

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Identificação de possíveis fatores de virulência do parasito *Toxoplasma gondii* no reconhecimento inato por macrófagos pela análise transcriptômica**

Tayane Trindade Fontes

UBERLÂNDIA - MG  
DEZEMBRO/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Identificação de possíveis fatores de virulência do parasito *Toxoplasma gondii* no reconhecimento inato por macrófagos pela análise transcriptômica**

Tayane Trindade Fontes

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Dra. Caroline Martins Mota

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, sob orientação do Prof. Dr. Edgar Silveira Campos.

UBERLÂNDIA - MG

DEZEMBRO/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Identificação de possíveis fatores de virulência do parasito *Toxoplasma gondii* no reconhecimento inato por macrófagos pela análise transcriptômica**

Tayane Trindade Fontes

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos  
Instituto de Ciências Biomédicas

Dra. Caroline Martins Mota  
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso  
de Biotecnologia em \_\_/\_\_/\_\_.  
Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

UBERLÂNDIA - MG  
DEZEMBRO/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Identificação de possíveis fatores de virulência do parasito *Toxoplasma gondii* no reconhecimento inato por macrófagos pela análise transcriptômica**

Tayane Trindade Fontes

Aprovado pela Banca Examinadora em:    /    /                      Nota: \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia,        de                      de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais e  
irmão por todo apoio e paciência ao longo  
deste trajeto, me motivando nos  
momentos mais críticos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Célia e Marcos, pelas oportunidades que me proporcionaram ao longo da minha jornada, pelo amor incondicional, pelo aprendizado e pelos esforços para me ajudarem durante a trajetória. Obrigado pelo apoio sem medidas!

Ao meu irmão Adriel, pelo companheirismo e compreensão por todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, por compartilhar seus conhecimentos e auxiliar nos momentos de dúvidas.

A Dr.<sup>a</sup> Caroline Martins Mota, por todo o conhecimento passado e pela ajuda com os experimentos.

Ao Prof. Dr. Edgar Silveira Campos, por ter me acolhido e atendido inúmeras vezes às minhas dúvidas.

Ao Jhoan David Aguillón Torres, por ter me auxiliado no meu trabalho, me apoiado nos momentos de alegria e tribulação, sempre muito paciente.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mário Endsfieldz Camargo”, por ter me acolhido e por ter sido meu habitat de trabalho.

Aos meus amigos, Matheus Ribeiro, Lucas Carneiro, Lucas Corumbá, Ian Paniago, Pedro Serafim, José Augusto, Vitória Juliane, Victória Finzi, pelos momentos de descontração, pela coragem e força e principalmente por terem contribuído ao meu crescimento.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, causador da toxoplasmose que acomete humanos e animais homeotérmicos. É caracterizado pela presença do complexo apical, composto por micronemas, roptrias e grânulos densos, utilizadas pelo parasito durante o processo de adesão e invasão da célula hospedeira. O desenvolvimento de ferramentas moleculares tem sido aplicado como estratégia para melhor compreender esse sistema de invasão e replicação do hospedeiro e da interação parasito-hospedeiro. Este trabalho teve como finalidade identificar os possíveis fatores de virulência do parasito *T. gondii* responsáveis por controlar a resposta imune do hospedeiro, onde a análise de transcriptoma e os mapas de calor (*heatmaps*), demonstraram o papel crucial das moléculas imunes inata do hospedeiro MyD88 e Caspase 1/11 na regulação da expressão de genes fundamentais na sua patogênese. A maioria dos genes do parasito apresentaram um aumento da sua expressão quando infectados nas células depletadas geneticamente por MyD88 e Caspase 1/11.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, transcriptoma, expressão.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2. Transmissão da toxoplasmose	1
1.3. Ciclo lítico	3
1.4. Resposta imune protetora do hospedeiro	4
1.5. Análise de transcriptoma	5
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo geral	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1. Análise de bioinformática e seleção de alvos	7
3.1.1. RNA-Seq	7
3.1.2. Genoma de referência	7
3.1.3 Galaxy	7
3.1.4 Gráficos de calor ( <i>heatmap</i> ) e <i>pizza</i>	8
4. RESULTADOS	9
4.1. Amostras usadas para análise de RNASeq e os dados gerados apresentaram uma boa qualidade as sequências analisadas	9
4.1.1. Qualidade da sequência por base	9
4.1.2. Qualidade da sequência por título	11
4.1.3. Qualidade da sequência por escore	12
4.1.4. Qualidade da sequência por conteúdo	12
4.1.5. Qualidade da sequência por conteúdo GC	13
4.1.6. Qualidade da sequência por conteúdo N	14
4.1.7. Distribuição do comprimento da sequência	14
4.1.8. Sequências duplicadas	15
4.2. MyD88 e Caspase 1/11 modulam a expressão gênica no parasito <i>T. gondii</i>	16
4.2.1. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes das sequências relacionadas a SAG-1 (SRS) do parasito	17
4.2.2. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes de micronemas do parasito	19

4.2.3. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes de grânulo denso do parasito -----	19
4.2.4. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes das roptrias do parasito -----	20
4.2.5. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes do fator de transcrição AP2 do parasito -----	21
4.2.6. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes das sequências relacionadas a SAG-1 (SRS), micronemas, grânulos densos, roptrias e do fator de transcrição AP2 do parasito -----	23
5. DISCUSSÃO-----	26
6. CONCLUSÃO -----	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> -----	2
Figura 2 - Invasão e disseminação de <i>Toxoplasma gondii</i> na célula hospedeira -----	4
Figura 3 - Representação da leitura das sequências, onde a opção FastQC verifica a qualidade das sequências, informando quais áreas podem ter problemas -----	8
Figura 4 - Esquema representativo da ordem das análises -----	8
Figura 5 - Gráfico da qualidade da sequência por base do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	10
Figura 6 - Gráfico da qualidade da sequência por base do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	10
Figura 7 - Gráfico da qualidade da sequência por título do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	11
Figura 8 - Gráfico da qualidade da sequência por título do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	11
Figura 9 - Gráfico da qualidade da sequência por escore do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	12
Figura 10 - Gráfico da qualidade da sequência por conteúdo do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	13
Figura 11 - Gráfico da qualidade da sequência por conteúdo GC do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	13
Figura 12 - Gráfico da qualidade da sequência por conteúdo N do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	14
Figura 13 - Gráfico da qualidade da sequência por conteúdo N do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	14
Figura 14 - Gráfico de distribuição do comprimento da sequência do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	15
Figura 15 - Gráfico de sequências duplicadas do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT) -----	16
Figura 16 - Gráfico com o número de genes que apresentaram diferença de expressão para a célula MyD88 <sup>-/-</sup> e Caspase 1/11 <sup>-/-</sup> -----	17
Figura 17 – Gráfico de calor dos genes relacionados as sequências relacionadas a SAG-1 (SRS) do parasito <i>Toxoplasma gondii</i> -----	18

Figura 18 – Gráfico de calor relacionado aos genes das micronemas do parasito <i>Toxoplasma gondii</i> -----	19
Figura 19 - Gráfico de calor relacionado aos genes dos grânulos densos do parasito <i>Toxoplasma gondii</i> -----	20
Figura 20 - Gráfico de calor relacionado aos genes das roptrias do parasito <i>Toxoplasma gondii</i> -----	21
Figura 21 – Gráfico de calor relacionado aos genes do fator de transcrição AP2 do parasito <i>Toxoplasma gondii</i> -----	22
Figura 22 - Gráfico de calor com os valores de diferença de expressão com os genes das sequências relacionadas a SAG-1 (SRS), micronemas, grânulos densos, roptrias e do fator de transcrição AP2 do parasito <i>Toxoplasma gondii</i> -----	24
Figura 23 - Resumo da expressão dos genes do parasito <i>Toxoplasma gondii</i> em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) depletados geneticamente para MyD88 ou Caspase 1/11 em razão das células parentais (WT) -----	25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. ALRs – *AIM-like receptors (absent in melanoma like receptors)*
2. AMA1 – *Apical membrane antigen 1*
3. AP2 – Fator de transcrição da família AP2
4. B6 – Refere-se ao camundongo C57BL/6 (Black 6)
5. C57BL/6 – Camundongo C57BL/6
6. Casp1/11<sup>-/-</sup> - *Knockout Caspase 1/11*
7. CDC - Centro para o controle e prevenção de doenças, do inglês *Center for Disease Control and Prevention*
8. cDNA – Ácido Desoxirribonucleico complementar
9. CRLs - *C-type lectin receptors*
10. DAMP - Padrões moleculares associados ao dano
11. DCs - Células dendríticas
12. GRA - Proteínas de grânulos densos
13. HIV - *Human immunodeficiency virus*
14. ICE - Caspase 1/11 / *Interleukin-1/11 converting enzyme*
15. IFN- $\gamma$  - Interferon gama
16. IgG - Imunoglobulina G
17. IgM - Imunoglobulina M
18. IL-12 - Interleucina 12
19. IL-1 $\beta$  - Interleucina  $\beta$
20. MIC - Proteínas de micronemas
21. mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
22. MVP - Membrana do vacúolo parasitóforo
23. MyD88 - Fator de diferenciação Mieloide 88
24. NF-kB - Fator de transcrição nuclear kappa B
25. NGS - *Next generation sequencing*
26. NK - Célula natural killer
27. NLRs - *NOD-Like Receptors*
28. PAMP - Padrões moleculares associados a patógeno
29. PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
30. PRRs - Receptores de reconhecimento padrão

31. RLRs - RIG-1-Like Receptors
32. RNA – Ácido ribonucleico
33. RNA-Seq – *RNA Sequencing*
34. RONS – *Rhoptry neck*
35. ROPs - Proteínas de roptrias
36. SAG - Antígenos de superfície imunodominantes
37. SRS - Sequências relacionadas a SAG1
38. T. gondii - *Toxoplasma gondii*
39. Th1 – T helper 1
40. TIR - Domínio amino terminal
41. TLRs – *Toll like receptors*
42. TNF - Fator de necrose tumoral
43. TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa
44. UI – *Uninfected*
45. VP - Vacúolo parasitóforo
46. WT – *Wild type*

## **1. INTRODUÇÃO**

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

*T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, causador da toxoplasmose que acomete humanos e animais homeotérmicos (SILVA et al., 2017). Os parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa são caracterizados pela presença do complexo apical composto por micronemas, roptrias e grânulos densos, que são usados pelo parasito durante o processo de adesão e invasão de células hospedeiras (SOUZA et al., 2010).

A toxoplasmose é uma antropozoonose de distribuição global, considerada uma infecção parasitária negligenciada, que acomete cerca de 30 milhões de pessoas só nos Estados Unidos e supõe-se que afete mais de um terço da população mundial, de acordo com a CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2018). No Brasil, esse número pode variar de 50 a 80% entre mulheres em idade reprodutiva e crianças em idade escolar (DUBEY et al., 2012).

Por ser uma doença assintomática em indivíduos imunocompetentes, muitas vezes é confundida com uma gripe comum, porém, em indivíduos imunocomprometidos, como pessoas portadoras de HIV, os sintomas são mais graves, incluindo convulsões, náuseas e má coordenação motora. Em gestantes, principalmente no primeiro trimestre de gestação há o risco de abortos e má-formação do feto. A doença é menos crítica em crianças após o nascimento, porém, há uma preocupação com neonatos que adquiriram a infecção durante a gestação, pois os sinais clínicos são graves, incluindo hidrocefalia e microcefalia (PRADO et al., 2011). Além disso pode levar a toxoplasmose ocular que gera uma infecção ocular, como retinite necrotizante, levando a perda da visão caso não tratada (PARK; NAM, 2013).

*T. gondii* apresenta três formas em seu ciclo de vida: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Os felídeos são os hospedeiros definitivos do parasito e quando infectados, liberam em suas fezes oocistos, estes em contato com tecido neural ou muscular se desenvolvem em taquizoítos, caracterizando a fase aguda da doença, apresentando maior atividade metabólica. Os bradizoítos formam cisto que são mais resistentes ao ambiente celular do que os taquizoítos, podendo permanecer por anos nos tecidos, sendo estes responsáveis pela fase crônica da doença (SOUZA; 2009).

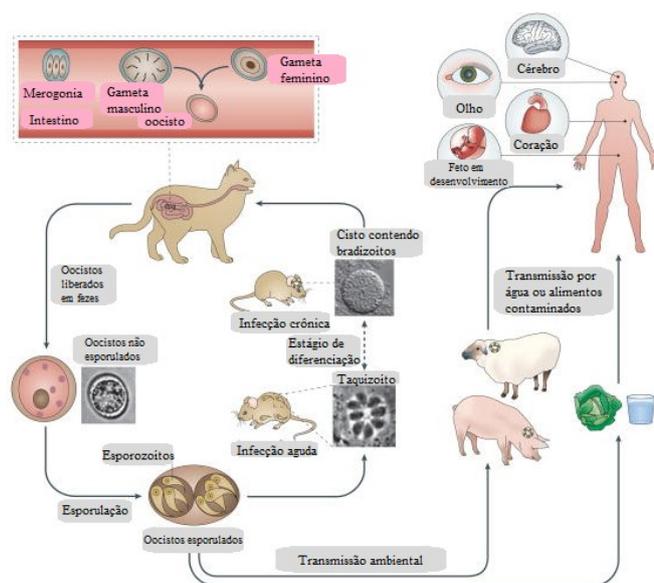
### **1.2. Transmissão da toxoplasmose**

Das vias de transmissão da toxoplasmose, ressalta-se a via zoonótica, oral e congênita, sendo a infecção por transfusões e transplante de órgãos menos recorrentes (TENTER et al., 2000; JONES & DUBEY, 2012; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Após os

merozoítos se replicarem nos enterócitos do intestino do gato, gametas masculinos e femininos de *T. gondii* se formam dentro da célula hospedeira, formando oocistos diplóides, que são eliminados em suas fezes até três semanas após sua infecção, contaminando o ambiente e animais, como roedores e pássaros, amplificando as vias de transmissão do parasito (TEUTSCH et al., 1979; DUBEY et al., 2011). No hospedeiro intermediário - apontado como roedor na Figura 1- ocorre a replicação assexual. A fase de infecção aguda é caracterizada por taquizoítos que se disseminam por todo o organismo e a de infecção crônica pela diferenciação para bradizoítos de crescimento lento dentro de cistos teciduais.

