

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**JÚLIA MARIA FERNANDES PITUBA**

**Papel de CCR5 nas alterações morfológicas no intestino delgado durante a infecção oral  
aguda por *Toxoplasma gondii* em modelos murinos**

**Uberlândia**

**2025**

**JÚLIA MARIA FERNANDES PITUBA**

**Papel de CCR5 nas alterações morfológicas no intestino delgado durante a infecção oral  
aguda por *Toxoplasma gondii* em modelos murinos**

Trabalho de Conclusão de Curso II  
apresentado à Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia, Curso de  
Graduação em Medicina Veterinária, da  
Universidade Federal de Uberlândia, como  
requisito para aprovação na disciplina de  
Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC 2,  
GMV054).

Linha de pesquisa: Imunopatologia de  
parasitoses

Orientadora: Profa. Dra. Neide Maria da  
Silva

**Uberlândia**

**2025**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Neide Silva, que me orientou durante praticamente toda a graduação, muito obrigada por tudo que me ensinou durante esse tempo, vou carregar para sempre.

À minha família, Anne e amigos que me ajudaram e incentivaram durante todo esse processo. Principalmente meus pais que sempre me apoiaram nos estudos e na vida, sempre me incentivando a buscar o melhor para mim, amo muito vocês. E à Yris que foi minha companheira de vida durante todo esse tempo de graduação e sempre me ajudou com tudo que precisei, amo você e o Azriel, espero te levar como amiga para sempre.

À equipe do Grupo de Estudos de Animais Selvagens da Universidade Federal de Uberlândia por me ensinarem tanto, me gerar amizades e me fazerem crescer como pessoa e profissional. Aos alunos do Laboratório de Imunopatologia, por tudo que me ensinaram durante minhas iniciações científicas e meu trabalho de conclusão de curso. E à equipe do Grupo de Estudos em Patologia Veterinária, obrigada por me acolher como o primeiro grupo de estudos que fiz parte e que me ensinou muito também.

Aos profissionais e colegas que acompanhei durante estágios, principalmente ao Setor de Animais Silvestres do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, que foi tão importante na minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida durante minha Iniciação Científica.

Obrigada a todos os citados, vocês me inspiram a ser uma profissional e uma pessoa melhor!

*“A natureza pode suprir todas as necessidades do homem, menos a ganância.”*

(Mahatma Gandhi)

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose, sendo a resposta imunológica do organismo a esse parasita baseada principalmente na resposta celular do tipo Th1. Já foi visto que a expressão do receptor para quimiocina CCR5 é importante para o recrutamento celular na infecção por *T. gondii*, ou seja, para o controle imunológico da infecção aguda. Além disso, foi verificado que, animais geneticamente deficientes para esse receptor são mais suscetíveis à infecção e apresentam maior carga parasitária. No entanto, as alterações morfológicas no intestino delgado, principal sítio de entrada do parasita, na ausência do receptor, necessita de investigações adicionais. Para tal, animais geneticamente deficientes em CCR5 (CCR5<sup>-/-</sup>) e animais controles, C57BL/6, foram infectados por via oral e a morbidade, sobrevivência e parâmetros histológicos intestinais foram avaliados. Os animais CCR5<sup>-/-</sup> foram mais suscetíveis a infecção que os animais controles. A infecção pelo parasita induziu uma inflamação suave no intestino delgado aos 5 dias de infecção em ambas as linhagens, sendo que animais C57BL/6 apresentaram um aumento do número de células de Paneth e CCR5<sup>-/-</sup> um aumento de linfócitos intraepiteliais. No entanto, em ambos, observou-se alterações inflamatórias aumentadas aos 7 dias de infecção. As alterações inflamatórias foram mais acentuadas em animais CCR5<sup>-/-</sup>. Além disso, foi observado uma diminuição do número de células caliciformes, Paneth e linfócitos intraepiteliais no intestino delgado em camundongos de ambas as linhagens, que foi mais acentuada nos animais CCR5<sup>-/-</sup>. Em conclusão, o receptor de quimiocinas CCR5, está envolvido na proteção contra lesões teciduais no intestino delgado em infecção por *T. gondii*.

