região codificadora da GRA17, gerando a cepa $RH\Delta KU80^{HXGPRT+}/GRA17^{HA+}$. Os primers P9-F e P9-R; P8-F e P8-R; P7-F e P7-R (tabela 1) foram utilização com o intuito de flanquear o construto a regiões específicas da sequência codificadora da GRA17, permitindo que os mesmos fossem utilizado para gerar as cepas $RH\Delta KU80^{HXGPRT+}/GRA17\Delta 224-239^{HA}$ (contendo uma truncação no domínio α -8), $RH\Delta KU80^{HXGPRT+}/GRA17\Delta 188-239^{HA+}$ (truncação nos domínios α -8 e α -7) e $RH\Delta KU80^{HXGPRT+}/GRA17\Delta 156-239^{HA+}$ (truncação nos domínios α -8, α -7 e α -6), respectivamente. A eficiência dessa estratégia consiste no fato de que o mesmo construto possa ser utilizado como DNA de reparo por recombinação homóloga, apenas modificado os 25 pb de homologia em cada extremidade do construto. Já para a truncação dos domínios N-terminal o construto não foi utilizado. Para tal, foi utilizado como DNA de reparo, uma pequena sequência de DNA comercial (90 pb), composta por uma sequência de 45 pb de homologia para a região que antecede e 45 pb para as regiões que precedem o sítio a ser trucidado.

3.7. Transfecção e seleção dos clones

Após a passagem de taquizoítos de *T. gondii* pelas agulhas (27G e 30G), para a remoção de células hospedeiras, o meio contendo parasito foi centrifugado a 1700 rpm x 8 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 10 ml de Cytomix (10 mM KPO_4 , 120 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA) e centrifugado na mesma rotação. O sobrenadante foi desprezado e pellet foi ressuspensionado em 350 μ l de Cytomix, na concentração de 5×10^7 taquizoítos.

Numa cuveta de 2mm (Bio-Rad) foram misturados:

- 350 μ l do parasito (5×10^7).
- 100 μ g do plasmídeo CRISPR, expressando o grRNA específico para o GOI.

- 40 µg do construto utilizado como DNA (C-terminal) / DNA comercial (N-terminal)
- 10 µl de ATP [2mM]
- 25 µl GSH [5mM]

A cuveta foi eletroporada utilizando o eletroporador BioRad Gene Pulser (Bio-Rad), com os seguintes parâmetros:

- Capacitância: 25 µFD
- Voltagem: 1250 kV (1.25)
- Resistência: ∞ ohm

Após a eletroporação as cuvetas foram incubadas por 15 à T. A. Para as cepas com modificações gênicas na porção C-terminal, os parasitos foram transferidos para a garrafa de cultura contendo HFF e, após 24 horas, foi adicionado o meio de seleção M/X (50 µg/ml ácido micofenólico e 50 µg/ml xantina). Após uma semana de seleção, foi feita a clonagem por diluição limitante. No caso das modificações na porção N-terminal, não foi utilizado nenhum marcador de seleção, a clonagem por diluição limitante foi realizada imediatamente após a eletroporação.

3.8. Western blot

Para acessar a expressão de HA nas cepas modificadas geneticamente, monocamadas de HFF em placas de 6 poços foram infectadas (MOI 3 -5), por 24 horas. PBS 1X gelado foi utilizado para lavar os poços antes das células serem removidas com o auxílio de um *cell scraper*. O pellet foi ressuspensionado em tampão de lise e aquecido imediatamente a 100°C por 5 minutos. Em seguida as amostras foram sonicadas e diluídas em tampão de amostra (0,1 mM Tris-HCL, 4% SDS, 0,2 % azul de bromofenol, 20% glicerol) e adicionadas ao gel de poliacrilamida 4-15%, pré-moldado [4-15% *Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well*] (Bio-Rad). A eletroforese foi realizada por 1 hora 110V. Após a separação, as proteínas foram transferidas para a membrana PVDF (Bio-Rad) por 2 horas a 45V, e bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente (PBS-0,1% Tween-20, 5% de leite em pó desnatado). A membrana foi incubada com os anticorpos primários

[Rato anti-HA (1:500); camundongo anti-GRA1 (1/2000)] *overnight*, sob agitação. Após a 6 lavagens de 5 minutos com PBS-T, a membrana foi incubada com os anticorpos secundários [IgG de Cabra anti-rato - HRP (1:3000); IgG de cabra anti- camundongo - HRP (1/2000)], por 1 hora à temperatura ambiente. A membrana foi submetida a um novo ciclo de lavagem e revelada com o substrato *Clarity Max Western ECL* (Bio-Rad). A quimioluminescência foi detectada pelo aparelho FluorChem M system (Proteinsimple, EUA) e as imagens foram analisadas no *software AlphaView* (Proteinsimple).

3.9. Ensaio de placa

A viabilidade e o crescimento do parasito foram avaliados pela contagem do número de placas e pela mensuração da área das placas, respectivamente. As células HFF foram plaqueadas em placas de 24 poços e infectadas com 100 taquizoítos das cepas $RH\Delta KU80^{HXGPRT+/GRA17HA+}$ e $RH\Delta KU80^{HXGPRT+/GRA17\Delta 224-239HA+}$. Devido à baixa viabilidade dos parasitos com truncamento na porção N-terminal ($RH\Delta KU80^{HXGPRT+/GRA17\Delta 34-69HA+}$, $RH\Delta KU80^{HXGPRT+/GRA17\Delta 34-87HA+}$, $RH\Delta KU80^{HXGPRT+/GRA17\Delta 34-173HA+}$) ou com truncamento na porção C-terminal, que inclui a α -6 ($RH\Delta KU80^{HXGPRT+/GRA17\Delta 156-239HA+}$) e α -7 ($RH\Delta KU80^{HXGPRT+/GRA17\Delta 188-239HA+}$), usamos 1000 parasitos na infecção, como uma estratégia compensatória. Todas as placas foram incubadas por 5 dias, a 37°C e 5 % de CO₂. As imagens foram capturadas por uma câmera digital (CoolSNAP EZ; Roper Scientific) conectada a um microscópio invertido de fluorescência eclipse Ti-S (Nikon) e o software NIS-Elements (Nikon) foi usada para realizar essas análises.

3.10. Imunofluorescência

Lamínulas redondas para cultivo celular em placas de cultura (12 x 0,11 mm) contendo HFF foram infectadas com taquizoítos, durante 24 horas. As lamínulas foram lavadas com PBS-1X e fixadas com formaldeído/PBS 3%, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após três ciclos de lavagem com PBS-1X, a reação foi bloqueada por uma hora, à temperatura ambiente, com o tampão de bloqueio (PBS1X/3%BSA/5% soro de carneiro/0.2% triton X 100/ 0,01% azida sódica). Na sequência, o tampão de bloqueio foi descartado e as lamínulas foram incubadas com os anticorpos primários: IgG de Rato anti-HA, 1/500; IgG de Coelho anti-GRA7, 1/5000; IgG de camundongo anti-Flag, 1/750 e IgG de camundongo anti- SAG1, 1/1000, por 18 horas a 4°C. Após a lavagem,

foi feito a incubação com os anticorpos secundários fluorescentes: IgG de cabra anti-rato AF488- (verde); IgG de cabra anti-coelho AF 594 (vermelho) e anti-camundongo AF-488 (verde), por uma hora à temperatura ambiente, no escuro. As lâminas foram lavadas e montadas em lâminas de microscopia utilizando o meio de montagem *vectashield*. As imagens foram capturadas com uma câmera digital (CoolSNAP EZ; Roper Scientific) conectada a um microscópio invertido de fluorescência (eclipse Ti-S; Nikon).

3.11. Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Para determinar a normalidade das amostras foram utilizados os testes Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors, Shapiro-Wilks e D'Agostino and Pearson omnibus. A diferença estatística entre os grupos foi analisada pelo teste paramétrico ANOVA. O teste de comparação múltipla de Bonferroni, foi utilizado para examinar comparações entre pares de grupos selecionados. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$ (*).

4. Resultados

4.1. A Predição *in silico* da estrutura secundária da GRA17 revela a presença de oito domínios alfa hélice

GRA17 foi identificado como uma proteína de grânulo denso, secretada para a MVP, onde atua no transporte de pequenas moléculas e na manutenção da morfologia do VP. Apesar da alta predição de estruturas α -hélice na sua composição, esses não foram funcionalmente caracterizado. Com um intuito de caracterizar a estrutura secundária dessa proteína, utilizamos o banco de dados *ToxoDB.org* para a predição da sequência proteica da GRA17, utilizando a cepa GT1 como referência [TGGT1_222170]. Em seguida, as plataformas *SOPMA*, *JPRED4* e *PCI-SS* foram empregadas na predição da estrutura secundária da GRA17. A análise da estrutura secundária demonstrou que a GRA17 possui oito domínios α -hélices, os quais nomeamos de α -1 a α -8 (Figura 2A, B).

A grande maioria das proteínas secretadas possuem um peptídeo sinal (PS), responsável pelo direcionamento da proteína para regiões específicas, onde exercerão suas funções. A interferência na sequência sinal, pode comprometer o endereçamento correto da proteína para a via secretora. Para evitar possíveis interferências na sequência do PS, nós utilizamos a plataforma *SignalP 4.1* para a predição do PS e de seu sítio de clivagem. O resultado da análise identificou um PS na porção N-terminal, com o sítio de clivagem entre os resíduos de aminoácidos (aa) 24 e 25 (Figura 1A, B). A fim de evitar a alteração no endereçamento da GRA17 para a via secretora, todos os gRNAs, utilizados para deleção das estruturas α -hélices, foram escolhidas após o sítio de clivagem do PS.

Neste trabalho utilizamos a cepa de *T. gondii* geneticamente deficiente para a *KU80* (*RH Δ KU80/ Δ HXGPRT*), que em complexo com a *KU70* são responsáveis pelo reparo de quebras na fita de DNA pela união de extremidade não homólogas (NHEJ). Essa cepa possui apenas a via de reparo do DNA por homologia (HDR), isso significa que após a quebra da dupla fita do DNA pela *CAS9* é obrigatório o oferecimento de um DNA de reparo. Antes de empregar o construto amplificado por PCR como DNA de reparo no truncamento C-terminal da GRA17, testamos se esse interferiria na função da proteína nativa. O plasmídeo pSS013 recombinante, expressando um gRNA com especificidade para uma região codificadora da GRA17, próxima ao stop códon, foi

utilizado para a indução da quebra na fita dupla do DNA. O construto contendo uma pequena região de homologia de 25 pb em cada uma das extremidades foi utilizado no reparo via HDR, introduzindo um *tag*-HA endógeno na porção C-terminal da proteína GRA17 e um gene de resistência *HXGPRT* (Fig. 2 C).

Três clones independentes do parasito resultante, *RHΔKU80*^{HXGPRT+/GRA17+HA}, expressando um *tag*-HA imediatamente após a região codificadora da GRA17, foram utilizados para a infecção de células HFF e submetidos ao ensaio de imunofluorescência. Para verificar a localização de GRA17, foi feita a co-marcação de GRA17 com uma outra proteína de grânulo denso (GRA7), que sabidamente se localiza na MVP. O resultado positivo da co-localização entre GRA17 e GRA7 na MVP dos clones *RHΔKU80*^{HXGPRT+/GRA17HA+} foi analisada por microscopia de fluorescência (Fig. 2D). Esses clones ainda foram utilizados para a aquisição de imagens do parasito vivo, em garrafas de cultura, para determinar alterações na morfologia do vacúolo (Fig. 2E). A localização correta da GRA17 na MVP (Fig. 2D) e a ausência de vacúolos no formato de bolhas (Fig. 2E), comprovam que o construto não interfere na função e na localização da GRA17 e poderia ser utilizado como DNA de reparo.

A



B



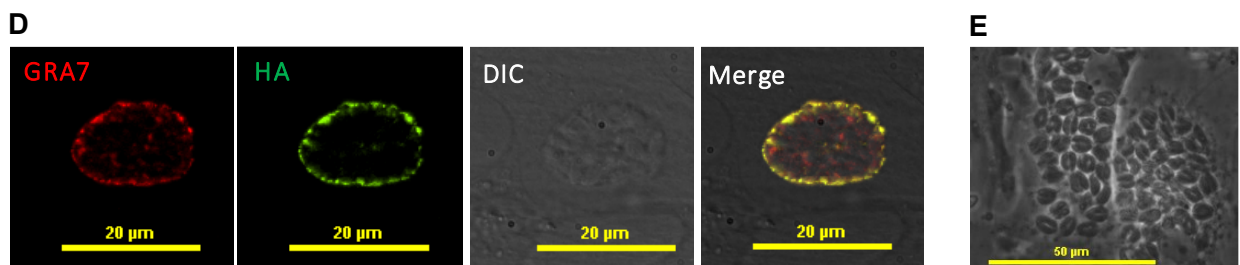
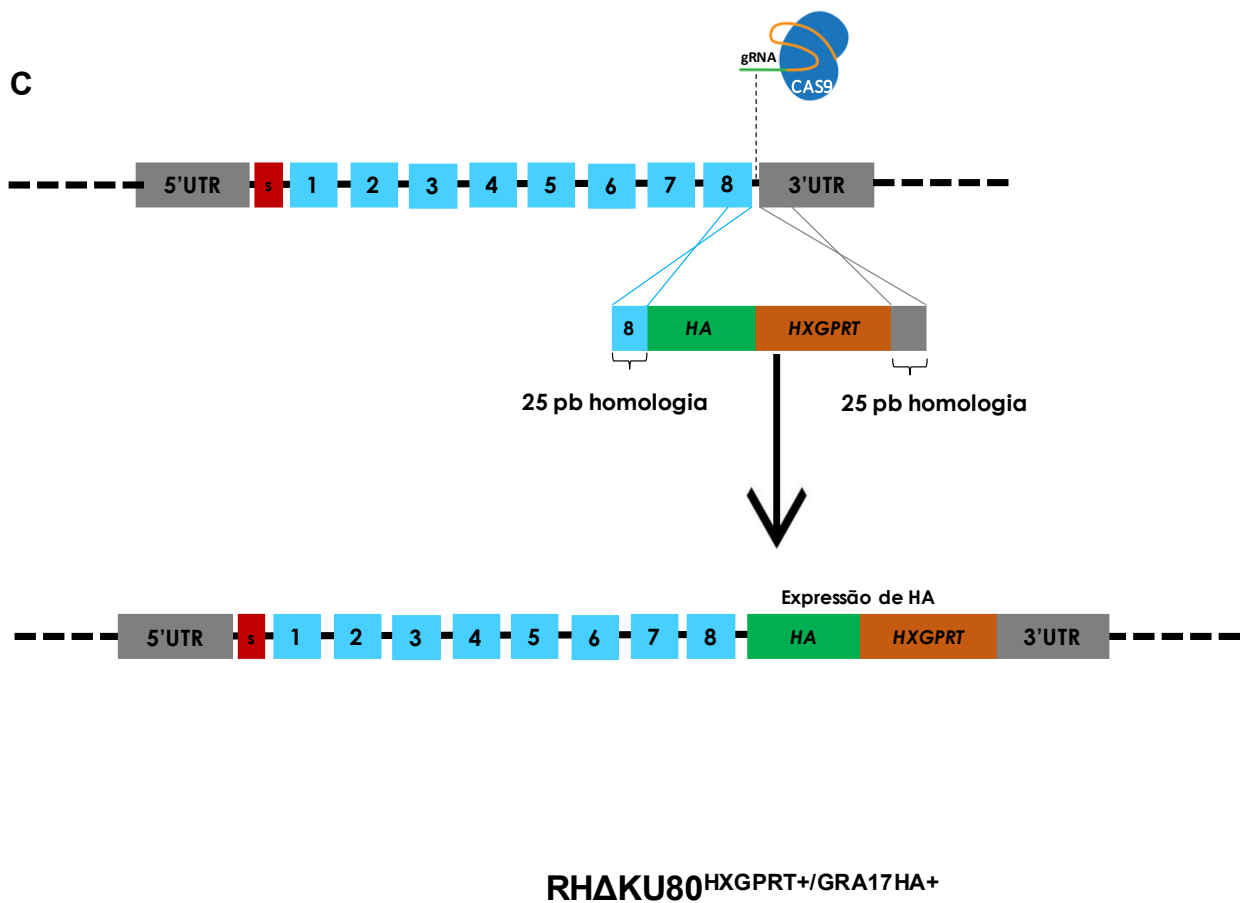


Figura 2- Predição da estrutura secundária de GRA17 revela 8 domínios α -hélices. (A) As plataformas, *SOPMA*, *JPRED4* e *PCI-SS* foram utilizadas para a predição da estrutura secundária da GRA17. Foram identificados 8 domínios α -hélices, nomeados de $\alpha 1$ - $\alpha 8$. **GE** - Sítio de Clivagem do peptídeo sinal, entre os aa 24 e 25. As marcações em azul correspondem às sequências de aminoácidos dos domínios α -hélices da GRA17. (B) representação esquemática da GRA17 com os 8 domínios α -hélices. (C) representação esquemática da estratégia utilizada para a introdução de um *tag*-HA, na porção C terminal de GRA17. (D) O clone $\text{RH}\Delta\text{KU80}^{\text{HXGPRT}+/\text{GRA17}+\text{HA}}$, expressando o *tag*-HA, foi utilizado na infecção de células HFF. As amostras foram fixadas 24 horas após a infecção e utilizadas no ensaio de imunofluorescência, para a detecção de HA e sua

co-localização com GRA7. Foram utilizados os anticorpos primários (anti-HA de rato e anti-GRA7 de camundongo) e os anticorpos secundários (AF488- verde e AF594-vermelho) para a marcação de HA e GRA7, respectivamente. (E) Imagem da garrafa de cultura contendo parasitos vivos foram capturadas por microscopia de contraste de fase. Barra de escala = 20 μm (Fig. D) e 50 μm (Fig. E).

4.2. Análise estrutural e funcional dos domínios α -hélices da porção C-terminal da GRA17

4.2.1. Com a exceção do domínio α -8 (GRA17 $\Delta^{224-239/HA}$) todos os domínios C terminal da GRA17 são importantes para estabilidade do VP e função proteica.

Com o intuito de caracterizar os domínios α -hélices da porção C-terminal preditos para a GRA17, utilizamos o sistema CRISPR/CAS9 para o truncamento dos domínios α -8 ($\Delta^{224-239}$), α -8 e α -7 ($\Delta^{188-239}$), e α -8, α -7 e α -6 ($\Delta^{156-239}$) na cepa parental RH Δ KU80/ Δ HXGPRT. Foram utilizadas três diferentes recombinações do plasmídeo pSS013 (pSS013-GRA17_gRNA_ α -8; pSS013-GRA17_gRNA_ α -7; pSS013-GRA17_gRNA_ α -6), cada um expressando o gRNA com especificidade para cada domínio de interesse, com o intuito de gerar quebras na dupla fita de DNA. O mesmo construto (previamente testado) foi utilizado como *template* de reparado, para cada truncamento. Após a seleção da população positiva com M/X, os clones individuais foram isolados por diluição limitante. As três cepas resultantes, RH Δ KU80/GRA17 $\Delta^{224-239/HA}$ (Figura 3A), RH Δ KU80/GRA17 $\Delta^{188-239/HA}$ (Figura 3D) e RH Δ KU80/GRA17 $\Delta^{156-239/HA}$ (Figura 3G) foram utilizados para a infecção de monocamadas de HFF e submetidos ao ensaio de imunofluorescência, para a avaliação da localização de GRA17. Essas cepas ainda foram utilizadas para a aquisição de imagens do parasito vivo, em garrafas de cultura, para determinar alterações na morfologia do vacúolo.

4.2.2. O domínio α -8 ($\Delta^{224-239}$) não atua na função transportadora de GRA17

Para a truncação da sequência α -8, o plasmídeo pSS013-GRA17_gRNA_A8 e o construto foram inseridos na cepa RH Δ KU80/ Δ HXGPRT. Após o isolamento do clone RH Δ KU80/GRA17 $\Delta^{156-239/HA}$ contendo o domínio α -8 truncado, este foi utilizado para infectar

células HFF. As amostras foram fixadas e marcadas com o anticorpo monoclonal (anti-HA; anti-GRA7) e as imagens da reação de imunofluorescência foram capturadas por microscopia de fluorescência. Uma falha estratégica, na escolha da região de homologia do “braço” 5’ do construto, resultou na destruição da pauta de leitura de HA, por isso, apesar do sucesso na truncção de α -8, não foi possível detectar a expressão de HA no clone $H\Delta KU80/GRA17^{\Delta 156-239/HA}$ (Figura 3B). Além disso, imagens da garrafa de cultura contendo o parasito vivo, demonstram que essa cepa não apresenta alterações na morfologia do vacúolo. Não foi identificado a presença de vacúolos no formato de bolha (Figura 3C), que é um fenótipo característico do comprometimento no transporte de moléculas através da MVP, observada após a deleção de GRA17. Podemos concluir, que α -8 não é necessário para ação efetora de GRA17, pois o fenótipo resultante, provavelmente como um mecanismo de compensação da falha no transporte de moléculas pequenas, não é visto no clone expressando GRA17 com o domínio α -8 truncado.

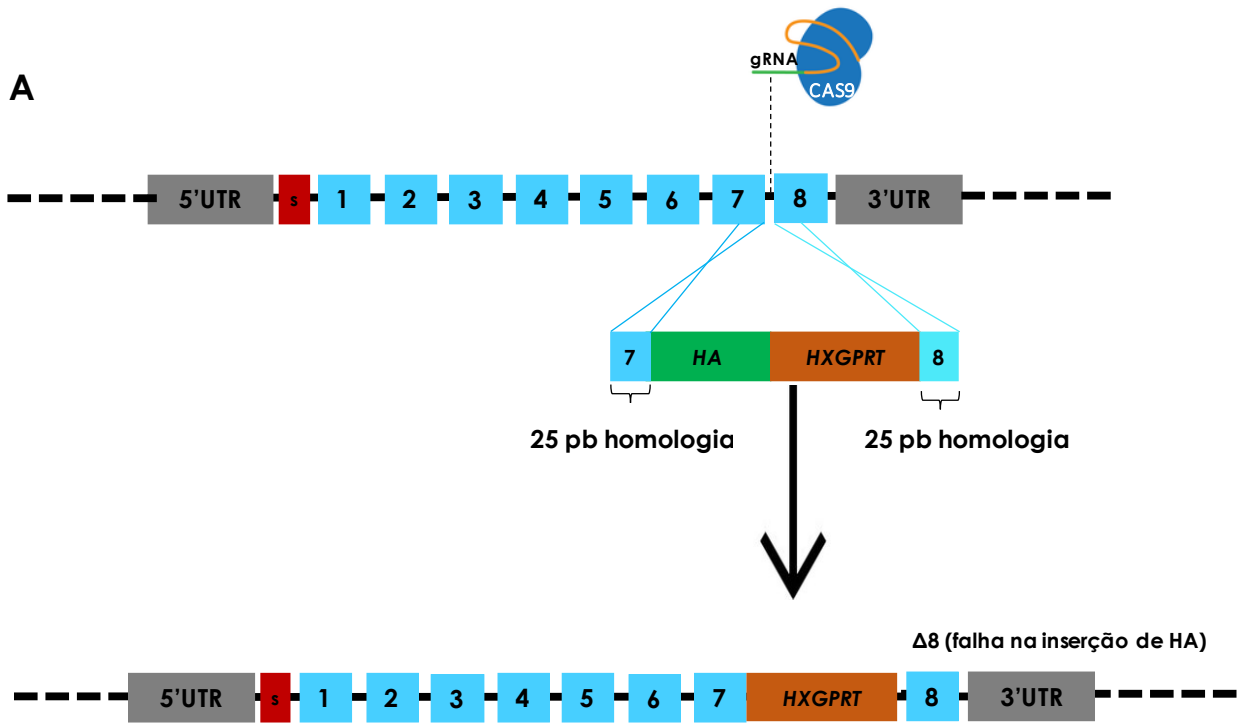
4.2.3. O truncamento dos domínios α -8 e α -7 ($\Delta 188-239$) compromete a função da GRA17 e resulta na instabilidade do VP

Após a eletroporação do $pSS013-GRA17_gRNA_ \alpha$ -7 na cepa parental, o clone resultante $RH\Delta KU80/GRA17^{\Delta 188-239/HA}$, contendo os resíduos de aminoácidos correspondentes aos domínios α -7 e α -8 da GRA17 truncados, foi isolado e utilizado para infectar células HFF. As lamínulas foram fixadas e marcadas com os anticorpos monoclonais anti-HA e anti-GRA7 e as imagens foram capturadas por microscopia de fluorescência. O mesmo equívoco no braço de homologia 5’ do construto se repetiu aqui. Fomos capazes de truncar os domínios, mas não foi possível detectar a expressão de HA no clone $RH\Delta KU80/GRA17^{\Delta 188-239/HA}$ (Fig. 3E). No entanto, imagens da garrafa de cultura, contendo o parasito vivo, demonstram alterações na morfologia do vacúolo, com a presença de vacúolos na forma de bolha (Fig. 3F). Este resultado demonstra que o domínio α -7 é necessário para o funcionamento proteico, uma vez que, o seu truncamento compromete a ação de GRA17 no transporte através da MVP. Além disso, reforça a ideia que α -8 não é necessário para a função da proteína.

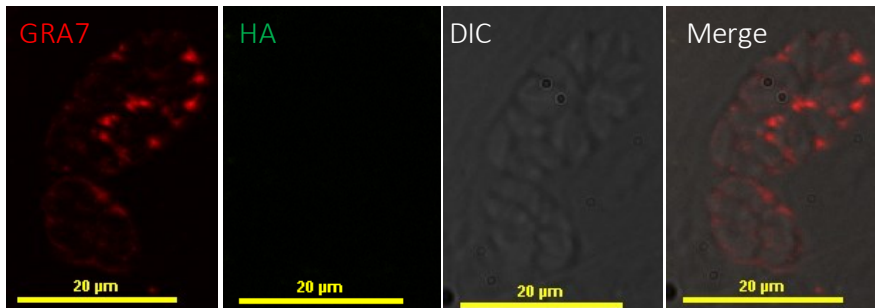
4.2.4. O truncamento conjunto dos três últimos domínios (α -6-8) da porção C-terminal de GRA17 (Δ 156-239) resulta em falha na locação na MVP e instabilidade do VP

O plasmídeo pSS013-GRA17_gRNA_ α -6 e o construto foram inseridos na cepa parental, para a truncação dos resíduos de aminoácidos correspondente a porção α -6, α -7 e α -8 da GRA17. O clone RH Δ KU80/GRA17 Δ 156-239/HA foi isolado e utilizado para infectar células HFF. As amostras foram submetidas aos mesmos procedimentos já citados. Nas imagens obtidas pelo microscópio de fluorescência, é possível identificar a expressão do tag-HA, na cepa mutante, RH Δ KU80/GRA17 Δ 156-239/HA. Porém, as imagens revelam um defeito na localização natural dessa proteína, determinada pela falha na co-localização com a GRA7. A proteína GRA17 contendo os três últimos domínios truncado, falha na migração para a MVP e apresenta um perfil mais disperso no interior do parasito (Fig. 3H). Com o intuito de testar se GRA17 é retido na membrana do parasito durante a sua exportação, foi feito a co-marcação de GRA17 com a SAG1, que é uma proteína de superfície, ancorada na membrana do parasito. A marcação de SAG1 na cepa RH Δ KU80/GRA17 Δ 156-239/HA demonstra a falha na co-localização entre GRA17 e SAG1, confirmando que GRA17 também não se encontra na membrana do parasito e sim dispersa no seu citoplasma. Além do defeito na localização da GRA17, essa cepa também apresenta alterações na morfologia do vacúolo. Imagens do parasito vivo demonstram a presença de vacúolos na forma de bolha, o que denota o comprometimento na função proteica (Fig. 3I).