Os seres humanos são infectados pela ingestão de carne mal cozida contendo cistos teciduais ou pela ingestão de oocistos esporulados em água contaminada. A ingestão de cistos teciduais via alimentação onívora ou carnívora pode levar à transmissão para outros hospedeiros intermediários ou para gatos, reiniciando a fase sexual do ciclo de vida (Figura 1) (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

Embora a maioria das infecções humanas seja leve, a toxoplasmose pode causar sintomas graves no cérebro e em outros órgãos em pacientes imunocomprometidos, bem como no feto em desenvolvimento após infecção congênita, sendo esta a forma mais grave de transmissão da toxoplasmose. A via transplacentária ocorre através da infecção por taquizoítos provenientes da mãe na fase aguda da doença ou pela infecção crônica durante a gravidez (GUERINA et al., 1994). As mulheres que apresentam sorologia positiva antes da gravidez possuem menos chances de infectar seus fetos do que aquelas que se infectam durante a gestação (VOGEL et al., 1996; GAVINET et al., 1997).



Fonte: Hunter, 2012

Figura 1 - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.

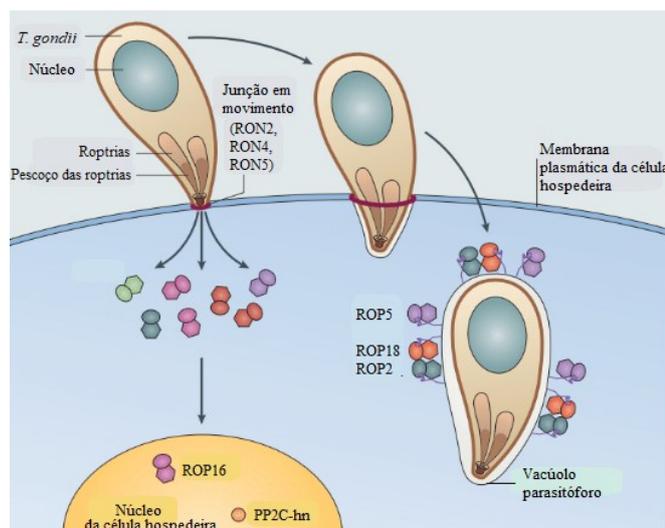
### 1.3. Ciclo lítico

A invasão e lise celular são os principais eventos na patogênese da infecção por *T. gondii*, os quais envolvem processos complexos e muito semelhantes entre os parasitos do filo Apicomplexa, por apresentarem uma maquinaria dedicada em seus complexos apicais (De SOUZA et al., 2010; LI et al., 2015). A invasão celular, dessa forma, é um mecanismo dinâmico com a participação ativa do parasito, e pode ser resumida em três etapas.

A primeira etapa é caracterizada pela adesão inicial do parasito à célula hospedeira com orientação aleatória do parasito, envolvendo antígenos de superfície imunodominantes (SAG). Após a adesão inicial, os parasitos posicionam a extremidade anterior para a extrusão do conóide, seguida por invaginação da membrana da célula hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (VP), onde várias proteínas de micronemas (MIC), como AMA1 são secretadas e funcionam como adesinas, sendo responsáveis pela espessa zona de adesão de modo irreversível. Em sequência, inicia-se o movimento de invasão celular, que o força para dentro do VP (LI et al., 2015). A membrana plasmática da célula hospedeira é usada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), resultando em um vacúolo que não se funde com lisossomos (SOUZA et al, 2010).

A segunda etapa é caracterizada pela secreção de proteínas de roptrias (ROPs) e do pescoço das roptrias, as “rhoptry neck” (RONs), que são liberadas dentro do VP e estendem a MVP para induzir a associação com organelas do hospedeiro, de modo que mitocôndrias e retículo endoplasmático posicionam-se de forma adjacente ao VP. As ROPs são liberadas no citoplasma da célula hospedeira e podem ser direcionadas ao núcleo, como a ROP16 e proteína fosfatase 2C (PP2C-hn), ou para a superfície do VP, como ROP2, ROP18 e ROP5, como visualizado na Figura 2 (HUNTER et al., 2012). Na última etapa, proteínas de grânulos densos (GRA) modificam a MVP e contribuem para a remodelação e maturação do vacúolo parasitóforo, com a formação de uma rede de membrana intravacuolar metabolicamente ativa para o crescimento e sobrevivência do parasito (MERCIER et al., 2005).

Os taquizoítos dentro do VP proliferam por endodiogenia, produzindo novas gerações de parasitos em poucas horas após a infecção e, subsequentemente, há lise da célula hospedeira e liberação dos taquizoítos que ficam livres para infectar uma variedade de tecidos e tipos celulares (HEMPHILL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006).



Fonte: Hunter, 2012

Figura 2 - Invasão e disseminação de *Toxoplasma gondii* na célula hospedeira.

#### 1.4. Resposta imune protetora do hospedeiro

Em modelos animais, a resposta imune do hospedeiro induzida pela infecção por parasitos do filo Apicomplexa, como *T. gondii* e *Neospora caninum* tem demonstrado que algumas citocinas pró-inflamatórias são fundamentais para o controle do crescimento dos parasitos (HEMPHILL; AGUADO-MARTÍNEZ; MÜLLER, 2016).

A imunidade protetora do hospedeiro induzida pela infecção por estes protozoários é tipicamente a resposta imune do tipo Th1, que envolve a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF), juntamente com a produção de imunoglobulina G2 (IgG2) (DONAHOE et al., 2015; HECKER et al., 2015).

Durante a fase aguda da infecção, macrófagos e células dendríticas (DCs) produzem e secretam altos níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$ , a fim de que a célula natural killer (NK) e as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> sejam requeridas e produzam altos níveis de IFN- $\gamma$  (HUNTER et al., 2012). Durante a infecção o organismo também produz altos níveis dos anticorpos anti-*T. gondii* IgG e IgM, que lisam o parasita antes do contato intracelular, mediados pelo sistema complemento (MITSUKA-BREGANÓ et al., 2010).

O reconhecimento imune inato é realizado por famílias de receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Estes PRRs comumente reconhecem estruturas conservadas, chamadas padrões moleculares associados a patógeno (PAMP) ou padrões moleculares associados ao dano (DAMP) de estruturas microbianas, derivadas do próprio organismo, ou de fatores ambientais, induzindo uma resposta imune inata (PATRA; CHOI, 2016; KIM; SHIN; NAHM, 2016). Ao detectar um PAMP ou DAMP, os PRRs desencadeiam uma cascata de sinalização que ativa as

respostas antimicrobianas inatas. Com base nas diferenças genéticas e funcionais, PRRs são classificados atualmente em cinco famílias: os TLRs (*Toll-like receptors*), os NLRs (*NOD-Like Receptors*), RLRs (*RIG-I-Like Receptors*), os CRLs (*C-type lectin receptors*), e os ALRs (*AIM-like receptors*) (KIM; SHIN; NAHM, 2016).

Uma das principais famílias de PRRs são os do tipo TLRs que são capazes de reconhecer moléculas derivadas de várias classes de patógenos, incluindo membros do filo Apicomplexa, e conseqüentemente desencadear uma cascata de sinalização culminando na produção de citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, peptídeos antimicrobianos e moléculas co-estimulatórias (MINEO et al., 2010). A transdução de sinal via TLRs ocorre através de proteínas adaptadoras contendo domínio amino terminal TIR, tais como MyD88 a qual acopla a sinalização por esses receptores, exceto TLR3, e induz uma cascata de sinalização importante para induzir uma resposta do tipo Th1. Como já descrito por Mineo e colaboradores (2010) a molécula MyD88 se liga ao receptor do tipo TLR2 presente na superfície de macrófagos, induzindo o fator de transcrição NF-kB a secretar IL-12. Essa citocina também desempenha um papel crucial na ativação de células NK e contribuem para a diferenciação dos linfócitos T em TCD4<sup>+</sup> (ABDUL-CADER et al., 2016).

O inflamassoma é um complexo proteico do sistema imunitário inato, composto por alguns receptores da família NLRs e diversas proteínas. Esse complexo é importante para ativação de caspase-1, uma enzima que cliva pró-IL-1 $\beta$  em sua forma ativa responsável pela ativação de processos inflamatórios tendo um papel fundamental na resposta imune do hospedeiro contra patógenos (KAYAGAKI et al., 2013; BROZ e DIXIT, 2016; CASSON et al., 2013).

### **1.5. Análise de transcriptoma**

A tecnologia de RNA-Seq, uma ferramenta transcriptômica promissora, é baseada no sequenciamento de cDNA e que se apoia nas plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS: *next generation sequencing*) (MADROÑERO, 2014). Essa tecnologia de sequenciamento possibilita a identificação de genes e transcritos diferencialmente expressos entre amostras biológicas, como também a compreensão da função, estrutura e interação dos genes envolvidos em certo processo biológico.

Além disso, o sequenciamento de RNA através do RNA-seq tem superado as limitações de outras tecnologias - como os Microarrays - devido a sua capacidade de detectar novos transcritos, possuir maior especificidade e sensibilidade (comparada aos microarrays, detecta-

se uma porcentagem maior de genes diferencialmente expressos, principalmente genes com baixa expressão), detecção de transcritos raros e de baixa abundância (a profundidade da cobertura de sequenciamento pode ser alterada para detectar transcritos raros, transcritos únicos por célula ou genes fracamente expressos) (ILLUMINA), exigir menores quantidades de RNA, possibilidade de encontrar estrutura de exons, íntrons e locais de splicing alternativo, bem como permitir a identificação das extremidades 5' e 3' dos genes (MARGUERAT et al., 2008; SHENDURE, 2008; WANG et al., 2009).

A metodologia empregada, de um modo geral consiste na purificação do mRNA, a preparação e fragmentação de uma livraria de cDNA obtida a partir do mRNA e o sequenciamento através de uma plataforma de sequenciamento (MADROÑERO, 2014).

Os dados obtidos a partir da tecnologia RNA-Seq podem ser analisados a partir do Galaxy (GIARDINE et al., 2005), uma plataforma web de código aberto para pesquisas biomédicas que analisa grandes volumes de dados. Através do servidor público (usegalaxy.org) ou pela instalação de sua instância local (galaxyproject.org), é possível executar, reproduzir e compartilhar análises de dados, onde os usuários podem executar análises computacionais complexas e ter acesso aos detalhes de cada etapa da execução para posterior inspeção, publicação ou reutilização dos dados.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Identificar possíveis fatores de virulência do parasito *Toxoplasma gondii* responsáveis por controlar a resposta do hospedeiro.

### **2.2. Objetivos específicos**

A. Selecionar os alvos por análise de bioinformática do transcriptoma de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 parental (WT), deletados geneticamente para MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>) ou para caspase-1/11 (CASP1/11<sup>-/-</sup>) infectados com a cepa do tipo 1 de *T. gondii* RH pelo programa Galaxy;

B. Analisar os resultados obtidos por *fold change* das amostras de BMDMs MyD88<sup>-/-</sup> ou CASP1/11<sup>-/-</sup> infectados com a cepa do tipo 1 de *T. gondii* RH pelos WT infectados;

C. Construção dos gráficos de calor e pizza com os valores dos genes transcritos diferencialmente expressos quando o *fold change* absoluto  $> 1$  (*up* ou *down* regulado) em relação ao BMDMs de C57BL/6 WT (parental) com o valor de  $P < 0,05$ .

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Análise de bioinformática e seleção de alvos**

##### **3.1.1. RNA-Seq**

Foram usados dados do sequenciamento de nova geração (NGS), do organismo *T. gondii*, cedidos pelo laboratório do professor Dr. Saeij Jeroen da Universidade da Califórnia, Davis (SAEIJ et al 2012).

Tais dados se referem à cepa RH de *T. gondii* sequenciada pelo equipamento Solexa/Illumina, após 6 horas de infecção em BMDMs derivados de camundongos WT (parental) ou depletados geneticamente para MyD88 ou caspase1/11, disponíveis sob o formato FASTQ33, contendo leituras pareadas de 51 pb cada.

##### **3.1.2. Genoma de referência**

*Toxoplasma gondii* do tipo GT1 em formato FASTA depositado no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>) versão 36 foi utilizado como genoma de referência para análise do transcriptoma, na análise de genes diferencialmente expressos.

##### **3.1.3. Galaxy**

A análise de bioinformática do transcriptoma usando o mRNA sequenciado (mRNAseq), obtido pelo sequenciador de nova geração Illumina GAIIx foi realizada na plataforma online Galaxy (<https://galaxyproject.org/>). Os dados do sequenciamento foram analisados pela pipeline FastQC, Trimmomatic, HISAT2, HTSeq e DESeq2 em replicada biológica (Figura 3 e 4).