**Palavras-chave:** receptores de quimiocinas; camundongos geneticamente deficientes em CCR5; infecção experimental; resposta imune intestinal; toxoplasmose.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is the etiological agent of toxoplasmosis and this parasite induces mainly a type 1 immune response. It has already been known that the expression of the CCR5 chemokine receptor is important for the cell recruitment in *T. gondii* infection, being important for the immune control of acute infection. In addition, it was found that genetically deficient animals for this receptor are more susceptible to infection and have higher parasite load. However, morphological changes in the small intestine, the main entry site of the parasite, in the absence of the receptor, require further investigation. To this end, animals genetically deficient in CCR5 (CCR5<sup>-/-</sup>) and control animals, C57BL/6, were infected orally and the morbidity, survival and intestinal histological parameters were evaluated. CCR5<sup>-/-</sup> animals were more susceptible to infection than control animals. Infection by the parasite induced a mild inflammation in the small intestine at day 5 of infection, and C57BL/6 showed an increase in the number of Paneth cells and CCR5<sup>-/-</sup> animals an increase in the number of intraepithelial lymphocytes. However, increased inflammatory changes were observed at day 7 of infection. The inflammatory changes were more pronounced in CCR5<sup>-/-</sup> animals. In addition, a decrease in number of goblet cells, Paneth and intraepithelial lymphocytes in the small intestine was observed in mice of both lineages, which were higher in CCR5<sup>-/-</sup> animals. In conclusion, the CCR5 chemokine receptor is involved in protecting against tissue lesions by *T. gondii* infection in the small intestine.

**Keywords:** chemokine receptor; CCR5 genetically deficient mice; experimental infection; intestinal immune response; toxoplasmosis.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>10</b>
2.1	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	10
2.2	TOXOPLASMOSE .....	14
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	16
2.4	RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR <i>Toxoplasma gondii</i> .....	17
2.5	RECEPTOR CCR5.....	18
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
5.1	AVALIAÇÃO DO ESCORE DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL .....	23
5.2	AVALIAÇÃO DO PARASITISMO TECIDUAL .....	23
5.3	QUANTIFICAÇÕES DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE CÉLULAS DE PANETH E DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS .....	24
5.4	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CALICIFORMES.....	25
5.5	QUANTIFICAÇÃO TECIDUAL DE MASTÓCITOS.....	25
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
6.1	DISTRIBUIÇÃO DA NORMALIDADE DOS DADOS.....	36
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii*, um protozoário, agente etiológico da toxoplasmose, é um parasita intracelular obrigatório, que pode ser encontrado em uma grande variedade de células (Montoya; Liesenfeld, 2004). Tem distribuição global sendo que em humanos, este parasita infecta cerca de um terço da população global, geralmente de forma assintomática (Robert-Gangneux; Marie-Laure, 2012; Jones *et al.*, 2001). Teoricamente, todos os animais endotérmicos, podem ser hospedeiros intermediários em seu ciclo biológico (Montoya; Liesenfeld, 2004). Sendo que apenas algumas espécies da família Felidae podem ser consideradas hospedeiros definitivos do parasita, sendo o gato doméstico (*Felis catus*) de grande importância epidemiológica (Montoya; Liesenfeld, 2004).

A toxoplasmose é uma importante zoonose, causando problemas em animais domésticos, silvestres e de produção, levando a perdas econômicas (Jenkins *et al.*, 2015; Aguirre *et al.*, 2019; Fernández-Escobar *et al.*, 2022). Em humanos, classicamente, os principais problemas estão relacionados à toxoplasmose congênita (transmissão transplacentária), que pode levar a uma série de problemas fetais, encefalite toxoplásrica em indivíduos imunocomprometidos e toxoplasmose ocular (Hill; Dubey, 2002). Atualmente observa-se associação da soroprevalência para *Toxoplasma* com doenças neuropsiquiátricas, neurodegenerativas e mudanças de comportamento, de forma que, pode ser que os problemas causados pela toxoplasmose sejam muito maiores do que o imaginado anteriormente (Torrey, 2006; Flegr, 2013; Milne; Webster; Walker, 2020). Assim, é uma importante doença no aspecto da Saúde Única, sendo essencial seu estudo e entendimento, para que esses impactos sejam mais brandos (Aguirre *et al.*, 2019). A transmissão pode se dar por meio da ingestão de qualquer uma de suas formas evolutivas, sendo o principal meio de contaminação pela alimentação (Montoya; Liesenfeld, 2004). Os cistos desse parasita podem ser encontrados em diversas espécies de animais de produção, sendo mais comumente encontrados em suínos e ovinos, podendo ocorrer a transmissão por meio da carne desses animais, por isso a importância do consumo de carnes bem cozidas, para evitar que isso aconteça (Hill; Dubey, 2002; Montoya; Liesenfeld, 2004).

