

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA (IBTEC)
CURSO BIOTECNOLOGIA

**Análises das diferenças entre as vias de infecção: gavagem e bucal em camundongos
C57BL/6 expostos a diferentes estágios infectantes de *Toxoplasma gondii***

Mariele De Fátima Alves Venâncio

Prof^a. Dr^a. Neide Maria da Silva
Instituto de Ciências Biomédicas

Uberlândia – MG

Julho– 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA (IBTEC)
CURSO BIOTECNOLOGIA

**Análises das diferenças entre as vias de infecção: gavagem e bucal em camundongos
C57BL/6 expostos a diferentes estágios infectantes de *Toxoplasma gondii***

Mariele De Fátima Alves Venâncio

Prof^ª. Dr^ª. Neide Maria da Silva

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Biotecnologia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho– 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA (IBTEC)
CURSO BIOTECNOLOGIA

**Análises das diferenças entre as vias de infecção: gavagem e bucal em camundongos
C57BL/6 expostos a diferentes estágios infectantes de *Toxoplasma gondii***

Mariele De Fátima Alves Venâncio

Prof^ª. Dr^ª. Neide Maria da Silva
Instituto de Ciências Biomédicas (ICBM)

Homologado pela coordenação do Curso
De Biotecnologia em __/__/__

Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Julho -2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA (IBTEC)
CURSO BIOTECNOLOGIA

**Análises das diferenças entre as vias de infecção: gavagem e bucal em camundongos
C57BL/6 expostos a diferentes estágios infectantes de *Toxoplasma gondii***

Mariele De Fátima Alves Venâncio

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: ____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 8 de julho de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as energias boas que recebi ao longo dessa caminhada. Agradeço aos meus avós, Ilcione e Miguelito, por todo amor e carinho, pelos conselhos, agradeço de forma incondicional por sempre estarem presentes nos momentos mais difíceis, a vocês todo meu amor e a minha gratidão. Agradeço também de forma incondicional o grande amor da minha vida, Pedro, sua presença tornou os dias mais fáceis, com certeza sem seu apoio esse trabalho não teria sido concretizado, a você o meu muito obrigada por me apoiar em todas as decisões, por não me deixar desistir, e por ter sempre um abraço de conforto ao final do dia, obrigado por ser o meu anjo! Agradeço a Rosana que foi uma segunda mãe, obrigada pelos conselhos e pelo carinho e por ser sempre tão bem recebida na sua casa! Agradeço a todos os amigos que se tornaram parte da família, vocês também fazem parte desse caminho e desse trabalho, obrigado turma do poker por cada sorriso, que vocês me proporcionam, obrigada por todas as reuniões, a vocês todo meu carinho! Agradeço aos amigos que fiz na Biotecnologia, a vocês todo minha admiração e agradecimentos, vocês tornaram a faculdade um segundo lar, obrigada por cada encontro, vocês fizeram cada almoço no restaurante universitário ser especial! Agradeço de forma especial e com muito carinho os amigos que fiz no laboratório, obrigada a cada um que tirou algum tempo, para me ensinar e para me orientar, nesse trabalho cada parte aqui escrita tem um pouquinho de vocês: Carlos, Camila, Ester, Layane, Marisol, Marcos, Natalia, Romulo e Yusmaris, brigada por cada bom dia, pela grande colaboração, pela disposição de ajudar e ensinar. Obrigada, vocês são incríveis! Na construção desse trabalho de conclusão de curso, agradeço ao Marcos Paulo pela ajuda na cultura de células, a Yusmaris por toda ajuda e paciência com as imagens histológicas, e uma gratidão eterna a Ester por toda paciência e disposição em me auxiliar com a escrita deste trabalho, e agradeço ao Carlos por todos os conselhos sobre pesquisa e principalmente me auxiliar na infecção dos animais. Agradeço também a Professora Neide por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa, pela confiança em desenvolver esse trabalho, obrigada por toda a orientação! Obrigado as agências de fomento, CAPES, FAPEMIG e CNPQ, pelo apoio financeiro!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico esquemático do <i>T.gondii</i> representando as fases sexuada e assexuadas.....	3
Figura 2. Esquema representativo das vias de infecção (bucal e gavagem) utilizando diferentes formas infectantes do <i>Toxoplasma gondii</i> (cistos, taquizoíto e bradizoíto) ...	10
Figura 3. Alterações no peso de camundongos infectados com cistos (A), com taquizoítos (B), com bradizoítos (C), e escore de morbidade de camundongos infectados com cistos (D), com taquizoítos (E), com bradizoítos (F)	13
Figura 4. Parasitismo intestinal de camundongos infectados com cisto (A), com taquizoítos (B), com bradizoítos (C) e patologia intestinal de camundongos infectados com cisto (D), com taquizoítos (E), e com bradizoítos (E)	15
Figura 5. Quantificação das células de Paneth de camundongos infectados com cistos (A) com taquizoítos (C) com bradizoítos (E), e quantificação de células caliciformes de camundongos infectados com cistos (D) com taquizoítos (E), e com bradizoítos (F), e micrografias representativas de células de Paneth (B), (D), (F) e caliciformes (H), (J), (L) das infecções bucal e gavagem com as três formas infectantes citadas acima.....	17
Figura 6. Secções teciduais de pulmão camundongos infectados com cistos (A) com taquizoítos (C) com bradizoítos (E), e micrografias representativas das infecções bucal e gavagem feitas cistos (B) com taquizoítos (D) com bradizoítos (F)	19
Figura 7. Secções teciduais de fígado de camundongos infectados com cistos (A) com taquizoítos (C) com bradizoítos (E) e micrografias representativas das infecções via bucal e gavagem feitas com cistos (C) com taquizoítos (D) com bradizoítos (F)	21
Figura 8. Secções teciduais da cavidade bucal camundongos infectados com cistos (A) com taquizoítos (C) com bradizoítos (E) e micrografias representativas da infecção bucal e gavagem com cistos (B) com taquizoítos (D) com bradizoítos (F)	22
Figura 9: Quantificação de IgA nas fezes dos camundongos infectados via bucal e gavagem com cistos (A), taquizoítos (B) e bradizoítos (C)	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parasitos secção tecidual, que foram quantificados no pulmão e no fígado de camundongos infectados com cistos pela via bucal e via gavagem	18
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RESUMO

A infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos C57BL/6 induz uma resposta imune exacerbada com perfil Th1, sendo um bom modelo para estudo de doenças intestinais inflamatórias como a doença de *Chron*. Na maioria dos casos a infecção por *T. gondii* é feita por gavagem, ou seja, inoculação intra-gástrica ou intraesofágica, e por injeções intraperitoneais. Como a via oral é a rota natural de infecção por *T. gondii*, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente duas formas dessa via: gavagem e bucal, utilizando diferentes estágios infectantes do parasito como: taquizoítos, bradizoítos e cistos para verificar a importância desse sítio de entrada do parasito na toxoplasmose. O modelo animal escolhido para realizar as análises foram camundongos C57BL/6. A infecção bucal gera uma menor disseminação de parasitos, e uma menor patologia intestinal, pulmonar e hepática, além de causar menos alterações na homeostase intestinal, uma vez que apresenta uma maior conservação das células de Paneth e células caliciformes. Os resultados sugerem que a infecção bucal gera uma maior ativação da resposta imune local pelo aumento do número de mastócitos na cavidade bucal. Com os dados apresentados neste trabalho concluímos que há diferenças entre a infecção realizada via gavagem e a infecção realizada via bucal, sendo a infecção gavagem mais prejudicial

Palavras-chave: infecção via bucal, infecção via gavagem, *Toxoplasma gondii*.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2 Ciclo de Vida.....	2
1.3 Vias de Infecção	4
1.4 Resposta Imune ao Parasito	5
1.4.1 Resposta Imune Intestinal a <i>T.gondii</i>	5
2. JUSTIFICATIVA	6
3. OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo geral.	7
3.2 Objetivos Específicos.	7
4. MATERIAL E MÉTODOS	7
4.1 Animais experimentais	7
4.2 Manutenção <i>in vivo</i> de cistos da cepa ME-49 <i>T. gondii</i>	8
4.3 Manutenção <i>in vitro</i> de taquizoítos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	8
4.4 Obtenção dos bradizoítos da cepa ME-49 de <i>T. gondii</i>	8
4.5 Desenho Experimental.....	9
4.6 Análises Histológicas	10
4.7 Imunohistoquímica para detecção de parasitos	11
4.8 Quantificação de IgA secretada no intestino delgado por ELISA.....	11
4.9 Análises Estatísticas	12
5.RESULTADOS	13
5.1 Análise da variação do peso e escore de morbidade.	13
5.2 Parasitismo, patologia intestinal e quantificação de células de Paneth e Caliciformes.	14
5.3 Parasitismo no pulmão e fígado.	18
5.4 Patologia do pulmão e do fígado	19

5.5 Quantificação de mastócitos na cavidade bucal	22
5.6 Quantificação de IgA nas fezes	22
6. DISCUSSÃO	24
7.CONCLUSÕES.....	27
8.REFERÊNCIAS	28

1.INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*.

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa e, subclasse Coccidia (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Este parasita possui uma distribuição mundial, com alta incidência de infecção em humanos e animais domésticos (FERGUSON, 2002). Em 2012, um estudo, relatou uma soroprevalência entre 30 e 50% na região sudeste e central da Europa e uma alta prevalência na América Latina e países tropicais do continente africano (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). No Brasil, estudos mostram que na população em geral, a prevalência da infecção por *T. gondii* variam de 20 a 84%, sendo os jovens de 20-29 anos a faixa etária mais atingida (DA SILVA WATANABE et al., 2018) (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Vários surtos de toxoplasmose foram relatados no Brasil, sendo o primeiro descrito na década de 1960. Após este relato, vários outros foram descritos em todas as regiões do país, como no Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Sul, os surtos ocorreram devido a oocistos e cistos de *T. gondii* (MEIRELES 2015). Em geral parasitos da subclasse Coccidia podem ter ciclos de vida complexos, particular de cada hospedeiro, e transmitidos apenas por um ciclo fecal-oral; contudo *T. gondii* pode ser transmitido pelo carnivorismo e também transplacentariamente (JONES; DUBEY, 2010). O sucesso evolutivo do parasito em diferentes hospedeiros se deve a rapidez de invadir células, utilizando receptores altamente conservados, consequentemente os animais, em sua grande maioria, são suscetíveis a infecção, na generalidade atuando como hospedeiro intermediários (DUBEY, 2004; HILL; DUBEY, 2002; JONES; DUBEY, 2010). Há mais de seis décadas, *T. gondii* tem sido um importante organismo modelo para se elucidar como o sistema imune murino promove resistência a patógenos (TAIT; HUNTER, 2009), sendo que o parasito infecta uma grande variedade de hospedeiros e em certas circunstâncias, como em indivíduos imunocomprometidos (pacientes com câncer, com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e transplantados) e gestantes, pode causar doença de maior gravidade (ELMORE et al., 2010).