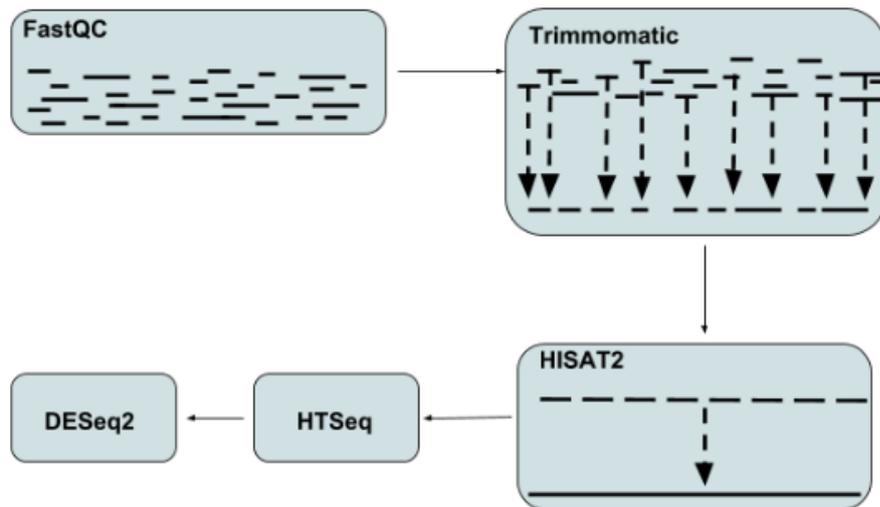


Figura 3 - Representação da leitura das sequências, onde a opção FastQC verifica a qualidade das sequências. A opção Trimmomatic alinha as sequências, ajustando a leitura e a opção HISAT2 alinha as sequências ao genoma de referência. HTSeq compara os níveis de expressão de genes e transcritos, indicando quais genes são regulados entre ambas as condições e também quais genes são diferenciados em relação a outros tipos de regulação, determinando a quantidade de leituras por gene e calculando o mapeamento de leituras para cada condição. Por fim, DESeq2 reúne transcriptomas a partir dos dados de RNA-Seq e quantifica a expressão diferencial dos genes.

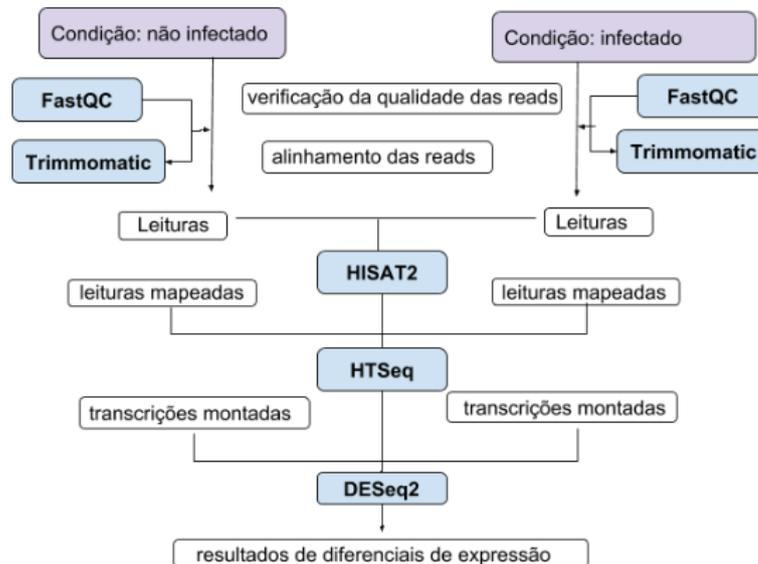


Figura 4 - Esquema representativo da ordem das análises.

### 3.1.4. Gráficos de calor (*heatmap*) e pizza

Gráficos de calor (*heatmap*) e pizza foram desenvolvidos com os dados de log<sub>2</sub> obtidos do RNAseq para dois alvos essenciais para induzir uma resposta imune eficaz do hospedeiro: MyD88 e Caspase 1/11, e expressos em relação aos dados obtidos pelo grupo WT. Foram

analisados o papel de MyD88 e Caspase1/11 na expressão de genes do parasito importante no seu processo de invasão, replicação e modulação da resposta imune do hospedeiro, como sequências relacionadas a SAG-1 (SRS), micronemas (MICs), roptrias (ROPs), grânulos densos (GRAs) e o fator de transcrição da família AP2 (proteína alfa, que atua como um fator de transcrição de ligação ao DNA, se ligando ao mesmo e recrutando a maquinaria de transcrição).

Os *heatmaps* foram obtidos pela escala de cor do Excel (Office 365, versão 1803), os genes transcritos foram considerados diferencialmente expressos quando o *fold change* absoluto apresentou valores  $> 1$  ou  $< -1$  (*up* ou *down* regulado) em relação ao BMDMs de C57BL/6 WT (parental) com o valor de  $P < 0,05$ , portanto, quanto mais próximo os valores foram de +1 mais intenso foi a cor vermelha (*up*); e valores menores de -1 mais intenso na cor azul (*down*). Os genes que não foram diferencialmente expressos foram nomeados como não alterado (NA) ou aqueles que apresentaram valores próximos de 0, receberam a cor branca nos gráficos de *heatmap* e cinza nos gráficos de pizza.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Amostras usadas para análise de RNA-Seq e os dados gerados apresentaram uma boa qualidade as sequências analisadas

Os dados analisados pelo software Galaxy em duplicada para macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 parental (WT), deletados geneticamente para MyD88 e caspase-1/11, não infectados e infectados com cepas do tipo 1 de *Toxoplasma gondii* (RH) geraram gráficos que permitem a visualização das qualidades das amostras e dos dados obtidos, onde a maioria apresentou bons resultados. Os parâmetros analisados quanto a qualidade da sequência (FastaQC) foram: por base, por título, por escore, por porcentagem do conteúdo de GC e N, por distribuição do comprimento das sequências e por sequências duplicatas como melhor exemplificado abaixo.

#### 4.1.1. Qualidade da sequência por base

O gráfico de análise da qualidade por base permite a visualização da faixa de valores de qualidade em todas as bases em cada posição no arquivo FastQ, onde o eixo y representa a pontuação de qualidade e o eixo x a posição das leituras, por pares de bases (Figura 5 e 6). A linha azul demonstra a qualidade média, a linha vermelha central representa o valor mediano, a caixa verde representa uma ótima qualidade, a amarela uma qualidade mediana e a vermelha

uma qualidade ruim. O valor mínimo aceitável de erro por Phred é de 20 quando utilizado o equipamento Illumina para realização do sequenciamento de nova geração (NGS).

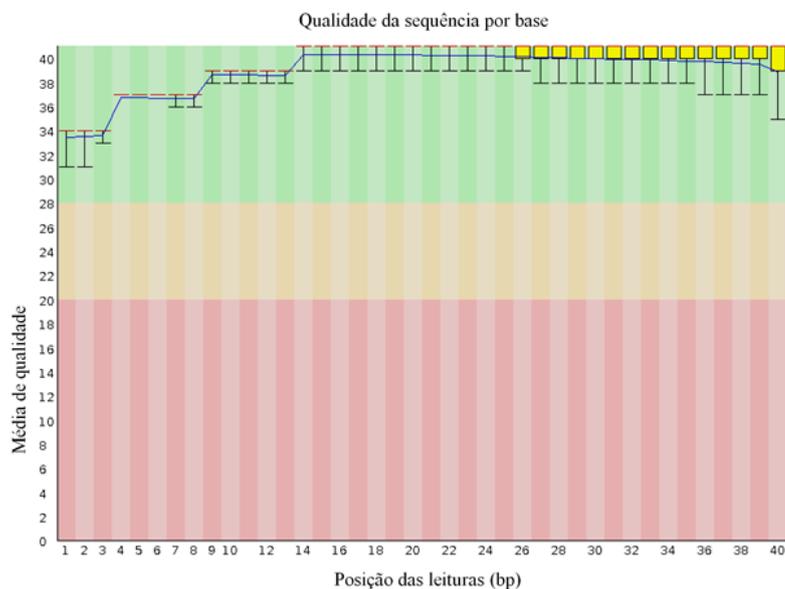


Figura 5 – Gráfico da qualidade da sequência por base do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): a figura representa um bom exemplo de qualidade das sequências.

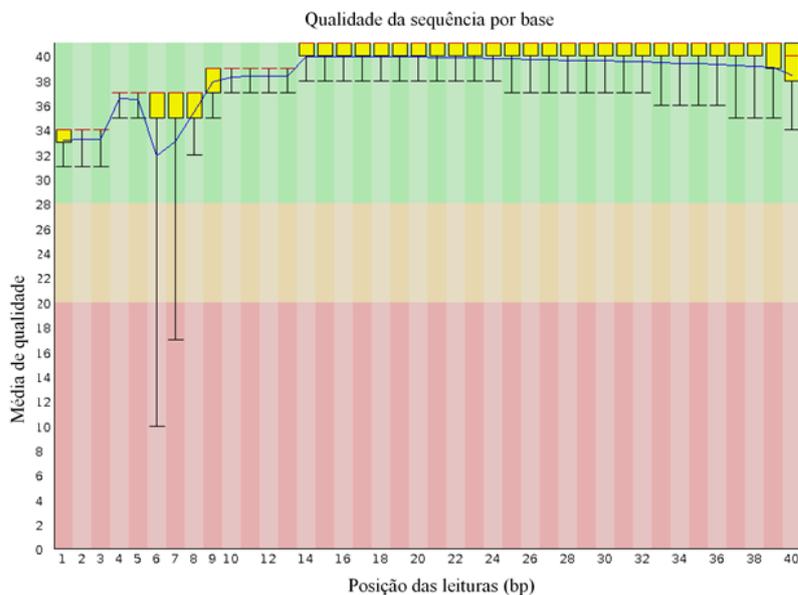


Figura 6 – Gráfico da qualidade da sequência por base do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): o gráfico apresenta erros no começo da leitura, onde o desvio padrão chega a tonalidade vermelha, indicando erros, mas que não afetam significativamente a interpretação do mesmo.

#### 4.1.2. Qualidade da sequência por título

O gráfico de qualidade da sequência por título mostra o desvio da qualidade média de cada ladrilho, onde as cores mais quentes (vermelho) indicam que o ladrilho possui pior qualidade que as outras bases e as cores frias (azul) indicam que a qualidade é igual ou acima da média para aquela base na corrida (Figura 7 e 8). Os gráficos analisados apresentaram alta qualidade da sequência por título, observando se o gráfico todo azul (Figura 7).

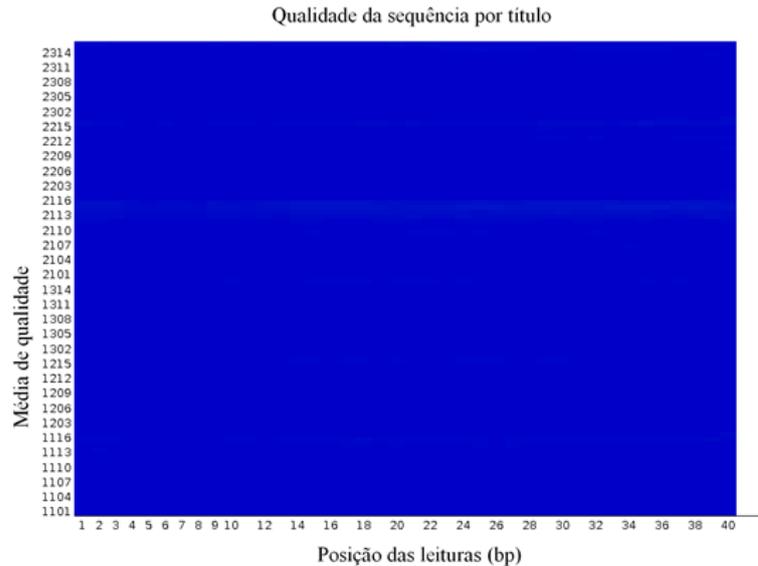


Figura 7 – Gráfico da qualidade da sequência por título do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): o gráfico gerado com esse parâmetro não apresentou erros.

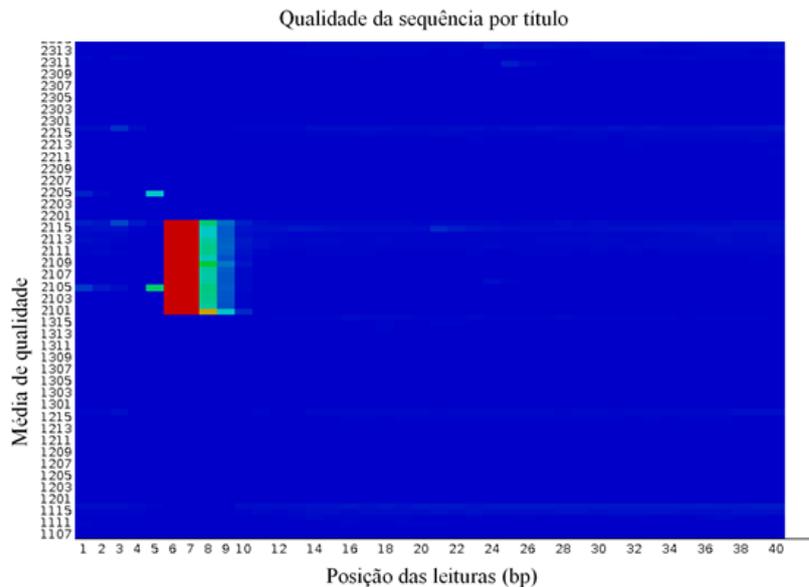


Figura 8 – Gráfico da qualidade da sequência por título do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): o gráfico gerado com esse parâmetro apresentou erro no começo, como observado em tons quentes.

### 4.1.3. Qualidade da sequência por escore

O gráfico de qualidade da sequência por escore permite observar se há um subconjunto das sequências que possuem valores de qualidade universalmente baixos. Se houver uma proporção significativa das sequências em uma corrida de baixa qualidade geral, isso pode indicar algum tipo de problema sistemático - possivelmente com apenas uma parte da corrida. Os dados utilizados na análise de RNA-Seq apresentaram alta qualidade da sequência por escore (Figura 9).