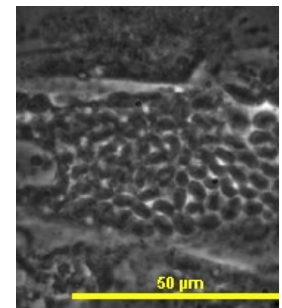
RH Δ KU80/HXGPRT⁺/GRA17 Δ 224-239HA⁺



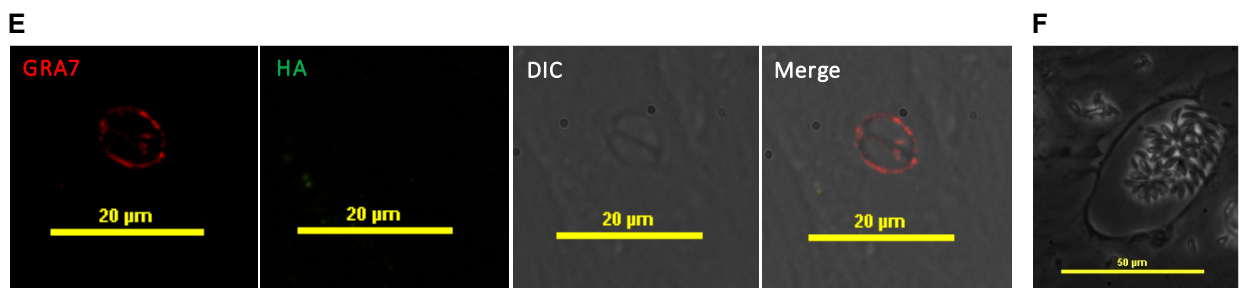
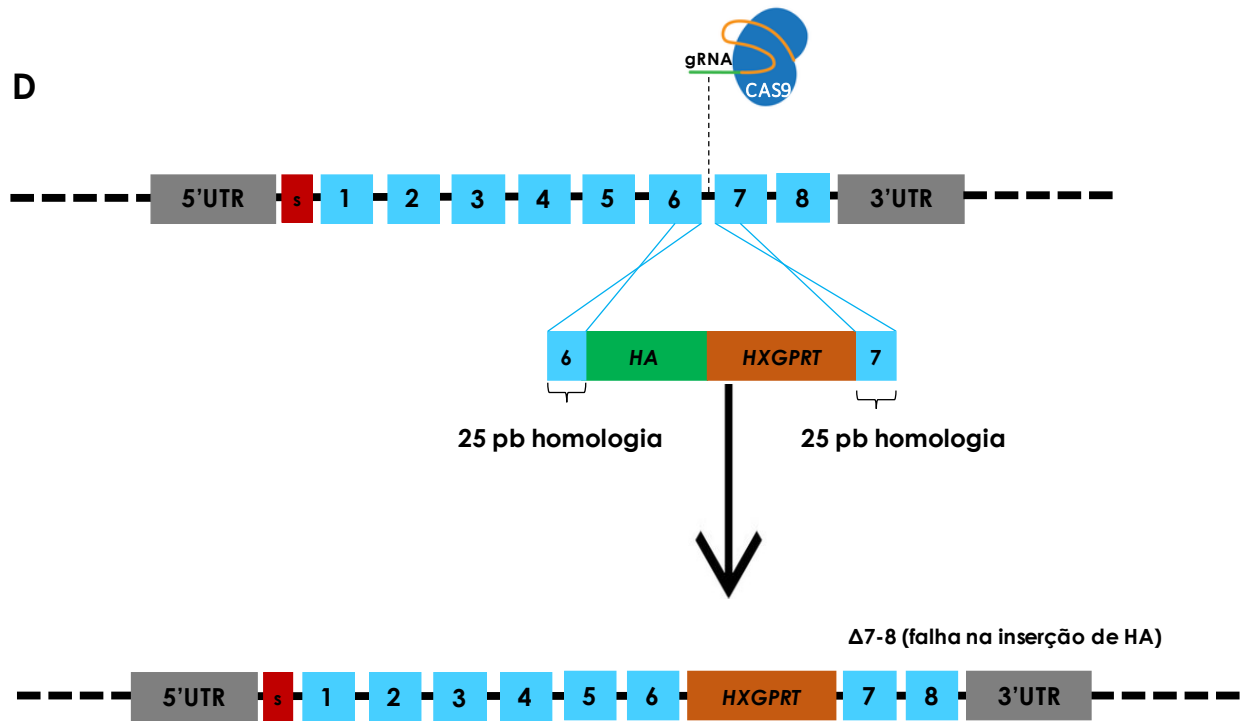
B



C



RH Δ KU80/HXGPRT⁺/GRA17 Δ 188-239HA⁺



RH Δ KU80/HXGPRT⁺/GRA17 Δ 156-239HA⁺

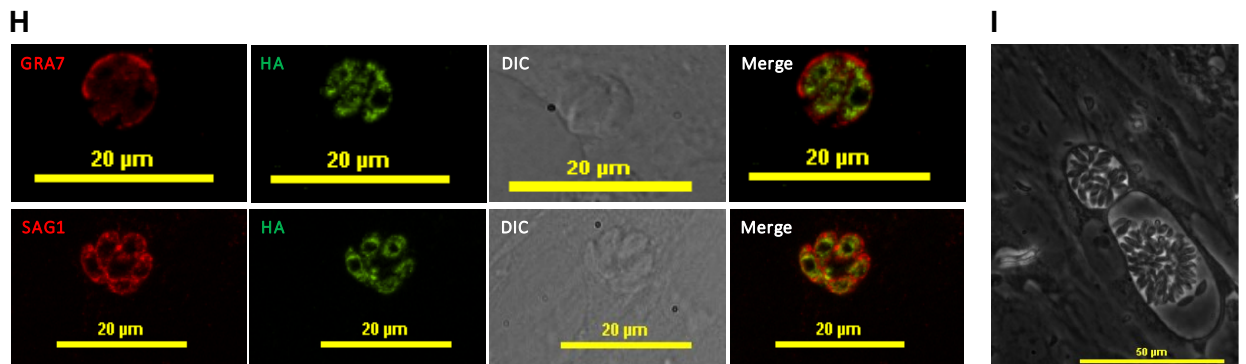
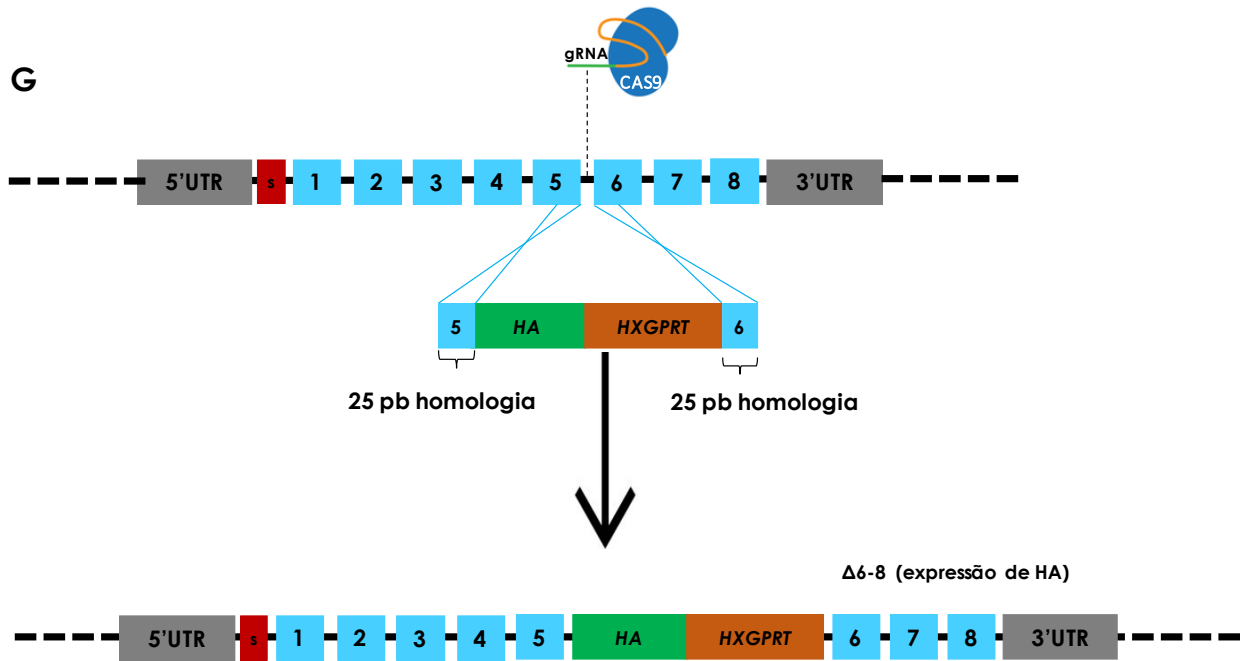


Figura 3- Truncamento dos domínios C-terminal da GRA17 por CRISP/CAS9. (A, D, G). Representação da estratégia e dos sítios de truncamento dos domínios α -8; α -7-8; α -6-8, respectivamente. Para a inativação desses domínios, os plasmídeos pSS013-GRA17_gRNA_ α -8, pSS013-GRA17_gRNA_ α -7 e pSS013-GRA17_gRNA_ α -6 expressando o gRNA específico para as sequências α -8, α -7 e α -6 e seus respectivos construtos, foram transfectados por eletroporação na cepa RH Δ KU80/ Δ HXGPRT. Após uma semana de seleção com M/X, os clones individuais resultantes (B) RH Δ KU80/^{HXGPRT+/GRA17 Δ 224-239HA+} (E) RH Δ KU80/^{HXGPRT+/GRA17 Δ 188-239HA+} (H) RH Δ KU80/^{HXGPRT+/GRA17 Δ 156-239HA+} foram isolados e utilizados na infecção de células HFF. As amostras foram fixadas e marcadas com os anticorpos monoclonais (anti-HA de rato, anti-GRA7 de camundongo e anti-SAG1 de camundongo) e os anticorpos secundários (AF488 anti-rato - verde; AF594 anti-coelho - vermelho e AF-488 anti-camundongo – verde) para a marcação de HA, GRA17 e SAG1, respectivamente. Imagem da garrafa de cultura contendo os clones vivos (C) RH Δ KU80/^{HXGPRT+/GRA17 Δ 224-239HA+} (F) RH Δ KU80/^{HXGPRT+/GRA17 Δ 188-239HA+} (I) RH Δ KU80/^{HXGPRT+/GRA17 Δ 156-239HA+} foram capturadas por microscopia de contraste de fase. Barra de escala = 20 μ m (Fig. B, E, H) e 50 μ m (Fig. C, F, I).

4.3. Análise estrutural e funcional dos domínios N terminal da GRA17

4.3.1. Todos os domínios N-terminal da GRA17 são indispensáveis para estabilidade e função proteica

A mesma estratégia utilizada para o truncamento dos domínios C-terminal não poderia ser aplicada no truncamento dos domínios N-terminal. Isso porque a inserção de um construto após o truncamento dos domínios iniciais interromperia a pauta de leitura dos códons e causaria a inativação dos domínios subsequentes. Não seríamos capazes de correlacionar os fenótipos à truncação de domínios específicos. Para evitar tal problema utilizamos uma nova estratégia para o truncamento dos domínios N-terminal. A cepa RH Δ KU80/GRA17^{HXGPRT+/GRA17HA+}, expressando um *tag*-HA, foi utilizada como cepa parental, pois nos permitiria triar a localização da GRA17 após o truncamento N-terminal. Foram utilizadas dois gRNA para cada truncamento, o primeiro gRNA com especificidade para a região que antecede o domínio α -1 e o segundo gRNA com especificidade para cada região que precede o domínio alvo. Para o truncamento dos domínios α -1 e α -2 (Δ 34-69), utilizamos a combinação dos plasmídeos, pSS013-GRA17_gRNA_ α -1 e pSS013-GRA17_gRNA_ α -2 (Fig. 4A). A combinação pSS013-GRA17_gRNA_ α -1 e pSS013-GRA17_gRNA_ α -3 foi utilizada na truncação dos domínios α -1, α -2 e α -3 (Δ 34-87) (Fig. 4D) e a combinação pSS013-GRA17_gRNA_ α -1 e pSS013-GRA17_gRNA_ α -6 na truncação de α -1, α -2, α -3, α -4, α -5 e α -6 (Δ 34-173) (Fig. 4G). Como DNA de reparo, foi utilizado uma pequena sequência de DNA comercial, composto por 45 pb de homologia para região que antecede o sítio

de quebra do primeiro gRNA (gRNA_α-1) e 45 pb de homologia para a região que precede o sítio de quebra do segundo gRNA. Como não foi inserido nenhuma marca de resistência, que visa favorecer o esquecimento da população, a clonagem por diluição limitante, foi realizada imediatamente após a eletroporação. Para a análise dos domínios N-terminal também foram geradas 3 cepas mutantes, contendo diferentes combinações de domínios truncados, $RH\Delta KU80/HXGPRT+/GRA17\Delta 34-69+HA$, $RH\Delta KU80/HXGPRT+/GRA17\Delta 34-87+HA$, e $RH\Delta KU80/HXGPRT+/GRA17\Delta 34-173+HA$.

4.3.2. O truncamento dos domínios α-1 e α-2 resulta em alterações parcial na localização proteica e instabilidade do VP

O plasmídeo recombinante expressando gRNA que tem por alvo a sequência α-1 (pSS013-GRA17_gRNA_α-1) e um outro para α-2 (pSS013-GRA17_gRNA_α-2), foram inseridos na cepa $RH\Delta KU80/GRA17^{HXGPRT+/GRA17HA+}$, juntamente com o DNA de reparo P29F e P29R (tabela 1) por eletroporação. Após a clonagem, células HFF foram infectadas com o clone resultante $RH\Delta KU80/HXGPRT+/GRA17\Delta 34-69+HA$. As amostras foram fixadas e submetidas ao ensaio de imunofluorescência. O clone expressando GRA17 com os domínios α-1 e α-2 truncados, apresenta uma parcial co-localização com o marcador da MVP GRA7 e falha total na co-localização com o marcador de superfície do parasito SAG1 (Fig. 4B). Imagens do parasito vivo, em garrafa de cultura, demonstram a instabilidade do VP, mediante a presença de vacúolo com formato de bolha (Fig. 4C). O resultado demonstra que a falha na função da GRA17 registrada aqui, é provavelmente devido ao comprometido de domínios α-hélices envolvidos diretamente no transporte efetivo de moléculas, e que esses domínios têm pouco envolvimento com a localização da proteína. Isso porque, apesar da proteína apresentar uma pequena falha na localização, ela continua presente na MVP. No entanto, o comprometimento da função da GRA17 é mais grave nos clones contendo os domínios N-terminal truncados, do que nos clones com domínios C-terminal truncados (demonstrado mais adiante). O resultado sugere um maior comprometimento dos domínios N-terminal no transporte e dos domínios C-terminal na associação da GRA17 à MVP.

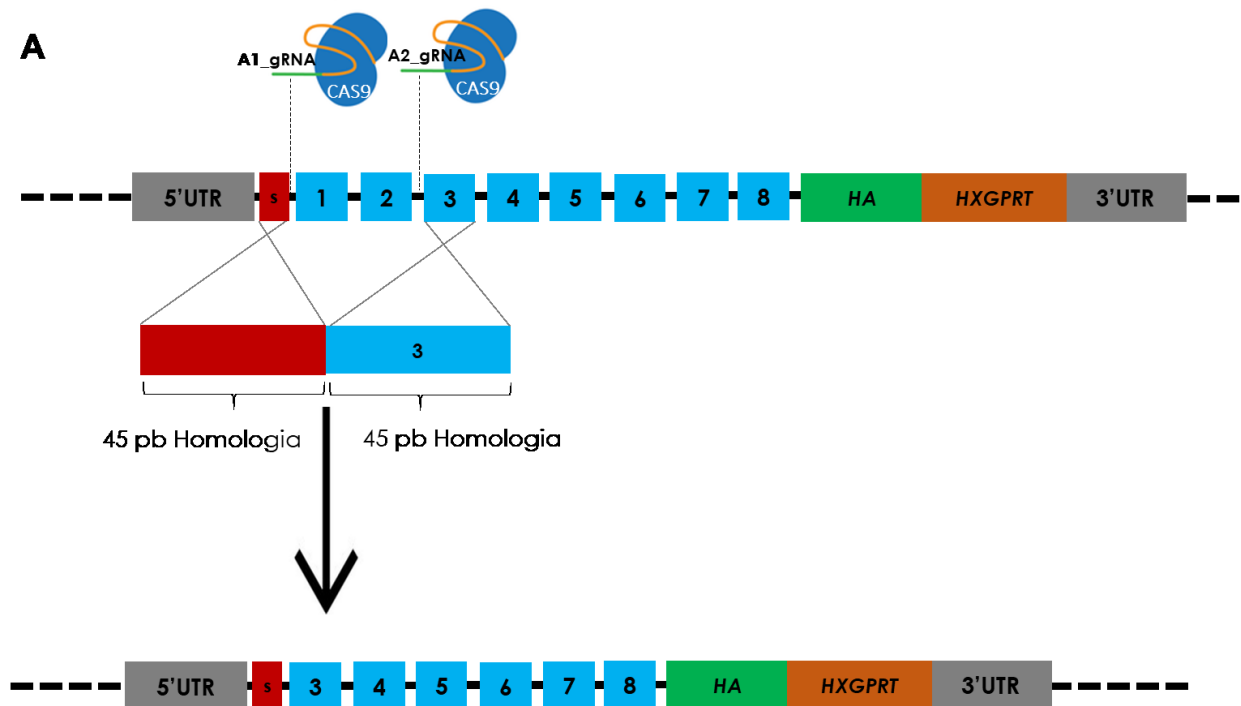
4.3.3. O clone com as sequências α -1, α -2 e α -3 truncada apresenta defeito parcial na localização de GRA17 e instabilidade do VP

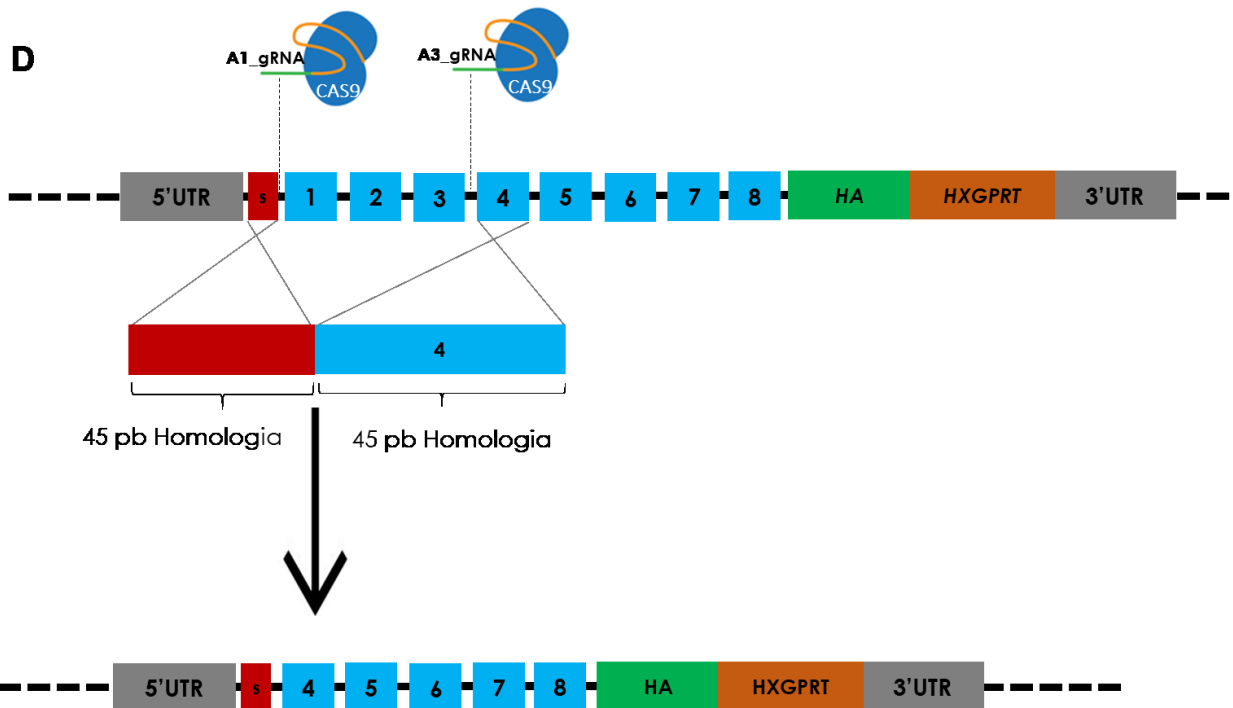
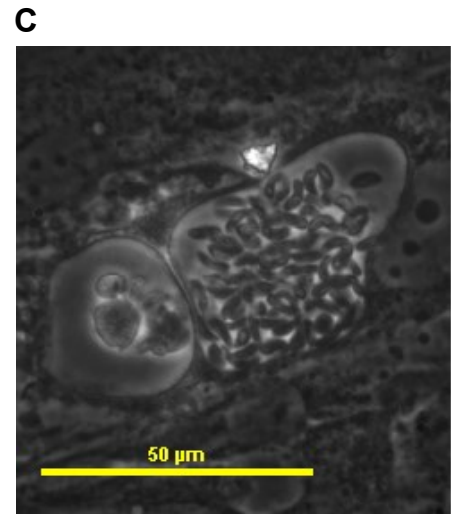
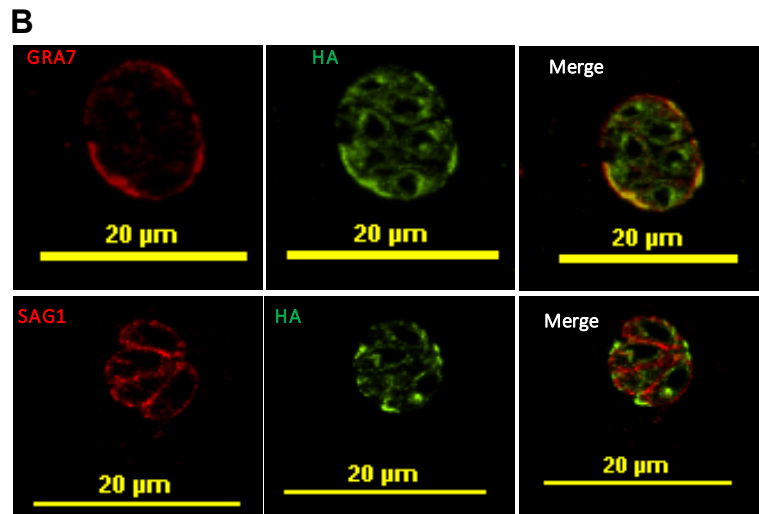
O truncamento das sequências α -1, α -2 e α -3 foi feito pela eletroporação do plasmídeo pSS013-GRA17_gRNA_ α -1 e pSS013-GRA17_gRNA_ α -3 juntamente com o DNA de reparo P30-F e P30-R (tabela 1), na cepa RH Δ KU80/GRA17^{HXGPRT+/GRA17HA+}. Após o isolamento do clone individual RH Δ KU80/^{HXGPRT+/GRA17 Δ 34-87+HA}, esse foi utilizado na infecção de células HFF e submetidos aos mesmos processamentos já descrito. A marcação com anticorpo anti-GRA7 e anti-SAG1 comprovam o defeito parcial na localização da GRA17 na MVP (Fig. 4E). Imagens do parasito vivo acusam o comprometimento da função da GRA17, através da presença de vacúolos no formato de bolhas (Fig. 4F). De modo semelhante ao truncamento dos domínios α -1-2, os clones com os domínios α -1-3 truncados apresentam uma parcial localização da GRA17 na MVP e um grave comprometimento na função proteica. Isso reforça a nossa hipótese de que os domínios N-terminal possuem um maior envolvimento com o transporte através da PVM.