T. gondii possui três estágios infectantes: taquizoítos que caracteriza a forma de replicação rápida em qualquer célula do hospedeiro intermediário e em células epiteliais não intestinais do hospedeiro definitivo (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). O bradizoíto representa a forma de multiplicação lenta do parasito, alojando-se no interior de cistos localizados em diferentes órgãos e tecidos, como músculos, cérebro e retina (SULLIVAN; JEFFERS, 2012). Já o esporozoíto está contido no interior de oocistos,

estruturas esféricas resistentes eliminadas junto às fezes dos felídeos, os hospedeiros definitivos de *T. gondii* (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os diferentes estágios infectantes são diferenciados pela expressão gênica de algumas proteínas como: o antígeno de superfície 1 (SAG1) identifica a forma taquizoíta, enquanto em bradizoítas é mais expressiva a proteína BAG 1 (antígeno da forma bradizoíta), e os cistos expressam glicoproteína CST1 (CASTRO-ELIZALDE et al., 2018).

1.2 Ciclo de Vida

O ciclo de vida de *T. gondii* é dividido nas fases sexuada, que ocorre nos hospedeiros definitivos felinos, e assexuada, que se desenvolve nos hospedeiros intermediários (Figura 1). Nos felídeos, a replicação do parasito ocorre no intestino dos indivíduos infectados com uma das três formas de *T. gondii* (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). No intestino dos felinos infectados observa-se a penetração no epitélio intestinal por uma das formas infectantes, as quais passam por um processo de multiplicação chamado endodiogenia dando origem à esquizontes que possuem cinco tipos A, B, C, D, E. Os esquizontes pelo processo de merogonia dão origem aos merozoítos que se diferenciam em gametas femininos e masculinos. Após uma série de processos de maturação desses gametas, o gameta feminino é fecundado pelo masculino formando um zigoto que dentro do epitélio irá evoluir em uma parede externa dupla dando origem ao oocisto. As células após 2-3 dias irão se romper liberando o oocisto imaturo (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; FERGUSON, 2002; NEVES et al., 2010; PITTMAN; KNOLL, 2015). A esporulação do oocisto imaturo ocorre fora do hospedeiro definitivo e ocorre por influência do meio externo como temperatura e oxigenação adequadas. Os oocistos esporulados são de forma elíptica e contém dois esporocistos, sendo que cada esporocisto possui quatro esporozoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; HILL; DUBEY, 2002).

A fase assexuada ocorre quando em ambos os hospedeiros, a partir do momento que os mesmos ingerem água ou alimentos contaminados com oocistos maduros contendo esporozoítos, ou através do consumo de carne contendo cistos com bradizoítos. Ambas as formas bradizoítos e esporozoítos invadem o epitélio intestinal e se diferenciam em taquizoítos penetrando em células nucleadas, nas quais se dividem causando a lise da célula hospedeira e penetrando em outras células. Após uma série de multiplicações os taquizoítos se disseminam para outros tecidos do hospedeiro, essa primeira fase de reprodução é caracterizada como a fase aguda da doença (NEVES et al., 2010;

SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010). Após essa disseminação dos taquizoítos ocorre uma pressão imunológica mediada por interferon (IFN)- γ que elimina a maior parte de taquizoítos presentes no hospedeiro. Entretanto uma parcela de taquizoítos resistem e se diferenciam em bradizoítos dentro dos cistos e permanecem em um estado de dormência e baixa multiplicação nos tecidos, principalmente nas células do Sistema Nervoso Central, caracterizando assim a fase crônica da doença (ELMORE et al., 2010; HILL; DUBEY, 2002; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

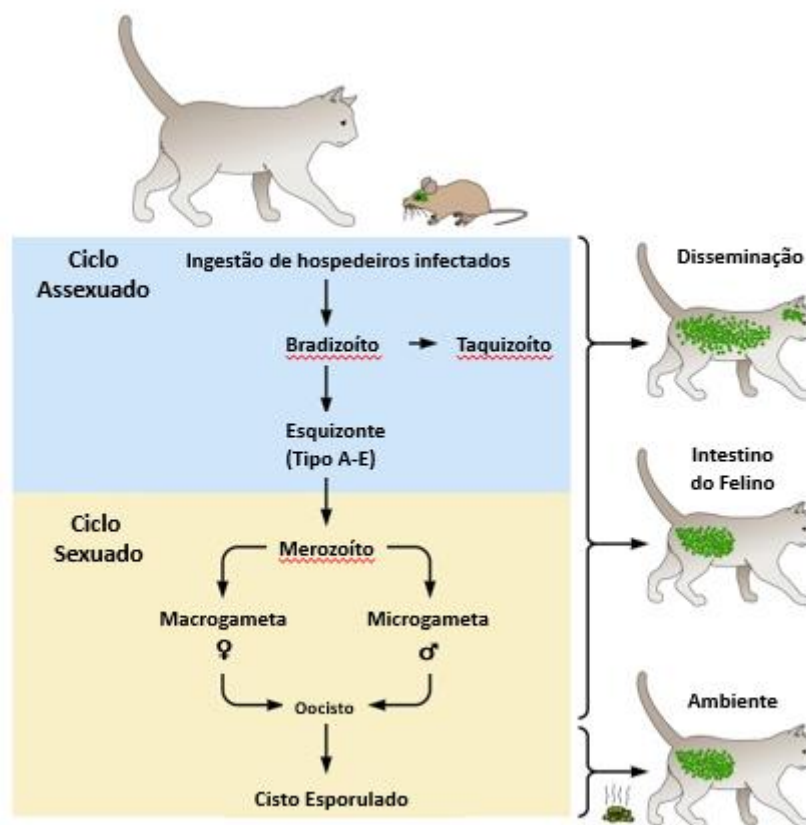


Figura 1: Ciclo biológico esquemático de *T. gondii* representando as fases sexuada e assexuadas. O felino se infecta por meio da ingestão de um hospedeiro intermediário contaminado. Uma vez ingerido, *T. gondii* penetra o epitélio intestinal e se diferenciam em taquizoítos e esquizontes. Os taquizoítos se disseminam pelos tecidos por meio de divisões e lise celular. Os esquizontes possuem cinco formas distintas (A,B,C,D,e E), a forma E se diferencia em merozoítos, os quais dão origem aos gametas feminino e masculino. Ocorre a fecundação do gameta feminino pelo gameta masculino formando um zigoto que dará origem ao oocisto. A esporulação dos oocistos ocorre de 1 a 5 dias após ser excretada nas fezes de gatos. Uma vez ocorrida a esporulação, os oocistos são infecciosos por um longo período de tempo, dependendo das condições ambientais. Adaptado de (PITTMAN; KNOLL, 2015).

1.3 Vias de Infecção e Toxoplasmose

A toxoplasmose apresenta uma fisiopatologia complexa em humanos, sendo seus efeitos sistêmicos e congênitos graves problemas de saúde pública (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). A patologia gerada por *T. gondii* desencadeia a toxoplasmose, uma doença que causa graves complicações em indivíduos imunocomprometidos e durante o período gestacional (HALONEN; WEISS, 2014). Na espécie humana, a infecção pode ser adquirida pelo consumo de água e alimentos contaminados por oocistos, pela ingestão de carne crua, ou malcozida, contendo cistos do parasito, ou pela aquisição direta das formas taquizoítos através de transplantes de órgãos ou sangue infectados, bem como por acidentes laboratoriais ou pela via transplacentária durante a gestação. Neste último caso, os taquizoítos podem atravessar a barreira placentária e infectar os tecidos fetais, levando à forma congênita da doença (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; TORREY; YOLKEN, 2013). Em decorrência de sua passagem placentária, o parasito é capaz de invadir e infectar diferentes órgãos e tecidos fetais, gerando consequências graves ao conceito, como hidrocefalia, microencefalia, calcificações intracranianas, trombocitopenia, anemia, além de distúrbios neurológicos e lesões visuais como retinocoroidite e estrabismo (KUMP; ANDROUDI; FOSTER, 2005). Assim, as infecções de primeiro trimestre podem ocasionar abortos espontâneos, e as transmissões congênitas de segundo e terceiro trimestres geram consequências clínicas, como as citadas, ou inexistentes ao feto (PITT; ROBOZ, 1967).

Embora cause infecção assintomática em adultos imunocompetentes, *T. gondii* pode causar doença grave em crianças infectadas congenitamente e naquelas com imunidade diminuída (HILL; DUBEY, 2002). A infecção experimental por *T. gondii*, na maioria dos estudos, pode ser realizada por duas vias: via oral e via intraperitoneal, entretanto vale ressaltar que a via natural de infecção pelo parasito é a via oral (HILL; DUBEY, 2002; HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; LIESENFELD et al., 1996). E estudos anteriores mostram que existem diferenças entre a infecção intraperitoneal e a oral, sendo que essas diferenças ocorrem por diferenças de pH, forma do parasito e sistema imunológico (JOHNSON, 1984). Em camundongos C57BL/6 imunocomprometidos da linhagem hu-PBL SCID, infectados com *T.gondii* da cepa RH, foi demonstrado que a infecção realizada pela via oral causa uma menor infectividade quando comparada com a infecção intraperitoneal, a qual desencadeia uma forma mais grave da doença (MEYER; ALLAN; BEAMAN, 2013).

1.4 Resposta Imune ao Parasito

O principal mecanismo protetor contra *T. gondii* é a imunidade mediada por células, (GAZZINELLI et al., 1991), sendo macrófagos, linfócitos T, e células *natural killer* (NK) e citocinas os elementos chaves na resposta imune (FILISETTI; CANDOLFI, 2004). A resposta imune contra infecção por *T. gondii* é caracterizada por uma forte resposta Th1 mediada por células TCD4⁺ e dominada pela produção de mediadores inflamatórios, sendo a interleucina (IL)-12 e (IFN)- γ as citocinas pró-inflamatórias mais atuantes no controle da infecção (GAZZINELLI et al., 1994). As células dendríticas e macrófagos ativados via *toll like receptors* (TLR) produzem IL-12 que ativa as células NK e linfócitos T a produzirem IFN- γ , os quais ativam a expressão de mediadores pró-inflamatórios pelas células da imunidade inata, favorecendo o desenvolvimento dos linfócitos T, que são a base do controle da infecção por *T. gondii* no hospedeiro (GAZZINELLI et al., 2014). Outro mecanismo de defesa do hospedeiro frente a infecção por *T. gondii*, são as moléculas de óxido nítrico (NO), resultantes do metabolismo de L-arginina em citrulina pela enzima Óxido Nítrico Sintetase (NOS), as quais são produzidas em resposta a diversos estímulos entre eles as altas concentrações de IFN- γ (MILLER et al., 2009).

Em relação a resposta imune humoral, na infecção por *T. gondii*, a produção de anticorpos desencadeada por linfócitos B, é considerada uma ferramenta utilizada para fins de detecção e diagnóstico da toxoplasmose (LIU et al., 2015). O papel dos anticorpos na imunidade ao *T. gondii* foi demonstrado em experimentos com camundongos deficientes de células B da linhagem (μ MT), os quais apresentam produção normal de IFN- γ , mas sucumbem a infecção dentro e 3-4 semanas após a infecção com altas cargas parasitárias no sistema nervoso central (KANG; REMINGTON; SUZUKI, 2000). Estudos indicam que a imunoglobulina mais importante da imunidade das mucosas contra a infecção por *T. gondii*, é o isotipo de anticorpo IgA, a qual pode ser importante para evitar reinfecções (DENKERS; GAZZINELLI, 1998).