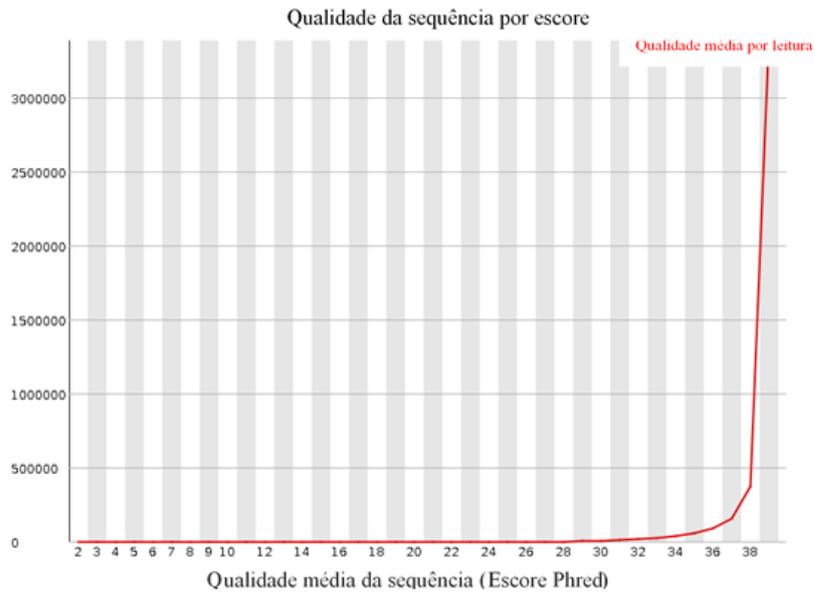


Figura 9 – Gráfico da qualidade da sequência por escore do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): o gráfico gerado com esse parâmetro não apresentou erros.

### 4.1.4. Qualidade da sequência por conteúdo

O gráfico de qualidade da sequência por conteúdo possui quatro linhas, sendo que cada uma representa uma base nitrogenada (adenina, timina, citosina e guanina). O gráfico para apresentar uma boa qualidade as linhas devem correr paralelas umas às outras, visto que a quantidade relativa de cada base deve refletir a quantidade total de bases em seu genoma (Figura 10).

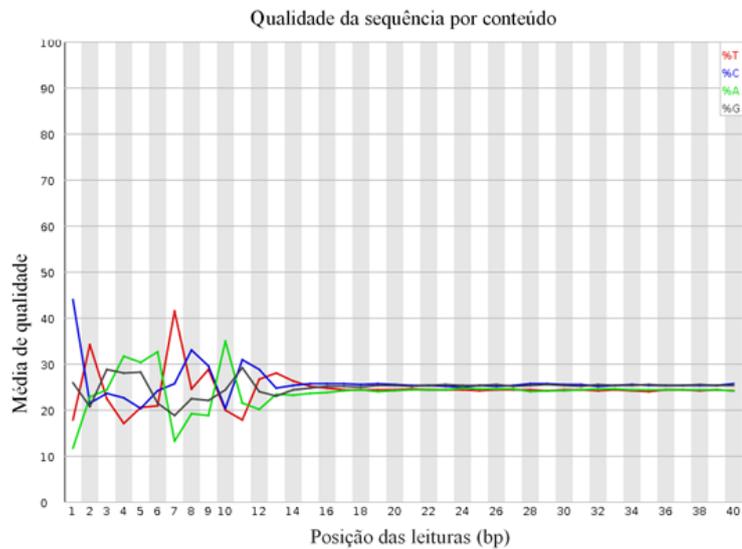


Figura 10 – Gráfico da qualidade da sequência por conteúdo do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): o gráfico gerado com esse parâmetro não apresentou erros.

#### 4.1.5. Qualidade da sequência por conteúdo GC

O gráfico mensura o conteúdo de GC em todo o comprimento de cada sequência em um arquivo e compara com a distribuição normal. O conteúdo GC é o que garante a estabilidade do DNA, o que também afeta a estrutura secundária do mRNA. É calculado a partir da equação:  $(\text{conteúdo}(G+C) / \text{conteúdo}(A+T+G+C)) \times 100$ . Um bom gráfico mostra o pico central alinhado com a distribuição normal (Figura 11), já um pico desregular, indica que a biblioteca foi contaminada.

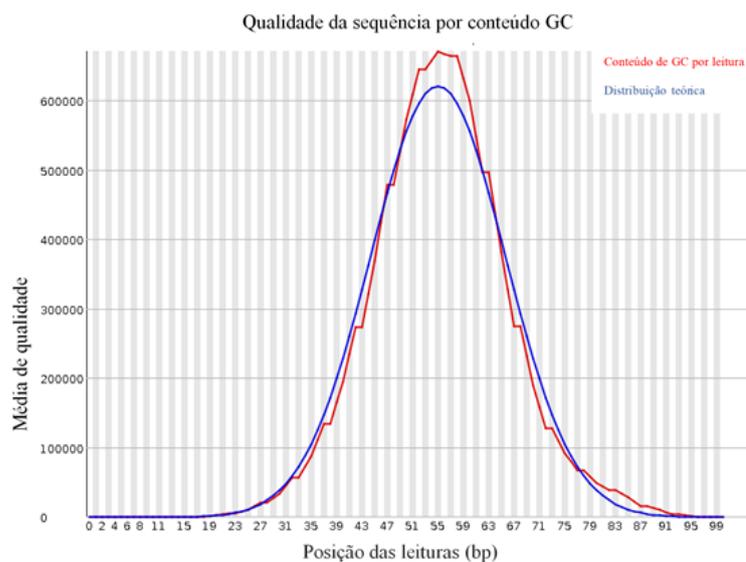


Figura 11 – Gráfico da qualidade da sequência por conteúdo GC do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): o gráfico gerado com esse parâmetro não apresentou erros.

#### 4.1.6. Qualidade da sequência por conteúdo N

O gráfico de qualidade da sequência por conteúdo N mostra se o sequenciador foi capaz de ligar as bases corretamente, caso isso não ocorra, uma base N substitui a base convencional. Porém, não é incomum ter uma proporção muito baixa de N aparecendo, especialmente mais próximo ao fim da sequência (Figura 12 e 13).

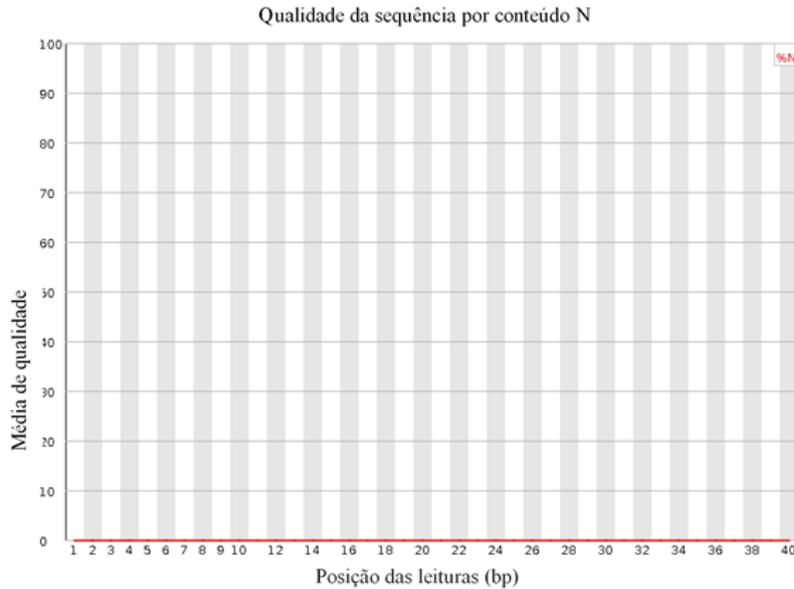


Figura 12 – Gráfico da qualidade da sequência por conteúdo N do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): o gráfico gerado com esse parâmetro não apresentou alteração.

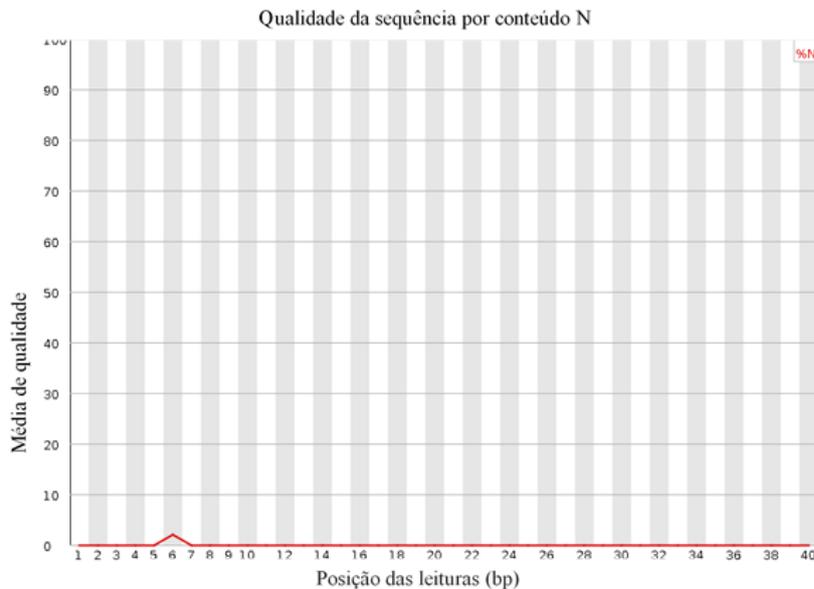


Figura 13 – Gráfico da qualidade da sequência por conteúdo N do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): o gráfico gerado com esse parâmetro não apresentou alteração significativa no começo.

#### 4.1.7. Distribuição do comprimento da sequência

O gráfico de distribuição do comprimento da sequência demonstra a distribuição dos fragmentos no arquivo analisado, o qual normalmente produz um gráfico simples com um pico em apenas um tamanho, mas para arquivos FastQ de comprimento variável, mostrará as quantidades relativas de cada tamanho diferente de fragmento de sequência (Figura 14).

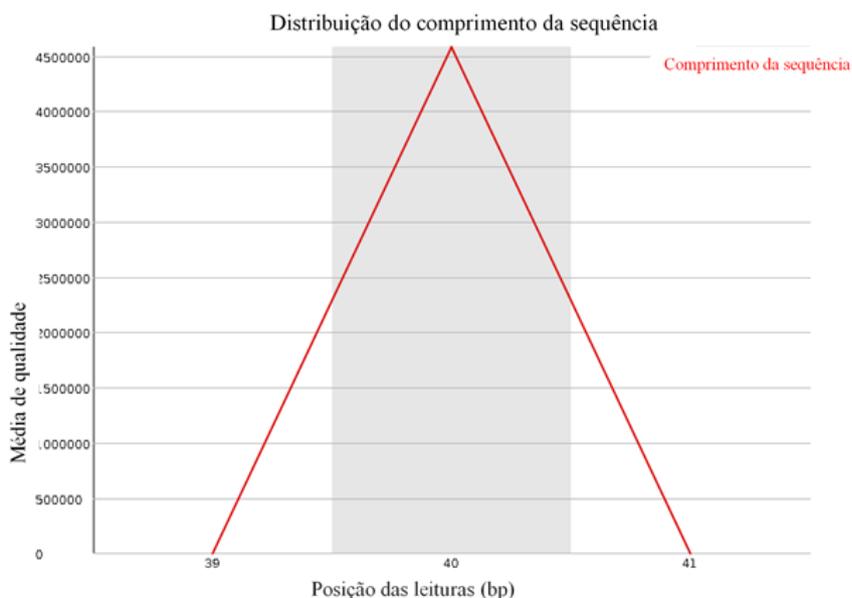


Figura 14 - Gráfico de distribuição do comprimento da sequência do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): o gráfico gerado com esse parâmetro não apresentou erros.

#### 4.1.8. Sequências duplicadas

O gráfico de análise das sequências duplicadas demonstra o grau de duplicação de toda sequência em uma biblioteca e cria um gráfico mostrando o número relativo de sequências com diferentes graus de duplicação. Um baixo nível de duplicação pode indicar um nível muito alto de cobertura da sequência alvo, mas um nível muito alto de duplicação é mais provável de indicar algum tipo de viés de enriquecimento.

A linha azul mostra o nível de distribuição da duplicação do conjunto de sequências, já na vermelha, as sequências são desduplicadas e as proporções mostradas são dos dados originais (Figura 15).

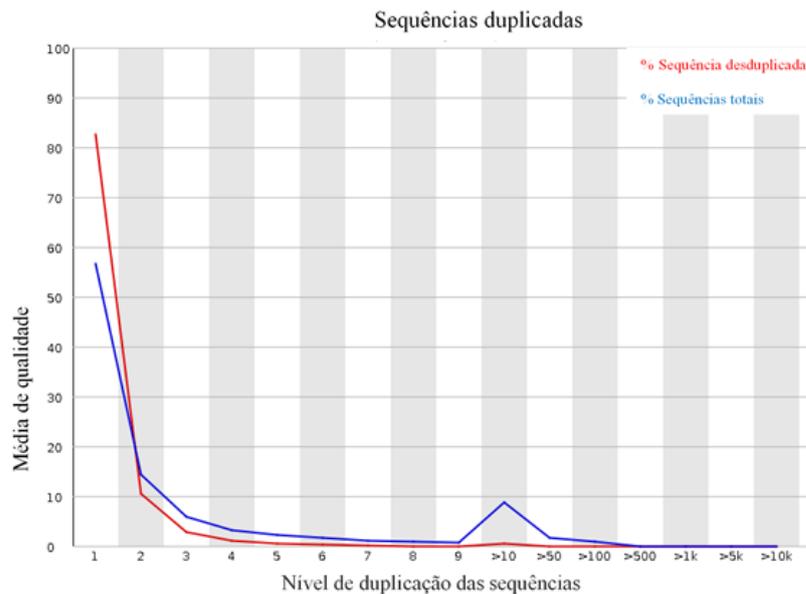


Figura 15 – Gráfico de sequências duplicadas do grupo de macrófagos derivados da medula óssea da linhagem parental (WT): o gráfico gerado com esse parâmetro não apresentou erros.