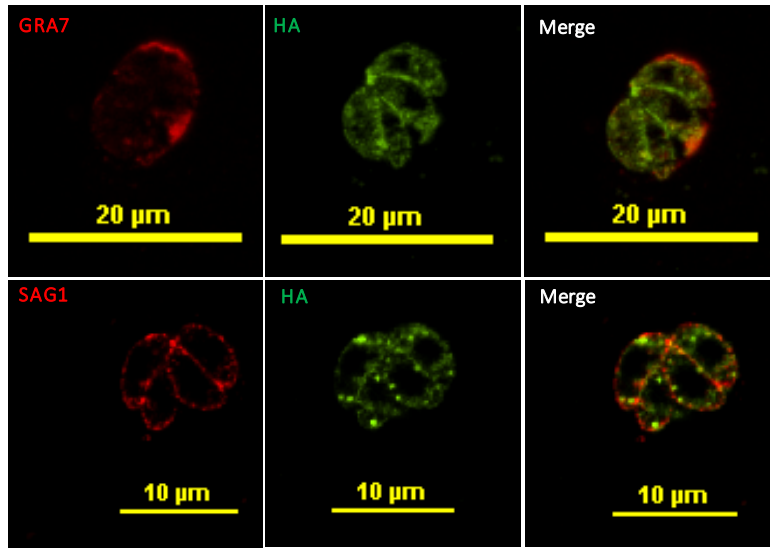
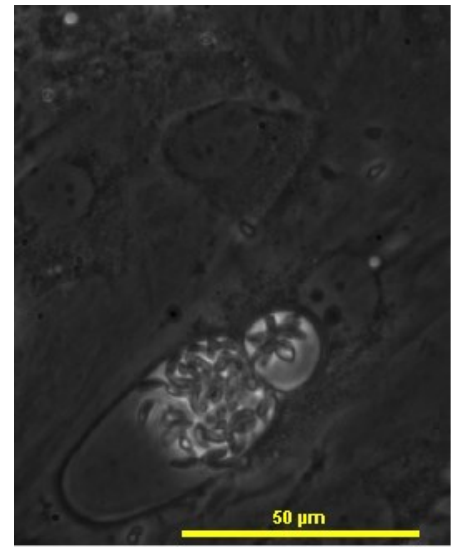
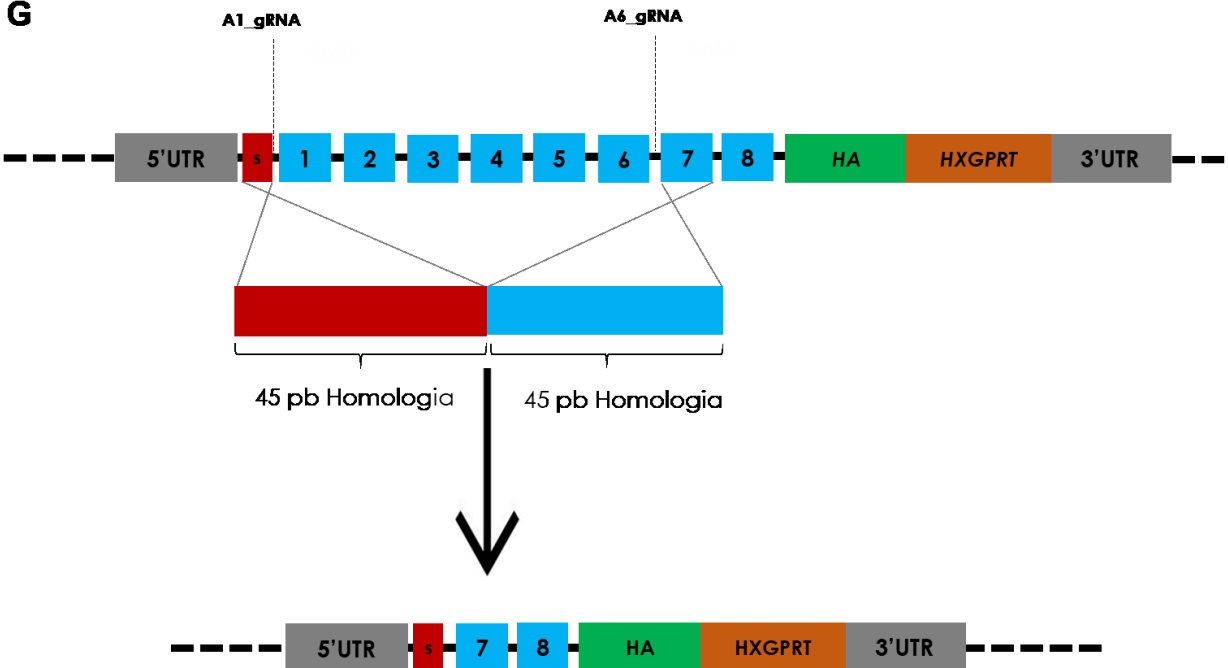
4.3.4. O truncamento de múltiplos domínios (α -1, α -2, α -3, α -4, α -5 e α -6) resulta nos mesmos fenótipos da truncação de domínios individuais

Para testar o efeito do truncamento de múltiplos domínios α -hélices (abrangendo tanto os domínios C como N-terminal), o plasmídeo pSS013-GRA17_gRNA_ α -1, pSS013-GRA17_gRNA_ α -6 e o DNA de reparo P31-F e P31-R (tabela1) foram inseridos na cepa RH Δ KU80/GRA17^{HXGPRT+/GRA17HA+}. Após a clonagem e isolamento da cepa RH Δ KU80/^{HXGPRT+/GRA17 Δ 34-173+HA}, esse foi utilizado para infecção de células HFF. As amostras foram fixadas e submetidas ao ensaio de imunofluorescência e imagens do parasito vivo foram adquiridas, utilizando o microscópio de contraste de fase. O clone isolado apresenta uma falha total na co-localização entre os marcadores de MVP (GRA7) e de superfície (SAG1) com a GRA17 (Fig. 4H). Além disso, essa cepa também apresenta instabilidade no VP, com a presença de vacúolos no formato de bolhas (Fig. 4I). É possível notar que a inclusão de domínios C-terminal na lista de domínios truncados, resulta na falha total de locação na MVP. No entanto, essa cepa não apresenta comprometidos adicionais na viabilidade e proliferação ao detectado no truncamento N-terminal (apresentados mais adiante). Coletivamente, estes resultados demonstram que provavelmente os domínios α -1 a α -7 estão envolvidos na difusão de moléculas através do VP, uma

vez que a deleção de qualquer um desses domínio resulta na mesma instabilidade do VP observada na deleção total da proteína. Já o domínio α -8 provavelmente, não participa na formação da estrutura responsável pela difusão, uma vez que o seu truncamento não resulta em alterações na estabilidade do VP. α -8 provavelmente funcional como um domínio regulador (discutida mais adiante).





E**F****G**

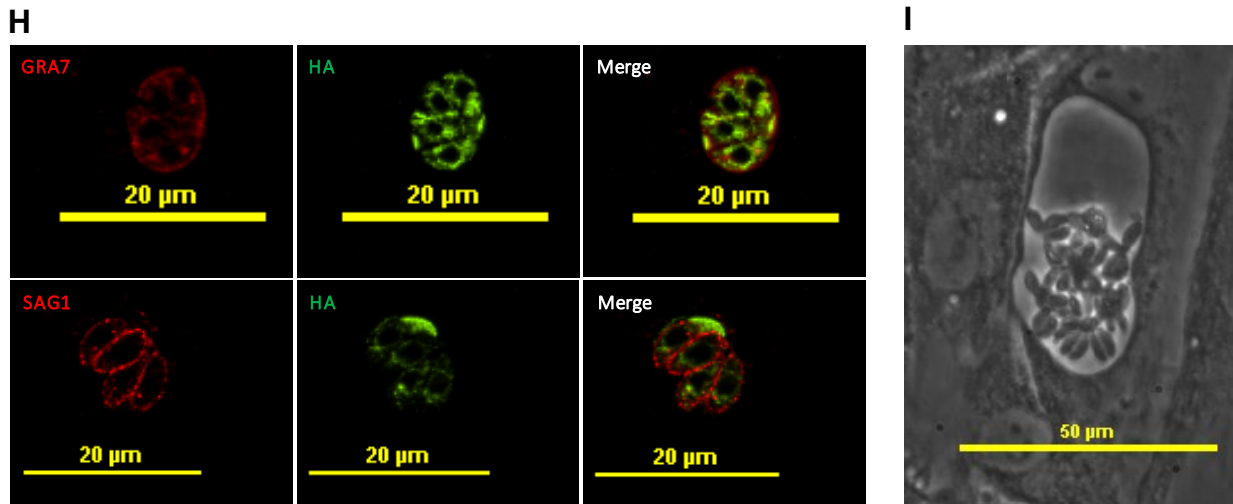


Figura 4- Truncamento dos domínios N-terminal da GRA17 por CRISP/CAS9. (A, D, G). Representação da estratégia (com dois gRNA) do truncamento dos domínios α -1-2; α -1-3; α -1-6, respectivamente. Os plasmídeos pSS013-GRA17_gRNA_α-1; pSS013-GRA17_gRNA_α-2; pSS013-GRA17_gRNA_α-3; pSS013-GRA17_gRNA_α-6 e seus respectivos DNA de reparo, foram transfectados por eletroporação na cepa $RH\Delta KU80/\Delta HXGPRT+/GRA17^{HA+}$, para o truncamento dos domínios α -1-2; α -1-3; α -1-6, respectivamente. Após a clonagem imediata, os clones individuais resultantes (B) $RH\Delta KU80/\Delta HXGPRT+/GRA17\Delta 34-69^{HA+}$ (E) $RH\Delta KU80/\Delta HXGPRT+/GRA17\Delta 34-87^{HA+}$ (H) $RH\Delta KU80/\Delta HXGPRT+/GRA17\Delta 34-173^{HA+}$ foram isolados e utilizados na infecção de células HFF. As amostras foram fixadas e marcadas com os anticorpos monoclonais (anti-HA de rato, anti-GRA7 de camundongo e anti-SAG1 de camundongo) e os anticorpos secundários (AF488 anti-rato - verde; AF594 anti-coelho - vermelho e AF-488 anti-camundongo - verde) para a marcação de HA, GRA17 e SAG1, respectivamente. Imagem da garrafa de cultura contendo os clones vivos (C) $RH\Delta KU80/\Delta HXGPRT+/GRA17\Delta 34-69^{HA+}$ (F) $RH\Delta KU80/\Delta HXGPRT+/GRA17\Delta 34-87^{HA+}$ (I) $RH\Delta KU80/\Delta HXGPRT+/GRA17\Delta 34-173^{HA+}$ foram capturadas por microscopia de contraste de fase. Barra de escala = 20 μ m (Fig. B, E, H) e 50 μ m (Fig. C, F, I).

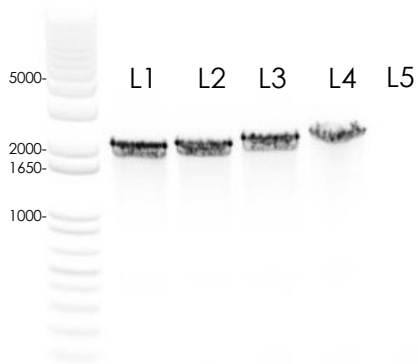
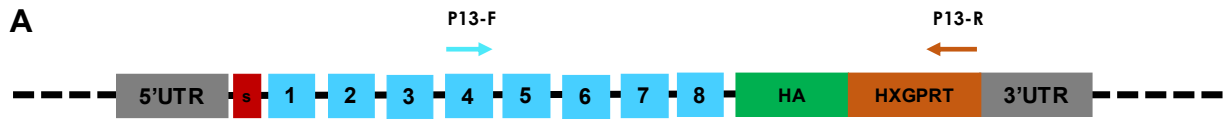
4.4. Diagnóstico dos clones modificados geneticamente comprovam a truncação de cada domínio α -hélice

Para confirmar as modificações gênicas realizadas na GRA17 utilizando CRISPR/CAS9, o DNA genômico de cada cepa mutante foi extraído e submetido a reações de PCR para a amplificação do *locus* alterado. Para as modificações na porção C-terminal, os primers P13-F e P13-R foram utilizados na reação da PCR com o DNA *template* proveniente das cepas: $RH\Delta KU80/GRA17\Delta 156-239/HA$ [$\Delta\alpha 6-8$]; $RH\Delta KU80/GRA17\Delta 188-239/HA$ [$\Delta\alpha 7-8$]; $RH\Delta KU80/GRA17\Delta 224-$

²³⁹/HA [$\Delta\alpha 8$]; RH Δ KU80/^{GRA17}HXGPRT+/^{GRA17}HA e RH Δ KU80/ Δ HXGPRT (Fig. 5A). O produto amplificado foi submetido ao sequenciamento e o resultado confirmou o truncamento de todos os clones (Fig. 5 B-E). O resultado do sequenciamento demonstra que apesar da inserção ter ocorrido no local correto, nas cepas RH Δ KU80/^{GRA17} Δ 188-239/HA [$\Delta\alpha 7-8$] e RH Δ KU80/^{GRA17} Δ 224-239/HA [$\Delta\alpha 8$] uma falha no braço esquerdo de homologia do construto (indicado pelo asterisco vermelho), provocou um deslocamento no quadro de leitura de HA (Fig. 5 C e D), por isso não foi possível detectar a expressão deste *tag* por IFA ou *western blot*.

Para a confirmação das modificações na porção N-terminal foi utilizado, primeiramente, uma estratégia de PCR que consiste no uso de um conjunto de primers, que permitem diferenciar as cepas mutantes pelo tamanho da banda amplificada, quando comparadas a cepa parental (Fig.6 A). O DNA genômico proveniente dos clones RH Δ KU80/HXGPRT+/^{GRA17} Δ 34-69HA+ [$\Delta\alpha 1-2$]; RH Δ KU80/HXGPRT+/^{GRA17} Δ 34-87HA+ [$\Delta\alpha 1-3$]; RH Δ KU80/HXGPRT+/^{GRA17} Δ 34-173HA+ [$\Delta\alpha 1-6$] foram submetidos a reação da PCR utilizando os primers P10-F e P11-R; P10-F e P12-R; P10-F e P17-R, respectivamente. Posteriormente, O material amplificado por PCR foi submetido ao sequenciamento, que confirmou os truncamentos (Fig.6 B-D).

Com intuito de avaliar a expressão da proteína GRA17 por *western blot*, utilizamos tanto as cepas contendo modificações na porção N-terminal quanto as cepas com truncamento na porção C-terminal para infectar células HFF. Após 24 horas de infecção, as amostras foram lisadas submetidas à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para a membrana de PVDF. Após o bloqueio a membrana foi incubada com os anticorpos anti-HA (expressão de GRA17) e anti-GRA1 (controle). Com exceção dos dois clones com comprometimento na pauta de leitura de HA, foi possível identificar a expressão das diferentes versões da proteína GRA17 truncada, nos demais clones (Fig.7). É possível observar uma forte expressão da GRA17 nos clones com truncamento N-terminal ($\Delta\alpha 1-2$; $\Delta\alpha 1-3$), uma expressão moderada no clone com truncamento que abrange as porções N e C-terminal ($\Delta\alpha 1-6$) e uma fraca expressão no clone com truncamento C-terminal $\Delta\alpha 6-8$ (Fig.7).



1Kb Plus DNA ladder

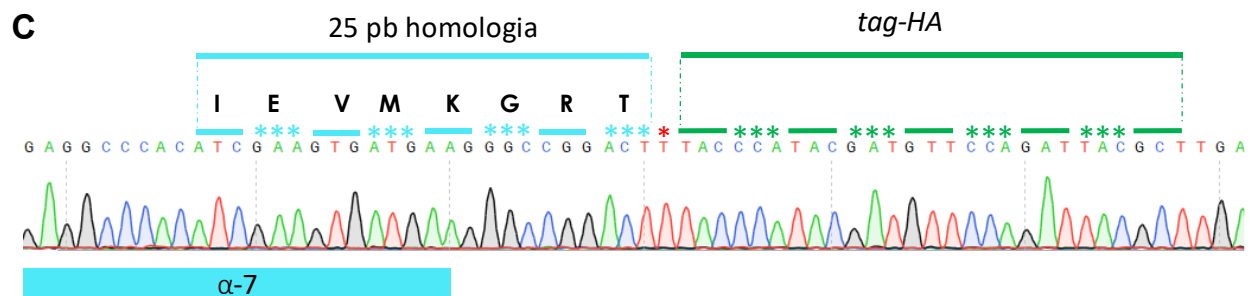
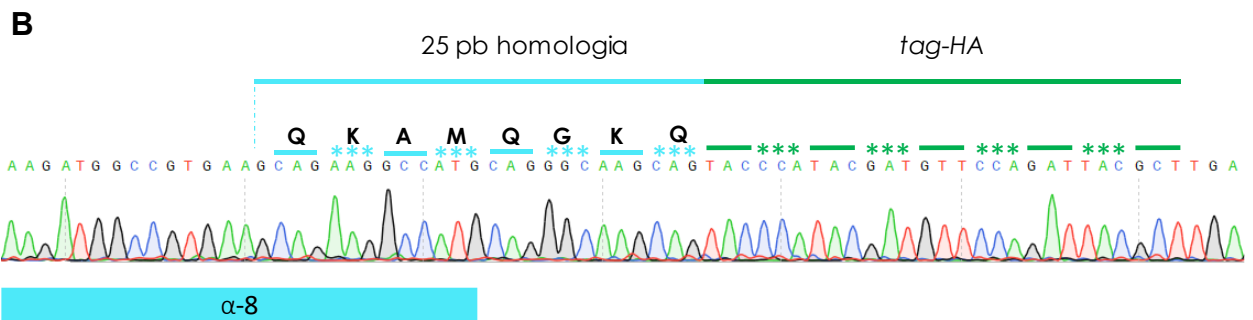
L1 - RH Δ KU80/GRA17 Δ 156-239/HA [Δ A6-8]

L2 - RH Δ KU80/GRA17 Δ 188-239/HA [Δ A7-8]

L3 - RH Δ KU80/GRA17 Δ 224-239/HA [Δ A8]

L4 - RH Δ KU80/GRA17^{HXGPRT+}/GRA17^{HA}

L5 - RH Δ KU80/ Δ HXPRT



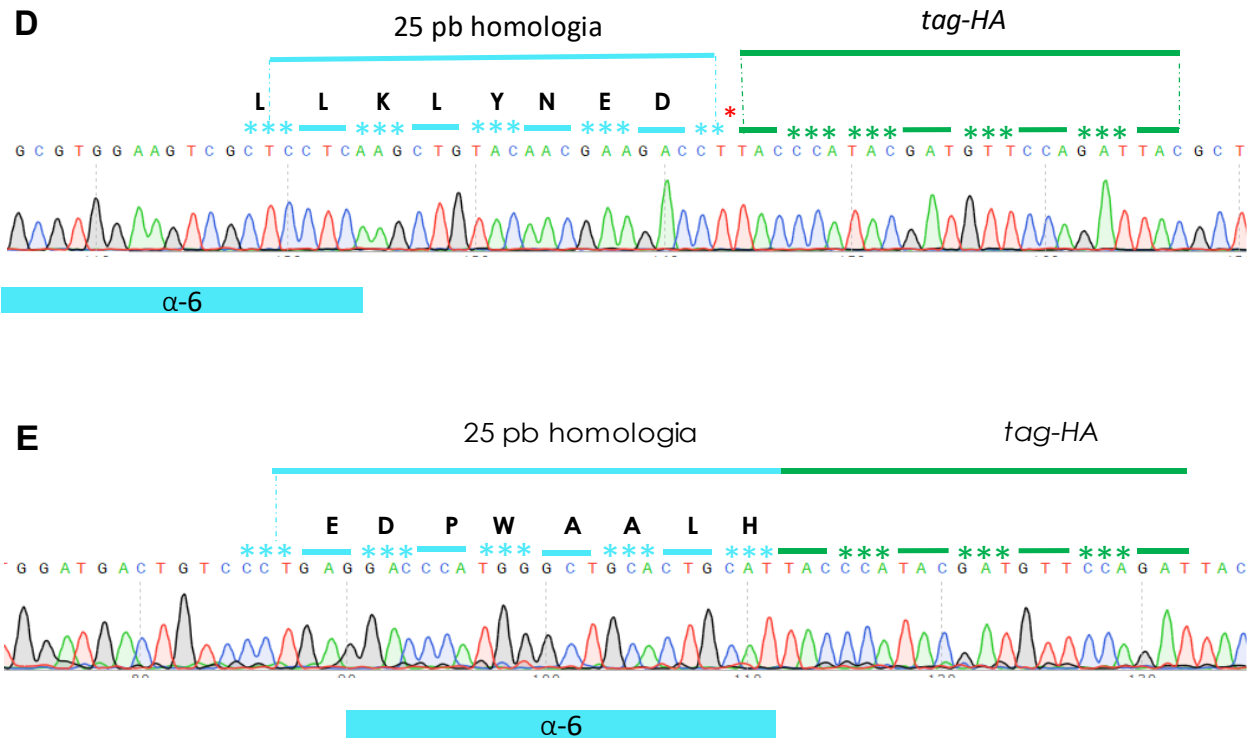
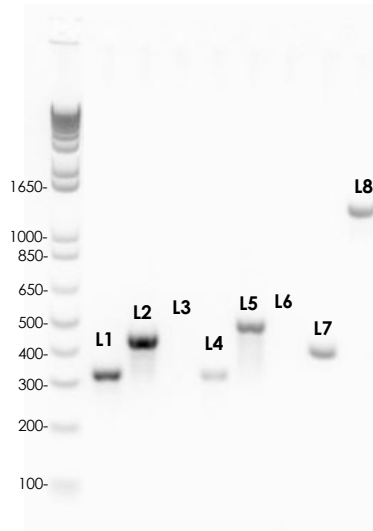
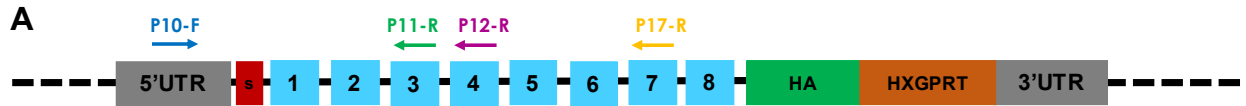


Figura 5. Diagnóstico dos clones com truncamento C-terminal. (A) O DNA genômico dos clones $RH\Delta KU80/^{GRA17\Delta 156-239/HA}$ [$\Delta\alpha 6-8$]; $RH\Delta KU80/^{GRA17\Delta 188-239/HA}$ [$\Delta\alpha 7-8$]; $RH\Delta KU80/^{GRA17\Delta 224-239/HA}$ [$\Delta\alpha 8$]; $RH\Delta KU80/^{GRA17HXGPRT+/GRA17HA}$ Foi amplificado utilizando os primers P13-F e P13-R. (B-E) Os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento do *locus* modificado. (C) * Asterisco vermelho demonstra um nucleotídeo (T) antes da sequência codificadora de HA, o que provocou um deslocamento no quadro de leitura de HA. (D) * Asterisco vermelho acusa a falta de um nucleotídeo para completar o códon, o que provocou um deslocamento no quadro de leitura de HA.



1Kb Plus DNA ladder

L1 - $\Delta\alpha 1 - \alpha 2$ [P10-F+P11-R]

L2 - WT [P10-F +P11-R]

L3 - Controle negativo

L4 - $\Delta\alpha 1 - \alpha 3$ [P10-F + P12-R]

L5 - WT [P10-F + P12-R]

L6 - Controle negativo

L7- $\Delta\alpha 1 - \alpha 6$ [P10-F+P17R]

L8- WT [P10-F+P17R]

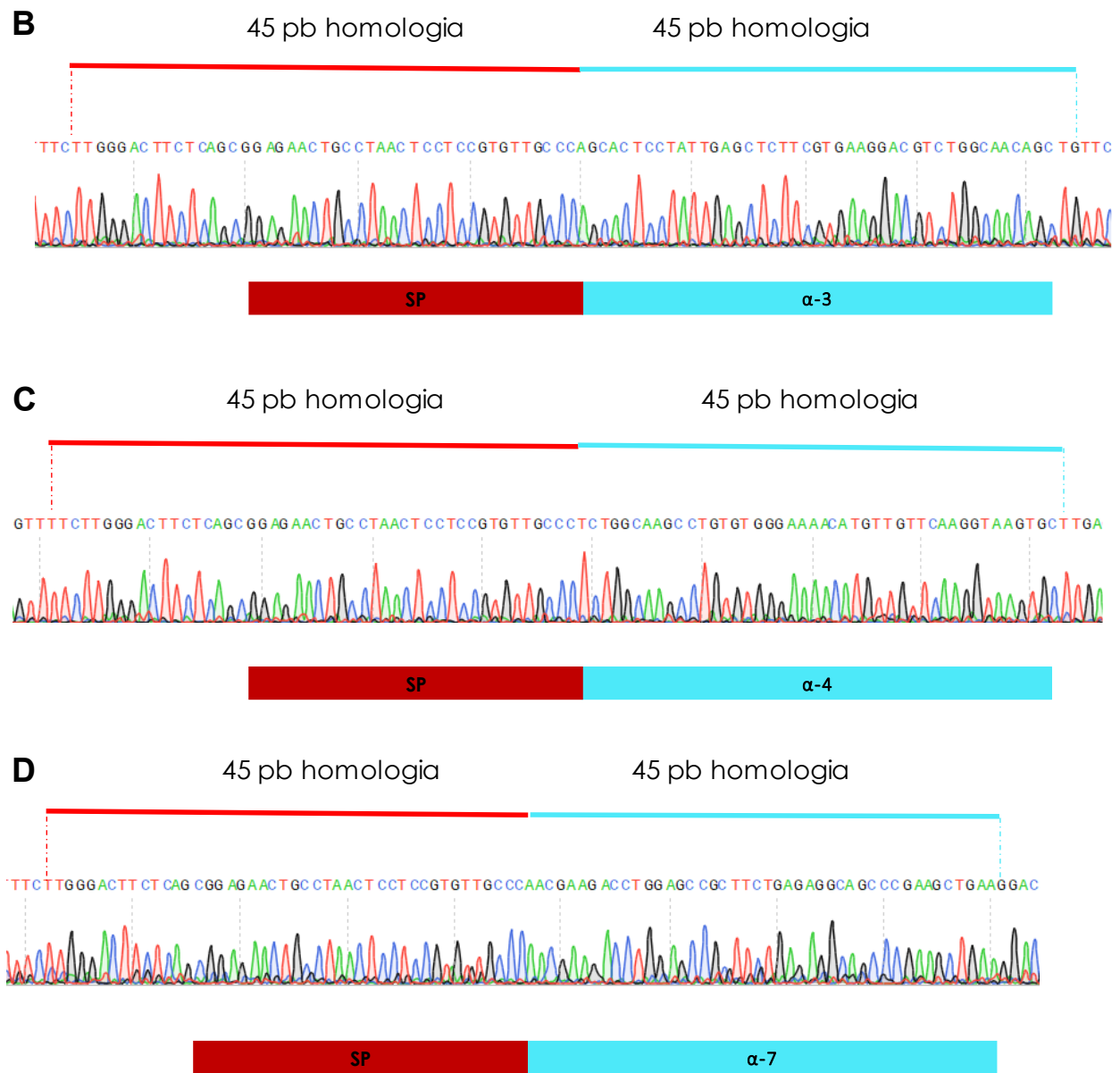


Figura 6. Diagnóstico dos clones com truncamento N-terminal. (A) O DNA genômico proveniente dos clones RHΔKU80/HXGPRT^{+/GRA17Δ34-69HA+} [Δα1-2]; RHΔKU80/HXGPRT^{+/GRA17Δ34-87HA+} [Δα1-3]; RHΔKU80/HXGPRT^{+/GRA17Δ34-173HA+} [Δα1-6] foram submetidos a reação da PCR utilizando os primers P10-F e P11-R; P10-F e P12-R; P10-F e P17-R, respectivamente. Os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento do *locus* modificado.