1.4.1 Resposta Imune Intestinal a *T. gondii*

O epitélio intestinal protege o hospedeiro contra infecções não só por formar uma barreira física, mas também por participação ativa na resposta imune inata via produção de citocinas, quimiocinas e peptídeos microbianos (MÜLLER; AUTENRIETH; PESCHEL, 2005). Esta barreira intestinal é composta por uma espessa camada de muco produzido e secretado por células epiteliais especializadas conhecidas como células

caliciformes (HOOPER; MACPHERSON, 2010), as quais também produzem outras proteínas microbidas, e subjacente a esta camada, encontram-se células não epiteliais, principalmente leucócitos com funções efetoras e reguladoras (MCGUCKIN et al., 2009). Outro tipo celular importante na imunidade intestinal são as células de Paneth que se encontram nas criptas de Lieberkühn no intestino delgado e são importantes contra a invasão das células epiteliais por bactérias comensais e patogênicas. As células de Paneth produzem grandes quantidades de α -defensinas e outros peptídeos antimicrobianos como lisozimas e fosfolipase A2 secretória (sPLA2) (PORTER et al., 2002).

A resposta imune à infecção por *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada. Essa variação individual pode ser explicada pelo alto grau de diversidade genética do hospedeiro. Além disso, o parasito é capaz de infectar uma série de tecidos, e a resposta imune é específica em cada um dos sítios de infecção (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). Uma importante via de entrada de *T. gondii* é através do trato gastrointestinal podendo causar inflamação na mucosa intestinal (SCHREINER; LIESENFELD, 2009). Em camundongos C57BL/6, após a infecção experimental por *T. gondii* por via oral, ocorre intensa resposta inflamatória, semelhantes à inflamação de pacientes com doenças de Crohn (EGAN et al., 2009), Tal inflamação do íleo gera uma necrose das vilosidades da mucosa causando uma posterior destruição tecidual (LIESENFELD; KOSEKFLLL; REMINGTON, 1996). A ileíte é causada por uma resposta exagerada de células T CD4⁺ do tipo 1 caracterizada por aumento de mediadores inflamatórios incluindo IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF) e óxido nítrico (NO) (KHAN et al., 1997).

Pesquisas realizadas com o parasito, *Trypanosoma cruzi*, demonstraram que a infecção sistêmica versus infecção na mucosa promove um padrão de doença distinto, e camundongos C57BL/6 infectados pela boca induzem uma taxa infecciosa mais alta quando comparados com a infecção intra-esofágica (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015a). O presente estudo, ainda não descrito na literatura, propõe avaliar as diferenças da infecção intra-esofágica (gavagem) e a infecção bucal, ou seja, realizada na boca de camundongos C57BL/6, causada pelo parasito *T. gondii*.

2. JUSTIFICATIVA.

Devido à alta incidência de toxoplasmose em humanos e animais, e em destaque o aumento de surtos de toxoplasmose no Brasil, decidimos verificar. A infectividade, disseminação do parasito e alterações inflamatórias nos órgãos dos animais infectados

pela boca com taquizoítos, bradizoítos e cistos do parasito, e a investigação de mecanismos envolvidos nessa patologia será importante para sugerir novas abordagens para tratamento efetivo ou mesmo profilático, dessa importante zoonose.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo geral.

Caracterizar a resposta imune e inflamatória a *T. gondii* diante duas formas de infecção oral (via gavagem ou via bucal) em camundongos C57BL/6 infectados com taquizoítos, bradizoítos e cistos da cepa ME-49.

3.2 Objetivos Específicos.

1. Avaliar as alterações histológicas, aos 8 dias de infecção oral (via gavagem e via bucal) de camundongos C57BL/6, infectados com taquizoítos, bradizoítos e cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.
2. Quantificar o número de células de Paneth, células caliciformes e mastócitos, aos 8 dias de infecção oral (via gavagem e via bucal) de camundongos C57BL/6 infectados com taquizoítos, bradizoítos e cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.
3. Avaliar o parasitismo intestinal, bem como em outros órgãos (pulmão e fígado) por Imuno-histoquímica, de camundongos C57BL/6 infectados por via oral (via gavagem e via bucal) com taquizoítos, bradizoítos e cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.
4. Quantificar a produção de IgA específica nas fezes de camundongos C57BL/6 infectados com taquizoítos, bradizoítos e cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*.

4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1 Animais experimentais

Para realização deste trabalho, foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6 com idade entre 8 a 12 semanas, sendo que cada grupo experimental continha no mínimo 4 a 5 animais. E também, fêmeas de camundongos Swiss de 8-12 semanas de idade que foram utilizadas para manutenção da cepa ME-49 de *T. gondii*. Todos os camundongos foram adquiridos e mantidos no Biotério Central da Rede de Biotérios e Roedores

(REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), livres de patógenos específicos, em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU sob o protocolo de número 025/17.

4.2 Manutenção *in vivo* de cistos da cepa ME-49 *T. gondii*.

Parasitas da cepa ME-49 de *T. gondii* foram mantidos em camundongos Swiss, os quais foram inoculados via intraperitoneal com 20 cistos de *T. gondii*. Um mês após o inóculo, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil) /Xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) e foram eutanasiados por deslocamento cervical. O cérebro foi removido, lavado em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01 M, estéril, pH 7.2 e homogeneizado com uma seringa e agulha de calibre 25 x 7. A quantificação dos cistos cerebrais foi feita em microscópio de luz utilizando uma objetiva de 10 x de aumento e os animais experimentais foram infectados com 10 cistos.

4.3 Manutenção *in vitro* de taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii*.

Os taquizoítos, da cepa ME-49, de *T. gondii*, foram mantidos na linhagem de células epiteliais uterinas humanas (HeLa), obtidas do ATCC, cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma). Os parasitos foram mantidos por passagem seriada em intervalos regulares de 48 horas e incubados em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (PAULO et al., 2019).

4.4 Obtenção dos bradizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii*

A obtenção dos bradizoítos foi feita de acordo com Freyre (1995), com modificações. O cérebro de camundongos Swiss infectados cronicamente foi coletado e homogeneizado em 1mL de PBS. Em seguida os cistos foram diluídos em dextran 30% em PBS. A solução foi centrifugada por 20 min a 4000 x g, a temperatura ambiente. O sedimento contendo os cistos foi coletado e quantificado. Os cistos foram digeridos em solução de digestão contendo 1g de NaCl, 1,4 mL de HCl em 100 ml de água, mais 3 mg de pepsina (Sigma) do estômago suíno. A solução foi neutralizada com 1 ml de Na₂CO₃

1%. Os bradizoítos foram quantificados e $0,7 \times 10^6$ parasitos foram utilizados para infectar os camundongos C57BL/6 por via gavagem e via bucal.

4.5 Desenho Experimental

A infecção experimental com *T.gondii* foi realizada por meio de duas vias (bucal ou intra-esofágica/gavagem) e utilizando três diferentes formas infectantes (cistos, bradizoítos e taquizoítos) da cepa ME-49 (Figura 2).

Para a infecção por gavagem, os animais tiveram a solução contendo uma das formas infectantes do parasito inoculada de forma intra-esofágica (gavagem) (DJAKOVIÆ; MILENKOVIÆ, 2001), já na infecção bucal os animais receberam o inóculo apenas na boca (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015a). Ambas as infecções foram realizadas utilizando a agulha de gavagem.

Para ambas as vias de infecção, os animais foram tratados com 19,4mg/kg de uma solução de hidróxido de magnésio ($Mg(OH)_2$) (Phillips) a 10% em água filtrada (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015a), com a finalidade de neutralizar o pH estomacal dos animais. Posteriormente, um grupo de camundongos foi infectado com 1×10^6 taquizoítos, outro grupo com 10 cistos de *T.gondii* e outro grupo infectado com $0,7 \times 10^6$ bradizoítos.

Os animais foram acompanhados durante todos os dias de infecção para análise de morbidade que foi feita de acordo com escores descrito anteriormente por (BARTLEY et al., 2006): (0) pelo brilhante, animal ativo; (1) pelo ouriçado, animal ainda ativo; (2) pelo arrepiado, animal pouco ativo; (3) pelo muito arrepiado, diminuição na frequência de locomoção do animal; (4) pelo muito arrepiado, pouca movimentação do animal. Aos 8 dias de infecção, grupos de animais foram anestesiados intraperitonealmente com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil) /Xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) e foram eutanaziados por deslocamento cervical. Os órgãos fígado, pulmão, mucosa oral, intestino delgado e fezes foram coletados. O intestino delgado foi coletado em toda a sua extensão, mensurado e segmentado em quatro porções: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, as quais foram enroladas utilizando palitos e formando cuidadosamente “rolos suíço” que foram, juntamente com os outros órgãos, fixados em formol tamponado 10% e incluídos em parafina. As fezes após coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 graus Celsius.

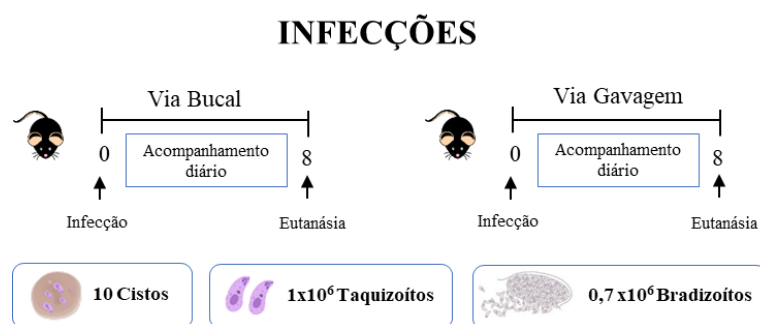


Figura 2: Esquema representativo das vias de infecção (bucal e gavagem) utilizando diferentes formas infectantes de *Toxoplasma gondii* (cistos, taquizoíto e bradizoíto). Os camundongos C57BL/6 (n=5) foram infectados pela via bucal ou via gavagem com diferentes formas do parasito e ambos os grupos foram acompanhados diariamente, foi considerado o dia zero, o dia da infecção e no oitavo dia foi realizada a eutanásia.

4.6 Análises Histológicas

Os cortes teciduais de intestino, pulmão e fígado foram corados com a coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E), a fim de analisar alterações histológicas, sendo que todas as análises foram realizadas utilizando o ensaio duplo cego. No intestino delgado foi realizada a análise de inflamação por meio do escore inflamatório, o qual segue os seguintes critérios: 0-2, pouco inflamado; 2-4, inflamação moderada; 4-6, inflamação grave e acima de 6, inflamação muito grave (BENEVIDES et al., 2013).

Além disso, a quantificação das células de Paneth e caliciformes, no intestino delgado foi realizada em cortes histológicos submetidos as colorações de H&E e Alcian Blue, respectivamente. O número de células de Paneth foi obtido por meio da avaliação de 100 criptas intestinais em cada segmento de intestino delgado, totalizando 400 criptas quantificadas por animal. Já para a quantificação das células caliciformes, foram analisados 52 campos teciduais por porção intestinal, totalizando 208 campos histológicos por camundongo.