#### 4.2. MyD88 e Caspase 1/11 modulam a expressão gênica no parasito *T. gondii*

Os gráficos de calor (*heatmap*) e pizza demonstram o papel das moléculas MyD88 e Caspase1/11 do hospedeiro na modulação da expressão de genes do parasito *T. gondii* envolvidos no seu processo de invasão e replicação da célula hospedeira. Foram avaliados a expressão das sequências relacionadas a SAG-1 (SRS), micronemas (MICs), roptrias (ROPs), grânulos densos (GRAs) e o fator de transcrição da família AP2. Os resultados obtidos foram apresentados a partir da expressão dos genes do parasito obtidos pelo grupo BMDMs deletados geneticamente para MyD88 ou Caspase1/11 e infectado em relação ao grupo WT infectado em gráficos de calor e pizza, no qual cores quentes (vermelho) representam maior regulação/expressão (*upregulation*) do gene do parasito na ausência de MyD88 ou Caspase1/11 e cores frias menor regulação/expressão (*downregulation*) dos mesmos.

Para MyD88<sup>-/-</sup>, 5127 genes aumentaram sua expressão, 406 genes diminuíram a expressão e 3104 não tiveram alteração. Para Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, 5519 genes aumentaram sua expressão, 557 diminuíram a expressão na ausência de caspase 1/11 e 2561 genes não foram alterados. A proteína adaptadora MyD88 do hospedeiro modula a expressão de 75% genes do parasito, enquanto a enzima caspase1/1 80% (Figura 16).

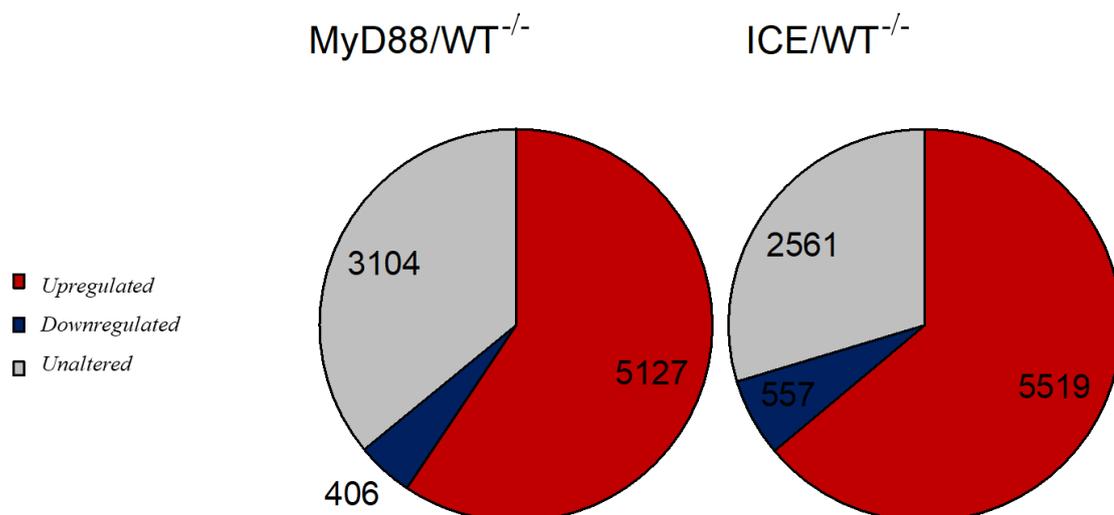


Figura 16: Gráfico com o número de genes que apresentaram diferença de expressão para a célula MyD88<sup>-/-</sup> e ICE/WT<sup>-/-</sup> (Caspase 1/11<sup>-/-</sup>): Os valores de upregulated são referentes aos genes que aumentaram sua expressão na ausência de Myd88 ou Caspase 1/11, downregulated foram os genes que diminuíram sua expressão e unaltered são referentes aos genes que não são expressos em uma ou duas das condições.

#### 4.2.1. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes das sequências relacionadas a SAG-1 (SRS) do parasito

O gráfico de calor demonstra que a ausência da proteína adaptadora MyD88 e a enzima Caspase1/11 de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) induzem um aumento na expressão nos genes relacionados a SRSs do parasito *T. gondii* após 6 horas de infecção quando comparados com os macrófagos WT (Figura 17).

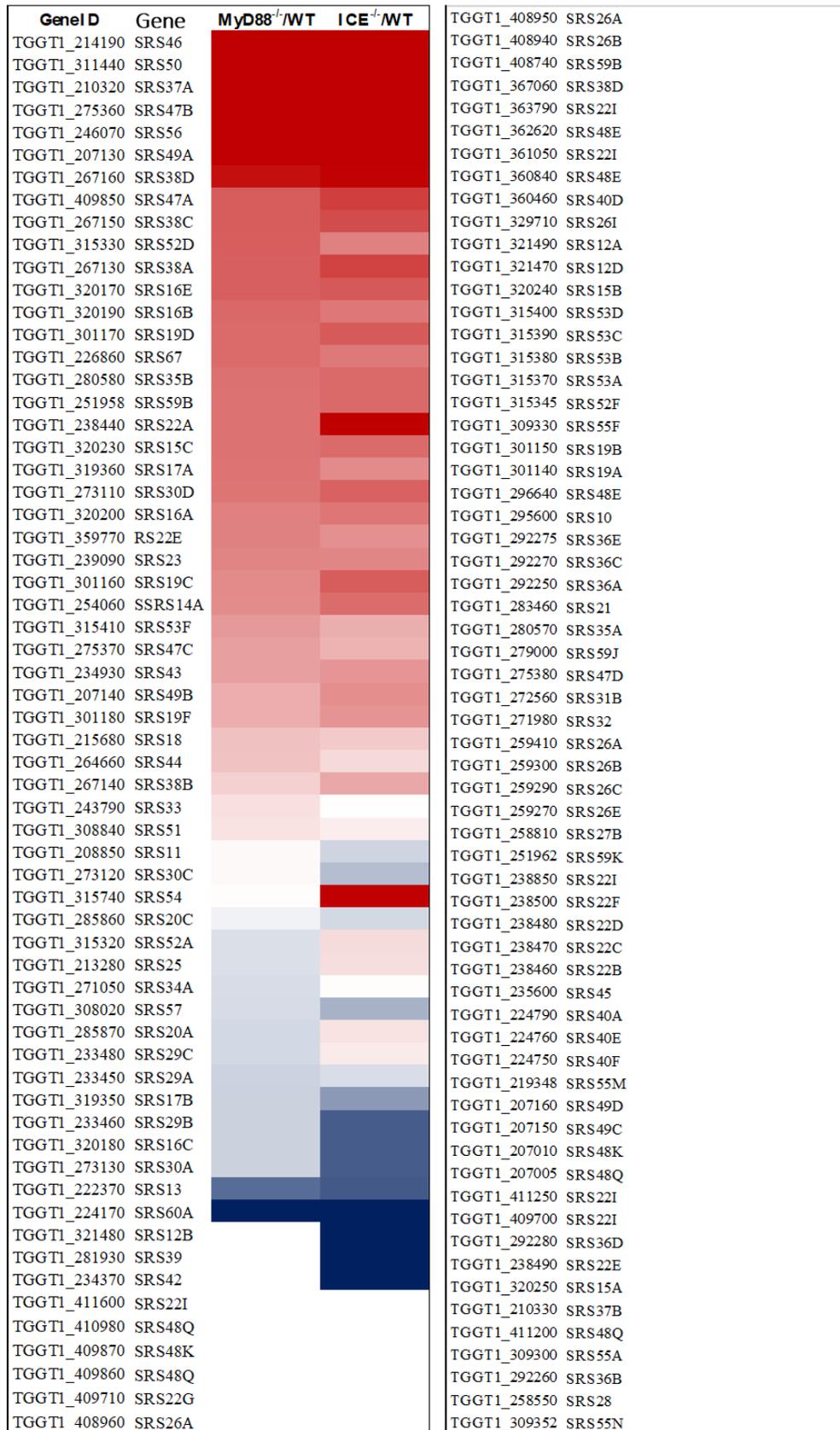


Figura 17: Gráfico de calor relacionado as sequências relacionadas a SAG-1 (SRS) do parasito *Toxoplasma gondii*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT (parental) e deletados geneticamente para MyD88 e Caspase 1/11 foram infectados por *Toxoplasma gondii* (MOI 3). O gráfico foi

representado pela razão de BMDMs depletados geneticamente para MyD88 ou Caspase 1/11 em razão pelo WT. Cores fria (azul) menor expressão gênica, cores quentes (vermelho) maior expressão do gene e cor branca não altera a expressão do gene.

#### 4.2.2. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes de micronemas do parasito

O gráfico de calor demonstra que a ausência da proteína adaptadora MyD88 e a enzima Caspase1/11 de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) induzem um aumento na expressão nos genes relacionados aos genes das micronemas do parasito *T. gondii* após 6 horas de infecção quando comparados com os macrófagos WT (Figura 18).

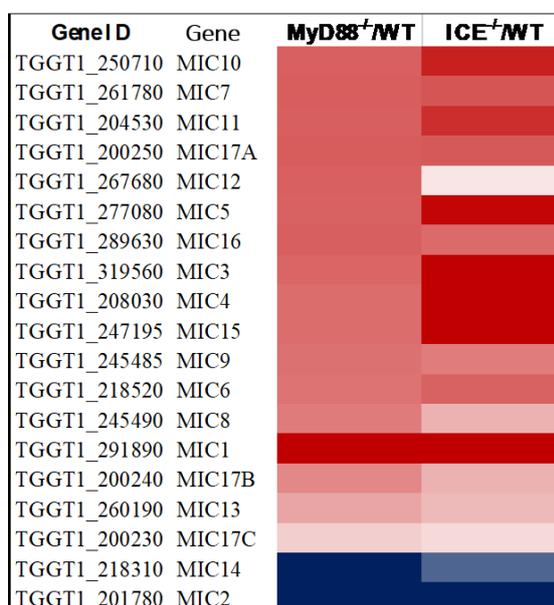


Figura 18: Gráfico de calor relacionado aos genes das micronemas do parasito *Toxoplasma gondii*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT (parental) e deletados geneticamente para MyD88 e Caspase 1/11 foram infectados por *T. gondii* (MOI 3). Após, 6 horas de infecção as amostras foram obtidas e submetidas ao sequenciamento de nova geração no equipamento Illumina e os dados analisados pelo software Galaxy. O gráfico foi representado pela razão de BMDMs depletados geneticamente para MyD88 ou Caspase 1/11 em razão pelo WT. Cores fria (azul) menor expressão gênica, cores quentes (vermelho) maior expressão do gene e cor branca não altera a expressão do gene.

#### 4.2.3. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes de grânulo denso do parasito

O gráfico de calor demonstra que a ausência da proteína adaptadora MyD88 e a enzima Caspase1/11 de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) induzem um aumento na

expressão nos genes relacionados aos genes de grânulo denso do parasito *T. gondii* após 6 horas de infecção quando comparados com os macrófagos WT (Figura 19).

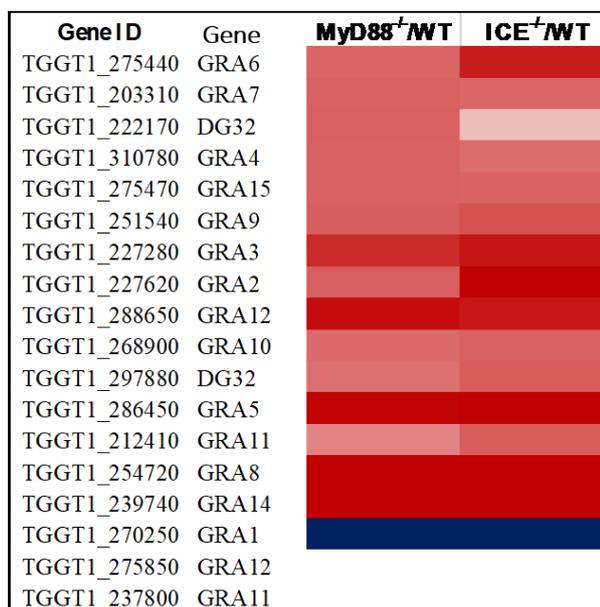


Figura 19: Gráfico de calor relacionado aos genes de grânulo denso do parasito *Toxoplasma gondii*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT (parental) e deletados geneticamente para MyD88 e Caspase 1/11 foram infectados por *T. gondii* (MOI 3). Após, 6 horas de infecção as amostras foram obtidas e submetidas ao sequenciamento de nova geração no equipamento Illumina e os dados analisados pelo software Galaxy. O gráfico foi representado pela razão de BMDMs depletados geneticamente para MyD88 ou Caspase 1/11 em razão pelo WT. Cores fria (azul) menor expressão gênica, cores quentes (vermelho) maior expressão do gene e cor branca não altera a expressão do gene.

#### 4.2.4. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes das roptrias do parasito

O gráfico de calor demonstra que a ausência da proteína adaptadora MyD88 e a enzima Caspase1/11 de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) induzem um aumento na expressão nos genes relacionados aos genes das roptrias do parasito *T. gondii* após 6 horas de infecção quando comparados com os macrófagos WT (Figura 20).