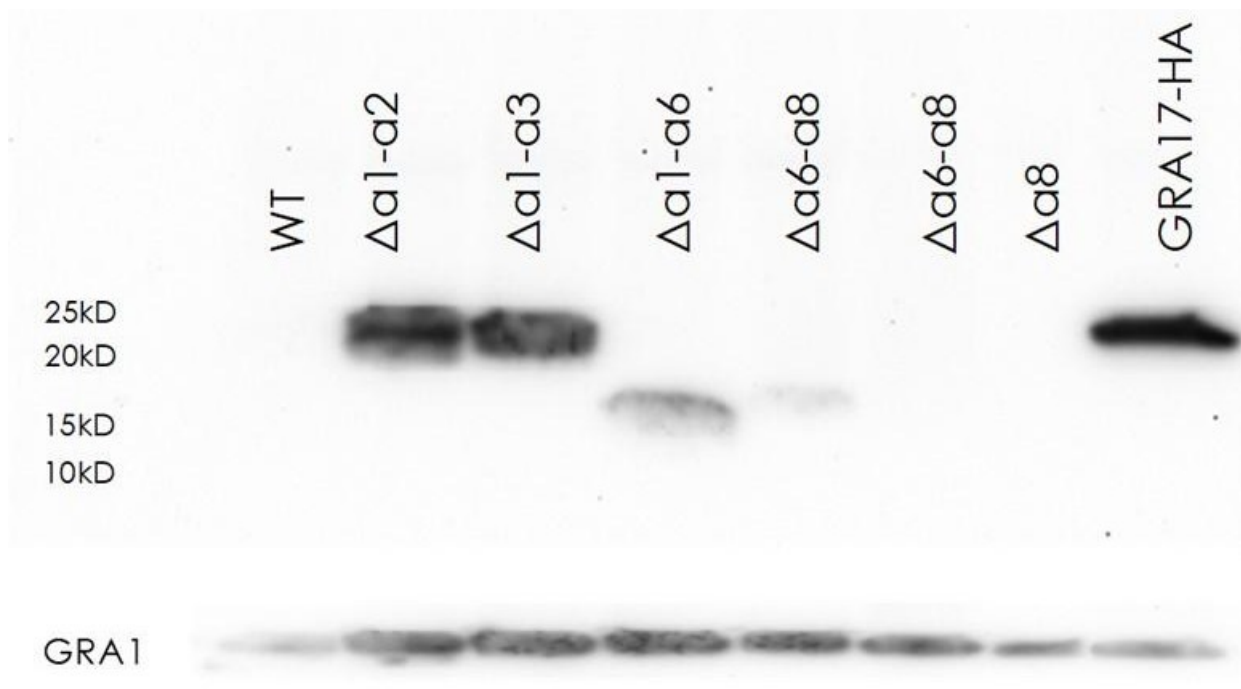


Figura 7. Expressão de GRA17-HA por Western blot. Células HFF plaqueadas em placas de 6 poços foram infectadas com os clones indicado (MOI 3-5), por 24 horas. As células contendo parasito intracelular foram lisadas e adicionadas ao gel de poliacrilamida 4-15%, pré-moldado. Após a separação, as proteínas foram transferidas para a membrana PVDF. A membrana foi incubada com os anticorpos primários [Rato anti-HA (1:500); camundongo anti-GRA1 (1/2000)] *overnight*, sob agitação. A membrana foi incubada com os anticorpos secundários [IgG de Cabra anti-rato - HRP (1:3000); IgG de cabra anti- camundongo - HRP (1/2000)], por 1 hora à temperatura ambiente. As bandas foram reveladas com o substrato ECL.

4.5. O truncamento na porção N-terminal da GRA17 é mais deletério para o crescimento e viabilidade do parasito em comparação a porção C-terminal.

O nível de expressão da GRA17 está diretamente relacionado com a viabilidade e a taxa de proliferação do parasito. Alta expressão de GRA17 aumenta significativamente a proliferação de taquizoítos, enquanto a deleção de GRA17 diminui a proliferação, provavelmente devido a diminuição do acesso ao conteúdo nutricional. Para testar o efeito do truncamento proteico na viabilidade (número de placas) e na taxa de crescimento do parasito (área das placas), células HFF foram plaqueadas em placas de 24 poços e infectadas com 100 taquizoítos dos clones $RH\Delta KU80^{HXGPRT+}/GRA17^{HA+}$ e $RH\Delta KU80^{HXGPRT+}/GRA17\Delta 224-239^{HA+}$. Devido à baixa viabilidade dos

parasitos com truncamento N-terminal ($RH\Delta KU80/HXGPRT+/GRA17\Delta 34-69HA^+$, $RH\Delta KU80/HXGPRT+/GRA17\Delta 34-87HA^+$, $RH\Delta KU80/HXGPRT+/GRA17\Delta 34-173HA^+$) ou com truncamento na porção C-terminal, que inclui α -hélice 6 ($RH\Delta KU80/HXGPRT+/GRA17\Delta 156-239HA^+$) e 7 ($RH\Delta KU80/HXGPRT+/GRA17\Delta 188-239HA^+$), utilizamos 1000 taquizoítos para infecção de HFF, como uma estratégia compensatória. Após 5 dias de incubação o número e a área das placas foram mensurados. Apesar de termos utilizado em torno de 10x mais taquizoítos dos clones expressando GRA17 truncada, o número de placas formados são inferiores aos da cepa controle $RH\Delta KU80/HXGPRT+/GRA17HA^+$ (Fig. 8 A). Os clones contendo truncamento N-terminal, apresentam uma diminuição na viabilidade, em torna de 25X inferiores ao controle. Além disso, os clones com truncamento N-terminal apresentaram uma diminuição na viabilidade de $\sim 6X$ em relação aos clones com truncamento C-terminal e 3X inferiores, em relação a cepa $\Delta GRA17$. Já o clone com truncamento no domínio α -8 não apresenta alteração na viabilidade (Fig. 8 A). Quanto a taxa de proliferação, os clones com truncamento na porção N-terminal também apresentaram menor taxa de proliferação comparada a cepa controle e com truncamento C-terminal. Curiosamente, o clone $\Delta\alpha$ -8 possui maior taxa de crescimento do que o próprio parasito controle (Fig. 8 B). Este fato sugere que o domínio α -8 possa atuar como um domínio regulador da GRA17, uma vez que na sua ausência, a taxa de proliferação do parasito é aumentada, fenótipo que também é observado após a superexpressão da GRA17. Em resumo, o quadro 1 apresenta as principais alterações observadas após o truncamento de diferentes domínios α -hélices da proteína GRA17.

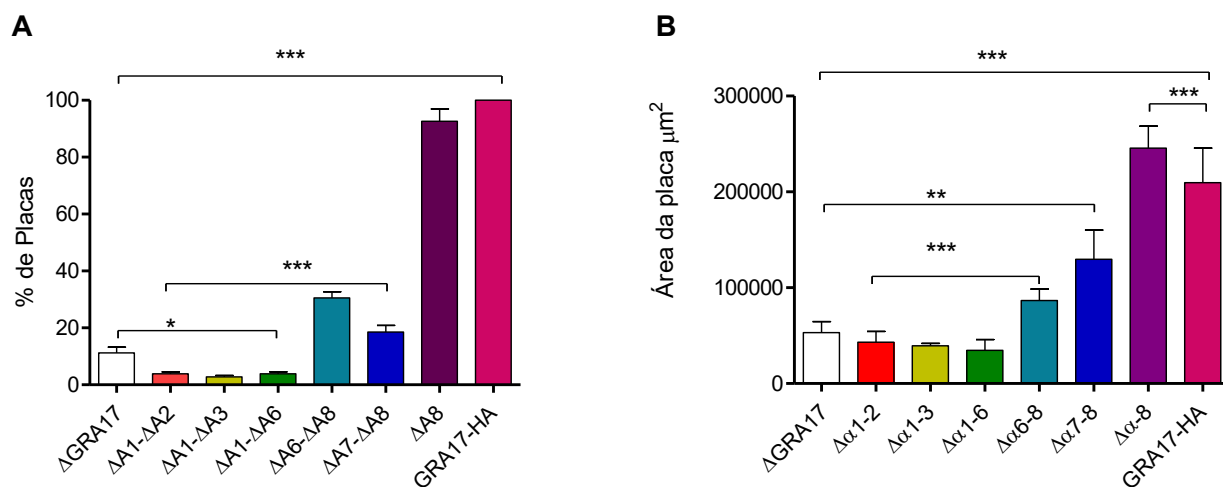


Figura 8. Viabilidade e taxa de crescimento dos clones mutantes. Células HFF foram plaqueadas em placas de 24 poços e infectadas com 100 taquizoítos das cepas RH Δ KU80^{HXGPRT⁺/GRA17HA⁺} (controle) e $\Delta\alpha$ -8 e com 1000 taquizoítos dos clones $\Delta\alpha$ 7-8; $\Delta\alpha$ 6-8; $\Delta\alpha$ 1-2; $\Delta\alpha$ 1-3 e $\Delta\alpha$ 1-6. Todas as placas foram incubadas por 5 dias a 37°C e 5 % de CO₂. As imagens foram capturadas por uma câmera digital (CoolSNAP EZ; Roper Scientific) conectada a um microscópio invertido de fluorescência eclipse Ti-S (Nikon) e o software NIS-Elements (Nikon) foi usada para realizar as análises. Resultados de 4 experimentos independentes. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0.001.

Cepa	Presença de bolha	Localização MVP	Crescimento
WT	Não	Sim	++++
Δ GRA17	Sim	Não	++
Δ A1-A2	Sim	Parcial	+
Δ A1-A3	Sim	Parcial	+
Δ A1-A6	Sim	Não	+
Δ A6-A8	Sim	Não	+++
Δ A7-A8	Sim	?	+++
Δ A8	Não	?	+++++

Quadro 1. Resumo das principais alterações observadas após o truncamento dos domínios α -hélices da proteína GRA17.

5. Discussão

Residir no interior de um vacúolo que não interage com outros componentes intracelulares do hospedeiro, pode oferecer a *T. gondii* uma certa proteção contra os mecanismos efetores do hospedeiro. No entanto, *T. gondii* depende da célula hospedeira para a aquisição de aminoácidos como triptofano e arginina, colesterol, purinas, entre outros nutrientes essenciais (COPPENS, 2014). A MVP é uma interface física entre o parasito e a célula hospedeira, durante o seu crescimento intracelular, que dificulta o sequestro desses nutrientes. Para garantir a sua sobrevivência, o parasito precisava enfrentar as dificuldades impostas por essa barreira. *T. gondii* supera esse obstáculo secretando proteínas de grânulos densos e roptrias, que se associam a MVP, modulando a sua permeabilidade e permitindo o transporte de nutrientes, subprodutos metabólicos e moléculas efectoras.

Estudos iniciais demonstrando que a MVP de *T. gondii* é seletivamente permeável, permitindo a difusão passiva de moléculas pequenas para o interior do VP, provavelmente através de poros na membrana do VP, levantaram as primeiras questões sobre os mecanismos de transporte através da membrana do VP (SCHWAB; BECKERS; JOINER, 1994). No entanto, a identidade molecular dos poros que conferem essa permeabilidade, permaneceu desconhecida até a identificação de GRA17. (GOLD et al., 2015). GRA17 é uma proteína secretada que se associa a MVP, muito provavelmente formando poros na membrana, que permitem o fluxo de moléculas pequenas através dessa membrana. O transporte de moléculas entre o citosol do hospedeiro e o VP desempenha um papel crítico no crescimento e sobrevivência de taquizoítos. Sua redução pode resultar na restrição de nutrientes ou incapacidade de eliminar subprodutos metabólicos tóxicos. O papel da GRA17 nesse fluxo foi demonstrado por Gold e colaboradores, que baseados em experimentos de inclusão de corantes fluorescentes de tamanho definidos, reforçam a ideia de que a MVP de *T. gondii* é seletivamente permeável. A permeabilidade é drasticamente reduzida após a deleção da GRA17. Na ausência de GRA17, o VP apresenta uma dilatação exagerada que lhe confere o formato de uma bolha e instabilidade estrutural.

A filmagem da proliferação de taquizoítos, *in vitro*, demonstra que durante o curso da infecção alguns desses vacúolos se rompem espontaneamente. Os taquizoítos Δ GRA17 diminuem o ritmo de proliferação, *in vitro*, e se tornam avirulentos, *in vivo*. A comprovação de que esses

efeitos são resultados da deleção de GRA17 provém do resgate de todos esses fenótipos, pela reintegração da GRA17 no parasito Δ GRA17 ou pela complementação da cepa *Knockout* com EXP2 de *Plasmodium*. Além disso, a superexpressão da GRA17, tanto na cepa do tipo I quanto na cepa do tipo II, aumenta a proliferação do parasito, sugerindo que os nutrientes captados pelo parasito via GRA17 pode ser um fator limitante para o crescimento normal do parasito (GOLD et al., 2015). No entanto, o mecanismo através do qual GRA17 medeia o transporte dessas moléculas é desconhecida. Experimentos de modelagem sugerem que esse transporte possa ser mediada pela formação de poros na MVP, semelhantes a oligomerização da hemolisina E, uma toxina em *E. coli* que forma poros na membrana da célula hospedeira ou similarmente às moléculas α -helicoidais formadoras de poros como as colicinas (PARKER; FEIL, 2005; DE KONING-WARD et al., 2009; DE KONING-WARD et al., 2016; HAKIMI; OLIAS; SIBLEY, 2017).

Assim como muitas outras classes de proteínas formadoras de poros, a GRA17 possui uma alta predição de estruturas α -hélices na sua composição. A ausência de qualquer outro motivo que sugere algum papel funcional, indica que essas estruturas α -hélice possam atuar mediado a função proteica, no transporte de moléculas através da PVM. Neste trabalho, estabelecemos o modelo da estrutura secundária da GRA17, através da análise comparativa dos resultados preditos por três plataformas online (*SOPMA*, *JPRED4* e *PCI-SS0*). Foram identificados 8 domínios α -hélices, os quais foram nomeados de α 1- α 8 (Fig. 2A, B). Com o objetivo de caracterizar funcionalmente esses domínios e determinar a sua participação na função proteica, utilizamos CRISPR/CAS9 para a truncamento dos mesmos, gerando assim clones expressando diferentes combinações da proteína GRA17 truncada (Fig. 3 A-I e Fig. 4 A-I). Apesar da avaliação do envolvimento desses domínios na função proteica ser feita de forma indireta (ex: presença de vacúolos bolhas), ela é altamente fidedigna pois o fenótipo apenas é observado em situações na qual a GRA17 perde completamente a função. Nem mesmo as modificações gênicas, que resultam em baixa expressão de GRA17 ou na deleção de GRA23 (outra homóloga da EXP2 expressa em *T. gondii*), são capazes de desencadear o surgimento de vacúolos no formato de bolhas.

Os clones contendo truncamento na porção C e N-terminal da GRA17 foram utilizados na infecção de células HFF e submetidos ao ensaio de IFA. Imagem oriundas da reação revelam que a truncação dos domínios C-terminal (Fig. 3H) e N-terminal (Fig. 4 B, E, H) interferem na

localização de GRA17. A proteína continua sendo expressa, mas perde a sua forte localização na MVP. Os resultados demonstram que a deficiência na localização é menos agravante nos dois clones que possuem apenas pequenas deleções na porção N-terminal (Fig. 4B e E). É possível identificar uma pequena co-localização entre a GRA17 e a GRA7 na MVP. Esse fenótipo é completamente perdido após o truncamento da porção C-terminal, ou de uma longa porção que abrange tanto domínios N-terminal, quanto uma parte da porção C-terminal (Fig. 3H e 4E). Os resultados sugerem um maior envolvimento do domínio C-terminal na ancoragem da proteína na MVP. Enquanto, o domínio N-terminal medeia o transporte através da membrana. Isso porque, apesar do truncamento N-terminal resultar em menor impacto na localização proteica, a viabilidade e a proliferação do parasito é seriamente afetada.

Uma grande variedade de toxinas utiliza suas estruturas α -hélices para a formação de poros na membrana celular. Tomando como exemplo a colicina A, descobriu-se que a sua cadeia polipeptídica de 204 aminoácidos forma dez α -hélice, que são arranjados em uma estrutura de três camadas. Uma parte da estrutura (α -8 e α -9) são inseridas inteiramente na camada lipídica, enquanto outras se associam à superfície da membrana (PARKER et al., 1989; PARKER et al., 1992; HOLM; SANDER, 1993). Esse modelo foi testado por várias abordagens experimentais, por exemplo, a introdução de pontes dissulfídicas entre as hélices 1 e 9, hélices 5 e 6 e hélices 9 e 10, respectivamente, produziram moléculas inativas, a menos que as pontes fossem quebradas por agente redutor (DUCHE et al., 1994).

Os nossos dados seriam mais conclusivos se não tivéssemos comprometido a expressão da GRA17 nos clones $\Delta\alpha$ -8 e $\Delta\alpha$ -7-8. Ademais, estudos adicionais serão necessários para determinar se o acúmulo da GRA17 no citoplasma do parasito observado nas imagens, é uma consequência na falha da exportação para a MVP ou uma deficiência na ancoragem da mesma, em consequência o parasito acaba sintetizando mais GRA17, que é observado no citoplasma do parasito.

No entanto, independentemente da sua localização da GRA17, imagem do parasito vivo (Fig. 3F, I e Fig. 4C, F, I) demonstram que os domínios α 1-7 são indispensáveis no desempenho da função da GRA17. Os seus respectivos truncamentos resultam na instabilidade da MVP e surgimento de vacúolos bolhas, uma característica associada a deficiência no transporte de moléculas através da MVP, após a deleção de GRA17. Atualmente, trabalhamos para descobrir se

a função desses domínios é apenas estrutural (associação com a MVP e formação de poros) ou na interação com outras proteínas. Uma vez que, o nosso grupo identificou, através de ensaios de imunoprecipitação, que assim como EXP2, GRA17 também forma complexos proteicos associados a MVP (dado não apresentado). Atualmente, estamos trabalhando na identificação dessas proteínas, para determinar se possuem componentes similaridade ao complexo de transporte de *Plasmodium* (PTEX), ou são formados por componentes diferentes. Ademais, utilizaremos os clones gerados aqui para testar a habilidade de formação desses complexos macromoleculares na MVP. Esses resultados podem nos informar se os domínios α -hélice estão envolvidos, ou não, na formação desses complexos.

GRA17 é ortóloga à EXP2 de *Plasmodium* e essas proteínas são conservadas apenas entre os membros do filo apicomplexa, que residem no interior do VP. Enquanto em *Plasmodium* EXP2 atua no transporte de proteínas através da MVP e sua deleção é letal para o parasito, GRA17 parece não atuar no transporte de proteínas em *T. gondii*, mas no transporte de moléculas através da MVP (GOLD et al., 2015). No entanto, o argumento utilizado para desconsiderar o envolvimento de GRA17 no transporte de proteína merece uma reconsideração. Gold e colaboradores, testaram apenas o transporte de duas proteínas (GRA16 e GRA24), que trafegam para o núcleo da célula hospedeira, modulando diferentes vias de sinalização.

A escolha dessas proteínas reside no fato da localização nuclear das mesmas, aumentar com o decorrer da infecção, atingindo o pico máximo 20 horas após a infecção (BOUGDOUR et al., 2013; BRAUN et al., 2013). Isso indica que essas proteínas são exportadas através da MVP, após a formação do VP, o que implica a necessidade de uma maquinaria especializada para a translocação através da MVP. Devido a homologia existente entre GRA17 e EXP2, os pesquisadores extrapolaram que a função seria a mesma. Como a deleção da GRA17 não alterou a migração dessas proteínas para o núcleo das células hospedeiras, foi concluído que a GRA17 não estaria envolvida no transporte de proteínas e sim, no transporte de moléculas através da MVP.

Alguns fatores influenciaram a precipitação desses pesquisadores em descartar o envolvimento de GRA17 no transporte proteico. A primeira é que antes da identificação da GRA16 e GRA24 se tinha uma ideia de que as proteínas de grânulos densos eram secretadas durante e após a invasão, mas possuíam uma ação local, na modulação do ambiente vacuolar (HAKIMI;

BOUGDOUR, 2015). Com a descoberta da capacidade de translocação dessas proteínas para o núcleo hospedeiro, vinculada ao fato da existência de poucos estudos sobre o transporte através da MVP em *T. gondii*, idealizou-se a existência de um mecanismo universal de exportação, baseado no modelo básico visto em *Plasmodium*. Porém, estudos subsequentes demonstraram que o mecanismo de transporte em *T.gondii* é mais diversificado, com a existência de maquinarias de exportação especializadas para diferentes classes de carga proteica (HAKIMI; BOUGDOUR, 2015; CURT-VARESANO et al., 2016; HAKIMI; OLIAS; SIBLEY, 2017).

O transporte de GRA16 e 24 depende de uma maquinaria de transporte especializada, envolvendo a proteína MYR1. Esta proteína secretada é clivada pela TgASP5 (um homólogo da plasmepsina 5 de *Plasmodium*) em duas porções estáveis que são encontradas no VP e na MVP. A MYR1 parece estar envolvida apenas no transporte de proteínas de grânulos densos que trafegam para o núcleo das células hospedeira. Na deficiente de MYR1, apenas a exportação de GRA16, GRA24 e TgIST são prejudicadas, ao passo que MAF1 e GRA15 não são afetadas (FRANCO et al., 2016). A análise filogenética revelou que nenhum homólogo de MYR1 foi detectado em *Sarcocystis*, *Eimeria* e *Plasmodium* se restringindo apenas ao subconjunto de coccídios formadores de cistos teciduais (FRANCO et al., 2016). Recentemente, foi demonstrado que MYR1 forma complexo com MYR2 e MYR3, e juntos medeiam o transporte de GRA16 e GRA24 para a células hospedeira (MARINO et al., 2018). Estes novos dados revelam a diversidade de mecanismos de exportação presente nesse filo. Portanto, a possibilidade da GRA17 estar envolvida no transporte de outras classes de proteínas não pode ser descartada sem a argumentação ou comprovação adequada.

Para testar o envolvimento dos domínios α -hélices preditos para GRA17 na viabilidade e replicação do parasito, utilizamos o sistema CRISPR/CAS9 para a truncação dos domínios α -8 (Δ 224-239), α -7-8 (Δ 188-239), e α -6-8 (Δ 156-239) correspondentes a porção C-terminal e os domínios α -1-2 (Δ 34-69); α -1-3 (Δ 34-87); α -1-6 (Δ 34-173) correspondentes a porção N-terminal. Os clones resultantes foram utilizados para a infecção de monocamadas de HFF em placas de 24 poços, para a avaliação do número e da área das placas formadas. Utilizamos como controle do experimento, a cepa RH Δ KU80^{HXGPRT+/GRA17HA+} que não possui nenhum comprometimento na sequência codificadora do gene. Contrariando os demais fenótipos, o truncamento do domínio α -8 aumenta significativamente a taxa de proliferação do parasito. Esse resultado nos leva a crer que

o domínio α -8 possa atuar, de alguma forma, na regulação negativa da expressão de GRA17. Após a sua deleção a taxa de proliferação do parasito aumenta, da mesma forma que acontece com taquizoítos da cepa do tipo I e tipo II, que superexpressam GRA17. A superexpressão de GRA17 nesses parasitos aumenta a taxa proliferação, o que implica que o excesso de GRA17 acelera o crescimento do parasito (GOLD et al., 2015).

O truncamento dos demais domínios resulta numa redução drástica redução na taxa de proliferação parasitária, com destaque para os clones com truncação nos domínios N-terminal (Fig. 8B). Os clones expressando GRA17 contendo o domínio N-terminal truncado apresentam uma deficiência na proliferação idêntica ao parasito com a deleção total da proteína GRA17. Esses clones proliferam em torno de 5X menos em comparação com cepa parental. Seguindo a mesma ideia de que a ação da GRA17 está diretamente relacionada a proliferação do parasito, provavelmente devido ao acesso nutricional, esses resultados demonstram que os domínios N-terminal estão diretamente envolvidos na função transportadora da GRA17. Já nos clones com truncamento nos domínios C-terminal, o efeito na taxa de proliferação é reduzido em torno de 2X em comparação com a cepa controle.

Quanto a viabilidade do parasito, o clone $\Delta\alpha$ -8 não apresenta nenhum comprometimento na taxa de sobrevivência, enquanto os demais clones apresentaram uma redução significativa na viabilidade (Fig. 8A). A viabilidade desses clones é tão baixa que para realização do ensaio de placa foi necessário utilizar 10X mais parasito (1000 parasitos/poço) do que o clone controle e $\Delta\alpha$ -8 (100 parasitos/ poço). Os resultados demonstram uma redução em torno de 25X na viabilidade dos clones com truncamento N-terminal e \sim 4X nos clones com truncamento C-terminal, em relação ao controle. Curiosamente os clones com truncamento N-terminal apresentam uma redução na viabilidade de \sim 6X em relação aos clones com truncamento C-terminal e \sim 3X a cepa Δ GRA17. Esses resultados confirmam a importância da GRA17 na sobrevivência e proliferação do parasito e então de acordo com a nossa hipótese de que os domínios N-terminais estão diretamente envolvidos na função efetora da GRA17, enquanto a porção C-terminal talvez tenha uma função estrutural, mas indispensável para o funcionamento proteico. Percebemos que, apesar do maior comprometimento das estruturas α - hélices da porção N-terminal, ambas (C e N-terminal) são indispensáveis na ação da GRA17.

O fato do truncamento N-terminal resultar em menor viabilidade que a deleção total da GRA17, pode estar associado com o mecanismo compensatório da ausência da GRA17. A análise do sequenciamento do genoma inteiro demonstra que na ausência de GRA17 existe um aumento no nível de expressão de GRA23. Apesar da ausência de GRA23, em cepas que expressam GRA17 funcional, não resultar nos mesmos fenótipos da ausência da GRA17, a deleção das duas proteínas é letal para o parasito. Foi possível deletar GRA23 em uma cepa que expressa baixos níveis de GRA17, mas não em cepas com deleção total da GRA17. Além disso, a superexpressão de GRA23 na cepa Δ GRA17 resgata parcialmente os fenótipos da deleção de GRA17, sugerindo que o GRA17 e o GRA23 operam sinergicamente. Esses dados demonstram que GRA23 pode atuar como um mecanismo compensatório, mas insuficiente para resgatar o impacto da ausência da GRA17 (GOLD et al., 2015). Nossos dados de reação de *western blotting* (Fig. 7) demonstram que, apesar da deficiência funcional da GRA17 nos clones com a porção N-terminal truncada, o nível de expressão da proteína é muito alto. A alta expressão da GRA17 nos clones pode atuar inibição os mecanismos compensatórios, como por exemplo o aumento da expressão de GRA23. É possível que a alta expressão da proteína GRA17 com defeito funcional seja capaz de inibir a expressão de GRA23, comprometendo a sobrevivência do parasito a um nível superior ao observado na cepa Δ GRA17, que devido à ausência total da GRA17 pode usufruir dos benefícios dos mecanismos compensatórios.