No pulmão, foi mensurada a inflamação por meio da análise do espessamento dos septos alveolares. Para esse fim realizamos a captura de imagens de 10 campos microscópicos de cada lâmina/animal, utilizando o aumento de 10X. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software ImageJ versão 1.50i, no qual cada imagem foi convertida em uma imagem de 8 bit (que equivale a uma escala de cinzas). Em seguida, o *threshold* foi configurado a fim de que apenas os septos pulmonares fossem

preenchidos, e com isso a área do tecido pulmonar em relação à área total da imagem foi mensurada e os resultados expressos em porcentagem.

Em relação ao fígado, os cortes histológicos foram corados com H&E e contados os focos inflamatórios em 40 campos utilizando a objetiva de 10 X.

Por fim, o número de mastócitos na mucosa oral dos camundongos, foi quantificado em cortes histológicos submetidos a coloração por Azul de tuloidina, pH 3,0. Os cortes foram analisados em toda a sua extensão, utilizando a objetiva de 10X.

4.7 Imuno-histoquímica para detecção de parasitos

Os cortes teciduais desparafinizados, foram primeiramente incubados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em concentração 3% a fim de bloquear peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito com tampão citrato (pH 6,0), em forno micro-ondas durante sete minutos e sítios não específicos foram bloqueados pela incubação com leite desnatado 0,3% por 30 minutos. Os cortes foram incubados toda a noite, com soro de camundongos Swiss cronicamente infectados com *T. gondii* (obtido em nosso laboratório) que foi diluído em saponina 0.01%. Como anticorpo secundário foi utilizada IgG de cabra biotilada anti-camundongo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA). A reação foi amplificada usando o complexo avidina biotina peroxidase (ABC) (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) e desenvolvida com 3,3-diaminobenzidina (DAB; Sigma). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, montados entre lâminas e lamínulas, os quais foram examinados em microscópio de luz. As análises foram realizadas com objetiva de 40 x de aumento, e foram contabilizados em cada “rolo suíço” de intestino (52 campos), em uma lâmina foram analisados 208 campos. As análises de fígado e pulmão também foram realizadas com objetiva de 40 x de aumento, e foram analisados toda a extensão do tecido tanto de fígado quanto de pulmão.

4.8 Mensuração de IgA secretada nas fezes por ELISA

A mensuração de IgA secretada nas fezes foi realizada conforme Frehn e colaboradores (2014), com modificações. As amostras de fezes dos camundongos C57BL/6 foram coletadas e diluídas 1:5 em tampão de diluição fecal [90 ml de PBS 0,01 M, pH 7,2; 10 ml de EDTA 0,5M, pH 8; 10 mg de aprotinina (Sigma) e 666 μ l PMSF (Sigma; 100mM)], obtendo assim uma solução fecal. Em seguida, as amostras foram

centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante coletado. Para realização da reação de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), placas de alta afinidade foram sensibilizadas com 10 µg/ml de STAg (antígeno solúvel de taquizoítos; GAZZINELLI et al., 1991) a 4°C por 16 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-Tween (PBS-T) e bloqueadas com albumina sérica bovina (BSA) 5% em PBS-T por 1 hora, lavadas e incubadas com a solução fecal (1:7) a 4 °C por 16 horas. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase anti-IgA (Santa Cruz Biotechnology, Dalas, TX, EUA) diluído 1:2000 a 37 °C por 1 hora. A reação foi revelada com o substrato enzimático constituído de 0,03% de H₂O₂ e 1 µg/mL de Ortofenilenodiamina (OPD) e avaliada em leitora de ELISA (VersaMax , Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) a 492 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO).

4.9 Análises Estatísticas

A análise foi realizada utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Diferenças entre grupos foram analisadas usando teste ANOVA, Kruskal-Wallis quando ou teste t apropriado com os respectivos pós teste de comparação múltipla Bonferroni ou Dunn. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5.RESULTADOS

5.1 Análise da variação do peso e escore de morbidade.

Estudos anteriores já demonstraram que camundongos C57BL/6 infectados por via oral (rota natural da infecção) representam um bom modelo experimental para estudo da toxoplasmose (SZABO; FINNEY, 2017). Nesse sentido, camundongos C57BL/6 infectados com cistos, taquizoítos ou bradizoítos de *T. gondii* pela via bucal e via gavagem (ambas fazem parte da rota oral) foram acompanhados diariamente durante oito dias de infecção em relação à variação do peso (Figura 3A-C) e ao escore de morbidade (Figura 3D-F).

Com tais análises, foi observado que em todas as formas infectantes houve um menor escore de morbidade nos camundongos infectados pela via bucal (Figura 3D-F). Em relação à variação do peso, os camundongos infectados por via bucal apresentaram uma menor perda de peso quando comparados com os camundongos infectados via gavagem (Figura 3A, B). Já a infecção com bradizoítos não apresentou diferença significativa entre os grupos, sendo que ambos apresentaram uma tendência uniforme a perder 20% do peso anterior a infecção (Figura 3C).

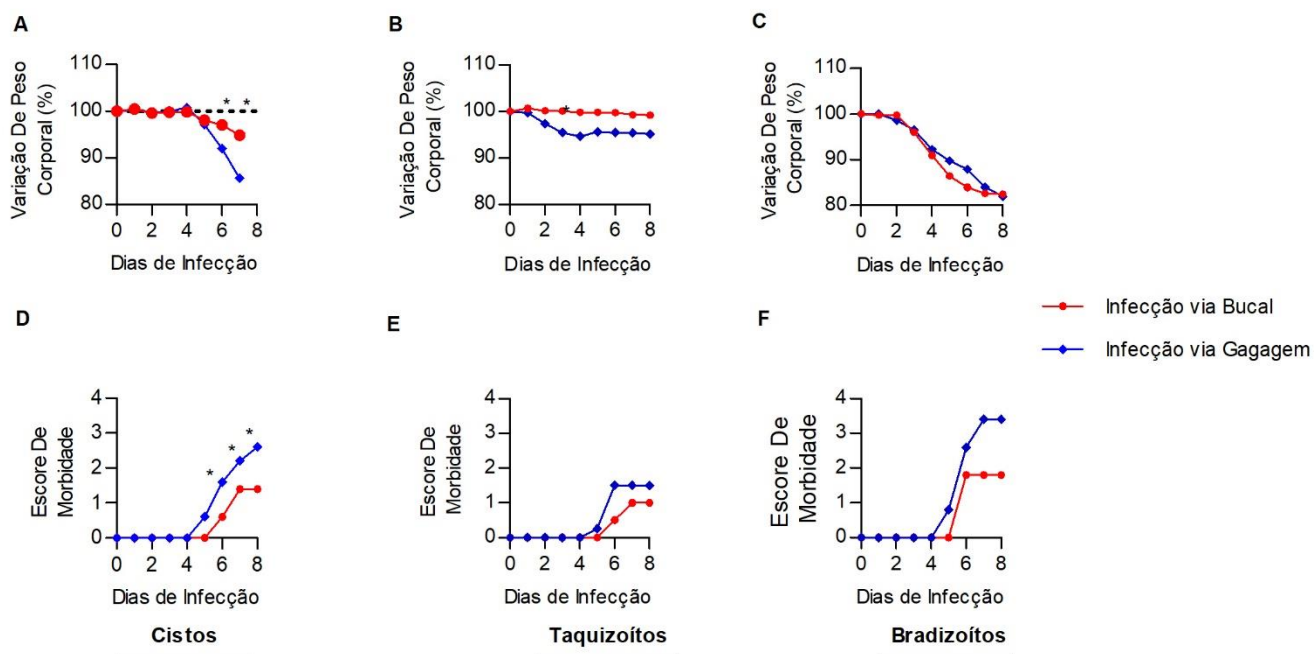


Figura 3: Alterações no peso de camundongos infectados com cistos (A), taquizoítos (B), bradizoítos (C), e escore de morbidade de camundongos infectados com cistos (D), com taquizoítos (E), com bradizoítos (F). Camundongos C57BL/6 foram infectados por via bucal e via gavagem, com 10 cistos, 1×10^6 taquizoítos e $0,7 \times 10^6$ bradizoítos de *T. gondii*, cepa ME-49. Para analisar o escore de morbidade, os animais foram observados diariamente em um horário fixo, e afim de mensurar a variação corporal, os

camundongos foram pesados todos os dias. A variação do peso e o escore de morbidade foram analisados utilizando o teste estatístico *Two-way* ANOVA, seguindo de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,0001$.

5.2 Parasitismo, patologia intestinal e quantificação de células de Paneth e Caliciformes.

O intestino delgado é um dos órgãos mais afetados durante a infecção por via oral com *T. gondii* (LIESENFELD et al., 1996). Com a finalidade de entender como diferentes formas de infecção oral afetam esse importante sítio de infecção, foram analisados o parasitismo e as alterações histológicas no intestino delgado dos camundongos C57BL/6 infectados via bucal e via gavagem com as três formas infectantes de *T. gondii* (Figura 4).

Os camundongos infectados por via bucal, na qual os parasitos foram deixados apenas na boca dos animais, apresentam um menor parasitismo intestinal quanto comparado com aqueles infectados por gavagem, independente da forma infectante utilizada (Figura 4A-C). De forma semelhante, as análises das alterações histológicas decorrentes da infecção por *T. gondii* demonstraram uma maior inflamação no intestino dos animais infectados via gavagem por cistos (Figura 4D) ou bradizoítos (Figura 4F).

Além disso, foi observado que em camundongos infectados por taquizoítos e bradizoítos, independente da via de infecção, apresentam uma menor quantidade de parasitos no intestino delgado quando comparados aos animais infectados com cistos (Figuras 4A-C). Com relação às alterações histológicas, a infecção com cistos também foi a que apresentou maiores danos histopatológicos no intestino delgado dos camundongos (Figuras 4D-F).

Em conjunto, os dados apresentados sugerem que independente da forma infectante utilizada, camundongos infectados pela via bucal apresentam uma menor inflamação e parasitismo tecidual no intestino delgado quando comparados aos animais infectados por gavagem.