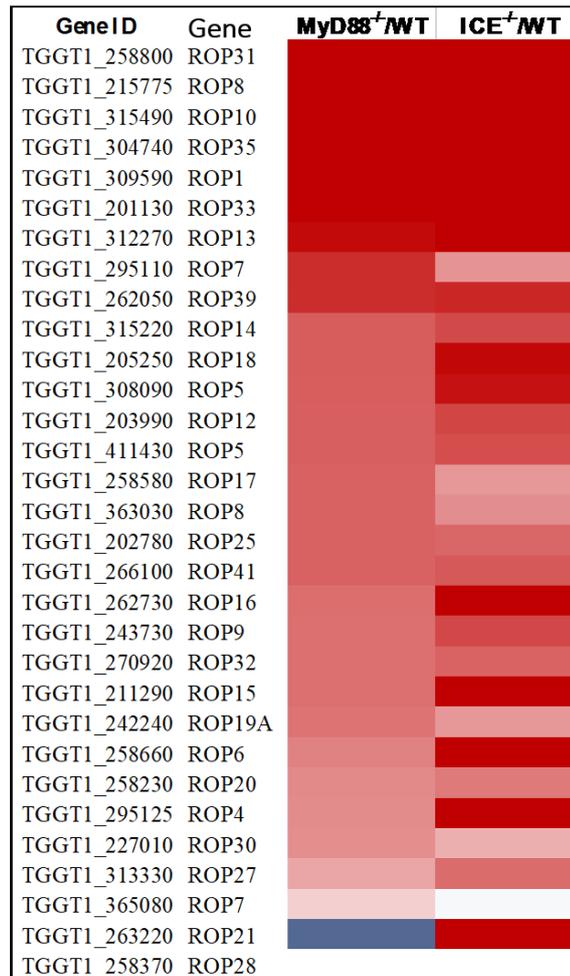


Figura 20: Gráfico de calor relacionado aos genes das roptrias do parasito *Toxoplasma gondii*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT (parental) e deletados geneticamente para MyD88 e Caspase 1/11 foram infectados por *T. gondii* (MOI 3). Após, 6 horas de infecção as amostras foram obtidas e submetidas ao sequenciamento de nova geração no equipamento Illumina e os dados foram analisados pelo software Galaxy. O gráfico foi representado pela razão de BMDMs depletados geneticamente para MyD88 ou Caspase 1/11 em razão pelo WT. Cores fria (azul) menor expressão gênica, cores quentes (vermelho) maior expressão do gene e cor branca não altera a expressão do gene.

#### 4.2.5. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes do fator de transcrição AP2 do parasito

O gráfico de calor demonstra que a ausência da proteína adaptadora MyD88 e a enzima Caspase1/11 de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) induzem um aumento na expressão nos genes relacionados aos genes dos fatores de transcrição AP2 do parasito *T. gondii* após 6 horas de infecção quando comparados com os macrófagos WT (Figura 21).

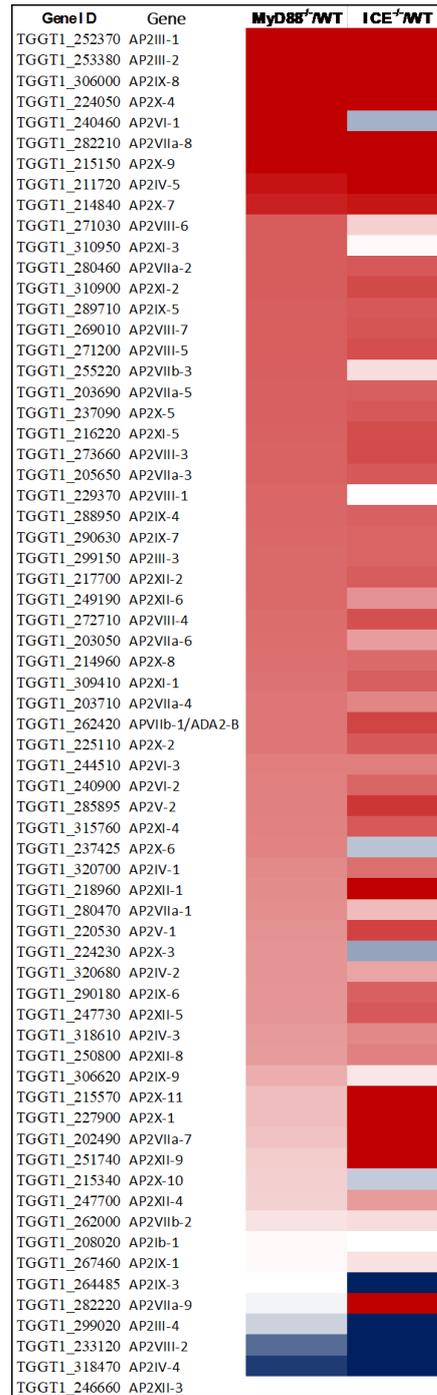


Figura 21: Gráfico de calor dos genes relacionados aos genes do fator de transcrição AP2 do parasito *T. gondii*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT (parental) e deletados geneticamente para MyD88 e Caspase 1/11 foram infectados por *T. gondii* (MOI 3). Após, 6 horas de infecção as amostras foram obtidas e submetidas ao sequenciamento de nova geração no equipamento Illumina e os dados analisados pelo software Galaxy. O gráfico foi representado pela razão de BMDMs depletados geneticamente para MyD88 ou Caspase 1/11 em razão pelo WT. Cores fria (azul) menor expressão gênica, cores quentes (vermelho) maior expressão do gene e cor branca não altera a expressão do gene.

#### 4.2.6. MyD88 e Caspase 1/11 do hospedeiro diminuem a expressão da maioria dos genes das sequências relacionadas a SAG-1 (SRS), micronemas, grânulos densos, roptrias e do fator de transcrição AP2 do parasito

O gráfico de calor e pizza demonstram que a ausência da proteína adaptadora MyD88 e a enzima Caspase1/11 de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) induzem um aumento na expressão nos genes relacionados aos genes das sequências relacionadas a SAG-1 (SRS), micronemas, grânulos densos, roptrias e do fator de transcrição AP2 do parasito. *gondii* após 6 horas de infecção quando comparados com os macrófagos WT, principalmente no últimos quatro grupos, onde em relação aos genes totais do parasito *T. gondii* RH, a maioria dos genes foram alterados (Figura 22).

Gene ID	Gene	MyD88 <sup>-/-</sup> /WT	ICE <sup>-/-</sup> /WT	Gene ID	Gene	MyD88 <sup>-/-</sup> /WT	ICE <sup>-/-</sup> /WT
TGGT1_208020	AP2Ib-1	0,024297703	0	TGGT1_409870	SRS48K	0	0
TGGT1_252370	AP2III-1	46,8513329	51,52296839	TGGT1_214190	SRS46	34,73358849	2,185700348
TGGT1_253380	AP2III-2	45,88985361	41,95036132	TGGT1_311440	SRS50	2,060965298	2,22251563
TGGT1_299150	AP2III-3	0,591745403	0,60934058	TGGT1_254060	SSRS14A	0,45139669	0,577058488
TGGT1_299020	AP2III-4	-0,201390627	-4,120522492	TGGT1_408950	SRS26A	0	0
TGGT1_320700	AP2IV-1	0,463712591	0,56340439	TGGT1_315320	SRS52A	-0,140766138	0,143627049
TGGT1_320680	AP2IV-2	0,422241707	0,359231048	TGGT1_233480	SRS29C	-0,169564129	0,086221947
TGGT1_318610	AP2IV-3	0,399628137	0,468810268	TGGT1_233460	SRS29B	-0,201390627	-0,72426213
TGGT1_318470	AP2IV-4	-0,875271936	-3,146150012	TGGT1_408740	SRS59B	0	0
TGGT1_211720	AP2IV-5	0,932499264	1,074191434	TGGT1_409850	SRS47A	0,640598563	0,758059829
TGGT1_267460	AP2IX-1	0,023769112	0,120055534	TGGT1_409860	SRS48Q	0	0
TGGT1_264485	AP2IX-3	0	-3,545387034	TGGT1_409710	SRS22G	0	0
TGGT1_288950	AP2IX-4	0,596569665	0,624605607	TGGT1_239090	SRS23	0,4830419	0,477966505
TGGT1_289710	AP2IX-5	0,634943981	0,657731979	TGGT1_301170	SRS19D	0,586418427	0,647517916
TGGT1_290180	AP2IX-6	0,41756362	0,626230246	TGGT1_233450	SRS29A	-0,197704989	-0,150718302
TGGT1_290630	AP2IX-7	0,59277858	0,610771199	TGGT1_301160	SRS19C	0,459063446	0,641380245
TGGT1_306000	AP2IX-8	5,082885397	3,801902128	TGGT1_210320	SRS37A	1,708090243	1,968380192
TGGT1_306620	AP2IX-9	0,323358834	0,105397111	TGGT1_273130	SRS30A	-0,201390627	-0,72426213
TGGT1_220530	AP2V-1	0,433336273	0,745599196	TGGT1_308020	SRS57	-0,157414416	-0,34500021
TGGT1_285895	AP2V-2	0,49646537	0,78848939	TGGT1_273120	SRS30C	0,024960679	-0,291208456
TGGT1_240460	AP2VI-1	1,631850384	-0,349364741	TGGT1_246070	SRS56	1,102826826	1,253683114
TGGT1_240900	AP2VI-2	0,499862263	0,609280813	TGGT1_208850	SRS11	0,025605439	-0,189632347
TGGT1_244510	AP2VI-3	0,506498774	0,506948491	TGGT1_308840	SRS51	0,115914205	0,073512944
TGGT1_280470	AP2VIIa-1	0,443559013	0,268709768	TGGT1_271050	SRS34A	-0,15503027	0,0121522
TGGT1_280460	AP2VIIa-2	0,637034122	0,661373764	TGGT1_320170	SRS16E	0,628139416	0,652141989
TGGT1_205650	AP2VIIa-3	0,616588077	0,651734369	TGGT1_320200	SRS16A	0,499357449	0,538073114
TGGT1_203710	AP2VIIa-4	0,539382093	0,479847244	TGGT1_264660	SRS44	0,242429134	0,150183573
TGGT1_203690	AP2VIIa-5	0,627013165	0,629338231	TGGT1_238440	SRS22A	0,555323698	1,291894454
TGGT1_203050	AP2VIIa-6	0,570446612	0,387357425	TGGT1_207140	SRS49B	0,324288345	0,44319279
TGGT1_202490	AP2VIIa-7	0,240346102	1,489215786	TGGT1_321480	SRS12B	0	-2,084922401
TGGT1_282210	AP2VIIa-8	1,280160725	1,234433606	TGGT1_207130	SRS49A	1,003812533	1,016400518
TGGT1_282220	AP2VIIa-9	-0,046972508	1,041221353	TGGT1_408960	SRS26A	0	0
TGGT1_262000	AP2VIIb-2	0,11661038	0,138762672	TGGT1_410980	SRS48Q	0	0
TGGT1_255220	AP2VIIb-3	0,629446442	0,130966213	TGGT1_251958	SRS59B	0,556204485	0,590889109
TGGT1_229370	AP2VIII-1	0,601040559	-0,000883889	TGGT1_359770	RS22E	0,496756848	0,437801287
TGGT1_233120	AP2VIII-2	-0,660884103	-1,872634489	TGGT1_408940	SRS26B	0	0
TGGT1_273660	AP2VIII-3	0,617522994	0,707483333	TGGT1_273110	SRS30D	0,542346379	0,623090132
TGGT1_272710	AP2VIII-4	0,574410066	0,686715499	TGGT1_234930	SRS43	0,378283415	0,417244236
TGGT1_271200	AP2VIII-5	0,631435876	0,695004291	TGGT1_280580	SRS35B	0,558086602	0,592139251
TGGT1_271030	AP2VIII-6	0,640245994	0,187633467	TGGT1_315330	SRS52D	0,632709297	0,49797367
TGGT1_269010	AP2VIII-7	0,632564743	0,667081185	TGGT1_226860	SRS67	0,582107012	0,5256944
TGGT1_227900	AP2X-1	0,261608305	1,021341085	TGGT1_224170	SRS60A	-7,768045006	-7,460191976
TGGT1_215340	AP2X-10	0,189677876	-0,232701739	TGGT1_234370	SRS42	0	-5,871289503
TGGT1_215570	AP2X-11	0,261701718	1,133726449	TGGT1_222370	SRS13	-0,655189241	-0,736442685
TGGT1_225110	AP2X-2	0,538579469	0,653829776	TGGT1_243790	SRS33	0,122180596	0,008917631
TGGT1_224230	AP2X-3	0,422241707	-0,412140159	TGGT1_285870	SRS20A	-0,169564129	0,11549211
TGGT1_224050	AP2X-4	2,757906446	2,725910589	TGGT1_275360	SRS47B	1,495290289	1,630691407
TGGT1_237090	AP2X-5	0,623868375	0,655853876	TGGT1_320230	SRS15C	0,553997679	0,580599197
TGGT1_237425	AP2X-6	0,48936489	-0,268963208	TGGT1_285860	SRS20C	-0,056661273	-0,170030032
TGGT1_214840	AP2X-7	0,871976613	0,917981124	TGGT1_267150	SRS38C	0,637236123	0,704671988
TGGT1_214960	AP2X-8	0,562932585	0,587979575	TGGT1_301180	SRS19F	0,324288345	0,425561274
TGGT1_215150	AP2X-9	1,150148297	1,251803472	TGGT1_267160	SRS38D	0,942337373	0,994804436
TGGT1_309410	AP2XI-1	0,55548187	0,634990235	TGGT1_215680	SRS18	0,24331565	0,210985224
TGGT1_310900	AP2XI-2	0,635607161	0,716708161	TGGT1_320190	SRS16B	0,593462219	0,531401058
TGGT1_310950	AP2XI-3	0,63966179	0,029819543	TGGT1_267130	SRS38A	0,628869838	0,742627728
TGGT1_315760	AP2XI-4	0,493043228	0,656499056	TGGT1_315740	SRS54	0,015219257	1,38951573
TGGT1_216220	AP2XI-5	0,62149902	0,700675653	TGGT1_319360	SRS17A	0,549681816	0,455819575
TGGT1_218960	AP2XII-1	0,452768149	1,269350162	TGGT1_213280	SRS25	-0,140766138	0,130839572
TGGT1_217700	AP2XII-2	0,589655015	0,641900689	TGGT1_315410	SRS53F	0,40059666	0,318138313
TGGT1_246660	AP2XII-3	0	0	TGGT1_367060	SRS38D	0	0
TGGT1_247700	AP2XII-4	0,182327999	0,394867925	TGGT1_411600	SRS22I	0	0
TGGT1_247730	AP2XII-5	0,41756362	0,655010502	TGGT1_319350	SRS17B	-0,201390627	-0,453609664
TGGT1_249190	AP2XII-6	0,587810658	0,433759218	TGGT1_275370	SRS47C	0,378904528	0,301088069