6. Tabela 1

Código tese	Nome	Sequência	Uso
P1-F	DHFR5'UTR_Sense	CAGCACGAAACCTTGCATTCAAAC	Gerar construto PCR1
P1-R	GRA2_3'UTR_antisense	TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTGA GACTACGACGAAAGTGATGCGC	Gerar construto PCR1
P2-F	PCR2_GRA17_CTerm_F	GCAGAAGGCCATGCAGGGCAAGCAGTA CCCATACGATGTT	Adicionar tag-HA em GRA17
P2-R	PCR2_GRA17_CTerm_R	ACCTCGCTCTGTGAGGGTGCGAACCCAGC ACGAAACCTTG	Adicionar tag-HA em GRA17
P3-F	PB_GRA17_A1_Forward	AACTGCCAACTCCTCCGTGTTGCCTACCC ATACGATGTT	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P3-R	PB_GRA17_A1_reverse	TCATATTTGTCAACGCTTCCACCTTCAGCA CGAAACCTTG	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P4-F	PB_GRA17_A2_Forward	AAAAACTATGCGGAAGTCGCAAGGTACC CATACGATGTT	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P4-R	PB_GRA17_A2_reverse	GCCAGATTTATGGAACAGCTGTTGCCAGCA CGAAACCTTG	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P5-F	PB_GRA17_A3_Forward	CTTCGTGAAGGACGTCTGGCAACAGTACC CATACGATGTT	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P5-R	PB_GRA17_A3_reverse	GGTGTCCGATCATACTGCCAACTTCAGC ACGAAACCTTG	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P6-F	PB_GRA17_A4_Forward	TGAGGACCCATGGGCTGCACTGCATTACC CATACGATGTT	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P6-R	PB_GRA17_A4_reverse	CTTCGGGCTGCCTCTCAGAAGCGGCCAGC ACGAAACCTTG	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P7-F	PB_GRA17_A5_Forward	TGAGGACCCATGGGCTGCACTGCATTACC CATACGATGTT	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P7-R	PB_GRA17_A5_reverse	TCTCCAGGTCCTTCAGCTTCGGGCTCAGC ACGAAACCTTG	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P8-F	PB_GRA17_A6_Forward	TCCTCAAGCTGTACAACGAAGACCTTACC CATACGATGTT	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P8-R	PB_GRA17_A6_reverse	ATCTGCGGATCGTCGCCAGCTTCGACAGC ACGAAACCTTG	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17

P9-F	PB_GRA17_A7_Forward	ATCGAAGTGATGAAGGGCCGGACTTTACC CATACGATGTT	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P9-R	PB_GRA17_A7_reverse	GCTTGCCCTGCATGGCCTTCTGCTTCAGCA CGAAACCTTG	Flanquear o construto ao <i>locus</i> GRA17
P10-F	TGGT1_065990 F	CGGGCAGTTGCCCTTTCACGTTT	GRA17- 5'UTR
P11-R	PB_GRA17_A2_NTER_R	GGCGACTTCCGCATAGTTTTT	Dentro de GRA17- α 2
P12-F	PB_intra_A3_F	GTGAAGGACGTCTGGCAACAG	Dentro de GRA17- α 3
P12-R	PB_GRA17_A3_NTER_R	CTGTTGCCAGACGTCTTCA	Dentro de GRA17- α 3
P13-F	PB_GRA17_Sq_primerF	GAACTGAGGCACTTCTGTATG	Dentro de GRA17- α 4
P13-R	IntraHXGPRT antisense	GATCCAGACGTCTTCAATGC	Dentro de HXGPRT
P14-R	PB_GRA17_A4_NTER_R	TGAACAACATGTTTTCCAC	Dentro de GRA17- α 4
P15-R	PB_GRA17_A5_NTER_R	CCACCACTCACGAAATAGC	Dentro de GRA17- α 5
P16-R	PB_GRA17_A6_NTER_R	TACAGCTTGAGGAGCGACTT	Dentro de GRA17- α 6
P17-R	PB_GRA17_A7_NTER_R	TTCATCACTTCGATGTGGGC	Dentro de GRA17- α 7
P18-F	GRA17_A1_NTER_gRNA1F	AAGTTGACGGGCAACACGGAGGAGTG	Truncamento N- terminal GRA17
P18-R	GRA17_A1_NTER_gRNA1 R	AAAACACTCCTCCGTGTTGCCGTCA	Truncamento N- terminal GRA17
P19-F	PB_GRA17_gRNA_A1_F	AAGTTGTCGCCGCTGACGGCGATGGG	Truncamento N- terminal GRA17
P19-R	PB_GRA17_gRNA_A1_R	AAAAC CCATCGCCGTCAGCGGCGAC-A	Truncamento N- terminal GRA17
P20-F	PB_GRA17_gRNA_A2_F	AAGTT-GTCCTTCACGAAGAGCTCAA-G	Truncamento N- terminal GRA17
P20-R	PB_GRA17_gRNA_A2_R	AAAAC-TTGAGCTCTTCGTGAAGGAC-A	Truncamento N- terminal GRA17
P21-F	PB_GRA17_gRNA_A3_F	AAGTTGAACAACATGTTTTCCACAG	Truncamento N- terminal GRA17
P21-R	PB_GRA17_gRNA_A3_R	AAAAGTGGGAAAACATGTTGTTCA	Truncamento N- terminal GRA17
P22-F	PB_GRA17_gRNA_A4_F	AAGTTGGTCTTCGTTGTACAGCTTGG	Truncamento N- terminal GRA17
P22-R	PB_GRA17_gRNA_A4_R	AAAACCAAGCTGTACAACGAAGACCA	Truncamento N- terminal GRA17
P23-F	PB_GRA17_gRNA_A5_F	AAGTTGGTCTTCGTTGTACAGCTTGG	Truncamento N- terminal GRA17
P23-R	PB_GRA17_gRNA_A5_R	AAAACCAAGCTGTACAACGAAGACCA	Truncamento N- terminal GRA17
P24-F	PB_GRA17_gRNA_A6_F	AAGTTGAGAGGCAGCCCGAAGCTGAG	Truncamento N- terminal GRA17
P24-R	PB_GRA17_gRNA_A6_R	AAAAGTCAAGCTTCGGGCTGCCTCTCA	Truncamento N- terminal GRA17
P25-F	PB_GRA17_gRNA_A7_F	AAGTTGGACTTCTAACATGGTTCCTG	Truncamento N- terminal GRA17

P25-R	PB_GRA17_gRNA_A7_R	AAAACAGGAACCATGTTAGAAGTCCA	Truncamento N-terminal GRA17
P26-F	PB_GRA17_gRNA_3'UTR_F	AAGTTGAGGCGGTTTCGCACCCTCACG	Truncamento N-terminal GRA17
P26-R	PB_GRA17_gRNA_3'UTR_R	AAAACGTGAGGGTGCGAACCGCCTCA	Truncamento N-terminal GRA17
P27-F	GRA17_A1_NTER_DonorF	<u>TTGGGACTTCTCAGCGGAGA</u> <u>ACTGCCTAACTCCTCCGTGTT</u> <u>GCCCGCTGACGGCGATGGC</u> GCCAAAACTATGCGGAAGT CGCCAAGGTGG	DNA de reparo N-terminal
P27-R	GRA17_A1_NTER_DonorR	CCACCTTGCGACTTCCGCA TAGTTTTTGGCGCCATCGCC GTCAGCGGGCAACACGGA GGAGTTAGGCAGTTCTCCG CTGAGAAGTCCCAA	DNA de reparo N-terminal
P28-F	GRA17_A2_NTER_DonorF	<u>TTGGGACTTCTCAGCGGA</u> <u>GAAGTGCCTAACTCCTCC</u> <u>GTGTTGCCAGCACTCCTA</u> TTGAGCTTTCGTGAAGGA CGTCTGGCAACAGCTG	DNA de reparo N-terminal
P28-R	GRA17_A2_NTER_DonorR	CAGCTGTTGCCAGACGTC CTTCACGAAGAGCTCAA TAGGAGTGCTGGGCAACA CGGAGGAGTTAGGCAGTT CTCCGCTGAGAAGTCCCAA	DNA de reparo N-terminal
P29-F	GRA17_A3_NTER_DonorF	<u>TTGGGACTTCTCAGCGGAG</u> <u>AACTGCCTAACTCCTCCGTG</u> <u>TTGCCCTTGCCAAGCCTGT</u> GTGGGAAAACATGTTGTTC AGGTAAGTGCT	DNA de reparo N-terminal
P29-R	GRA17_A3_NTER_DonorR	AGCACTTACCTGAACAA CATGTTTTCCACACAGGC TTGCCAGAGGGCAACACG GAGGAGTTAGGCAGTTC TCCGCTGAGAAGTCCCAA	DNA de reparo N-terminal
P30-F	GRA17_A4_NTER_DonorF	<u>TTGGGACTTCTCAGCGGAGAA</u> <u>CTGCCTAACTCCTCCGTGTTGC</u> <u>CCAACGAAGACCTAGAGCCGCTT</u> <u>CTGAGAGGCAGCCCCGAAGCTGAAG</u>	DNA de reparo N-terminal
P30-R	GRA17_A4_NTER_DonorR	CTTCAGCTTCGGGCTGCCTCTCA GAAGCGGCTCTAGGTCTTCGTTG GGCAACACGGAGGAGTTAGGCA GTTCTCCGCTGAGAAGTCCCAA	DNA de reparo N-terminal

Capítulo II

Identificação de proteínas de *T. gondii* envolvidas na ativação do inflamassoma e controle da infecção em BMDMs de rato Lewis

1. Introdução

A principal função do sistema imune é a manutenção da homeostase do organismo. O sistema imune deve ser capaz de detectar e reparar o dano ao tecido estéril, que ocorre após um trauma. Os patógenos invasores devem ser eliminados, enquanto a nossa microbiota deve ser tolerada. Os vertebrados desenvolveram dois sistemas complementares para detectar e eliminar patógenos. O sistema imune inato, composto por células e moléculas estrategicamente posicionadas que respondem imediatamente na defesa contra os agentes invasores. A resposta imune inata geralmente é suficiente para a eliminação do patógeno. No entanto, se os mecanismos da imunidade inata não forem suficientes para controlar a infecção, os mecanismos efetores da imunidade adaptativa são ativados. As principais células da imunidade adaptativa são os linfócitos T e B. Os receptores de antígenos destes linfócitos são gerados através de rearranjo gênico somático e hipermutação, que permite a geração de um repertório virtualmente infinito de receptores de antígenos. Então, o sistema imune adaptativo possui o potencial de reconhecer, de forma específica, qualquer tipo de microrganismo. Em contraste, a imunidade inata é caracterizada por sua capacidade de reconhecer uma ampla gama de patógenos, como vírus, bactérias e fungos, através de variedade limitada de receptores de linhagem germinativa denominados, receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002; BRUBAKER et al., 2015; HUBER-LANG; LAMBRIS; WARD, 2018).

Os PRRs são expressos por muitos tipos de células, incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos e células epiteliais, e permitem a detecção precoce de patógenos diretamente no local da infecção. Esses receptores podem ser ativados, principalmente, por duas classes de moléculas. Padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), que são moléculas simples e padrões regulares de estruturas celulares conservadas. Os PAMPs estão presentes em muitos microrganismos, mas não em células de mamíferos. Geralmente as estruturas reconhecidas pelos receptores inatos são vitais para a sobrevivência dos microrganismos. Isso garante que esses alvos não sejam descartados pelo microrganismo na tentativa de evadir ao reconhecimento pelo hospedeiro. Exemplos desses padrões alvos da imunidade inata incluem, RNAs de fita dupla (cruciais para a replicação de muitos vírus), lipopolissacarídeo e ácido lipoteicoico, que são importantes componentes da parede celular de bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente. Outra classe de moléculas reconhecidas pelos PRRs são os padrões moleculares

associados a danos (DAMPs), que são moléculas endógenas produzidos ou liberados por células danificadas e que não deveriam estar presentes em tecidos saudáveis. Alguns exemplos de DAMPs são: Proteínas do grupo box1 de alta motilidade (HMGB1), proteínas S100, cristais de ácido úrico e metabólitos de purina como ATP extracelular (YIN et al., 2015; LISTON; MASTERS, 2017).

A primeira classe de PRRs identificada foram os receptores semelhantes a *toll* (TLRs) e isso redefiniu a história da imunidade inata. Antes da descoberta dessa família de receptores transmembrânicos evolutivamente conservados, a imunidade inata era vista como uma parte não sofisticada do sistema imune, com a principal função, a ativação dos mecanismos sofisticados da imunidade adaptativa. A caracterização dos TLRs forneceu uma nova visão sobre os mecanismos de ação da imunidade inata e também estimulou pesquisas que levaram a descoberta de novas classes de receptores da imunidade inata. Um dos grandes achados nessa área foi a identificação de uma família de PRRs citosólico denominados NLRs (receptores semelhantes ao domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos -NOD). Os membros dessa família de receptores compartilham um domínio central NACHT (domínio de ligação de nucleotídeo, também conhecida como NOD) e uma região C-terminal contendo repetição rica em leucina (LRR). Já foram identificados 22 membros dessa família em humano e 34 em camundongos, que são divididos em quatro subfamílias, com base na porção N-terminal (requerida para a tradução de sinal) (TING et al., 2008; SCHRODER; TSCHOPP, 2010; BRYANT; MONIE, 2012). Os membros do grupo NLRP (também chamada de NALP) contêm um domínio pirina (PYD) na região N-terminal. Os membros do grupo NOD contêm domínios de ativação e recrutamento de caspases (CARD). Os membros do IPAF também contêm um domínio CARD, mas são distintos dos membros NOD. Os membros NAIP possuem três domínios BIR.

As proteínas contendo CARD são capazes de ligar diretamente as caspases. Já as proteínas contendo PYD são incapazes de ligar as caspases diretamente e requerem uma proteína adaptadora, *speck-like* associada à apoptose contendo um CARD (ASC conhecido também como PYCARD), que contém tanto o domínio PYD quanto CARD (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013; STEWART; COOKSON, 2016). Diferentes membros da família NLR, incluindo as proteínas contendo os domínios NACHT, LRR e PYD (NLRP-1, NLRP-3) e proteína contendo o domínio CARD (NLRC-4), atuam como sensores capazes de formar complexos macromoleculares conhecido como inflamassoma canônico. Além dos membros da família NLR, um membro da família de proteínas

PYHIN, ausente no melanoma 2 (AIM2) também é capaz de ativar o inflamassoma (ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015; BROZ; DIXIT, 2016). Esses sensores variam nos tipos de ligantes (DAMPs e PAMPs) que reconhecem e nos seus modos de ativação. Apesar das diferenças nos mecanismos de ativação, os sensores seguem o mesmo caminho geral. Após o reconhecimento de um ligante, os sensores oligomerizam em um complexo multiprotéicos, formando o inflamassoma (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). A pró-caspase-1 inativada é recrutada para este complexo, onde sofre a ativação proteolítica. Após a sua ativação, a caspase-1 se torna apta a clivar dois de seus substratos, a pró-IL-1 β e a pró-IL8. A pró-IL-18 é constitutivamente expressa nas células mieloides (PUREN; FANTUZZI; DINARELLO, 1999). Já a expressão de pró-IL-1 β deve ser induzida através da ativação do fator de transcrição NF- κ B. O LPS (um agonista do TLR4), é muito utilizado na indução de pró-IL-1 β (etapa conhecida como *priming*) (GUO; CALLAWAY; TING, 2015). A clivagem dessas citocinas leva à sua ativação e liberação das células. A IL-1 β está envolvida na inflamação local, recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e a indução da produção de IFN- γ pelos neutrófilos e células *natural killer* (NK). A IL-18 estimula a produção de IFN- γ pelas células NK e células T (DINARELLO, 1996; VAN DE VEERDONK et al., 2011; ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015). A ativação da caspase-1 também pode ser acompanhada por uma forma programada de morte celular, denominada piroptose (FINK; COOKSON, 2005). A caspase-11 também desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro. Essa caspase é ativada diretamente pelo reconhecimento de LPS citoplasmático (SHI et al., 2014). A ativação da caspase-11 também induz a piroptose. A piroptose é um tipo de morte celular, que resulta na ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular pró-inflamatório, que atuam como DAMPs ativando as células vizinhas e impedindo a replicação de patógenos intracelulares (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009; MIAO et al., 2010). As caspases-1/11 utilizam a gasdermina D como substrato para a indução de piroptose (KAYAGAKI et al., 2011; HE et al., 2015; KAYAGAKI et al., 2015).

1.1.Utilização de ratos como modelo de estudo para *T. gondii*.

O modelo mais utilizado para o estudo de *Toxoplasma* é o camundongo. Este modelo é importante para a elucidação das vias envolvidas na interação patógeno-hospedeiro que ocorrem naturalmente, já que roedores são hospedeiros naturais. No entanto, para o estudo da toxoplasmose em humanos, este pode não ser o melhor modelo. Os seres humanos são hospedeiros acidentais e

a toxoplasmose geralmente é assintomática em indivíduos imunocompetentes. Ao contrário, camundongos imunocompetentes são relativamente susceptíveis a infecção, apresentando perda de peso, letargia e outros sintomas, durante a infecção aguda. Assim como os seres humanos, os ratos também são resistentes à infecção por *T. gondii*. Infecções com altas doses de cepas virulentas em camundongos, não resultam nos sintomas observados em camundongos e desencadeiam o desenvolvimento de uma infecção crônica e assintomática. No entanto, existem níveis variados de resistência entre as linhagens de ratos. A infecção nos ratos da linhagem Fischer (CDF) e Brown Norway (BN) é caracterizada pela alta produção de anticorpos e desenvolvimento de cistos no cérebro e no tecido muscular (SERGENT et al., 2005; CAVAILLES et al., 2006). Já a linhagem Lewis representa um caso peculiar. A infecção de ratos Lewis com *T. gondii* resulta na total eliminação do parasito, sem desenvolvimento de uma resposta mediada por anticorpos e falha no desenvolvimento de cistos (SERGENT et al., 2005; CAVAILLES et al., 2006). Cirelli e colaboradores demonstraram que essa resistência é mediada pela ativação de NLRP1, com alta produção de IL-1 β e IL-18 e indução piroptose. O rato Lewis expressa uma variante do gene *NLRP1*, que reconhece *T. gondii* e induz a lise de células infectadas, impedindo a replicação do parasito (CIRELLI et al., 2014). No entanto, os alvos envolvidos na ativação de NLRP1 não foram identificados. Neste trabalho, utilizamos um ensaio de mutagênese química para identificar três proteínas secretadas de grânulos densos TGGT1_226380 (GRA35), TGGT1_237015 e TGGT1_236870, que individualmente estão envolvidas na ativação de NLRP1 e indução de piroptose. A deleção dessas proteínas resulta na inibição da piroptose em BMDMs oriundas de rato Lewis. Uma busca mais detalhada dos clones gerados pelo ensaio, revela que fatores adicionais podem estar envolvidos na indução de piroptose. A família da GRA35 é composta por três outras proteínas (TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970). A deleção dessas proteínas não altera a capacidade de indução de piroptose em BMDMs, o que demonstra que estas proteínas não estão envolvidas na indução de piroptose.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Identificar fatores de *T. gondii* envolvidos na ativação de NLRP1 e indução de piroptose em BMDMs de rato Lewis.

2.2. Objetivos específicos

Utilizar o ensaio de mutagênese química para identificar clones que não induzem piroptose em BMDMs de Lewis.

Determinar os genes candidatos envolvidos na ativação de NLRP1, através da triagem *in silico*, e sequenciamento do genoma.

Deleção e complementação de GRA35, TGGT1_237015 e TGGT1_236870 para averiguar a capacidade de indução de piroptose em BMDMs.

Busca por novos alvos envolvidos na indução de piroptose.

Deleção de três proteínas membros da família GRA35 (TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970) para determinar o seu envolvimento na indução de piroptose.

3. Materiais e métodos

3.1. Diferenciação de Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs)

Após a eutanásia, os ratos foram pulverizados com álcool 70% e os fêmures/tíbias foram obtidos e dissecados. Foi realizado um corte na articulação fêmoro-tibial, e na articulação coxo-femoral, sem danificar as epífises e ossos foram transferidos para tubos de 15 ml com meio DMEM incompleto. Em uma câmara de fluxo laminar, os ossos foram colocados em álcool 70% por 1 minuto e as epífises foram cortadas com o auxílio de tesoura e pinça estéreis. Os ossos foram lavados com o auxílio de uma seringa contendo meio RPMI 1640 incompleto e uma agulha de 26G de diâmetro. A suspensão celular obtida foi centrifugada e ressuspensa em meio de diferenciação composta por:

- RPMI incompleto (50%)
- Soro fetal bovinos (20%)
- Meio condicionado de células L929, LCCM (30%).

A suspensão celular foi distribuída igualmente em placas de Petri (volume final/placa = 9 ml) e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Quatro dias após a incubação, foi adicionado mais 9 mL do mesmo meio de diferenciação/placa e as placas foram mantidas na estufa a 37° e 5% CO₂ por mais 3-4 dias. No sétimo-oitavo dia, o sobrenadante das placas de Petri foi descartado e 5 mL de PBS estéril gelado foi adicionado em cada placa. As placas foram incubadas a 4°C por 10-15 minutos. Os macrófagos foram então removidos (jatos utilizando P1000). Por fim as células foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos e o pellet obtido foi ressuspensa em meio RPMI 10%, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de cultura de 24/96 poços de fundo chato e aderente.

3.2. Ensaio de mutagênese química e seleção de clones incapazes de ativar o inflamassoma

Taquizoítos da cepa RH/GFP intracelulares foram tratados com 40 μ M de N-etil-N-nitrosourea (ENU), 100 μ M de Metanosulfonato de etilo (EMS) ou dimetilsulfóxido (DMSO), por 4 horas. A cultura foi lavada 3X com PSB, as células hospedeiras foram lisadas e os parasitos foram utilizados para infectar novas células HFF. Para a seleção, BMDM derivados do rato Lewis foram infectados com a população parasitária (MOI 0.2-0.3), por duas horas. Para a remoção de parasitos extracelulares a cultura foi lavada 3X com PSB. Foi adicionado ao meio de cultura 30mg/ml de sulfato de dextrano. Depois de 24 horas de infecção, os parasitos extracelulares foram removidos através de cinco lavagens com PBS. Após a lise de células hospedeiras este processo foi repetido por 9X. Em seguida, a população foi clonada em placas de 96 poços, por diluição limitante. A cultura dos clones individuais foi lavada com PBS e filtradas (filtro Millipore 5 μ m) para a remoção de células hospedeiras. O DNA genômico do parasito foi isolado utilizando o Kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit, seguidos as orientações do fabricante. O RNA dos clones foi isolado utilizando o kit Qiagen RNeasy Mini Kit. O sequenciamento realizado no Illumina HiSeq 2000 or MiSeq. Os Reads foram alinhados utilizando a cepa GT1 (v9.0) como genoma de referência.

3.3. Geração de cepas *knockout* e complementação gênica

O *Knockout* dos genes candidatos foi realizado usando CRISPR-CAS9. Resumidamente, os oligos utilizados como gRNA (tabela 1) para cada deleção, foram clonados no vetor pSS013, após a digestão com a enzima de restrição *BsaI*. Após a purificação, o plasmídeo expressando os gRNA foi transfectado, juntamente com o DNA de reparo (plasmídeo pLoxP-DHRF-mCherry ou pTKOatt linearizados) na cepa parental RH Δ HXGPRT. Depois de 24 horas, a população foi selecionada com 10 μ M de pirimetamina ou com M/X (50 μ g/ml ácido micofenólico e 50 μ g/ml xantina) e clonada por diluição limitante. A complementação dos genes deletados foi feito pela clonagem do gene e sua região promotora (~2000 pb que antecedem o códon de início) no vetor pENTER- TOPO (invitrogen) e posterior no plasmídeo pTKOatt. Antes da transfecção o plasmídeo foi linearizado, utilizando uma enzima de restrição com um único sítio de corte. A confirmação das inserções foi feita por PCR e posterior sequenciamento.

3.4. Ensaio de viabilidade celular

A taxa de indução de piroptose foi avaliada por um método colorimétrico, capaz de determinar a percentagem de células viáveis em cultura. BMDMs provenientes de ratos Lewis foram plaqueadas em placas de 96 poços por 24 horas e infectados com taquizoítos (MOI 0.5-3). Após 24 horas de infecção, as células foram incubadas com o composto de tetrazólio MTS (20 µl/poço), por 2 horas a 37°C. As células viáveis são capazes de converter o substrato no produto formazano colorido, o que resulta na geração de um sinal proporcional ao número de células viáveis presentes. Já as células mortas perdem a capacidade de converter o substrato no produto. O corante formazan foi quantificado medindo a absorbância a 490 nm, no espectrofotômetro.

3.5. Ensaio de placas

As células HFF foram plaqueadas em placas de 24 poços e infectadas com 100 taquizoítos e incubadas por 5 dias a 37°C. As imagens foram capturadas por uma câmera digital (CoolSNAP EZ; Roper Scientific) conectada a um microscópio invertido de fluorescência eclipse Ti-S (Nikon) e o software NIS-Elements (Nikon) foi usada para determinar a área das placas.

3.6. Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Para determinar a normalidade das amostras foram utilizados os testes Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors, Shapiro-Wilks e D'Agostino and Pearson omnibus. A diferença estatística entre os grupos foi analisada pelo teste paramétrico ANOVA. O teste de comparação múltipla de Bonferroni, foi utilizado para examinar comparações entre pares de grupos selecionados. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$ (*).

4. Resultados

4.1. Ensaio de mutagênese resulta em clones que falham na ativação do inflamassoma

O nosso grupo de pesquisa demonstrou que a resistência do rato Lewis a infecção por *T. gondii* é mediada pela ativação de NLRP1 e indução rápida da morte da célula hospedeira por piroptose (CIRELLI et al., 2014). Com o intuito de identificar fatores de *T. gondii* envolvidos na ativação de NLRP1 e indução de piroptose, foi realizado um ensaio de mutagênese química, com o objetivo de enriquecer a população incapaz de induzir piroptose. Cinco populações diferentes de taquizoítos da cepa RH/GFP, tratadas com ENU e EMS, foram utilizadas na infecção de BMDS de rato Lewis por duas horas. Os parasitos extracelulares foram lavados e foi adicionado meio novo contendo sulfato de dextrano (SD). Este composto age como um competidor de glicano e impede a invasão de células hospedeiras por parasitos extracelulares. Os parasitos que não sofreram mutações nos genes que sintetizam fatores envolvidos na indução de piroptose, são liberados de células lisadas, e, no sobrenadante, são recobertos com o sulfato de dextrano, que impede a invasão de novas células. Já os parasitos que sofreram mutações em genes envolvidos na indução de piroptose, continuam replicando no interior de células hospedeiras. Depois de 24 horas, os parasitos extracelulares foram removidos através da lavagem com PBS e os parasitos intracelulares continuaram se replicando até a sua saída natural dos macrófagos (Fig. 1A). Após nove ciclos de seleção, foi feita a clonagem das populações e os clones individuais foram testados quanto a sua capacidade de indução de piroptose. Um total de onze clones com defeito na indução de piroptose foram sequenciados. O resultado do sequenciamento demonstrou que várias dos clones eram idênticos. No final escolhemos focar em três clones, em que pelo menos 75% dos BMDMs sobrevivem à infecção, em contraste com a cepa WT, em que apenas 25% das células hospedeiras sobrevivem (Fig. 1B). Como esperado, a sobrevivência da célula hospedeira foi correlacionada à capacidade do parasito se replicar no interior do macrófago. Após 24 horas de infecção, 80% dos macrófagos sobreviventes infectados com parasitos de tipo selvagem continham apenas parasitos isolados, em comparação com as células infectadas com os clones mutantes, em que apenas 25% das células infectadas continham parasitos únicos (Fig. 1 B- painel à direita).