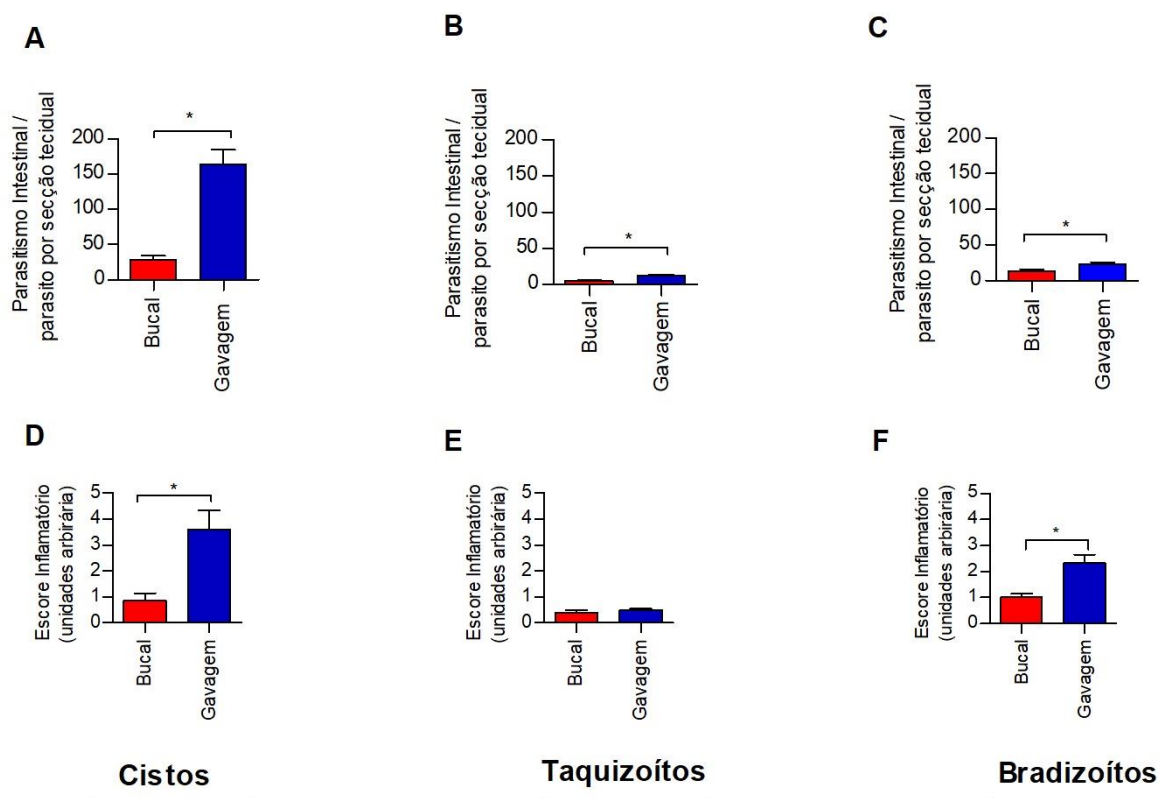


Figura 4: Parasitismo intestinal de camundongos infectados com cistos (A), taquizoítos (B), bradizoítos (C) e patologia intestinal de camundongos infectados com cisto (D), taquizoítos (E), e bradizoítos (F). Secções teciduais do intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados por via bucal e via gavagem, com 10 cistos, 1×10^6 taquizoítos e $0,7 \times 10^6$ bradizoítos de *T. gondii*, cepa ME-49, foram submetidas a reação de imuno-histoquímica para detecção de parasitos, os quais foram quantificados em microscópio de luz, utilizando a objetiva de 40 X. Para análise de patologia, foi realizado coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) e analisadas em microscópio de luz com objetiva de 40 X. Os dados estatísticos foram analisados pelo teste t de Student. * ($p < 0.05$).

Uma vez que a análise do parasitismo e da patologia no intestino delgado mostraram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre a infecção via bucal e via gavagem, decidimos avaliar outros parâmetros intestinais. Com esse intuito, foi realizada a quantificação de células de Paneth e células caliciformes (Figura 5), no intestino delgado dos camundongos C57BL/6 infectados via bucal e via gavagem com as três formas de *T. gondii*. Foi observado que os animais infectados com *T. gondii* apresentaram menor número de células de Paneth ($p < 0.05$) quando comparados aos animais não infectados, sendo essa diferença significativa naqueles infectados por gavagem com cistos (Figura 5 A, B) ou com bradizoítos (Figura 5E, F). Além disso, os camundongos que receberam o

inóculo de parasitos na boca (via bucal) apresentaram uma tendência a preservar o número de células de Paneth (Figura 5A-F), sendo esse fenômeno observado nas três formas infectantes utilizada.

Em relação a quantificação de células caliciformes (Figura 5G-L), observou-se um resultado similar as células de Paneth. De maneira geral, a infecção realizada pela via bucal, possui uma tendência de preservar também as células caliciformes, sendo que esse comportamento se repetiu nas três formas infectantes utilizadas. Foi observado de maneira significativa ($p < 0.05$) que a infecção realizada com cistos (Figura 5G, H) apresentou uma diferença estatística entre o grupo de camundongos não infectado, em relação ao grupo infectado pela gavagem, demonstrando que essa forma de infecção causa uma maior depleção das células caliciformes. Entretanto, quando a infecção foi realizada com a forma infectante taquizoítos (Figura 5I, J), não foi observado diferença estatisticamente significativa, apenas uma tendência de que a via bucal preservou mais o número de células caliciformes. Contudo, a infecção utilizando taquizoítos, de modo geral, tanto na via bucal quanto na via gavagem não apresentou uma depleção significativa das células caliciformes (Figura 5I, J). De maneira análoga ao comportamento da infecção com cistos (Figura 5G, H), a infecção bucal realizada com bradizoítos (Figura 5K, L) apresentou uma maior conservação das células de caliciformes em relação a infecção realizada por gavagem ($p < 0,05$). Entretanto, quando comparada com as formas infectantes cistos (Figura 5G, H), taquizoítos (Figura 5I, J), e bradizoítos (Figura 5K, L) é notável que a infecção com bradizoítos (Figura 5K, L) foi a que mais gerou uma depleção das células caliciformes.

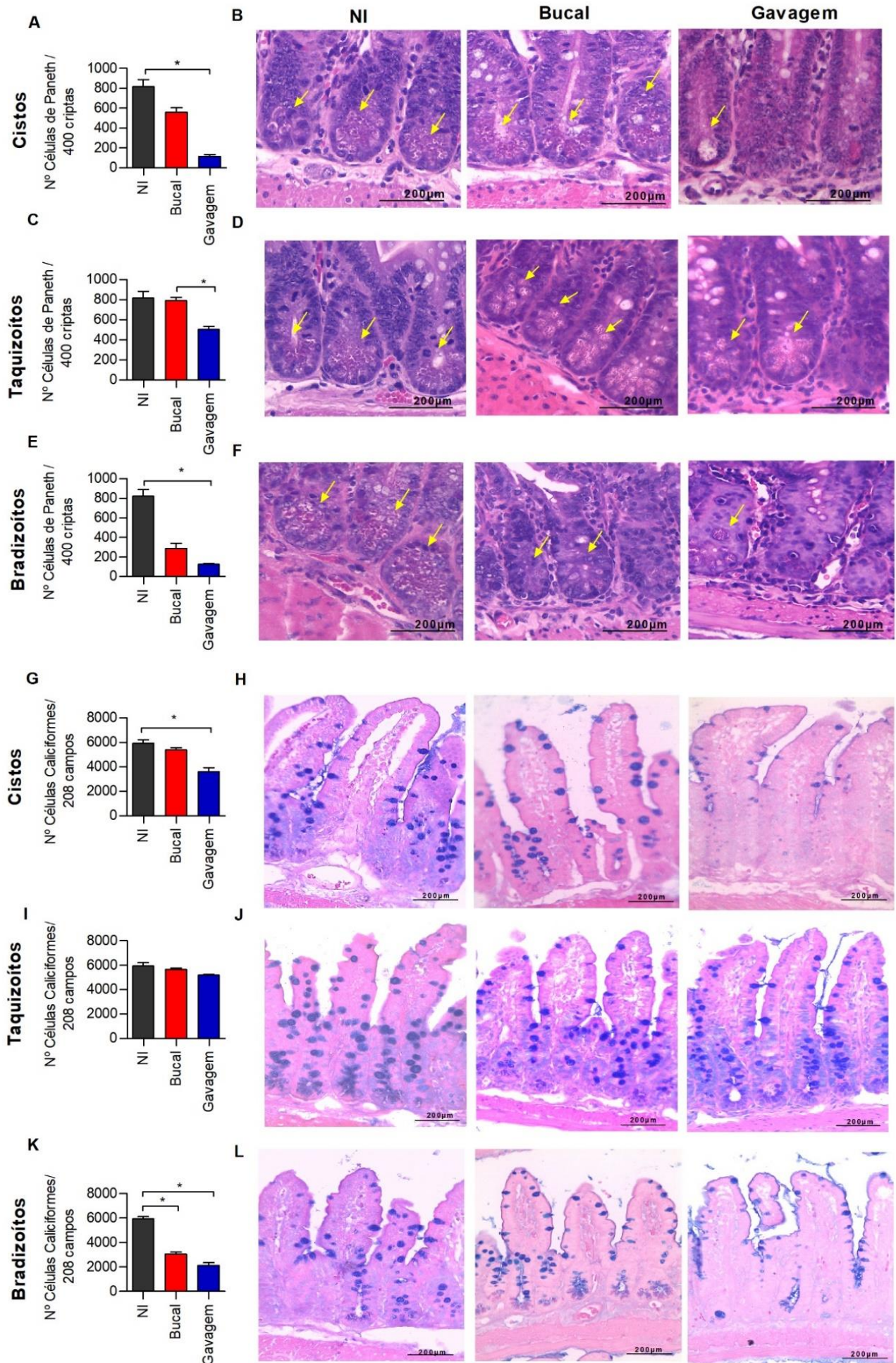


Figura 5: Quantificação das células de Paneth de camundongos infectados com cistos (A) taquizoítos (C), bradizoítos (E), e quantificação de células caliciformes de camundongos infectados com cistos (D) com taquizoítos (E), e com bradizoítos (F), e micrografias representativas de células de Paneth (B), (D), (F) e caliciformes (H), (J), (L) das infecções bucal e gavagem com as três formas infectantes citadas acima. Secções teciduais do intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados por via bucal e via gavagem, com três formas infectantes de *T. gondii*, cepa ME-49, foram submetidas a coloração por Hematoxilina e eosina (H&E) e também à coloração por Alcian Blue, para a quantificação de células de Paneth e Caliciforme respectivamente, as quantificações foram realizadas em microscópio óptico utilizando objetiva de 40X de aumento. Barras representam 200 µm. Para análises estáticas dos dados foi utilizado o teste *One-way* ANOVA, com pós-teste de Dunnett. * ($p < 0.05$)

5.3 Parasitismo no pulmão e fígado.

Após observar o parasitismo e patologia no intestino (Figura 4) e também outros parâmetros intestinais, como células de Paneth e caliciformes (Figura 5), decidimos investigar os efeitos da infecção via bucal em comparação com a gavagem em outros sítios de infecção. Com essa finalidade foi realizada a análise do parasitismo no pulmão e no fígado (Tabela 1) dos camundongos C57BL/6 infectados por via bucal e via gavagem, com três formas infectantes da cepa ME-49 de *T. gondii*.

De maneira interessante, quando a infecção foi realizada com cistos tanto no pulmão quanto no fígado o parasitismo tende a ser menor nos camundongos infectados pela via bucal. Porém, curiosamente, quando foi utilizada a forma infectante taquizoíto, não detectamos parasito no pulmão e no fígado. Já com a forma infectante bradizoíto, camundongos infectados por gavagem apresentaram maior número de parasitos no pulmão quando comparados com aqueles infectados pela via bucal. Entretanto, não foram observados parasitos no fígado desses camundongos.

Via	Forma Infectante	Parasitos/secção tecidual	
		Pulmão	Fígado
Bucal	Taquizoíto	–	–
	Bradizoíto	6*	–
	Cistos	5	5
Gavagem	Taquizoíto	–	–
	Bradizoíto	18	–
	Cistos	25	7

Tabela 1: Parasitismo no pulmão e no fígado de camundongos infectados com cistos, taquizoítos ou bradizoítos pela via bucal e por gavagem. Para mensurar o parasitismo realizou-se a reação de imunohistoquímica e os parasitos foram quantificados utilizando a objetiva de 40 X de aumento. Os dados estatísticos foram analisados pelo teste t de Student. * ($p < 0.05$). (*) Diferença estaticamente significante em relação a infecção por gavagem com a mesma forma infectante. (-). Parasitos não detectados.