TGGT1_250800	AP2XII-8	0,390634751	0,49963737	TGGT1_320180	SRS16C	-0,201390627	-0,72426213
TGGT1_251740	AP2XII-9	0,202195826	1,273940103	TGGT1_281930	SRS39	0	-3,425384927
TGGT1_262420	APVIII-1/ADA2-B	0,538942914	0,73596823	TGGT1_267140	SRS38B	0,185671241	0,345605265
TGGT1_222170	DG32	0,624483004	0,265894733	TGGT1_320250	SRS15A	0	0
TGGT1_297880	DG32	0,560875453	0,638780733	TGGT1_270250	GRA1	-4,965096841	-7,456218211
TGGT1_268900	GRA10	0,585964068	0,621263455	TGGT1_239740	GRA14	21,8331885	23,23534205
TGGT1_212410	GRA11	0,489524126	0,634201985	TGGT1_237800	GRA11	0	0
TGGT1_288650	GRA12	0,958731512	0,91545882	TGGT1_309352	SRS55N	0	0
TGGT1_275470	GRA15	0,621212589	0,618676142	TGGT1_411200	SRS48Q	0	0
TGGT1_227620	GRA2	0,629255097	1,320010202	TGGT1_258550	SRS28	0	0
TGGT1_227280	GRA3	0,838858442	0,91909289	TGGT1_292260	SRS36B	0	0
TGGT1_310780	GRA4	0,621996453	0,579374356	TGGT1_210330	SRS37B	0	0
TGGT1_286450	GRA5	0,986700882	1,299446922	TGGT1_275850	GRA12	0	0
TGGT1_275440	GRA6	0,604296041	0,889346392	TGGT1_292280	SRS36D	0	0
TGGT1_203310	GRA7	0,619058642	0,60013296	TGGT1_238490	SRS22E	0	0
TGGT1_254720	GRA8	1,191791616	2,162003264	TGGT1_309300	SRS55A	0	0
TGGT1_251540	GRA9	0,635289255	0,677621368	TGGT1_207160	SRS49D	0	0
TGGT1_291890	MIC1	1,062420905	1,544967028	TGGT1_259270	SRS26E	0	0
TGGT1_250710	MIC10	0,626220973	0,878627842	TGGT1_251962	SRS59K	0	0
TGGT1_204530	MIC11	0,629585507	0,824257709	TGGT1_238500	SRS22F	0	0
TGGT1_267680	MIC12	0,626455752	0,103549201	TGGT1_207010	SRS48K	0	0
TGGT1_260190	MIC13	0,353258671	0,277060129	TGGT1_411250	SRS22I	0	0
TGGT1_218310	MIC14	-2,070714464	-0,687944669	TGGT1_224790	SRS40A	0	0
TGGT1_247195	MIC15	0,573606508	1,051275182	TGGT1_238470	SRS22C	0	0
TGGT1_289630	MIC16	0,628368426	0,583799116	TGGT1_238850	SRS22I	0	0
TGGT1_200250	MIC17A	0,635892013	0,652481439	TGGT1_207150	SRS49C	0	0
TGGT1_200240	MIC17B	0,468721939	0,306879482	TGGT1_207005	SRS48Q	0	0
TGGT1_200230	MIC17C	0,192943815	0,15060629	TGGT1_409700	SRS22I	0	0
TGGT1_201780	MIC2	-2,200933043	-2,189972351	TGGT1_238460	SRS22B	0	0
TGGT1_319560	MIC3	0,60465274	1,185106233	TGGT1_235600	SRS45	0	0
TGGT1_208030	MIC4	0,574844441	1,1989255	TGGT1_238480	SRS22D	0	0
TGGT1_277080	MIC5	0,62051639	0,979399743	TGGT1_224750	SRS40F	0	0
TGGT1_218520	MIC6	0,551428292	0,620610589	TGGT1_258810	SRS27B	0	0
TGGT1_261780	MIC7	0,631626626	0,666872888	TGGT1_219348	SRS55M	0	0
TGGT1_245490	MIC8	0,520155846	0,307358595	TGGT1_224760	SRS40E	0	0
TGGT1_245485	MIC9	0,55983791	0,515465155	TGGT1_360460	SRS40D	0	0
TGGT1_309590	ROP1	1,230631024	1,950621727	TGGT1_361050	SRS22I	0	0
TGGT1_315490	ROP10	2,018341361	2,33755676	TGGT1_315370	SRS53A	0	0
TGGT1_203990	ROP12	0,630897385	0,730398605	TGGT1_321490	SRS12A	0	0
TGGT1_312270	ROP13	0,964265833	1,061967103	TGGT1_315400	SRS53D	0	0
TGGT1_315220	ROP14	0,636945846	0,717463136	TGGT1_292250	SRS36A	0	0
TGGT1_211290	ROP15	0,566525424	1,096339834	TGGT1_295600	SRS10	0	0
TGGT1_262730	ROP16	0,569295402	1,024485428	TGGT1_309330	SRS55F	0	0
TGGT1_258580	ROP17	0,622470737	0,409224351	TGGT1_315390	SRS53C	0	0
TGGT1_205250	ROP18	0,635917735	0,973241003	TGGT1_283460	SRS21	0	0
TGGT1_242240	ROP19A	0,55287888	0,40826114	TGGT1_279000	SRS59J	0	0
TGGT1_258230	ROP20	0,463144593	0,523838069	TGGT1_259300	SRS26B	0	0
TGGT1_263220	ROP21	-0,671835546	1,96998208	TGGT1_301140	SRS19A	0	0
TGGT1_202780	ROP25	0,622376146	0,597059448	TGGT1_271980	SRS32	0	0
TGGT1_313330	ROP27	0,349201017	0,578775951	TGGT1_259290	SRS26C	0	0
TGGT1_258370	ROP28	0	0	TGGT1_272560	SRS31B	0	0
TGGT1_227010	ROP30	0,443559013	0,315419395	TGGT1_363790	SRS22I	0	0
TGGT1_258800	ROP31	9,668903674	10,43380397	TGGT1_292270	SRS36C	0	0
TGGT1_270920	ROP32	0,568290293	0,617955454	TGGT1_329710	SRS26I	0	0
TGGT1_201130	ROP33	1,137959192	1,077630628	TGGT1_360840	SRS48E	0	0
TGGT1_304740	ROP35	1,375356968	1,356835229	TGGT1_320240	SRS15B	0	0
TGGT1_262050	ROP39	0,82602232	0,853530509	TGGT1_275380	SRS47D	0	0
TGGT1_295125	ROP4	0,453598602	1,355422067	TGGT1_296640	SRS48E	0	0
TGGT1_266100	ROP41	0,621328579	0,651399411	TGGT1_315380	SRS53B	0	0
TGGT1_308090	ROP5	0,634187036	0,934518118	TGGT1_315345	SRS52F	0	0
TGGT1_411430	ROP5	0,628698486	0,694744078	TGGT1_280570	SRS35A	0	0
TGGT1_258660	ROP6	0,492195912	1,456110503	TGGT1_321470	SRS12D	0	0
TGGT1_295110	ROP7	0,828418525	0,420619197	TGGT1_259410	SRS26A	0	0
TGGT1_365080	ROP7	0,190687488	-0,031243305	TGGT1_362620	SRS48E	0	0
TGGT1_215775	ROP8	2,076918226	2,510078159	TGGT1_301150	SRS19B	0	0
TGGT1_363030	ROP8	0,622460709	0,446310239	TGGT1_292275	SRS36E	0	0
TGGT1_243730	ROP9	0,56858502	0,722469663				

Figura 22: Gráfico de calor com os valores de diferença de expressão com os genes das sequências relacionadas a SAG-1 (SRS), micronemas, grânulos densos, roprias e do fator de transcrição AP2 do parasito *Toxoplasma gondii*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT (parental) e deletados geneticamente para MyD88 e Caspase 1/1 foram infectados por *T. gondii* (MOI 3). Após, 6 horas de infecção as amostras foram obtidas e submetidas ao sequenciamento de nova geração no equipamento Illumina e os dados analisados pelo software Galaxy. O gráfico foi representado pela razão de BMDMs depletados geneticamente para MyD88 ou Caspase 1/1 em razão pelo WT. Cores fria (azul) menor expressão gênica, cores quentes (vermelho) maior expressão do gene e cor branca não altera a expressão do gene.

Foram encontrados 19 genes de micronemas, sendo que para MyD88<sup>-/-</sup>, 16 genes tiveram aumento de expressão e 2 diminuíram a expressão e para Caspase 1/1<sup>-/-</sup>, 14 genes tiveram

aumento de expressão e 2 diminuíram a expressão. Para as roptrias, foram encontrados 31 genes, onde para MyD88<sup>-/-</sup>, 28 genes tiveram aumento de expressão e 1 diminuiu sua expressão e para Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, 29 genes tiveram aumento de expressão. Dos 18 genes de grânulos densos, 15 genes tiveram aumento de expressão e 1 foi regulado negativamente para MyD88<sup>-/-</sup>, e para Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, 14 genes tiveram aumento de expressão, 1 diminuiu a expressão e 3 não foram alterados. Para os fatores de transcrição da família AP2, 66 genes tiveram diferença de expressão, sendo para MyD88<sup>-/-</sup>, 51 genes tiveram aumento na expressão e 2 diminuíram expressão e para Caspase 1/11<sup>-/-</sup>, 48 genes aumentaram sua expressão e 6 genes diminuíram sua expressão (Figura 23).

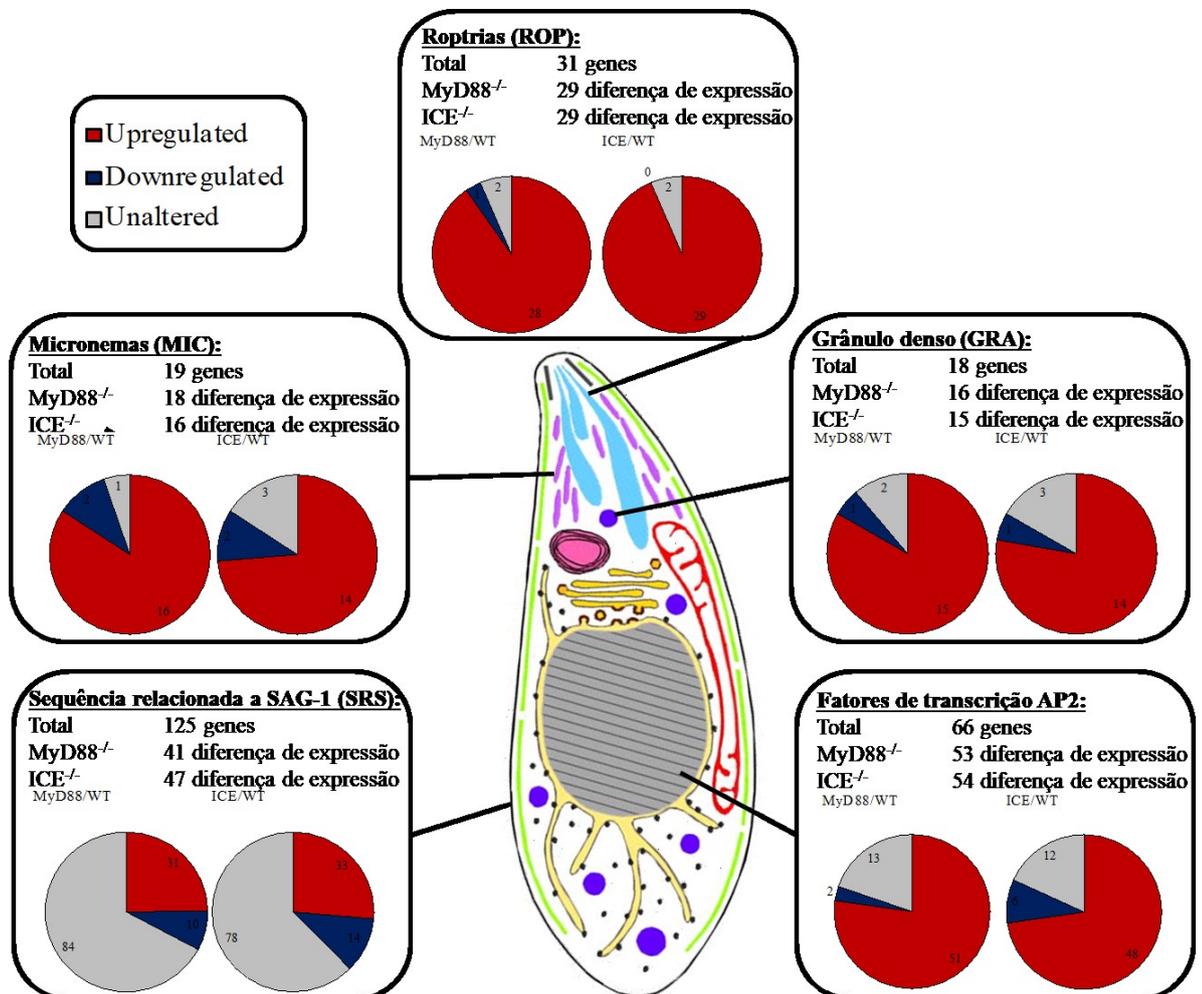


Figura 23: Resumo da expressão dos genes do parasito *Toxoplasma gondii* em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) depletados geneticamente para MyD88 ou Caspase 1/11 em razão das células parentais (WT). Porcentagem da diferença de expressão para genes de micronemas, grânulos densos, roptrias, fatores de transcrição da família AP2 e sequências relacionadas a SAG-1 (SRS).