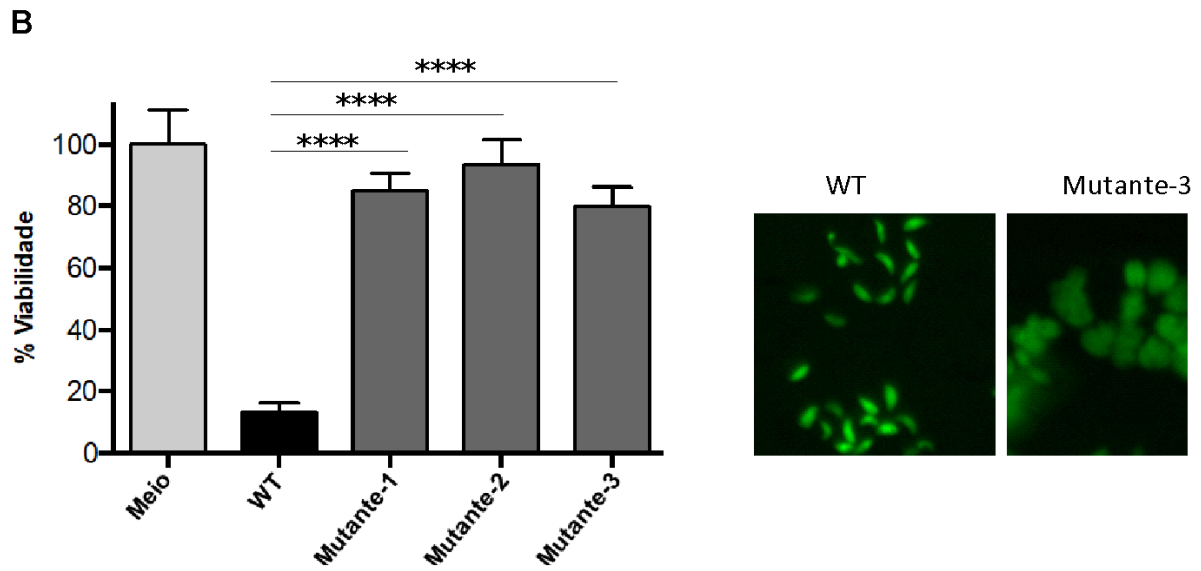
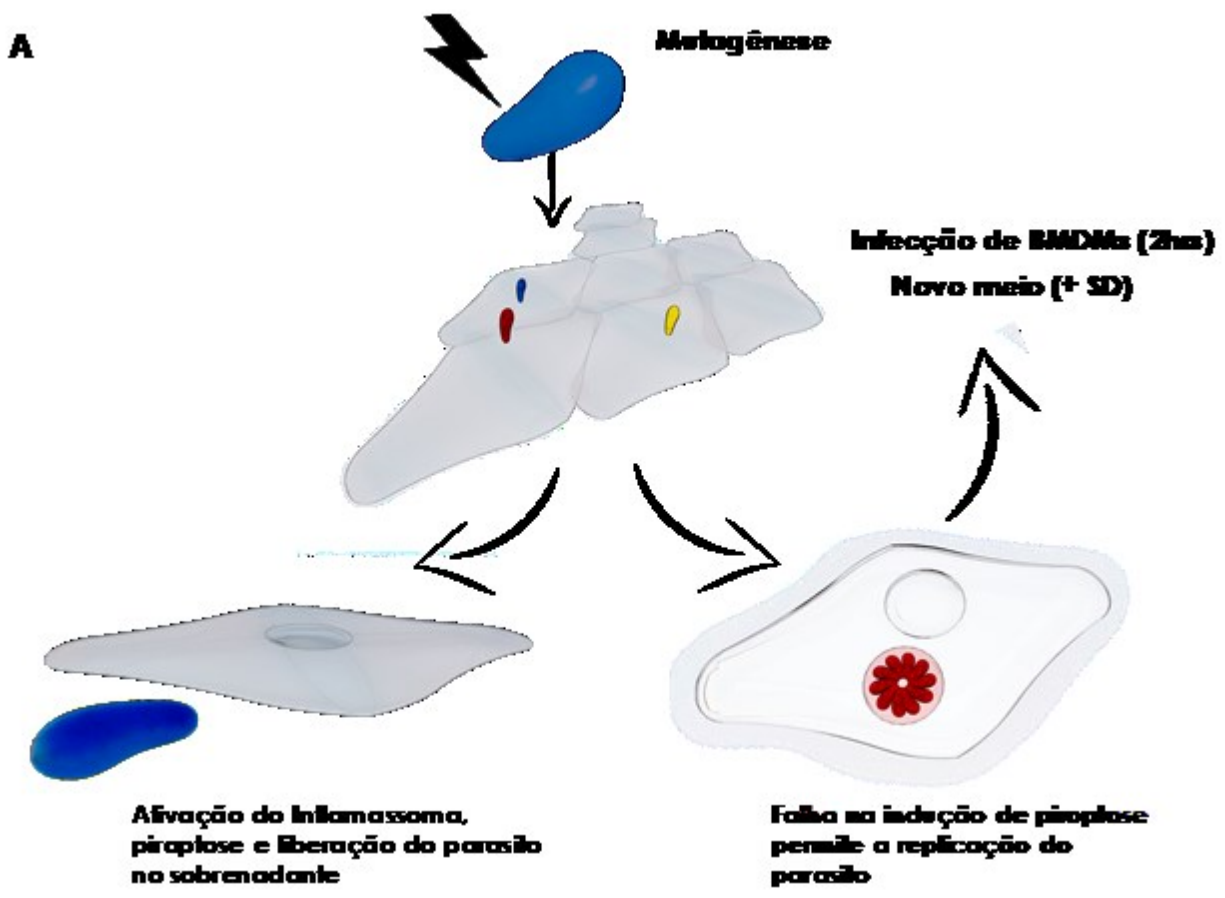


Figura 1. Isolamento de clones incapazes de induzir piroptose. (A) representação esquemática do ensaio de mutagênese química. (B) BMDMs de rato Lewis foram infectados com os clones mutantes indicados (MOI-1), por 24 horas. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada através do ensaio de viabilidade MTS. Os dados apresentados são a média de 7 experimentos independentes. Os valores são expressos como média, \pm desvio padrão. **** $p < 0.0001$. No painel à direita, imagens representativas de BMDMs infectados (24 hrs) com a cepa WT e o clone mutante-3.

4.2. Identificação de genes com mutação

O resultado da análise do genoma identificou pelo menos cinco mutações não-sinônimas em cada clone. Com a lista dos genes com mutação, foi utilizando alguns critérios de exclusão para facilitar a identificação de genes envolvidos na indução de piroptose. O inflamassoma é formado no citoplasma da célula, então a proteína de *T. gondii* que ativa NLRP1 possivelmente é secretado e interage com o citoplasma do hospedeiro. Foi feito uma triagem na lista, selecionando apenas genes cujos produtos proteicos expressam um peptídeo sinal. A informação de que diferentes cepas de *T. gondii* (RH, GTI, PA7, ME49, CEP, VEG, CASTELLS, MAS, GUY-KOE, GUY-MAT, GPHT, CAST, P89, GUY-DOS, WTD3) são capazes de induzir piroptose em BMDMs de rato Lewis (CIRELLI et al., 2014), sugere que os alvos da NLRP1 são expressos nessas cepas. Foi feito uma busca dos genes expressos em todas essas cepas. Utilizando esses critérios a lista de genes candidatos foi drasticamente reduzida. A deleção da maioria dos genes candidatos não resultou em alterações na viabilidade da célula hospedeira. No entanto, a deleção individual (CRISPR/CAS9) de três genes, TGGT1_226380 (GRA35), TGGT1_237015 e TGGT1_236870, resulta na inibição significativa da morte da célula hospedeira, em comparação com a cepa WT (Fig. 2A). Para confirmar que mutações nestes genes são responsáveis pela falha na ativação do inflamassoma, nos clones resultantes do ensaio de mutagênese, foi realizada a complementação destes clones, com um alelo WT de cada gene. Adição de GRA35, TGGT1_237015 e TgGT1_236870 nos seus respectivos mutantes foi suficiente para restaurar a habilidade desses clones em induzir a morte da célula hospedeira (Fig. 2B).

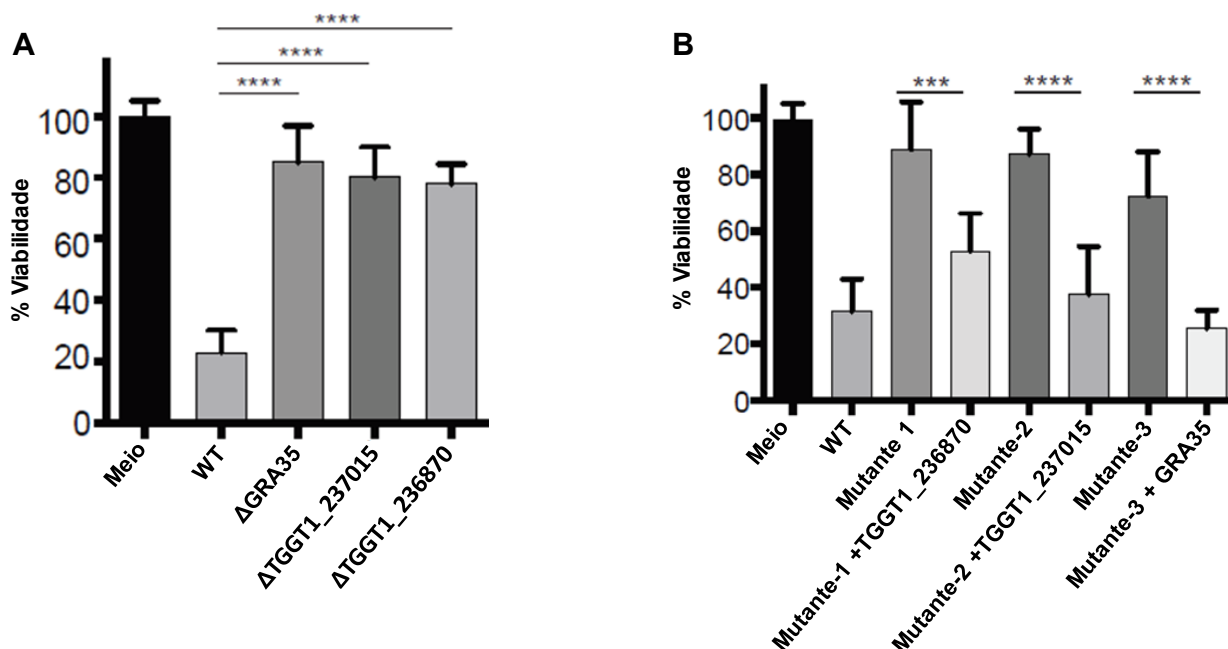


Figura 2. Três genes são individualmente necessários para a indução de piroptose. (A) CRISPR/CAS9 foi utilizado para gerar parasitos *knockout* para GRA35 TgGT1_237015 e TgGT1_236870. BMDMs de rato Lewis foram infectados com os parasitos indicados e a viabilidade celular foi determinado por ensaio MTS. (B) Após a reposição (CRISPR/CAS9) de uma versão funcional dos genes GRA35, TgGT1_237015 e TgGT1_236870 nas cepas mutantes, estes foram utilizados para a infecção de BMDMs (MOI-1), por 24 horas e a viabilidade dos macrófagos foi avaliada através do ensaio MTS. Os dados apresentados são a média de 3 experimentos independentes. Os valores são expressos como média, \pm desvio padrão. **** $p < 0.0001$.

4.3. Uma triagem adicional revela que outros fatores do parasito podem estar envolvidos na ativação do inflamassoma e indução de piroptose

Com o objetivo de averiguar se além da GRA35, TGGT1_237015 e TGGT1_236870 algum outro fator do parasito está envolvido na ativação de NLPR1 e indução de piroptose, 11 clones oriundos do ensaio de mutagênese com ENU e EMS, foram utilizados na infecção de BMDMs de rato Lewis. Todos os clones capazes de alterar de forma significativa a viabilidade celular, foram selecionados e as regiões codificadoras da GRA35, TGGT1_237015 e TGGT1_236870 foram amplificadas por PCR e sequenciadas. Com exceção do clone ENU 3.8, todos os demais clones apresentaram mutações em um destes três genes (Fig. 3). O fato de ENU 3.8 apresentar uma falha significativa na capacidade de induzir morte na célula hospedeira, mas não apresentar nenhuma

mutação nos genes GRA35, TGGT1_237015 e TGGT1_236870, sugere o envolvimento de outros fatores do parasito na ativação do inflamassoma.

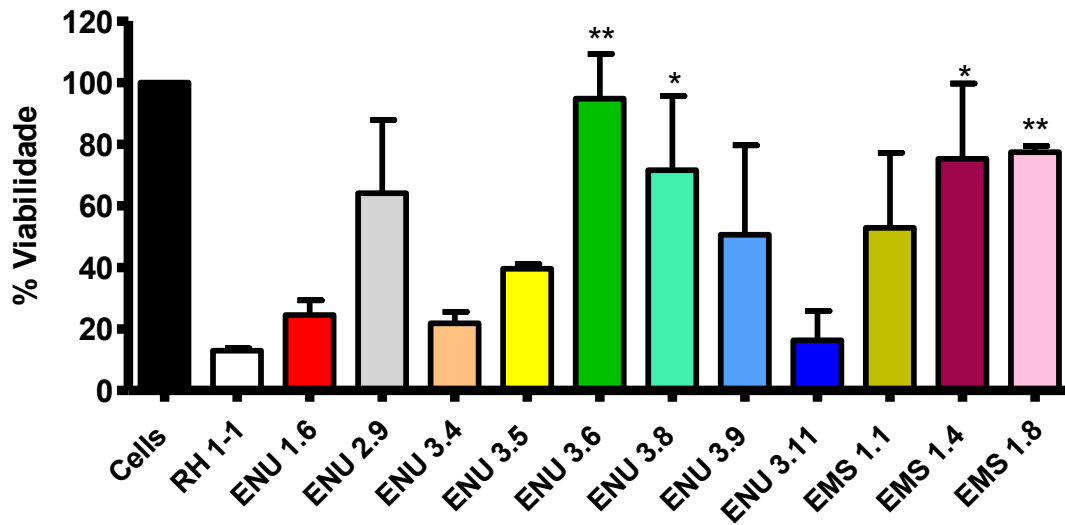


Figura 3. Triagem adicional de clones com deficiência na indução de piroptose. BMDMs de rato Lewis foram infectados com 11 clones individuais provenientes do ensaio de mutagênese (MOI 0.5), por 24 horas. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada através do ensaio MTS. Os dados apresentados são a média de 3 experimentos independentes. Os valores são expressos como média, \pm desvio padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.4. Deleção de três outros membros da família GRA35 demonstra que estes não participam na indução de piroptose em BMDMs de rato Lewis

A família GRA35 é composta por outras três proteínas (TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970). Cogitamos que essas proteínas, assim como a GRA35, poderiam estar envolvidas na ativação do inflamassoma. Para testar esta hipótese, utilizando CRIPR/CAS9 para deletar os genes TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970 na cepa RH. Os clones *knockout* resultantes foram utilizados na infecção de BMDMs de ratos Lewis. Após a deleção

individual de cada um desses genes, nenhuma alteração foi observada na indução de piroptose. Os clones RH Δ TGGT1_225160, RH Δ TGGT1_213067, RH Δ TGGT1_257970 causaram a morte de ~80% das células hospedeiras, enquanto mais de 80% das células hospedeiras permaneceram viáveis após a infecção com a cepa RH Δ GRA35. Para testar se a deleção destes genes comprometeria a taxa de proliferação do parasito, células HFF (em placas de 24 poços) foram infectadas com taquizoítos *knockout* para cada um dos genes por 5 dias. Não há alteração na taxa de crescimento dos clones *knockout* em relação aos controles (WT e Δ GRA35) (Fig. 4 B). O resultado demonstra que esses genes não estão envolvidos na proliferação do parasito, assim como GRA35, TGGT1_237015 e TGGT1_236870 (não apresentado).

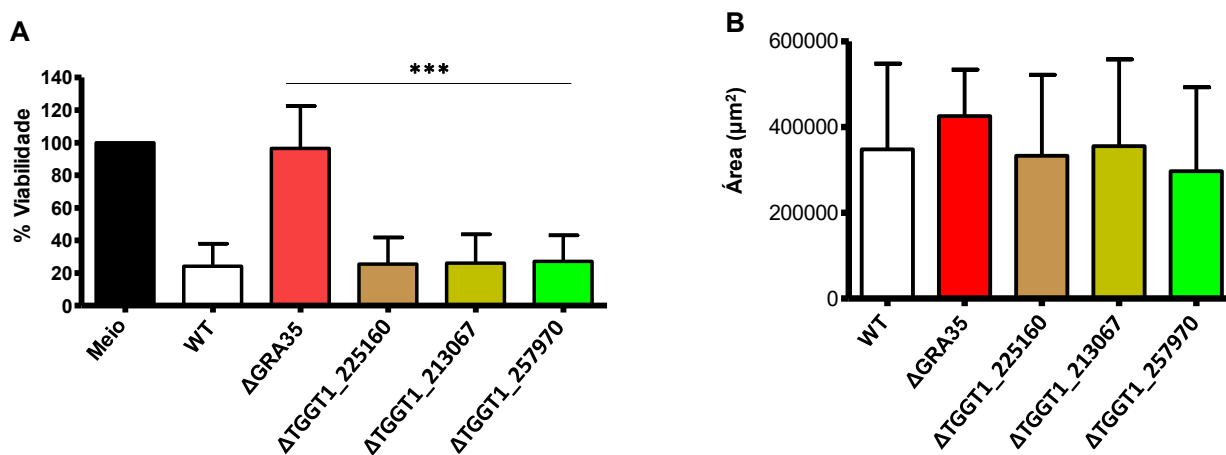


Figura 4. Os outros membros da família GRA35 não estão envolvidos na ativação do inflamassoma e na proliferação do parasito. BMDMs de rato Lewis foram infectados com taquizoítos da cepa RH *knockout* para TGGT1_225160, TGGT1_213067 e TGGT1_257970 (MOI 0.5), por 24 horas. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada através do ensaio MTS. (B) Células HFF em placas de 24 poços foram infectados com os clones indicados, por 5 dias. As imagens foram capturadas por uma câmera digital (CoolSNAP EZ; Roper Scientific) conectada a um microscópio invertido de fluorescência eclipse Ti-S (Nikon) e o software NIS-Elements (Nikon) foi usada para realizar as análises. Os dados apresentados são a média de 3 experimentos independentes. Os valores são expressos como média, \pm desvio padrão. *** $p < 0.001$.

5. Discussão

A imunidade inata desempenha um papel crucial na proteção do hospedeiro contra patógenos. A ativação da resposta imune inata ocorre após o reconhecimento de patógenos, seus produtos ou sinais de danos induzido por eles durante a infecção, através de receptores como TLR e NLR (BRUBAKER et al., 2015; STEWART; COOKSON, 2016). *T. gondii* é capaz de ativar a resposta imune inata em uma grande variedade de espécies de vertebrados. Em camundongos a resistência contra a infecção causada por esse parasito é dependente da proteína adaptadora MyD88, que é necessária para a indução de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- γ . Essas citocinas ativam diferentes vias efetoras, incluindo IRGs, GBPs e produção de NO que culminam na eliminação do parasito (YAROVINSKY, 2014; SASAI; PRADIPTA; YAMAMOTO, 2018).

Os macrófagos são células que desempenham um papel fundamental no controle de infecções por patógenos intracelulares. Esta linhagem celular é ativada quando os seus receptores detectam a presença de produtos microbianos, no compartimento extracelular ou intracelular. No caso da ativação dos receptores citosólicos NLR, o complexo multiprotéico inflamassoma é formado recrutando e ativando a caspase-1/11. A ativação da caspase-1 é tipicamente associada com a morte rápida de macrófagos, através de um processo conhecido como piroptose. A ativação da Caspase-1 também é associada a clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL8 e com a liberação dessas citocinas ativadas. IL-1 β e IL8 estão envolvidas na inflamação local e na produção de IFN- γ (LAMKANFI; DIXIT, 2012; JHA; BRICKEY; TING, 2017).

O inflamassoma é geralmente formado por três principais componentes, uma caspase-1/11 inflamatória, uma molécula adaptadora (como ASC) e uma proteína sensor (como NLRP1, NLRP3, NLRP12, NAIP1, NAIP2, NAIP5 ou AIM2). O sensor determina a especificidade do inflamassoma, através da interação com produtos de patógenos e sinais de estresse celular (ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015). A proteína NLRP3 está envolvida no reconhecimento de uma variedade de molécula incluindo RNA bacteriano, DNA viral, cristais de ácido úrico, nigericina entre outros DAMPs e PAMPs (JO et al., 2016; STEWART; COOKSON, 2016). Em contraste, para a proteína NLRP1 só foram relatados dois produtos, toxina letal do antrax (BOYDEN; DIETRICH, 2006) e muramildipeptídeo bacteriano (FAUSTIN et al., 2007).

O primeiro relato do envolvimento de NLRP1 na infecção por *T. gondii* veio de estudos demonstrando o envolvimento desse sensor na susceptibilidade a toxoplasmose congênita (WITOLA et al., 2011). Estudos subsequentes demonstraram que o rato Lewis é completamente resistente à infecção por *T. gondii*, independentemente da cepa, dose e via de infecção e essa resistência foi mapeada para um único *locus* no cromossomo 10, denominada *Toxo1* (KEMPF et al., 1999; SERGENT et al., 2005; CAVAILLES et al., 2006). Este *locus* possui aproximadamente 250 genes anotados incluindo o gene *NLRP1* que codifica a proteína NLRP1. Em 2014, Cirelli e colaboradores utilizaram diferentes métodos para demonstrar que esta resistência é mediada pela ativação do sensor NLRP1, que estimula a produção de IL-1 β e IL-18 e induz a morte de células hospedeiras por piroptose (CIRELLI et al., 2014). No entanto, os fatores do parasito envolvidos na ativação de NLRP1 não foram identificados.

Neste trabalho, foi utilizado um ensaio de mutagênese química, que introduz mutações aleatórias no genoma para isolar clones de *T. gondii* que falham na indução de piroptose em BMDMs de rato Lewis (Fig 1A, B). Os clones isolados foram submetidos ao sequenciamento do genoma inteiro e com o auxílio de abordagens de busca *in silico*, fomos capazes de identificar três proteínas de granulo denso envolvidas na indução de piroptose em BMDMs (Fig. 2A, B). A deleção individual dessas proteínas é suficiente para reduzir de forma significativa a piroptose, o que apoia um modelo de atuação em complexo.

O mecanismo pelo qual GRA35, TgGT1_237015 e TgGT1_236870 coordenam a ativação de NLRP1 é desconhecido. Estas proteínas podem interagir diretamente com NLRP1 ou podem facilitar o reconhecimento de outros fatores do parasito. Uma outra opção é que essas proteínas possam modificar alguma proteína específica de rato, que é reconhecida por NLRP1, de forma similar ao reconhecimento do complexo NAIP5/NAIP6/flagelina, por NLRC4 (KOFOED; VANCE, 2011; ZHAO et al., 2011; ZHAO; SHAO, 2015). A expressão de NLRP1 e caspase-1 em fibroblasto humano, ou macrófagos de camundongos que expressam apenas NLRP1 de rato Lewis, falham na indução de piroptose quando infectados com *T. gondii*, sugerindo que fatores adicionais são necessários para a ativação do inflamassoma (CIRELLI et al., 2014).

Para avaliar se além de GRA35, TgGT1_237015 e TgGT1_236870 outras proteínas de *T. gondii* estão envolvidas na ativação do inflamassoma e indução de piroptose, infectamos BMDMs

de Lewis com 11 clones diferentes, oriundos do ensaio de mutagênese química. Fizemos o sequenciamento da região codificadora da GRA35, TGGT1_237015 e TGGT1_236870 nos clones com falha na indução de piroptose (Fig. 3), para averiguar se mutações nesses genes são responsáveis pela falha na morte das células hospedeiras. Surpreendentemente um dos clones (ENU 3.8) com falha na indução de piroptose não apresentou nenhuma mutação nesses três genes. O resultado sugere que outros fatores de *T. gondii*, além da GRA35, TGGT1_237015 e TGGT1_236870 estão envolvidas na ativação do inflamassoma.

A família GRA35 é composta por outras três proteínas (TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970) e nós cogitamos que essas proteínas, assim como a GRA35, poderiam estar envolvidas na ativação do inflamassoma. Para testar essa hipótese, utilizando CRIPR/CAS9 para deletar TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970 na cepa RH. Os clones *knockout* resultantes foram utilizados na infecção de BMDMs de Lewis. Nós observamos que após a deleção individual de cada um dos genes citados, nenhuma alteração foi detectada na indução de piroptose. Os clones RHΔTGGT1_225160, RHΔTGGT1_213067, RHΔTGGT1_257970 causaram a morte de ~ 80% das células hospedeiras, enquanto mais de 80% das células hospedeiras permaneceram viáveis após a infecção com a cepa RHΔGRA35 (Fig. 4A). Esse resultado descarta qualquer possibilidade de envolvimento de TGGT1_225160, TGGT1_213067, TGGT1_257970 na ativação do inflamassoma.

Em resumo, neste trabalho estabelecemos que GRA35, TGGT1_237015 e TGGT1_236870 são necessárias para ativação de NLRP1 por *T. gondii* e indução de piroptose em BMDM de rato Lewis. Nós agora trabalhamos para elucidar os mecanismos de interação entre NLRP1 e estas proteínas, bem como na identificação de outros fatores envolvidos nesta via.

6. Conclusão Geral:

Em conclusão, demonstramos que as proteínas de grânulos densos são essenciais para a sobrevivência no interior do vacúolo parasitóforo e no reconhecimento e eliminação do parasito pelos mecanismos sensoriais e efetores do hospedeiro. Os dados do truncamento dos domínios α -hélices da GRA17, utilizando CRISPR/CAS9, revelam que com exceção de α -8, todas as estruturas α -hélices da GRA17 são importantes para função da proteína, estabilidade do VP e viabilidade do parasito. Além disso, identificamos três novas proteínas de grânulos densos de *T. gondii* (GRA35, TGGT1_237015 e TGGT1_236870) que atuam como agonistas do sensor inato NLRP1 do hospedeiro e mediam a ativação do inflamassoma e indução de piroptose, em BMDM de rato Lewis.