5.4 Avaliação histológica do pulmão e do fígado

Com relação aos parâmetros de mensuração da histopatologia decorrentes da infecção por *T. gondii*, a infecção resultou no aumento da área dos septos alveolares, sendo um indicativo de inflamação pulmonar (Figura 6).

Independente da forma infectante que foi utilizada e de maneira significativa ($p < 0.05$), a infecção via bucal gera menos inflamação quando comparada com a infecção via gavagem, ou seja, camundongos infectados por gavagem apresentam um maior aumento da área dos septos alveolares. Animais infectados com cistos (Figura 6A) e com bradizoítos (Figura 6C) apresentam uma maior patologia quando comparados com animais infectados com a forma infectante taquizoíto (Figura 6B).

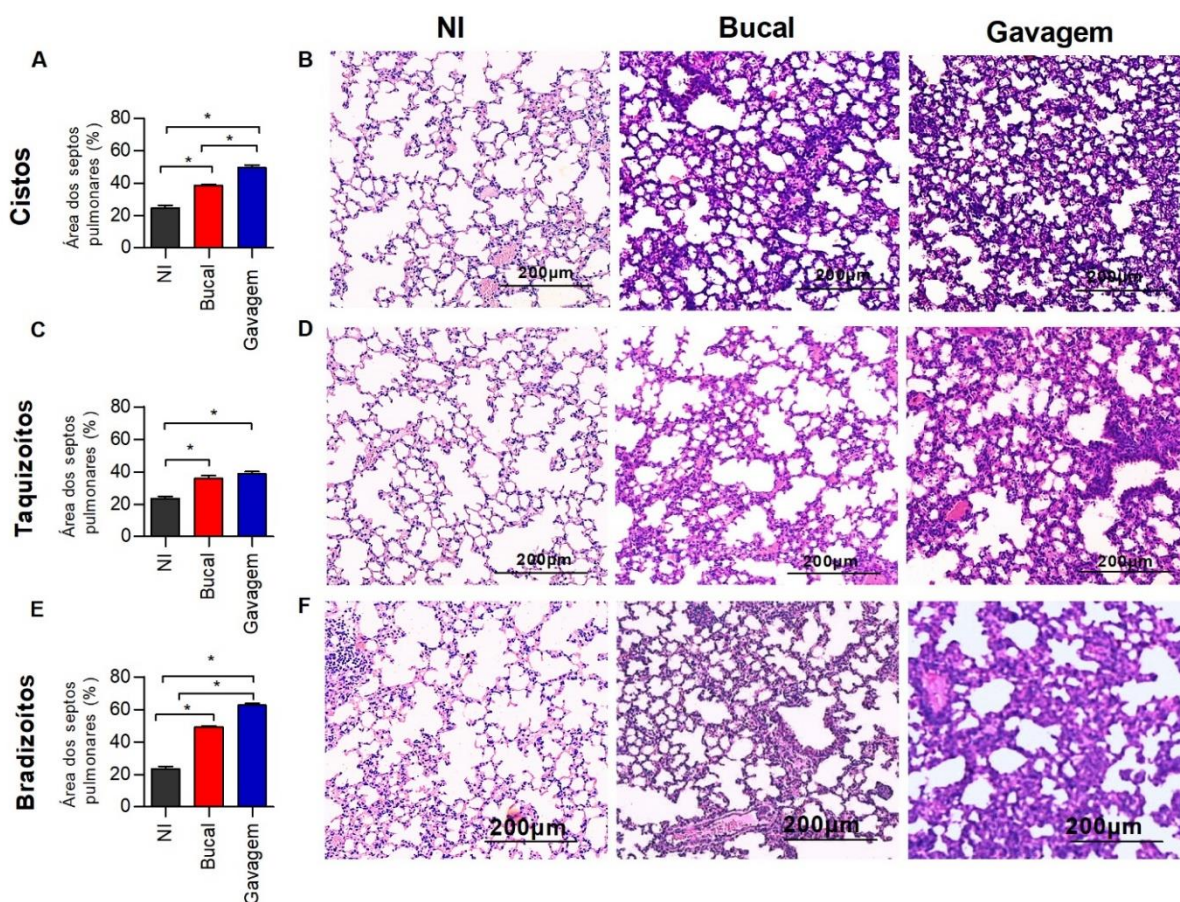


Figura 6: Escore de alterações histológicas de pulmão de camundongos infectados com cistos (A), taquizoítos (C), bradizoítos (E), e micrografias representativas das infecções bucal e gavagem feitas com cistos (B), taquizoítos (D) e bradizoítos (F). Barras representam 200 μm . As secções teciduais foram coradas com H&E e submetidas ao software ImageJ para quantificação do espessamento dos septos pulmonares. Para análise estatísticas dos dados foi utilizado o teste *One-way* ANOVA, com pós-teste de Dunnett. * ($p < 0.05$).

Ainda com o intuito de verificar como a infecção via bucal iria afetar outros órgãos, foi realizada a análise da patologia do fígado (Figura 7), por meio da quantificação dos focos inflamatórios no tecido hepático. Observou-se que camundongos C57BL/6 infectados com cistos por via bucal, apresentaram menor inflamação (Figura 7 A). Entretanto, a via de infecção não alterou o número de focos inflamatórios no fígado de camundongos infectados com taquizoítos (Figura 7B) ou bradizoítos (Figura 7C). Ainda, camundongos infectados com taquizoítos (Figura 7B), apresentam menor número de focos inflamatórios quando comparados aos camundongos infectados com cistos (Figura 7A) ou bradizoítos (Figura 7C).

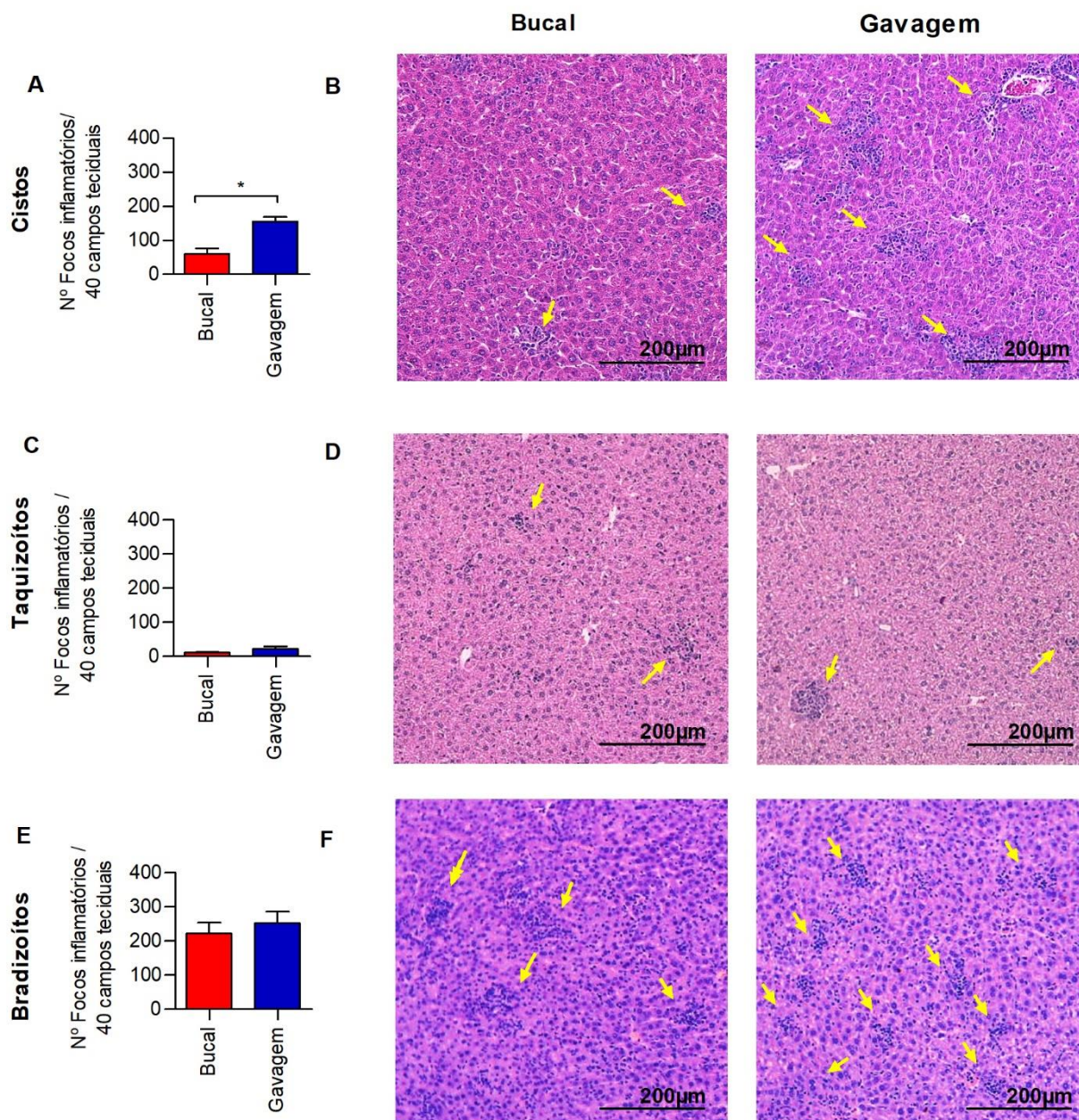


Figura 7: Quantificação de focos inflamatórios no fígado de camundongos infectados com cistos (A), taquizoítos (C) ou bradizoítos (E) da cepa ME49 de *T. gondii* e fotomicrografias representativas das infecções via bucal e gavagem feitas com cistos (C) com taquizoítos (D) com bradizoítos (F). As secções teciduais foram coradas com H&E e os focos inflamatórios foram quantificados microscópio óptico na objetiva de 10X. Barras representam 200 μm. Os dados estatísticos foram analisados pelo teste t de Student. * ($p < 0.05$).

5.5 Quantificação de mastócitos na cavidade bucal

A infecção bucal se caracteriza pelo inóculo de parasitos diretamente na boca dos camundongos. Assim, tornou-se importante avaliar a mucosa da boca desses camundongos C57BL/6 infectados pela via bucal e gavagem com as três formas do parasito. Os resultados demonstraram que os camundongos infectados com *T. gondii* apresentaram um número de mastócitos aumentado quando comparado com os camundongos não infectados, em ambas as vias de infecção. De forma interessante, quando a infecção é realizada pela boca, independente da forma do parasito utilizada, há uma tendência de aumentar ainda mais o número de mastócitos na mucosa quando comparada a infecção via gavagem (Figura 8 A-C).