## 5. DISCUSSÃO

A toxoplasmose é uma antropozoonose de distribuição global, considerada uma infecção parasitária negligenciada e supõe-se que afete mais de um terço da população mundial, de acordo com a CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). Por ser uma doença assintomática em indivíduos imunocompetentes, pode ser confundida com uma gripe comum, porém, em indivíduos imunocomprometidos, os sintomas são mais graves, afetando o cérebro e outros órgãos. Em gestantes, principalmente no primeiro trimestre de gestação há o risco de abortos e má-formação do feto, sendo que a doença é menos crítica em crianças após o nascimento, porém, em neonatos que adquiriram a infecção durante a gestação, os sinais clínicos são graves, incluindo hidrocefalia e microcefalia (PRADO et al., 2011). Além disso pode levar a toxoplasmose ocular que gera uma infecção ocular, como retinite necrotizante, levando a perda da visão caso não tratada (PARK; NAM, 2013).

Nos últimos trinta anos, as tecnologias e aplicações de sequenciamento de DNA foram passando por desenvolvimento, afim de facilitar estudos científicos. Em 2005 surgiu o sequenciamento de nova geração (NGS), que impulsionou a pesquisa genômica e permitiu que os pesquisadores aprimorassem experimentos que anteriormente não possuíam técnicas viáveis para terem continuidade (VOELKERDING et al., 2009). O sequenciamento de nova geração é uma tecnologia de apoio a profissionais da saúde, em várias técnicas, como clonagem molecular, reprodução, comparativos evolutivos, estudo de genes patogênicos, entre outros. Tem a vantagem de ser um método rápido, preciso, fácil de manipular e barato (MARGUERAT, 2008). A tecnologia NGS contribuiu para um melhor entendimento dos processos de invasão e infecção de *T. Gondii*, a fim de direcionar a potenciais alvos terapêuticos e profiláticos.

O sequenciamento através do RNASeq foi utilizado por superar outras tecnologias, como os Microarrays, principalmente por sua capacidade de detectar uma maior porcentagem de genes diferencialmente expressos (MARGUERAT et al., 2008; SHENDURE, 2008; WANG et al., 2009). O Galaxy (BLANKENBERG et al., 2010) foi a plataforma usada para análise de transcriptoma por permitir analisar um grande volume de dados, ser de fácil acesso, sem necessitar de instalação prévia e por manipular os dados facilmente, onde cada etapa fica disponível para inspeção e por ser um software gratuito.

A cepa do tipo I GT1 de *T. gondii* foi utilizada como genoma de referência, descrita como altamente virulenta, associada a fase aguda da doença toxoplasmose, causando rápida mortalidade. Dentre as cepas do tipo 1 já descritas tem-se RH, GT1, CAST, VEL, entre outras, virulentas em camundongos, causando a morte dos mesmos e nos humanos, trazendo

complicações clínicas graves (GAJRIA, 2008). O genoma de referência GT1 foi escolhido como genoma de referência por ser a cepa virulenta com o genoma disponível mais completo no banco de dados ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>) e pelo parasito da cepa RH ter sido utilizado no modelo experimental.

As moléculas MyD88 e Caspase 1/11 são moléculas essenciais para a sinalização dos Toll -Like Receptor (TLR) e para indução de interleucinas. Estudos demonstram que o fator de diferenciação Mielóide 88 (MyD88) é importante na imunidade inata por ativar a maioria dos TLRs, consequentemente ativando a cascata de sinalização de resposta do tipo Th1, induzindo o fator de transcrição NF- $\kappa$ B a secretar citocinas que ativam células natural killers (NK), secretando outras citocinas e recrutando óxido nítrico (MINEO et al, 2010). Já a Caspase 1/11 é uma enzima conversora da pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em suas formas ativas, além de induzir a piroptose ao ser ativada por um complexo inflamassoma (KAYAGAKI et al., 2013; BROZ e DIXIT, 2016).

MyD88 e Caspase 1/11 foram avaliados utilizando macrófago depletados para estes alvos, a fim de observar-se individualmente como estas proteínas influenciariam no parasito regulando seus genes.

Foram analisados também os genes SRS, por acreditar-se que as proteínas destes medeiam a ligação às células hospedeiras e ativam a imunidade do hospedeiro (WASMUTH et al., 2012). Porém, grande parte dos genes não mostraram alteração na ausência de MyD88 e Caspase 1/11.

Trabalhos prévios têm demonstrado o papel de diversas proteínas do parasito que regulam a resposta do parasito, como ROP18-IGs, ROP16 – NF $\kappa$ B e IL12, GRA15, IL12, MIC2 e inflamassoma. É demonstrado, por exemplo, que ROP16 regula a ativação de STAT3 – fator de transcrição ativados por tirosinas quinases em resposta a citocinas e receptores de fatores de crescimento, controlando a proliferação e sobrevivência do parasito – levando a supressão das respostas imunes inatas (BUTCHER et al., 2011; CARRUTHER et al., 2006; SHWAB et al., 2016).

O presente trabalho permite identificar possíveis fatores de virulência do parasito que são influenciados por fatores importante da resposta imune inata do hospedeiro, MyD88 e Caspase 1/11, que são potenciais alvos terapêuticos ou profiláticos. Os antígenos expressos na superfície do parasito que permitem sua adesão e iniciam a primeira etapa do processo de invasão e patogênese são altamente expressos na ausência de MyD88 e Caspase1/11 e o mesmo ocorrem quando analisados as micronemas que proporcionam a invasão, roptrias que permitem

a formação do vacúolo parasitóforo e grânulos denso que contribuem com a manutenção do parasito na célula hospedeira.

Uma das estratégias futuras será selecionar os genes que foram menos expressos e tiveram maior valor genotípico e validar os dados por reação em cadeia por polimerase (PCR) e posteriormente avaliação do fenótipo *in vitro* do papel dos alvos selecionados na biologia do parasito e na regulação da resposta imune do hospedeiro.

## 6. CONCLUSÃO

Análise de transcriptoma do parasito intracelular *Toxoplasma gondii*, com base no genoma de referência da cepa GT1, após 6 horas de infecção sugere o papel crucial das moléculas imunes inata do hospedeiro MyD88 e Caspase 1/11 na regulação da expressão de genes fundamentais na patogênese do parasito *T. gondii*, onde em sua maioria apresentaram um aumento da sua expressão quando infectados nas células depletadas geneticamente por essas moléculas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-CADER, M. S.; AMARASINGHE, A.; ABDUL-CAREEM, M. F. Activation of toll like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. **Archives of Virology**, v. 161, n. 8, p. 2075-2086, 2016.

BLANKENBERG D.; GORDON A.; KUSTER G.; CORAOR N.; TAYLOR J.; NEKRUTENKO A. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. **Bioinformatics**, v. 26, n. 4, p. 1783-1785, 2010.

BUTCHER B. A.; FOX B. A.; ROMMEREIM L. M.; KIM S. G.; MAURER K. J.; YAROVINSKI 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, n. 9, e1002236, 2011.

CARRUTHER, V. B.; BOOTHROYD, J. C.; HUYNH, H. *Toxoplasma* MIC2 is a Major Determinant of Invasion and Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 8, e84. 2006.

CASSON, C. N.; COPENHAVER, A. M.; ZWACK, E. E.; NGUYEN, H. T.; STROWIG, T.; JAVDAN, B.; BRADLEY, W. P.; FUNG, T. C.; FLAVELL, R. A.; BRODSKY, I. E.; SHIN, S. Caspase-11 activation in response to bacterial secretion systems that access the host cytosol. **PLoS.Pathogens**, v. 9, e1003400, 2013.

CDC. Parasitas – Toxoplasmose. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/disease.html>>. Acesso em dezembro de 2018.

DUBEY JP, LAGO EG, GENNARI SM, SU C, JONES JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; JONES, J. L. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in different types of commercial cat litter. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 5, p. 751-754, 2011.

GAJRIA, B.; BAHL, A.; BRESTELLI, J.; DOMEER, J.; FICSCHER, S.; GAO X.; HEIGES, M.; IODICE, J.; KISSINGER, J. C.; MACKAY, A. J.; PINNEY, D. F.; ROSS, D. S.; STOECKERT, C. J. J.; WANG, H.; BRUNK, B.P. ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 553–556, 2008.

GAVINET, M. F.; ROBERT, F.; FIRTION, G.; DELOUVRIER, E.; HENNEQUIN, C.; MAURIN, J. R. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 1276-1277, 1997.

GIARDINE, B.; RIEMER, C.; HARDISON, R. C.; BURHANS, R.; ELNITSKI, L.; SHAH, P.; ZHANG, Y.; BLANKENBERG, D.; ALBERT, I.; TAYLOR, J.; MILLER, W.; KENT, WJ.; NEKRUTENKO, A. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. **Genome Research**, v. 15, n. 10, p. 1451-1455, 2005.

GUERINA, N. G.; HSU, H. W.; MEISSNER, H. C.; MAGUIRE, J. H.; LYNFIELD, R.; STECHENBERG, B. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital

*Toxoplasma gondii* infection. The New England Regional Toxoplasma Working Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 6, p. 1858-1863, 1994.

HEMPHILL, A.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; MÜLLER, J. Approaches for the vaccination and treatment of *Neospora caninum* infections in mice and ruminant models. **Parasitology**, v. 143, p. 245-259, 2016.

HEMPHILL, A.; VONLAUFEN, N.; NAGULESWARAN, A. Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 133, p. 261–278, 2006.

HUNTER, C. A.; LAB. DAVID SIBLEY. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature**, v. 10, 2012.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Foodborne toxoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 845-851, 2012.

KAYAGAKI, N.; WONG, M. T.; STOWE, I. B.; RAMANI, S. R.; GONZALEZ, L. C.; AKASHI-TAKAMURA, S.; MIYAKE, K.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; MUSZYNSKI, A.; FORSBERG, L. S.; CARLSON, R. W.; DIXIT, V. M. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. **Science**, v. 341, p. 1246-1249, 2013.

KIM, Y. K.; SHIN, J. S., NAHM, M. H. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity and Diseases. **Yonsei medical journal**, v. 57, p. 5-14, 2016.

LI, W.; LIU, J.; WANG, J.; FU, Y.; NAN, H.; LIU, Q. Identification and characterization of a microneme protein (NcMIC6) in *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v. 114, p. 2893-2902, 2015.

MADROÑERO, L. J. Análise transcriptômica da interação mamoeiro- papaya meleira vírus. Vitória-ES, 2014.

MARGUERAT, S.; WILHELM, BRIAN T.; BÄHLER, J. Next-generation sequencing: applications beyond genomes. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 5, p. 1091, 2008.

MERCIER, C.; ADJOGLE, K. D.; DÄUBENER, W. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? **International of Journal Parasitology**, v. 35, p. 829-849, 2005.

MINEO, T. W.; OLIVEIRA, C. J.; GUTIERREZ, F. R.; SILVA, J. S. Recognition by Toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology & Cell Biology**, v. 88, n. 8, p. 825-833, 2010.

MITSUKA-BREGANÓ R.; LOPES-MORI F. M. R.; NAVARRO I. T. Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita vigilância: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas. **SciELO**, 2010.

PARK, Y. H.; NAM, H W. Clinical Features and Treatment of Ocular Toxoplasmosis. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 51, n. 4, p. 393-399, 2013.

PATRA, M. C.; CHOI, S. Recent progress in the development of Toll-like receptor (TLR) antagonists. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, p. 719-730, 2016.

PRADO, A. A. F.; ALMEIDA, G. F.; GONTIJO, L. S.; TORRES, M. L. M. Toxoplasmose: o que o profissional da saúde deve saber. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 7, n. 12; p. 1-30, 2011.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

SAEIJ, J. P. J.; HASSAN, M. A.; MELO, M. B.; HASS, B.; JENSEN, K. D. C. De novo reconstruction of the *Toxoplasma gondii* transcriptome improves on the current genome annotation and reveals alternatively spliced transcripts and putative long non-coding RNAs. **BioMed Genomics**, v. 13, n. 696, 2012.

SHWAB, E. K.; JIANG, T.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across

globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 2, p. 141-146, 2016.

SILVA, C. M.; PEDER, L. D.; MENOLLI, R. A.; TAKIZAWA, M. G. M. H.; TAKIZAWA, M. C. H.; HORVATH, J. D.; SILVA, E. S.; TEIXEIRA, J. J. V.; BERTOLINI, D. A. *Toxoplasma gondii* - Soroprevalência em pacientes HIV no sul do Brasil. **Santa Maria**, v. 43, n. 2, p. 73-80, 2017.

SOUZA, M. V. B. Tipagem molecular de *Toxoplasma gondii*: Análise de líquidos amnióticos de gestações com diagnóstico de toxoplasmose congênita. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009.

SOUZA, W.; DUARTE, E. S. M.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal of Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TEUTSCH, S. M.; JURANEK, D. D.; SULZER, A.; DUBEY, J. P.; SIKES, R. K. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. **The New England Journal of Medicine**, v. 300, n. 13, p. 695-699, 1979.

VOELKERDING K. V., DAMES S. A., DURTSCHI J. D. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 641-658, 2009.

VOGEL, N.; KIRISITS, M.; MICHAEL, E.; BACH, H.; HOSTETTER, M.; BOYER, K. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 1055-1060, 1996.

WASMUTH, J. D.; PSZENNY, V.; HAILE, S.; JANSEN, E. M.; GAST, A. T.; SHER,

A.; BOYLE, J. P.; BOULANGER, M. J.; PARKINSON, J.; GRIGGB, M. E. Integrated Bioinformatic and Targeted Deletion Analyses of the SRS Gene Superfamily Identify SRS29C as a Negative Regulator of Toxoplasma Virulence. **mBio**, v. 3, n. 6, e00321, 2012.