7. Referências Bibliográficas

ADAMS, L. B.; HIBBS, J. B., JR.; TAINTOR, R. R.; KRAHENBUHL, J. L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **Journal of Immunology**, v. 144, p. 2725-2729, 1990.

AJIKA, J. W.; FITZPATRICK, J. M.; REITTER, C. P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 2001, p. 1-19, 2001.

<https://doi.org/10.1017/S1462399401002204>

AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; TIBAYRENC, M.; DARDE, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 27-38, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00301-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00301-0)

AJZENBERG, D.; COLLINET, F.; MERCIER, A.; VIGNOLES, P.; DARDE, M. L. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 4641-4645, 2010.

<https://doi.org/10.1128/JCM.01152-10>

AJZENBERG, D.; DUMETRE, A.; DARDE, M. L. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1940-1943, 2005.

<https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1940-1943.2005>

ALAGANAN, A.; FENTRESS, S. J.; TANG, K.; WANG, Q.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* GRA7 effector increases turnover of immunity-related GTPases and contributes to acute virulence in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, p. 1126-1131, 2014.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1313501111>

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. **Jornal de Pediatria**, v. 86, p. 85-88, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0021-75572010000100015>

AZAMI, S. J.; AMANI, A.; KESHAVARZ, H.; NAJAFI-TAHER, R.; MOHEBALI, M.; FARAMARZI, M. A.; MAHMOUDI, M.; SHOJAEI, S. Nanoemulsion of atovaquone as a promising approach for treatment of acute and chronic toxoplasmosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 117, p. 138-146, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.02.018>

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; OREFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55-62, 2003.

<https://doi.org/10.3201/eid0901.020160>

BEHNKE, M. S.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genetic Mapping of Pathogenesis Determinants in *Toxoplasma gondii*. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, p. 63-81, 2016.

<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104353>

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 Pathogens**, v. 8, p. e1002992, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002992>

BEHNKE, M. S.; KHAN, A.; WOOTTON, J. C.; DUBEY, J. P.; TANG, K.; SIBLEY, L. D. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 9631-9636, 2011.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1015338108>

BELFORT-NETO, R.; NUSSENBLATT, V.; RIZZO, L.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; NUSSENBLATT, R.; KHAN, A.; SIBLEY, L. D.; BELFORT, R., JR. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 111-114, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0001-37652007000100013>

BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 99-109, 2009.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>

BERNEY, C.; PAWLOWSKI, J. A molecular time-scale for eukaryote evolution recalibrated with the continuous microfossil record. **Proceedings. Biological Sciences**, v. 273, p. 1867-1872, 2006.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3537>

BEVERLEY, J. K. Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. **Nature**, v. 183, p. 1348-1349, 1959.

<https://doi.org/10.1038/1831348a0>

BIERLY, A. L.; SHUFESKY, W. J.; SUKHUMAVASI, W.; MORELLI, A. E.; DENKERS, E. Y. Dendritic cells expressing plasmacytoid marker PDCA-1 are Trojan horses during *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 8485-8491, 2008.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8485>

BLADER, I. J.; COLEMAN, B. I.; CHEN, C. T.; GUBBELS, M. J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 463-485, 2015.

<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

BLISS, S. K.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 4515-4521, 2000.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4515>

BOEHM, U.; GUETHLEIN, L.; KLAMP, T.; OZBEK, K.; SCHAUB, A.; FUTTERER, A.; PFEFFER, K.; HOWARD, J. C. Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN-gamma. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 6715-6723, 1998.

BOUGDOUR, A.; DURANDAU, E.; BRENIER-PINCHART, M. P.; ORTET, P.; BARAKAT, M.; KIEFFER, S.; CURT-VARESANO, A.; CURT-BERTINI, R. L.; BASTIEN, O.; COUTE, Y.; PELLOUX, H.; HAKIMI, M. A. Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. **Cell Host Microbe**, v. 13, p. 489-500, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.002>

BOWIE, W. R.; KING, A. S.; WERKER, D. H.; ISAAC-RENTON, J. L.; BELL, A.; ENG, S. B.; MARION, S. A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. **Lancet**, v. 350, p. 173-177, 1997.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)11105-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)11105-3)

BOYDEN, E. D.; DIETRICH, W. F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. **Nature Genetics**, v. 38, p. 240-244, 2006.

<https://doi.org/10.1038/ng1724>

BOYLE, J. P.; RAJASEKAR, B.; SAEIJ, J. P.; AJIOKA, J. W.; BERRIMAN, M.; PAULSEN, I.; ROOS, D. S.; SIBLEY, L. D.; WHITE, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 10514-10519, 2006.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0510319103>

BRAUN, L.; BRENIER-PINCHART, M. P.; YOGAVEL, M.; CURT-VARESANO, A.; CURT-BERTINI, R. L.; HUSSAIN, T.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; COUTE, Y.; PELLOUX, H.; TARDIEUX, I.; SHARMA, A.; BELRHALI, H.; BOUGDOUR, A.; HAKIMI, M. A. A *Toxoplasma* dense granule protein, GRA24, modulates the early immune response to infection by promoting a direct and sustained host p38 MAPK activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, p. 2071-2086, 2013.

<https://doi.org/10.1084/jem.20130103>

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 407-420, 2016.

<https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>

BRUBAKER, S. W.; BONHAM, K. S.; ZANONI, I.; KAGAN, J. C. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 33, p. 257-290, 2015.

<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>

BRYANT, C. E.; MONIE, T. P. Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity. **Open Biology**, v. 2, p. 120015, 2012.

<https://doi.org/10.1098/rsob.120015>

BUTCHER, B. A.; FOX, B. A.; ROMMEREIM, L. M.; KIM, S. G.; MAURER, K. J.; YAROVINSKY, F.; HERBERT, D. R.; BZIK, D. J.; DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. **PLoS Pathogens**, v. 7, p. e1002236, 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002236>

CARLOW, D. A.; MARTH, J.; CLARK-LEWIS, I.; TEH, H. S. Isolation of a gene encoding a developmentally regulated T cell-specific protein with a guanine nucleotide triphosphate-binding motif. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 1724-1734, 1995.

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

[https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00201-7)

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**, v. 73, p. 114-123, 1997.

CAVAILLES, P.; SERGENT, V.; BISANZ, C.; PAPAPIETRO, O.; COLACIOS, C.; MAS, M.; SUBRA, J. F.; LAGRANGE, D.; CALISE, M.; APPOLINAIRE, S.; FARAUT, T.; DRUET, P.; SAOUDI, A.; BESSIERES, M. H.; PIPY, B.; CESBRON-DELAUW, M. F.; FOURNIE, G. J. The rat Toxo1 locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 744-749, 2006.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0506643103>

CEREDE, O.; DUBREMETZ, J. F.; SOETE, M.; DESLEE, D.; VIAL, H.; BOUT, D.; LEBRUN, M. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 453-463, 2005.

<https://doi.org/10.1084/jem.20041672>

CHAPMAN, H. D.; BARTA, J. R.; BLAKE, D.; GRUBER, A.; JENKINS, M.; SMITH, N. C.; SUO, X.; TOMLEY, F. M. A selective review of advances in coccidiosis research. **Advances in Parasitology**, v. 83, p. 93-171, 2013.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407705-8.00002-1>

CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 3049-3059, 2002.

CHAUDHARY, K.; DARLING, J. A.; FOHL, L. M.; SULLIVAN, W. J., JR.; DONALD, R. G.; PFEFFERKORN, E. R.; ULLMAN, B.; ROOS, D. S. Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 31221-31227, 2004.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M404232200>

CHECKLEY, W.; WHITE, A. C., JR.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M. J.; CHALMERS, R. M.; CHEN, X. M.; FAYER, R.; GRIFFITHS, J. K.; GUERRANT, R. L.; HEDSTROM, L.; HUSTON, C. D.; KOTLOFF, K. L.; KANG, G.; MEAD, J. R.; MILLER, M.; PETRI, W. A., JR.; PRIEST, J. W.; ROOS, D. S.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, R. C.; WARD, H. D.; VAN VOORHIS, W. A.; XIAO, L.; ZHU, G.; HOUP, E. R. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. **Lancet Infectious Diseases**, v. 15, p. 85-94, 2015.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70772-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70772-8)

CIRELLI, K. M.; GORFU, G.; HASSAN, M. A.; PRINTZ, M.; CROWN, D.; LEPPLA, S. H.; GRIGG, M. E.; SAEIJ, J. P.; MOAYERI, M. Inflammasome sensor NLRP1 controls rat macrophage susceptibility to *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 10, p. e1003927, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003927>

COPPENS, I. Exploitation of auxotrophies and metabolic defects in *Toxoplasma* as therapeutic approaches. **International Journal for Parasitology**, v. 44, p. 109-120, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.09.003>

COPPENS, I.; DUNN, J. D.; ROMANO, J. D.; PYPART, M.; ZHANG, H.; BOOTHROYD, J. C.; JOINER, K. A. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. **Cell**, v. 125, p. 261-274, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.056>

COPPENS, I.; JOINER, K. A. Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 3804-3820, 2003.

<https://doi.org/10.1091/mbc.e02-12-0830>

COPPENS, I.; SINAI, A. P.; JOINER, K. A. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. **Journal of Cell Biology**, v. 149, p. 167-180, 2000.

<https://doi.org/10.1083/jcb.149.1.167>

COUVREUR, J.; DESMONTS, G. [Late Evolutive Outbreaks of Congenital Toxoplasmosis]. **Cahiers du Collège de Médecine des Hôpitaux de Paris**, v. 5, p. 752-758, 1964.

COUVREUR, J.; DESMONTS, G. Congenital and maternal toxoplasmosis. A review of 300 congenital cases. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 4, p. 519-530, 1962.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1962.tb03221.x>

CROKEN, M. M.; QIU, W.; WHITE, M. W.; KIM, K. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of *Toxoplasma gondii* expression datasets links cell cycle progression and the bradyzoite developmental program. **BMC Genomics**, v. 15, p. 515, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-515>

CURT-VARESANO, A.; BRAUN, L.; RANQUET, C.; HAKIMI, M. A.; BOUGDOUR, A. The aspartyl protease TgASP5 mediates the export of the *Toxoplasma* GRA16 and GRA24 effectors into host cells. **Cellular Microbiology**, v. 18, p. 151-167, 2016.

<https://doi.org/10.1111/cmi.12498>

DAI, W.; PAN, H.; KWOK, O.; DUBEY, J. P. Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits *Toxoplasma gondii* growth in fibroblast cells. **Journal of Interferon Research**, v. 14, p. 313-317, 1994.

<https://doi.org/10.1089/jir.1994.14.313>

DARD, C.; MARTY, P.; BRENIER-PINCHART, M. P.; GARNAUD, C.; FRICKER-HIDALGO, H.; PELLOUX, H.; POMARES, C. Management of toxoplasmosis in transplant recipients: an update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. p. 2018.

DARDE, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, v. 78, p. 786-794, 1992.

<https://doi.org/10.2307/3283305>

DARDE, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 39, p. 551-558, 1988.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.39.551>

DARNELL, J. E., JR.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, p. 1415-1421, 1994.

<https://doi.org/10.1126/science.8197455>

DE KONING-WARD, T. F.; DIXON, M. W.; TILLEY, L.; GILSON, P. R. *Plasmodium* species: master renovators of their host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 494-507, 2016.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.79>

DE KONING-WARD, T. F.; GILSON, P. R.; BODDEY, J. A.; RUG, M.; SMITH, B. J.; PAPPENFUSS, A. T.; SANDERS, P. R.; LUNDIE, R. J.; MAIER, A. G.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. A newly discovered protein export machine in malaria parasites. **Nature**, v. 459, p. 945-949, 2009.

<https://doi.org/10.1038/nature08104>

DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRACA, R. M.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 326-329, 2006.

<https://doi.org/10.3201/eid1202.041115>

DEGRANDI, D.; KRAVETS, E.; KONERMANN, C.; BEUTER-GUNIA, C.; KLUMPERS, V.; LAHME, S.; WISCHMANN, E.; MAUSBERG, A. K.; BEER-HAMMER, S.; PFEFFER, K. Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. 294-299, 2013.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1205635110>

DESAI, S. A.; ROSENBERG, R. L. Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 2045-2049, 1997.

<https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.2045>

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. [Congenital toxoplasmosis. Prospective study of the outcome of pregnancy in 542 women with toxoplasmosis acquired during pregnancy]. **Annales de Pédiatrie**, v. 31, p. 805-809, 1984.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J.; ALISON, F.; BAUDELLOT, J.; GERBEAUX, J.; LELONG, M. [Epidemiological study on toxoplasmosis: the influence of cooking slaughter-animal meat on the incidence of human infection]. **Revue Française d'Études Cliniques et Biologiques**, v. 10, p. 952-958, 1965.

DIMIER, I. H.; BOUT, D. T. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. **Immunology**, v. 94, p. 488-495, 1998.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00553.x>

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095-2147, 1996.

DOBROWOLSKI, J.; SIBLEY, L. D. The role of the cytoskeleton in host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Behring Institute Mitteilungen**, v. p. 90-96, 1997.

DRISCOLL, C. A.; MENOTTI-RAYMOND, M.; ROCA, A. L.; HUPE, K.; JOHNSON, W. E.; GEFFEN, E.; HARLEY, E. H.; DELIBES, M.; PONTIER, D.; KITCHENER, A. C.;

YAMAGUCHI, N.; O'BRIEN S, J.; MACDONALD, D. W. The Near Eastern origin of cat domestication. **Science**, v. 317, p. 519-523, 2007.

<https://doi.org/10.1126/science.1139518>

DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p. 592-602, 1997a.

<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05965.x>

DUBEY, J. P. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 69-75, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.018>

DUBEY, J. P. Comparative infectivity of *Toxoplasma gondii* bradyzoites in rats and mice. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 1279-1282, 1998.

<https://doi.org/10.2307/3284691>

DUBEY, J. P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 957-961, 1996.

<https://doi.org/10.2307/3284206>

DUBEY, J. P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 215-219, 2001.

[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0215:OSBCFI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0215:OSBCFI]2.0.CO;2)

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 467-475, 2008.

<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>

DUBEY, J. P. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. **Parasitology**, v. 115 (Pt 1), p. 15-20, 1997b.

<https://doi.org/10.1017/S0031182097008949>

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: (Ed.). **Parasitic Protozoa** New York, v.3, 1977. p.101e237.

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

<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1972.tb03431.x>

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; JONES, J. L.; HIGHTOWER, A. W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C.; MISKA, K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef,

chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 1082-1093, 2005.

<https://doi.org/10.1645/GE-683.1>

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.

<https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; LUNNEY, J. K.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; ASHFORD, D. A.; THULLIEZ, P. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 438-443, 1996.

<https://doi.org/10.2307/3284082>

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, p. 636-662, 1970.

<https://doi.org/10.1084/jem.132.4.636>

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; BLIXT, J. A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 870-882, 1997.

<https://doi.org/10.2307/3284282>

DUCHE, D.; PARKER, M. W.; GONZALEZ-MANAS, J. M.; PATTUS, F.; BATY, D. Uncoupled steps of the colicin A pore formation demonstrated by disulfide bond engineering. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 6332-6339, 1994.

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

<https://doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3>

EL HAJJ, H.; LEBRUN, M.; AROLD, S. T.; VIAL, H.; LABESSE, G.; DUBREMETZ, J. F. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 3, p. e14, 2007.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030014>

ELSWORTH, B.; SANDERS, P. R.; NEBL, T.; BATINOVIC, S.; KALANON, M.; NIE, C. Q.; CHARNAUD, S. C.; BULLEN, H. E.; DE KONING WARD, T. F.; TILLEY, L.; CRABB, B. S.; GILSON, P. R. Proteomic analysis reveals novel proteins associated with the *Plasmodium* protein exporter PTEX and a loss of complex stability upon truncation of the core PTEX component, PTEX150. **Cellular Microbiology**, v. 18, p. 1551-1569, 2016.

<https://doi.org/10.1111/cmi.12596>

ETHERIDGE, R. D.; ALAGANAN, A.; TANG, K.; LOU, H. J.; TURK, B. E.; SIBLEY, L. D. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. **Cell Host Microbe**, v. 15, p. 537-550, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.002>

FAUSTIN, B.; LARTIGUE, L.; BRUEY, J. M.; LUCIANO, F.; SERGIENKO, E.; BAILLY-MAITRE, B.; VOLKMANN, N.; HANEIN, D.; ROUILLER, I.; REED, J. C. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. **Molecular Cell**, v. 25, p. 713-724, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.032>

FELDMAN, H. A.; MILLER, L. T. Serological study of toxoplasmosis prevalence. **American Journal of Hygiene**, v. 64, p. 320-335, 1956.

FENTRESS, S. J.; BEHNKE, M. S.; DUNAY, I. R.; MASHAYEKHI, M.; ROMMEREIM, L. M.; FOX, B. A.; BZIK, D. J.; TAYLOR, G. A.; TURK, B. E.; LICHTI, C. F.; TOWNSEND, R. R.; QIU, W.; HUI, R.; BEATTY, W. L.; SIBLEY, L. D. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. **Cell Host Microbe**, v. 8, p. 484-495, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.11.005>

FENTRESS, S. J.; SIBLEY, L. D. The secreted kinase ROP18 defends *Toxoplasma*'s border. **Bioessays**, v. 33, p. 693-700, 2011.

<https://doi.org/10.1002/bies.201100054>

FERREIRA ADE, M.; VITOR, R. W.; CARNEIRO, A. C.; BRANDAO, G. P.; MELO, M. N. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, p. 131-142, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.03.002>

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1907-1916, 2005.

<https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>

FINLAY, B. B.; COSSART, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. **Science**, v. 276, p. 718-725, 1997.

<https://doi.org/10.1126/science.276.5313.718>

FOX, B. A.; GIGLEY, J. P.; BZIK, D. J. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 323-331, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.001>

FRANCO, M.; PANAS, M. W.; MARINO, N. D.; LEE, M. C.; BUCHHOLZ, K. R.; KELLY, F. D.; BEDNARSKI, J. J.; SLECKMAN, B. P.; POURMAND, N.; BOOTHROYD, J. C. A Novel Secreted Protein, MYR1, Is Central to *Toxoplasma*'s Manipulation of Host Cells. **MBio**, v. 7, p. e02231-02215, 2016.

<https://doi.org/10.1128/mBio.02231-15>

FRENAL, K.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M.; SOLDATI-FAVRE, D. Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 645-660, 2017.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.86>

FRENKEL, J. K. Pursuing toxoplasma. **Journal of Infectious Diseases**, v. 122, p. 553-559, 1970.

<https://doi.org/10.1093/infdis/122.6.553>

FRENKEL, J. K. *Toxoplasma* in and around us. **Bioscience**, v. 23, p. 343e352., 1973.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, p. 893-896, 1970.

<https://doi.org/10.1126/science.167.3919.893>

GAIL, M.; GROSS, U.; BOHNE, W. Transferrin receptor induction in *Toxoplasma gondii*-infected HFF is associated with increased iron-responsive protein 1 activity and is mediated by secreted factors. **Parasitology Research**, v. 94, p. 233-239, 2004.

<https://doi.org/10.1007/s00436-004-1209-2>

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 6115-6119, 1993.

<https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6115>

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 2533-2543, 1994.

GHOSH, A.; UTHAIAH, R.; HOWARD, J.; HERRMANN, C.; WOLF, E. Crystal structure of IIGP1: a paradigm for interferon-inducible p47 resistance GTPases. **Molecular Cell**, v. 15, p. 727-739, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.017>

GILLY, M.; WALL, R. The IRG-47 gene is IFN-gamma induced in B cells and encodes a protein with GTP-binding motifs. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 3275-3281, 1992.

GOLD, D. A.; KAPLAN, A. D.; LIS, A.; BETT, G. C.; ROSOWSKI, E. E.; CIRELLI, K. M.; BOUGDOUR, A.; SIDIK, S. M.; BECK, J. R.; LOURIDO, S.; EGEEA, P. F.; BRADLEY, P. J.; HAKIMI, M. A.; RASMUSSEN, R. L.; SAEIJ, J. P. The *Toxoplasma* Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole. **Cell Host Microbe**, v. 17, p. 642-652, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.003>

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine**, v. 21, p. 677-687, 2015.

<https://doi.org/10.1038/nm.3893>

HAKIMI, M. A.; BOUGDOUR, A. Toxoplasma's ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 26, p. 24-31, 2015.

HAKIMI, M. A.; OLIAS, P.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* Effectors Targeting Host Signaling and Transcription. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, p. 615-645, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.003>

HALONEN, S. K.; WEISS, L. M. Toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 114, p. 125-145, 2013.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>

HARKER, K. S.; UENO, N.; LODOEN, M. B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. **Parasite Immunology**, v. 37, p. 141-149, 2015.

<https://doi.org/10.1111/pim.12163>

HE, W. T.; WAN, H.; HU, L.; CHEN, P.; WANG, X.; HUANG, Z.; YANG, Z. H.; ZHONG, C. Q.; HAN, J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. **Cell Research**, v. 25, p. 1285-1298, 2015.

<https://doi.org/10.1038/cr.2015.139>

HEHL, A. B.; BASSO, W. U.; LIPPUNER, C.; RAMAKRISHNAN, C.; OKONIEWSKI, M.; WALKER, R. A.; GRIGG, M. E.; SMITH, N. C.; DEPLAZES, P. Asexual expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes. **BMC Genomics**, v. 16, p. 66, 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12864-015-1225-x>

HEMELAAR, J.; GOUWS, E.; GHYS, P. D.; OSMANOV, S.; ISOLATION, W.-U. N. F. H.; CHARACTERISATION. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. **AIDS**, v. 25, p. 679-689, 2011.

<https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328342ff93>

HOLM, L.; SANDER, C. Structural alignment of globins, phycocyanins and colicin A. **FEBS Letters**, v. 315, p. 301-306, 1993.

[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81183-Z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81183-Z)

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

<https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>

HU, K.; ROOS, D. S.; MURRAY, J. M. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Biology**, v. 156, p. 1039-1050, 2002.

<https://doi.org/10.1083/jcb.200112086>

HUBER-LANG, M.; LAMBRIS, J. D.; WARD, P. A. Innate immune responses to trauma. **Nature Immunology**, v. 19, p. 327-341, 2018.

<https://doi.org/10.1038/s41590-018-0064-8>

HUNN, J. P.; KOENEN-WAISMAN, S.; PAPIC, N.; SCHROEDER, N.; PAWLOWSKI, N.; LANGE, R.; KAISER, F.; ZERRAHN, J.; MARTENS, S.; HOWARD, J. C. Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to *Toxoplasma gondii*. **EMBO Journal**, v. 27, p. 2495-2509, 2008.

<https://doi.org/10.1038/emboj.2008.176>

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

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>

HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2818-2824, 1994.

HUYNH, M. H.; CARRUTHERS, V. B. *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 2, p. e84, 2006.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020084>

HUYNH, M. H.; RABENAU, K. E.; HARPER, J. M.; BEATTY, W. L.; SIBLEY, L. D.; CARRUTHERS, V. B. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. **EMBO Journal**, v. 22, p. 2082-2090, 2003.

<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg217>

INNES, E. A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 1-7, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01276.x>

JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 46, p. 11-21, 1960.

<https://doi.org/10.2307/3275325>

JANITSCHKE, K.; WERNER, H. [Studies on the host specificity of the sexual development cycle of *Toxoplasma gondii*]. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 39, p. 247-254, 1972.

<https://doi.org/10.1007/BF00329461>

JENSEN, K. D.; HU, K.; WHITMARSH, R. J.; HASSAN, M. A.; JULIEN, L.; LU, D.; CHEN, L.; HUNTER, C. A.; SAEIJ, J. P. *Toxoplasma gondii* rhoptry 16 kinase promotes host resistance to oral infection and intestinal inflammation only in the context of the dense granule protein GRA15. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 2156-2167, 2013.

<https://doi.org/10.1128/IAI.01185-12>

JEWELL, M. L.; FRENKEL, J. K.; JOHNSON, K. M.; REED, V.; RUIZ, A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, p. 512-517, 1972.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1972.21.512>

JHA, S.; BRICKEY, W. J.; TING, J. P. Inflammasomes in Myeloid Cells: Warriors Within. **Microbiol Spectr**, v. 5, p. 2017.

JO, E. K.; KIM, J. K.; SHIN, D. M.; SASAKAWA, C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 13, p. 148-159, 2016.

<https://doi.org/10.1038/cmi.2015.95>

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Foodborne toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, p. 845-851, 2012.

<https://doi.org/10.1093/cid/cis508>

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 10-25, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>

JONES, J. L.; MUCCIOLI, C.; BELFORT, R., JR.; HOLLAND, G. N.; ROBERTS, J. M.; SILVEIRA, C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 582-587, 2006.

<https://doi.org/10.3201/eid1204.051081>

KAYAGAKI, N.; STOWE, I. B.; LEE, B. L.; O'ROURKE, K.; ANDERSON, K.; WARMING, S.; CUELLAR, T.; HALEY, B.; ROOSE-GIRMA, M.; PHUNG, Q. T.; LIU, P. S.; LILL, J. R.; LI, H.; WU, J.; KUMMERFELD, S.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; SNIPAS, S. J.; SALVESEN, G. S.; MORRIS, L. X.; FITZGERALD, L.; ZHANG, Y.; BERTRAM, E. M.; GOODNOW, C. C.; DIXIT, V. M. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, p. 666-671, 2015.

<https://doi.org/10.1038/nature15541>

KAYAGAKI, N.; WARMING, S.; LAMKANFI, M.; VANDE WALLE, L.; LOUIE, S.; DONG, J.; NEWTON, K.; QU, Y.; LIU, J.; HELDENS, S.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; ROOSE-GIRMA, M.; DIXIT, V. M. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, p. 117-121, 2011.

<https://doi.org/10.1038/nature10558>

KEMP, L. E.; YAMAMOTO, M.; SOLDATI-FAVRE, D. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 607-631, 2013.

<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12013>

KEMPF, M. C.; CESBRON-DELAUW, M. F.; DESLEE, D.; GROSS, U.; HERRMANN, T.; SUTTON, P. Different manifestations of *Toxoplasma gondii* infection in F344 and LEW rats. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 187, p. 137-142, 1999.

<https://doi.org/10.1007/s004300050085>

KESSLER, H.; HERM-GOTZ, A.; HEGGE, S.; RAUCH, M.; SOLDATI-FAVRE, D.; FRISCHKNECHT, F.; MEISSNER, M. Microneme protein 8--a new essential invasion factor in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 121, p. 947-956, 2008.