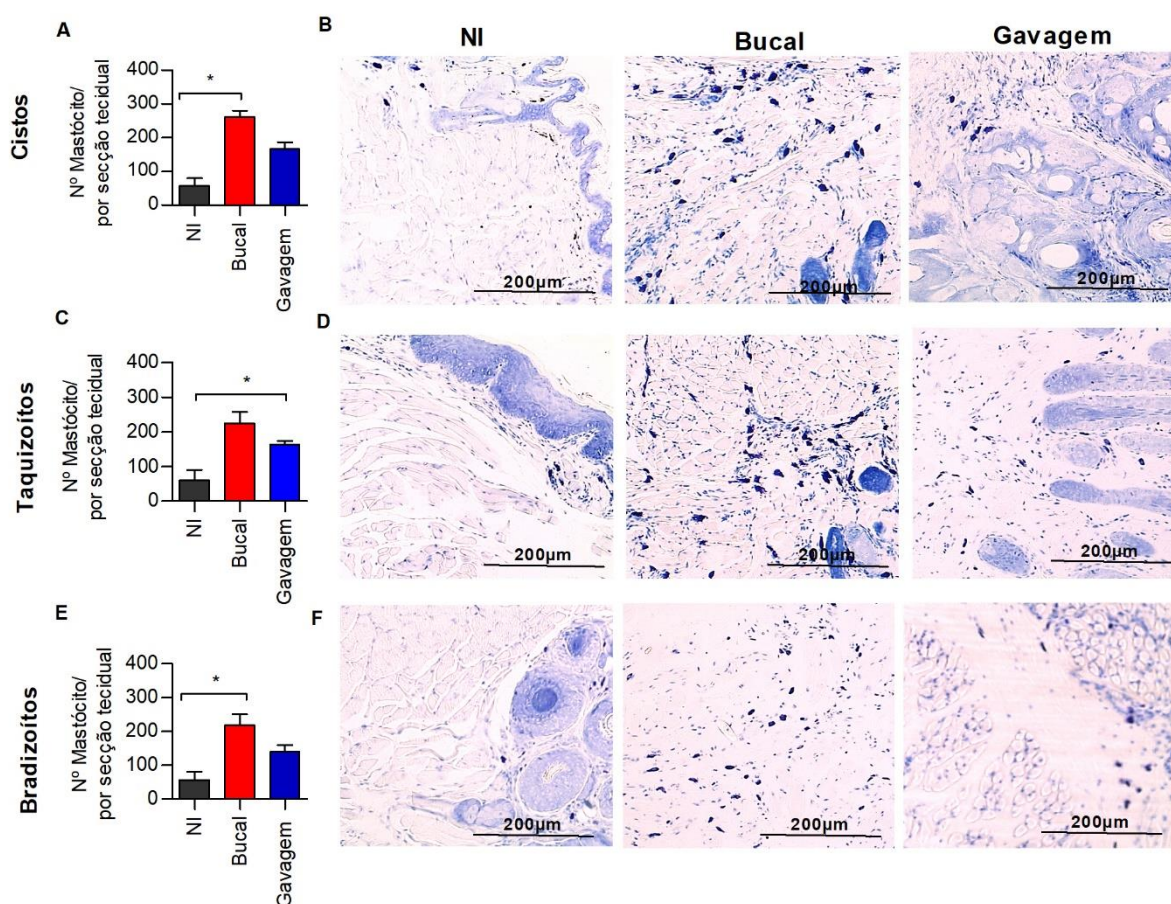


Figura 8: Secções teciduais da cavidade bucal de camundongos infectados com cistos (A), taquizoítos (C), bradizoítos (E) e micrografias representativas da infecção bucal e por gavagem com cistos (B), taquizoítos (D) e bradizoítos (F). Mastócitos corados em púrpura devido à metacromasia. As secções teciduais foram coradas com azul de tuloidina e os mastócitos foram quantificados utilizando microscópio óptico e objetiva de 10 X de aumento. Barras representam 200 μ m. Para análise estatísticas dos dados foi utilizado o teste *One-way* ANOVA, com pós-teste de Dunnett. * ($p < 0.05$).

5.6 Quantificação de IgA nas fezes

A presença de IgA específica para patógenos tem sido associada à proteção contra a infecção (MACK; MCLEOD, 1992). Dessa forma, avaliamos e quantificamos os níveis de IgA anti-*T. gondii* (Figura 9) nas fezes dos camundongos. Foi observado que camundongos infectados pela via bucal apresentam níveis de IgA menores quando comparado com a via gavagem. Essa diminuição ocorreu para duas formas infectantes taquizoítos (Figura 9B) e bradizoítos (Figura 9C) e cistos (Figura 9A). Entretanto, quando a infecção é realizada com cistos (Figura 9A), aqueles camundongos infectados pela via bucal apresentaram uma tendência de níveis de IgA mais elevados (Figura 9A). Quando comparamos de maneira geral, os níveis de IgA das três formas infectantes, observamos que a forma bradizoíto induziu maiores níveis em relação as outras (Figura 9A).

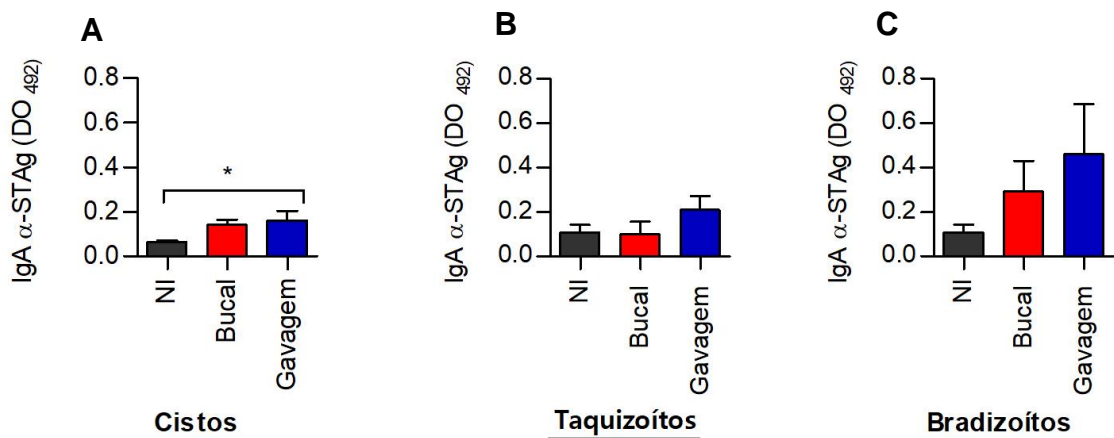


Figura 9: Quantificação de IgA nas fezes dos camundongos infectados via bucal e gavagem com cistos (A), taquizoítos (B) e bradizoítos (C). A quantificação foi realizada por ELISA utilizando fezes dos animais aos 8 dias de infecção. Para análise estatísticas dos dados foi utilizado o teste One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett. * ($p < 0.05$)

6. DISCUSSÃO

A toxoplasmose é adquirida, principalmente na espécie humana, pelo consumo de água e alimentos contaminados com oocistos, cistos e taquizoítos. (LIESENFELD et al., 1996; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). A contaminação com oocistos em fontes de água potável pode estar ligada a surtos de toxoplasmose (DUBEY, 2004). Em 1995 o Centro de Controle de Doenças da Colúmbia Britânica, relatou um grande surto de toxoplasmose na cidade de Victória (Canadá), o surto ocorreu devido a contaminação da água por oocistos (BOWIE et al., 1997). O Brasil possui uma taxa expressiva de infecção por *T. gondii* em humanos, 50% das crianças e 50-80% das mulheres em idade fértil têm anticorpos para *T. gondii* (DUBEY et al., 2012). Um dos maiores surtos relatados no Brasil, ocorreu em Santa Isabel do Ivaí (Paraná), entre 2001 e 2002, causando por contaminação por oocistos no reservatório de água, estudos realizados por Sanders e colaboradores, em 2015, demonstrou que ainda existem grades consequências desse surto como toxoplasmose ocular e congênita na população de Santa Isabel do Ivaí (SANDERS et al, 2017). Em 2016, em uma fazenda no sul do Brasil, foi feito um relato de um surto de toxoplasmose em galinhas, as quais haviam sido contaminadas por oocisto no solo da fazenda (VIELMO et al., 2019).

Sabendo que a rota natural de infecção é a via oral como foi descrito acima, este presente estudo propõe que existem duas ramificações da via oral, sendo estas, a via de infecção bucal, na qual o inóculo dos parasitos é realizado apenas na cavidade bucal (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015), e a via de infecção realizada por gavagem na qual, o inóculo de parasitos é dado ao camundongo de maneira intra-esofágica (DJAKOVIÆ; MILENKOVIÆ, 2001).

Essa hipótese foi reforçada por meio do estudo realizado com *Trypanosoma cruzi*, no qual eles demonstraram diferenças entre a infecção realizada por gavagem e a infecção realizada pela cavidade bucal (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015a). Com base nesse estudo realizado com *T. cruzi*, fizemos a análise das diferenças da via bucal e via gavagem utilizando três formas infectantes de *T.gondii*: cistos, taquizoítos e bradizoítos, essas formas foram utilizadas para infectar pelas duas vias camundongos C57BL/6. Além disso, um trabalho realizado com *Neospora caninum*, um protozoário do mesmo filo que o *T.gondii*, evidencia a diferença das vias de infecção subcutânea e intravenosa, alterando parâmetros como mortalidade e aumento da resposta imune (SÁNCHEZ et al., 2018).

No presente estudo, os camundongos que foram infectados pela via bucal apresentaram um menor escore de morbidade, e uma certa tendência a perderem menos peso, quando comparado com o grupo de camundongos que foram infectados por gavagem,

independente da forma infectante utilizada (cisto, taquizoíto ou bradizoíto). Estudos realizados com *T. cruzi* mostraram também diferenças na morbidade de camundongos que foram infectados pela via bucal e gavagem, entretanto com esse parasito a via bucal de infecção apresentava uma maior morbidade (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015a), o que aconteceu de maneira inversa ao nosso trabalho.

Quando *T. gondii* infecta o hospedeiro pela via natural de infecção, ocorre a disseminação e multiplicação dos parasitos no intestino, principalmente na lâmina própria. Em decorrência disso, observa-se o desenvolvimento de desordens inflamatórias intestinais, o que pode ser observado em algumas linhagens de camundongos (LIESENFELD; KOSEKFLLL; REMINGTON, 1996). Com isso o próximo passo foi investigar a patologia e o parasitismo no intestino, e de maneira interessante foi observado que independente da forma infectante utilizada quando a infecção foi realizada por via bucal, uma quantidade menor de parasitos e uma patologia mais leve foram detectadas quando comparado com o grupo que recebeu o inóculo gavagem.

Células de Paneth e células caliciformes são importantes e responsável pela homeostase intestinal (GOTO; KIYONO, 2012), e a infecção por *T. gondii* causa uma depleção nas células de Paneth (RAETZ et al., 2013), e também foi relatado que a infecção por *T. gondii* causa um desequilíbrio na barreira intestinal devido à redução de células caliciformes (SANT'ANA et al., 2012). De forma semelhante, ambas as vias de infecção causaram depleção nas células de Paneth e caliciformes quando os animais foram infectados com cistos ou bradizoítos, entretanto, a infecção pela via oral com taquizoítos apresentou uma capacidade de preservação de ambas as células. A infecção com cistos ou bradizoítos pela via bucal preservou ao menos parcialmente o número dessas células no intestino. Os resultados sugerem que quando a infecção é realizada por via bucal, há uma diferença na proliferação, patologia e no desequilíbrio homeostático no intestino desses camundongos, e que a infecção por via bucal induz padrões diferenciados de reposta imune no intestino daqueles observados quando a infecção é feita por gavagem.