<https://doi.org/10.1242/jcs.022350>

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. **Cellular Microbiology**, v. 12, p. 939-961, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01443.x>

KHAN, A.; AJZENBERG, D.; MERCIER, A.; DEMAR, M.; SIMON, S.; DARDE, M. L.; WANG, Q.; VERMA, S. K.; ROSENTHAL, B. M.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Geographic separation of domestic and wild strains of *Toxoplasma gondii* in French Guiana correlates with a monomorphic version of chromosome Ia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e3182, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003182>

KHAN, A.; BOHME, U.; KELLY, K. A.; ADLEM, E.; BROOKS, K.; SIMMONDS, M.; MUNGALL, K.; QUAIL, M. A.; ARROWSMITH, C.; CHILLINGWORTH, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; COLLINS, M.; FOSKER, N.; FRASER, A.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MURPHY, L.; O'NEIL, S.; RAJANDREAM, M. A.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; WHITEHEAD, S.; MAYR, T.; XUAN, X.; WATANABE, J.; SUZUKI, Y.; WAKAGURI, H.; SUGANO, S.; SUGIMOTO, C.; PAULSEN, I.; MACKAY, A. J.; ROOS, D. S.; HALL, N.; BERRIMAN, M.; BARRELL, B.; SIBLEY, L. D.; AJIOKA, J. W. Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. **Genome Research**, v. 16, p. 1119-1125, 2006a.

<https://doi.org/10.1101/gr.5318106>

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. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 645-655, 2011a.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.005>

KHAN, A.; FUX, B.; SU, C.; DUBEY, J. P.; DARDE, M. L.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 14872-14877, 2007.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0702356104>

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. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 942-949, 2006b.

<https://doi.org/10.3201/eid1206.060025>

KHAN, A.; MILLER, N.; ROOS, D. S.; DUBEY, J. P.; AJZENBERG, D.; DARDE, M. L.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B.; SIBLEY, L. D. A monomorphic haplotype of chromosome Ia is associated with widespread success in clonal and nonclonal populations of *Toxoplasma gondii*. **MBio**, v. 2, p. e00228-00211, 2011b.

<https://doi.org/10.1128/mBio.00228-11>

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.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000404>

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 Research**, v. 33, p. 2980-2992, 2005.

<https://doi.org/10.1093/nar/gki604>

KIM, B. H.; SHENOY, A. R.; KUMAR, P.; BRADFIELD, C. J.; MACMICKING, J. D. IFN-inducible GTPases in host cell defense. **Cell Host Microbe**, v. 12, p. 432-444, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.007>

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. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 23, p. 272-274, 2004.

<https://doi.org/10.1097/01.inf.0000115949.12206.69>

KOFOED, E. M.; VANCE, R. E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. **Nature**, v. 477, p. 592-595, 2011.

<https://doi.org/10.1038/nature10394>

KOWALSKI, R.; POST, D.; SCHNEIDER, M. C.; BRITZ, J.; THOMAS, J.; DEIERHOI, M.; LOBASHEVSKY, A.; REDFIELD, R.; SCHWEITZER, E.; HEREDIA, A.; REARDON, E.; DAVIS, C.; BENTLEJEWSKI, C.; FUNG, J.; SHAPIRO, R.; ZEEVI, A. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. **Clinical Transplantation**, v. 17, p. 77-88, 2003.

<https://doi.org/10.1034/j.1399-0012.2003.00013.x>

LAFUSE, W. P.; BROWN, D.; CASTLE, L.; ZWILLING, B. S. Cloning and characterization of a novel cDNA that is IFN-gamma-induced in mouse peritoneal macrophages and encodes a putative GTP-binding protein. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 57, p. 477-483, 1995.

<https://doi.org/10.1002/jlb.57.3.477>

LALIBERTE, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1900-1915, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s00018-008-7556-x>

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Inflammasomes and their roles in health and disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 137-161, 2012.

<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155745>

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 397-411, 2013.

<https://doi.org/10.1038/nri3452>

LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 11423-11428, 2006.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0601438103>

LISTON, A.; MASTERS, S. L. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. **Nature Reviews: Immunology**, v. 17, p. 208-214, 2017.

<https://doi.org/10.1038/nri.2016.151>

LORENZI, H.; KHAN, A.; BEHNKE, M. S.; NAMASIVAYAM, S.; SWAPNA, L. S.; HADJITHOMAS, M.; KARAMYCHEVA, S.; PINNEY, D.; BRUNK, B. P.; AJIOKA, J. W.; AJZENBERG, D.; BOOTHROYD, J. C.; BOYLE, J. P.; DARDE, M. L.; DIAZ-MIRANDA, M. A.; DUBEY, J. P.; FRITZ, H. M.; GENNARI, S. M.; GREGORY, B. D.; KIM, K.; SAEIJ, J. P.; SU, C.; WHITE, M. W.; ZHU, X. Q.; HOWE, D. K.; ROSENTHAL, B. M.; GRIGG, M. E.; PARKINSON, J.; LIU, L.; KISSINGER, J. C.; ROOS, D. S.; SIBLEY, L. D. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. **Nature Communication**, v. 7, p. 10147, 2016.

<https://doi.org/10.1038/ncomms10147>

LOURIDO, S.; SHUMAN, J.; ZHANG, C.; SHOKAT, K. M.; HUI, R.; SIBLEY, L. D. Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma*. **Nature**, v. 465, p. 359-362, 2010.

<https://doi.org/10.1038/nature09022>

LUDER, C. G. K.; RAHMAN, T. Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. **Microbial Cell**, v. 4, p. 203-211, 2017.

<https://doi.org/10.15698/mic2017.07.579>

MACMICKING, J. D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. **Nature Reviews: Immunology**, v. 12, p. 367-382, 2012.

<https://doi.org/10.1038/nri3210>

MARINO, N. D.; PANAS, M. W.; FRANCO, M.; THEISEN, T. C.; NAOR, A.; RASTOGI, S.; BUCHHOLZ, K. R.; LORENZI, H. A.; BOOTHROYD, J. C. Identification of a novel protein complex essential for effector translocation across the parasitophorous vacuole membrane of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 14, p. e1006828, 2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006828>

MARTENS, S.; PARVANNOVA, I.; ZERRAHN, J.; GRIFFITHS, G.; SCHELL, G.; REICHMANN, G.; HOWARD, J. C. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. **PLoS Pathogens**, v. 1, p. e24, 2005.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010024>

MARTIN, A. M.; LIU, T.; LYNN, B. C.; SINAI, A. P. The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 25-28, 2007.

<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00230.x>

MARTIN, A. M.; LIU, T.; LYNN, B. C.; SINAI, A. P. The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 25-28, 2007.

<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00230.x>

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Molecular Cell**, v. 10, p. 417-426, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)

MASHAYEKHI, M.; SANDAU, M. M.; DUNAY, I. R.; FRICKEL, E. M.; KHAN, A.; GOLDSZMID, R. S.; SHER, A.; PLOEGH, H. L.; MURPHY, T. L.; SIBLEY, L. D.; MURPHY, K. M. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Immunity**, v. 35, p. 249-259, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.008>

MCCUTCHAN, F. E. Global epidemiology of HIV. **Journal of Medical Virology**, v. 78 Suppl 1, p. S7-S12, 2006.

<https://doi.org/10.1002/jmv.20599>

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A., JR. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, p. 298-300, 2002.

<https://doi.org/10.1126/science.1068883>

MELAMED, J.; ECKERT, G. U.; SPADONI, V. S.; LAGO, E. G.; UBERTI, F. Ocular manifestations of congenital toxoplasmosis. **Eye (London, England)**, v. 24, p. 528-534, 2010.

<https://doi.org/10.1038/eye.2009.140>

MIAO, E. A.; LEAF, I. A.; TREUTING, P. M.; MAO, D. P.; DORS, M.; SARKAR, A.; WARREN, S. E.; WEWERS, M. D.; ADEREM, A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. **Nature Immunology**, v. 11, p. 1136-1142, 2010.

<https://doi.org/10.1038/ni.1960>

MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. **Journal of Parasitology**, v. 58, p. 928-937, 1972.

<https://doi.org/10.2307/3286588>

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 11-20, 1994.

<https://doi.org/10.1006/expr.1994.1054>

MINEO, J. R.; MCLEOD, R.; MACK, D.; SMITH, J.; KHAN, I. A.; ELY, K. H.; KASPER, L. H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **Journal of Immunology**, v. 150, p. 3951-3964, 1993.

MINEO, T. W.; BENEVIDES, L.; SILVA, N. M.; SILVA, J. S. Myeloid differentiation factor 88 is required for resistance to *Neospora caninum* infection. **Veterinary Research**, v. 40, p. 32, 2009.

<https://doi.org/10.1051/vetres/2009015>

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 13458-13463, 2012.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1117047109>

MITCHELL, C. D.; ERLICH, S. S.; MASTRUCCI, M. T.; HUTTO, S. C.; PARKS, W. P.; SCOTT, G. B. Congenital toxoplasmosis occurring in infants perinatally infected with human immunodeficiency virus 1. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 9, p. 512-518, 1990.

<https://doi.org/10.1097/00006454-199007000-00012>

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

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 554-566, 2008.

<https://doi.org/10.1086/590149>

MORDUE, D. G.; DESAI, N.; DUSTIN, M.; SIBLEY, L. D. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, p. 1783-1792, 1999.

<https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1783>

MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; CARRIERO, S. M.; HARRIS, A. M.; JAFFEE, E. A. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 134, p. 1982-1988, 1985.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Des Seances De l'Academie Des Sciences. Serie III, Sciences De La Vie**, v. 147, p. 763-766, 1908.

PAPIC, N.; HUNN, J. P.; PAWLOWSKI, N.; ZERRAHN, J.; HOWARD, J. C. Inactive and active states of the interferon-inducible resistance GTPase, Irga6, in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 32143-32151, 2008.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M804846200>

PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 88, p. 91-142, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009>

PARKER, M. W.; PATTUS, F.; TUCKER, A. D.; TSERNOGLOU, D. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. **Nature**, v. 337, p. 93-96, 1989.

<https://doi.org/10.1038/337093a0>

PARKER, M. W.; POSTMA, J. P.; PATTUS, F.; TUCKER, A. D.; TSERNOGLOU, D. Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 224, p. 639-657, 1992.

[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90550-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90550-4)

PARKIN, D. M. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncology**, v. 2, p. 533-543, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00486-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00486-7)

PEIXOTO, L.; CHEN, F.; HARB, O. S.; DAVIS, P. H.; BEITING, D. P.; BROWNBACK, C. S.; OULOGUEM, D.; ROOS, D. S. Integrative genomic approaches highlight a family of parasite-specific kinases that regulate host responses. **Cell Host Microbe**, v. 8, p. 208-218, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.07.004>

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

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>

PEPPER, M.; DZIERSZINSKI, F.; WILSON, E.; TAIT, E.; FANG, Q.; YAROVINSKY, F.; LAUFER, T. M.; ROOS, D.; HUNTER, C. A. Plasmacytoid dendritic cells are activated by *Toxoplasma gondii* to present antigen and produce cytokines. **Journal of Immunology**, v. 180, p. 6229-6236, 2008.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.6229>

PFAFF, A. W.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; VILLARD, O.; SENEGAS, 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.

<https://doi.org/10.1017/S0031182007000200>

PFEFFERKORN, E. R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 908-912, 1984.

<https://doi.org/10.1073/pnas.81.3.908>

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

[https://doi.org/10.1016/0166-6851\(86\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90101-5)

PITTMAN, K. J.; KNOLL, L. J. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, p. 387-401, 2015.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-15>

PUREN, A. J.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 2256-2261, 1999.

<https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2256>

RAWAL, B. D. Toxoplasmosis; a dye-test survey on sera from vegetarians and meat eaters in Bombay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 61-63, 1959.

[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(59\)90084-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(59)90084-7)

REESE, M. L.; BOOTHROYD, J. C. A conserved non-canonical motif in the pseudoactive site of the ROP5 pseudokinase domain mediates its effect on *Toxoplasma* virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 29366-29375, 2011.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253435>

REESE, M. L.; SHAH, N.; BOOTHROYD, J. C. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 is an allosteric inhibitor of the immunity-related GTPases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 27849-27858, 2014.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567057>

REIS E SOUSA, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; JANKOVIC, D.; CHAREST, H.; GERMAIN, R. N.; SHER, A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, p. 1819-1829, 1997.

<https://doi.org/10.1084/jem.186.11.1819>

ROBBEN, P. M.; MORDUE, D. G.; TRUSCOTT, S. M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SIBLEY, L. D. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 3686-3694, 2004.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3686>

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **Journal of Infection**, v. 68 Suppl 1, p. S125-133, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.023>

ROBERT-GANGNEUX, F.; BELAZ, S. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, p. 330-339, 2016.

<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000275>

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, p. 264-296, 2012.

<https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

ROSENTHAL, B. M. How has agriculture influenced the geography and genetics of animal parasites? **Trends Parasitol**, v. 25, p. 67-70, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.10.004>

ROSOWSKI, E. E.; LU, D.; JULIEN, L.; RODDA, L.; GAISER, R. A.; JENSEN, K. D.; SAEIJ, J. P. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, p. 195-212, 2011.

<https://doi.org/10.1084/jem.20100717>

RUGARABAMU, G.; MARQ, J. B.; GUERIN, A.; LEBRUN, M.; SOLDATI-FAVRE, D. Distinct contribution of *Toxoplasma gondii* rhomboid proteases 4 and 5 to micronemal protein protease 1 activity during invasion. **Molecular Microbiology**, v. 97, p. 244-262, 2015.

<https://doi.org/10.1111/mmi.13021>

SAEIJ, J. P.; BOYLE, J. P.; COLLER, S.; TAYLOR, S.; SIBLEY, L. D.; BROOKE-POWELL, E. T.; AJIOKA, J. W.; BOOTHROYD, J. C. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. **Science**, v. 314, p. 1780-1783, 2006.

<https://doi.org/10.1126/science.1133690>

SAEIJ, J. P.; COLLER, S.; BOYLE, J. P.; JEROME, M. E.; WHITE, M. W.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**, v. 445, p. 324-327, 2007.

<https://doi.org/10.1038/nature05395>

SASAI, M.; PRADIPTA, A.; YAMAMOTO, M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. **International Immunology**, v. 30, p. 113-119, 2018.

<https://doi.org/10.1093/intimm/dxy004>

SCANGA, C. A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 5997-6001, 2002.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.5997>

SCHARTON-KERSTEN, T. M.; WYNN, T. A.; DENKERS, E. Y.; BALA, S.; GRUNVALD, E.; HIENY, S.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 4045-4054, 1996.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, p. 821-832, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>

SCHWAB, J. C.; BECKERS, C. J.; JOINER, K. A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 509-513, 1994.

<https://doi.org/10.1073/pnas.91.2.509>

SCHWARTZMAN, J. D.; PFEFFERKORN, E. R. *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. **Experimental Parasitology**, v. 53, p. 77-86, 1982.

[https://doi.org/10.1016/0014-4894\(82\)90094-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(82)90094-7)

SCHWARTZMAN, J.; MAFFIA, A.; ET AL. Congenital toxoplasmosis. **Journal of Pediatrics**, v. 33, p. 66-73, 1948.

[https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(48\)80154-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(48)80154-X)

SEABRA, S. H.; DAMATTA, R. A.; DE MELLO, F. G.; DE SOUZA, W. Endogenous polyamine levels in macrophages is sufficient to support growth of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 455-460, 2004.

<https://doi.org/10.1645/GE-179R>

SELLECK, E. M.; FENTRESS, S. J.; BEATTY, W. L.; DEGRANDI, D.; PFEFFER, K.; VIRGIN, H. W. T.; MACMICKING, J. D.; SIBLEY, L. D. Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 9, p. e1003320, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003320>

SERGEANT, V.; CAUTAIN, B.; KHALIFE, J.; DESLEE, D.; BASTIEN, P.; DAO, A.; DUBREMETZ, J. F.; FOURNIE, G. J.; SAOUDI, A.; CESBRON-DELAUW, M. F. Innate refractoriness of the Lewis rat to toxoplasmosis is a dominant trait that is intrinsic to bone marrow-derived cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 6990-6997, 2005.

<https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6990-6997.2005>

SHEN, B.; BROWN, K. M.; LEE, T. D.; SIBLEY, L. D. Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. **MBio**, v. 5, p. e01114-01114, 2014.

<https://doi.org/10.1128/mBio.01114-14>

SHER, A.; TOSH, K.; JANKOVIC, D. Innate recognition of *Toxoplasma gondii* in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, p. 36-42, 2017.

<https://doi.org/10.1038/cmi.2016.12>

SHI, J.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; GAO, W.; DING, J.; LI, P.; HU, L.; SHAO, F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. **Nature**, v. 514, p. 187-192, 2014.

<https://doi.org/10.1038/nature13683>

SIBLEY, L. D. How apicomplexan parasites move in and out of cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 592-598, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.05.009>

SIBLEY, L. D.; AJIOKA, J. W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 329-351, 2008.

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162925>

SIBLEY, L. D.; ANDREWS, N. W. Cell invasion by un-palatable parasites. **Traffic**, v. 1, p. 100-106, 2000.

<https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010202.x>

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, p. 82-85, 1992.

<https://doi.org/10.1038/359082a0>

SIBLEY, L. D.; LEBLANC, A. J.; PFEFFERKORN, E. R.; BOOTHROYD, J. C. Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. **Genetics**, v. 132, p. 1003-1015, 1992.

SIDIK, S. M.; HACKETT, C. G.; TRAN, F.; WESTWOOD, N. J.; LOURIDO, S. Efficient genome engineering of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. **PloS One**, v. 9, p. e100450, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100450>

SINAI, A. P.; JOINER, K. A. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 415-462, 1997.

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.415>

SINAI, A. P.; WATTS, E. A.; DHARA, A.; MURPHY, R. D.; GENTRY, M. S.; PATWARDHAN, A. Reexamining Chronic *Toxoplasma gondii* Infection: Surprising Activity for a "Dormant" Parasite. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 3, p. 175-185, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s40588-016-0045-3>

SORACE, J. M.; JOHNSON, R. J.; HOWARD, D. L.; DRYSDALE, B. E. Identification of an endotoxin and IFN-inducible cDNA: possible identification of a novel protein family. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 58, p. 477-484, 1995.

<https://doi.org/10.1002/jlb.58.4.477>

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Parasitology**, v. 116 (Pt 1), p. 35-42, 1998.

<https://doi.org/10.1017/S0031182097001959>

SPILLMAN, N. J.; BECK, J. R.; GOLDBERG, D. E. Protein export into malaria parasite-infected erythrocytes: mechanisms and functional consequences. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 813-841, 2015.

<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034157>

SPLENDORE, A. Un nuovo parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. **Nota preliminare pel, Rev Soc Sci**, v. 3, p. 109-112, 1908.

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.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000576>

STEINFELDT, T.; KONEN-WAISMAN, S.; TONG, L.; PAWLOWSKI, N.; LAMKEMEYER, T.; SIBLEY, L. D.; HUNN, J. P.; HOWARD, J. C. Correction: Phosphorylation of Mouse Immunity-Related GTPase (IRG) Resistance Proteins Is an Evasion Strategy for Virulent *Toxoplasma gondii*. **PLoS Biology**, v. 13, p. e1002199, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002199>

STEWART, M. K.; COOKSON, B. T. Evasion and interference: intracellular pathogens modulate caspase-dependent inflammatory responses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 346-359, 2016.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.50>

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.

<https://doi.org/10.1126/science.1078035>

SU, C.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 10753-10758, 2002.

<https://doi.org/10.1073/pnas.172117099>

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 5844-5849, 2012.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>

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, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>

SUSS-TOBY, E.; ZIMMERBERG, J.; WARD, G. E. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 8413-8418, 1996.

<https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8413>

TARDIEUX, I.; BAUM, J. Reassessing the mechanics of parasite motility and host-cell invasion. **Journal of Cell Biology**, v. 214, p. 507-515, 2016.

<https://doi.org/10.1083/jcb.201605100>

TAYLOR, G. A.; JEFFERS, M.; LARGAESPADA, D. A.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G.; VANDE WOUDE, G. F. Identification of a novel GTPase, the inducibly expressed GTPase, that accumulates in response to interferon gamma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 20399-20405, 1996.

<https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20399>

TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS, S. J.; TANG, K.; BEATTY, W. L.; HAJJ, H. E.; JEROME, M.; BEHNKE, M. S.; WHITE, M.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 314, p. 1776-1780, 2006.

<https://doi.org/10.1126/science.1133643>

TEGEGNE, D.; ABDURAHAMAN, M.; MOSISSA, T.; YOHANNES, M. Anti-*Toxoplasma* antibodies prevalence and associated risk factors among HIV patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, p. 460-464, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.034>

TEUTSCH, S. M.; JURANEK, D. D.; SULZER, A.; DUBEY, J. P.; SIKES, R. K. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. **New England Journal of Medicine**, v. 300, p. 695-699, 1979.

<https://doi.org/10.1056/NEJM197903293001302>

TING, J. P.; LOVERING, R. C.; ALNEMRI, E. S.; BERTIN, J.; BOSS, J. M.; DAVIS, B. K.; FLAVELL, R. A.; GIRARDIN, S. E.; GODZIK, A.; HARTON, J. A.; HOFFMAN, H. M.; HUGOT, J. P.; INOHARA, N.; MACKENZIE, A.; MALTAIS, L. J.; NUNEZ, G.; OGURA, Y.; OTTEN, L. A.; PHILPOTT, D.; REED, J. C.; REITH, W.; SCHREIBER, S.; STEIMLE, V.; WARD, P. A. The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity**, v. 28, p. 285-287, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.005>

TORRE, L. A.; SIEGEL, R. L.; WARD, E. M.; JEMAL, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 25, p. 16-27, 2016.

<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>

VAN DE VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G.; DINARELLO, C. A.; JOOSTEN, L. A. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. **Trends in Immunology**, v. 32, p. 110-116, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.it.2011.01.003>

WANG, Z. D.; LIU, H. H.; MA, Z. X.; MA, H. Y.; LI, Z. Y.; YANG, Z. B.; ZHU, X. Q.; XU, B.; WEI, F.; LIU, Q. *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 389, 2017a.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00389>

WATTS, E.; ZHAO, Y.; DHARA, A.; ELLER, B.; PATWARDHAN, A.; SINAI, A. P. Novel Approaches Reveal that *Toxoplasma gondii* Bradyzoites within Tissue Cysts Are Dynamic and Replicating Entities In Vivo. **MBio**, v. 6, p. e01155-01115, 2015.

<https://doi.org/10.1128/mBio.01155-15>

WEINMAN, D.; CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 87, p. 211-216, 1954.

<https://doi.org/10.3181/00379727-87-21337>

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 895-901, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>

WERNER-MEIER, R.; ENTZEROTH, R. Diffusion of microinjected markers across the parasitophorous vacuole membrane in cells infected with *Eimeria nieschulzi* (Coccidia, Apicomplexa). **Parasitology Research**, v. 83, p. 611-613, 1997.

<https://doi.org/10.1007/s004360050305>

WILSON, D. C.; MATTHEWS, S.; YAP, G. S. IL-12 signaling drives CD8⁺ T cell IFN-gamma production and differentiation of KLRG1⁺ effector subpopulations during *Toxoplasma gondii* Infection. **Journal of Immunology**, v. 180, p. 5935-5945, 2008.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5935>

WITOLA, W. H.; MUI, E.; HARGRAVE, A.; LIU, S.; HYPOLITE, M.; MONTPETIT, A.; CAVAILLES, P.; BISANZ, C.; CESBRON-DELAUW, M. F.; FOURNIE, G. J.; MCLEOD, R. NALP1 influences susceptibility to human congenital toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. **Infection and Immunity**, v. 79, p. 756-766, 2011.

<https://doi.org/10.1128/IAI.00898-10>

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. H. Toxoplasmic encephalomyelitis: III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. **American Journal of Pathology**, v. 15, p. 657-694 611, 1939.

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. **Science**, v. 89, p. 226-227, 1939.

<https://doi.org/10.1126/science.89.2306.226>

WOLFE, R. A.; ROYS, E. C.; MERION, R. M. Trends in organ donation and transplantation in the United States, 1999-2008. **American Journal of Transplantation**, v. 10, p. 961-972, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03021.x>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report, 2016: Summary**. Geneva: **World Health Organization; 2017 (WHO/HTM/GMP/2017.4)**. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO). 2017.

YAMAMOTO, M.; MA, J. S.; MUELLER, C.; KAMIYAMA, N.; SAIGA, H.; KUBO, E.; KIMURA, T.; OKAMOTO, T.; OKUYAMA, M.; KAYAMA, H.; NAGAMUNE, K.; TAKASHIMA, S.; MATSUURA, Y.; SOLDATI-FAVRE, D.; TAKEDA, K. ATF6beta is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, p. 1533-1546, 2011.

<https://doi.org/10.1084/jem.20101660>

YAMAMOTO, M.; OKUYAMA, M.; MA, J. S.; KIMURA, T.; KAMIYAMA, N.; SAIGA, H.; OHSHIMA, J.; SASAI, M.; KAYAMA, H.; OKAMOTO, T.; HUANG, D. C.; SOLDATI-FAVRE, D.; HORIE, K.; TAKEDA, J.; TAKEDA, K. A cluster of interferon-gamma-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 37, p. 302-313, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.009>

YAMAMOTO, M.; STANDLEY, D. M.; TAKASHIMA, S.; SAIGA, H.; OKUYAMA, M.; KAYAMA, H.; KUBO, E.; ITO, H.; TAKAURA, M.; MATSUDA, T.; SOLDATI-FAVRE, D.; TAKEDA, K. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, p. 2747-2760, 2009.

<https://doi.org/10.1084/jem.20091703>

YAP, G. S.; SHER, A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 1083-1092, 1999.

<https://doi.org/10.1084/jem.189.7.1083>

YAP, G.; PESIN, M.; SHER, A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 628-631, 2000.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.628>

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 109-121, 2014.

<https://doi.org/10.1038/nri3598>

YILMAZ, S. M.; HOPKINS, S. H. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 58, p. 938-939, 1972.

<https://doi.org/10.2307/3286589>

YIN, Q.; FU, T. M.; LI, J.; WU, H. Structural biology of innate immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 33, p. 393-416, 2015.

<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112258>

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 265, p. 156-171, 2015.

<https://doi.org/10.1111/imr.12291>

ZHAO, Y. O.; KHAMINETS, A.; HUNN, J. P.; HOWARD, J. C. Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN γ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. e1000288, 2009.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000288>

ZHAO, Y.; FERGUSON, D. J.; WILSON, D. C.; HOWARD, J. C.; SIBLEY, L. D.; YAP, G. S. Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 3775-3781, 2009.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804190>

ZHAO, Y.; SHAO, F. The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Immunological Reviews**, v. 265, p. 85-102, 2015.

<https://doi.org/10.1111/imr.12293>

ZHAO, Y.; YANG, J.; SHI, J.; GONG, Y. N.; LU, Q.; XU, H.; LIU, L.; SHAO, F. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature**, v. 477, p. 596-600, 2011.

<https://doi.org/10.1038/nature10510>

ZUZARTE-LUIS, V.; MOTA, M. M. Parasite Sensing of Host Nutrients and Environmental Cues. **Cell Host Microbe**, v. 23, p. 749-758, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.018>