Tem sido descrito na literatura que a rota de entrada do parasita no hospedeiro é um fator importante, estudos com *T. cruzi* demonstraram que a infecção sistêmica versus a infecção da mucosa promove um padrão de doença distinto (MEIS et al., 2013). Já realizada a análise no intestino o qual é um dos órgãos mais comprometidos pela toxoplasmose, partimos para uma análise de patologia e parasitismo no pulmão e no fígado. A patologia no pulmão e no fígado foi menor na infecção bucal, independente da forma infectante. Em relação ao parasitismo foi detectado parasitos na infecção realizada com cistos no fígado e pulmão; e no pulmão dos camundongos infectados com bradizoítos, e de maneira similar os dados mostraram uma

tendência de apresentar uma menor carga parasitária nos animais que receberam o inóculo apenas na cavidade bucal.

A rota da inoculação também pode levar ao tropismo preferencial, como distintas respostas imunes locais e sistêmicas (BARRETO DE ALBUQUERQUE et al., 2018), isso corrobora com resultado no qual foi feita a quantificação de mastócitos, o número de mastócitos aumenta quando a infecção é realizada na boca dos camundongos, demonstrando dessa forma que a infecção via bucal feita com *T. gondii*, gera uma reação local, a qual ocorre na boca, diferente da reação sistêmicas, nos outros órgãos.

Um mecanismo importante de proteção do sistema imune, é a produção de IgA nas superfícies das mucosas, essa produção impede que microrganismos ultrapassem essas superfícies (LAMM, 1997). Além disso estudos anteriores demonstraram que camundongos infectados com *T.gondii* pela via oral (rota natural da infecção) apresentam anticorpos IgA específicos contra o parasito que são secretados no intestino (MACK; MCLEOD, 1992) (MINEO et al., 1993). Dessa forma os resultados sugerem que a infecção bucal realizada com taquizoítos, bradizoítos e cistos apresentam uma menor ativação do sistema imune e uma menor secreção de IgA específica, entretanto.

Com os resultados apresentados e discutidos nesse trabalho se torna evidente que existem diferenças significativas entre a via de infecção bucal e gavagem, ainda são necessários mais estudos para entender sítios de entrada do parasito e disseminação proveniente da infecção bucal. Porém o foco deste estudo foi entender que o local onde é realizado o inóculo do parasito altera parâmetros como: morbidade, peso, parasitismo, patologia e resposta imune.

7. CONCLUSÕES

1. A infecção bucal gera menor variação de peso, e menor escore de morbidade em camundongos C56BL/6;
2. A infecção bucal gera uma menor patologia intestinal, pulmonar e hepática quando comparada com a via gavagem;
3. A infecção bucal provoca uma menor proliferação de parasitos no intestino pulmão e fígado;
4. A infecção bucal gera menores alterações homeostáticas no intestino, uma vez que preserva células de Paneth e caliciforme;
5. A infecção via bucal gera uma maior ativação local (na cavidade bucal), pelo aumento do número de mastócitos;

8.REFERÊNCIAS

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. Highly Endemic , Waterborne Toxoplasmosis in North **Emerging Infectious Diseases** v. 9, n. 1, p. 55–62, 2003.

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

BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J. et al. Trypanosoma cruzi infection through the oral route promotes a severe infection in mice: New disease form from an old infection? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1–21, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003849>

BARRETO DE ALBUQUERQUE, J. et al. Oral Versus Intragastric Inoculation: Similar Pathways of Trypanosoma cruzi Experimental Infection? From Target Tissues, Parasite Evasion, and Immune Response. **Frontiers in Immunology**, v. 9,p. 1–9, 2018.

<https://dx.doi.org/10.3389%2Ffimmu.2018.01734>

BARTLEY, P. M. et al. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of Neospora caninum in vivo. **Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 421–432, 2006.

<https://doi.org/10.1017/S0031182006000539>

BENEVIDES, L. et al. Toxoplasma gondii Soluble Tachyzoite Antigen Triggers Protective Mechanisms against Fatal Intestinal Pathology in Oral Infection of C57BL/6 Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–14, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075138>

BOWIE, W. R. et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **The 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)

CASTRO-ELIZALDE, K. N. et al. Mycophenolic acid induces differentiation of Toxoplasma gondii RH strain tachyzoites into bradyzoites and formation of cyst-like structure in vitro.

Parasitology Research, v. 117,n. 2, p. 547–563, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5738-x>

DA SILVA WATANABE, P. et al. Immunocompetent host develops mild intestinal inflammation in acute infection with Toxoplasma gondii. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190155>

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. **Clinical Microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 569–588, 1998. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - A waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1–2, p. 57–72, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>

DUBEY, J. P. et al. 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, bradzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cyst. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.

EGAN, C. E. et al. Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling during protozoan infection: Focus on *Toxoplasma gondii*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 1, p. 17–24, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03876.x>

ELMORE, S. A. et al. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190–196, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 355–359, 2002.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Super Sanita**, v. 40, n. 1, p. 71–80, 2004. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy004>

FREHN, L. et al. Distinct patterns of IgG and IgA against food and microbial antigens in serum and feces of patients with inflammatory bowel diseases. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106750>

GAZZINELLI, R. T. et al. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of immunology**, v. 146, p. 286–292, 1991.

GAZZINELLI, R. T. et al. Parasite-Induced IL-12 Stimulates Early IFN- γ Synthesis and Resistance During Acute Infection with *Toxoplasma gondii*. **The journal of Immunology**, v. 12, n. 2, p. 1994, 153: 2533., 1994.

GAZZINELLI, R. T. et al. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: An evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 2, p. 132–138, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.004>

GOTO, Y.; KIYONO, H. Epithelial barrier : an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. **Nature Reviews Immunology** v. 245, p. 147–163, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01078.x>

HALONEN, S.; WEISS, L. Toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**. V.45 p.114-125, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8,n. 10, p. 634-640, 2002.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n.1, p. 41–61, 2005.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 159–169 2010.
<https://doi.org/10.1038/nri2710>

JOHNSON, A. M. Strain-dependent, route of challenge-dependent, murine susceptibility to toxoplasmosis. **Z Parasitenkd**, v. 70, p. 303–309, 1984.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10–25, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>

KANG, H.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Decreased Resistance of B Cell-Deficient Mice to Infection with *Toxoplasma gondii* Despite Unimpaired Expression of IFN- γ , TNF- α , and Inducible Nitric Oxide Synthase. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 5, p. 2629–2634, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2629>

KHAN, I. A. et al. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.94 ,p.25 1997. <https://dx.doi.org/10.1073%2Fpnas.94.25.13955>

KUMP, L. I.; ANDROUDI, S. N.; FOSTER, C. S. Ocular toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 33, n. 5, p. 455–460, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2005.01061.x>

LAMM, M. E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. **Annual review of microbiology**, v. 51, p. 311–340, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.311>

LIU, Q. et al. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6>

LIESENFELD, O. et al. Association of CD4 + T Cell-dependent, Interferon- γ -mediated Necrosis of the Small Intestine with Genetic Susceptibility of Mice to Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 597-607 1996. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.597>

LIESENFELD, B. O.; KOSEKFLLL, J.; REMINGTON, J. S. Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine** v. 184, p.597-607,1996. <https://dx.doi.org/10.1242%2Fjeb.074153>

MACK, D. G.; MCLEOD, R. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 6, p. 2585–2592, 1992. <https://doi.org/10.1172/JCII16153>

MCGUCKIN, M. A. et al. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases Inflammatory. **Bowel Diseases**, 2009. <https://doi.org/10.1002/ibd.20539>

MEIS, J. DE et al. Trypanosoma cruzi entrance through systemic or mucosal infection sites differentially modulates regional immune response following acute infection in mice.

Frontiers in Immunology v. 4, p. 1–7, 2013.

<https://dx.doi.org/10.3389%2Ffimmu.2013.00216>

MEYER, D. J.; ALLAN, J. E.; BEAMAN, M. H. Effect of route of infection on outcome of Toxoplasma gondii infection in hu-PBL SCID mice **European Journal of Microbiology and Immunology** v. 3, p. 28–35, 2013. <https://dx.doi.org/10.1556%2FEuJMI.3.2013.1.4>

MILLER, C. M. et al. The immunobiology of the innate response to Toxoplasma gondii International . **Journal for Parasitology**, Effect of route of infection on outcome of Toxoplasma gondii infection in hu-pbl scid mice.v.15, p. 100-113, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.002>

MINEO, J. R. et al. Antibodies to Toxoplasma gondii major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 9, p. 3951–3964, 1993.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The 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)

MÜLLER, C. A.; AUTENRIETH, I. B.; PESCHEL, A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier Cellular and Molecular . **Life Sciences**,v. 62,n. 12, p. 1339-1348, 2005.

<https://doi.org/10.1007/s00018-005-5034-2>

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of Toxoplasma gondii **Immunological Reviews**, v.85, n.1, p. 240-269 2011. [https://doi.org/10.1111/j.1600-](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x)

[065X.2010.00992.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x)

NEVES, David Pereira. Parasitologia humana. 13. ed. São Paulo: **Atheneu**, 2016.

PITT, D.; ROBOZ, P. Congenital toxoplasmosis. **Journal of Paediatrics and Child Health**, p.30–35. 1967. <https://dx.doi.org/10.1093%2Fjpid%2Fpiu077>

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, n. 4, p. 387–401, 2015. <https://dx.doi.org/10.1128%2FMMBR.00027-15>

PORTER, E. M. et al. The multifaceted Paneth cell Cellular and Molecular. **Life Sciences**, v.59, p. 156–170 ,2002. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-002-8412-z>

RAETZ, M. et al. Parasite-induced T H 1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. **Nature Immunology**, v. 14, n. 2, p. 136–142, 2013. <https://doi.org/10.1038/ni.2508>

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, p. 265- 289, 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

SANT'ANA, M. G. S. MARCELO, B.Z. JACQUELINE, N. ARISTEU, V. S. CLEVERTON, J. Intraepithelial lymphocytes , goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Experimental Pathology**, v.93, p. 279–286, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00824.x>

SÁNCHEZ, R. S. et al. Influence of dose and route of administration on the outcome of infection with the virulent *Neospora caninum* isolate Nc - Spain7 in pregnant sheep at mid - gestation. **Veterinary Research**, v.49, p. 1–15, 2018. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs13567-018-0539-5>

SCHREINER, M.; LIESENFELD, O. Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: Review of 70 reports from the literature. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 221–233, 2009. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000200015>

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: Determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v. 107, n. 2, p. 253–260, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>

SULLIVAN, W. J.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency **Microbiology Reviews**, v.33 p. 717–733, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x>

SZABO, E. K.; FINNEY, C. A. M. *Toxoplasma gondii*: One Organism, Multiple Models. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 113–127, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.007>

TAIT, E. D.; HUNTER, C. A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 201-210, 2009. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000200013>

TORREY, E. F.; YOLKEN, R. H. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. **Trends in Parasitology**, v.29,p. 380-384, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.06.001>