Com a infecção de células no intestino delgado, ocorre a liberação de quimiocinas, como CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) e CCL5 (RANTES) que vão atuar em receptores de quimiocinas do tipo CCR5 em células apresentadoras de antígeno, fazendo com que ocorra o recrutamento de células do sistema imune inato (Loetscher *et al.*, 1998; Appay, Rowland-Jones, 2001). A resposta imunológica do hospedeiro a *T. gondii* é mediada principalmente por resposta

celular do tipo Th1, com produção de IFN $\gamma$ , TNF, óxido nítrico e IL-12 (Liesenfeld *et al.*, 1996, 1999). Estudos demonstram que animais que são deficientes para o receptor de quimiocinas CCR5, são mais suscetíveis a infecção por *T. gondii*, apresentam maior carga parasitária, tecidos lesionados de forma mais extensa, mostrando esse receptor como essencial para a manutenção da homeostasia do hospedeiro (Bonfá *et al.*, 2014). Além disso, a proteína ciclofilina-18 produzida pelo parasita pode se ligar a esse receptor, induzindo a ativação de células apresentadoras de antígeno para produção de IL-12, de forma que essa proteína mimetiza os ligantes de CCR5 (Aliberti *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2014). Apesar desses conhecimentos, não está claro o envolvimento de CCR5 nas alterações morfológicas intestinais na fase aguda da infecção pelo parasita.

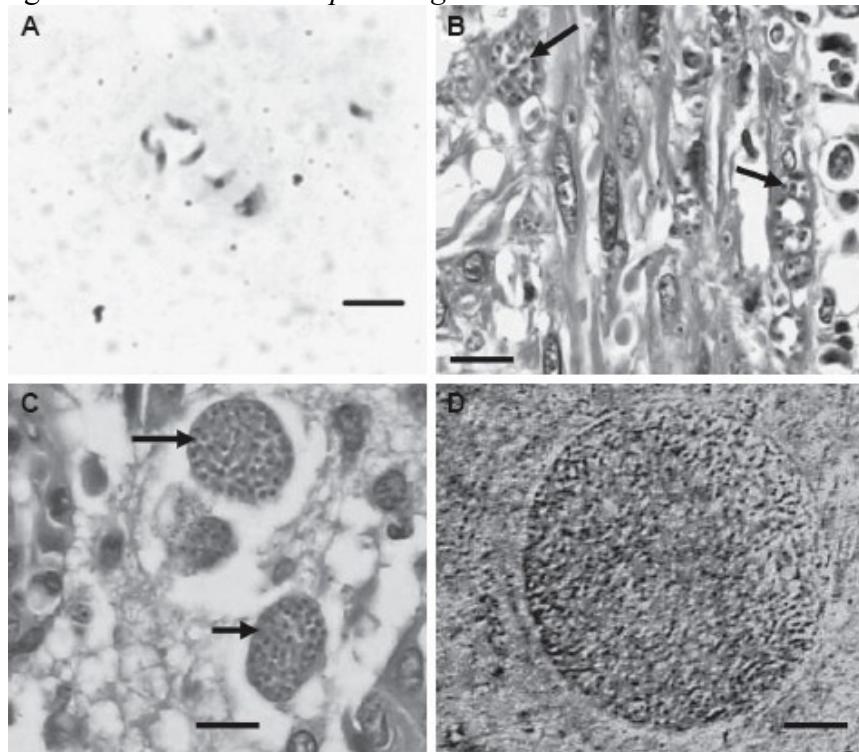
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, da ordem Eucoccidiida, da família Sarcocystidae (Salomão, 2017, p. 623). É um parasita intracelular obrigatório, capaz de invadir todas as células nucleadas (Dubey; Beattie, 1988). Por ser pertencente ao filo Apicomplexa, possui um complexo apical, que permite a invasão das células do hospedeiro e promove motilidade ao parasita (Rey, 2008, p. 193) apresentando as organelas secretórias especializadas, as micronemas e as roptrias (Dubey; Lindsay; Speer, 1998).

Esse parasita já foi encontrado em mais de 300 espécies de mamíferos e mais de 30 espécies de aves (Salomão, 2017, p. 622). Tem distribuição global e foi descoberto no século XX, sendo que a primeira vez que esse protozoário foi isolado foi em um gondi (*Ctenodactylus gundi*), um pequeno roedor na Tunísia em 1908, e ao mesmo tempo em um coelho na América do Sul (Lehmann *et al.*, 2006; Rey, 2008, p. 192; Aguirre *et al.*, 2019). Acredita-se que ele teve origem nos felídeos da América do Sul, e que se disseminou por meio de aves migratórias e migrações humanas, principalmente por meio da rota de escravos transatlântica, com a migração de mamíferos nessas embarcações, como gatos e roedores (Lehmann *et al.*, 2006).

Figura 1 – Estágios evolutivos do *Toxoplasma gondii*.



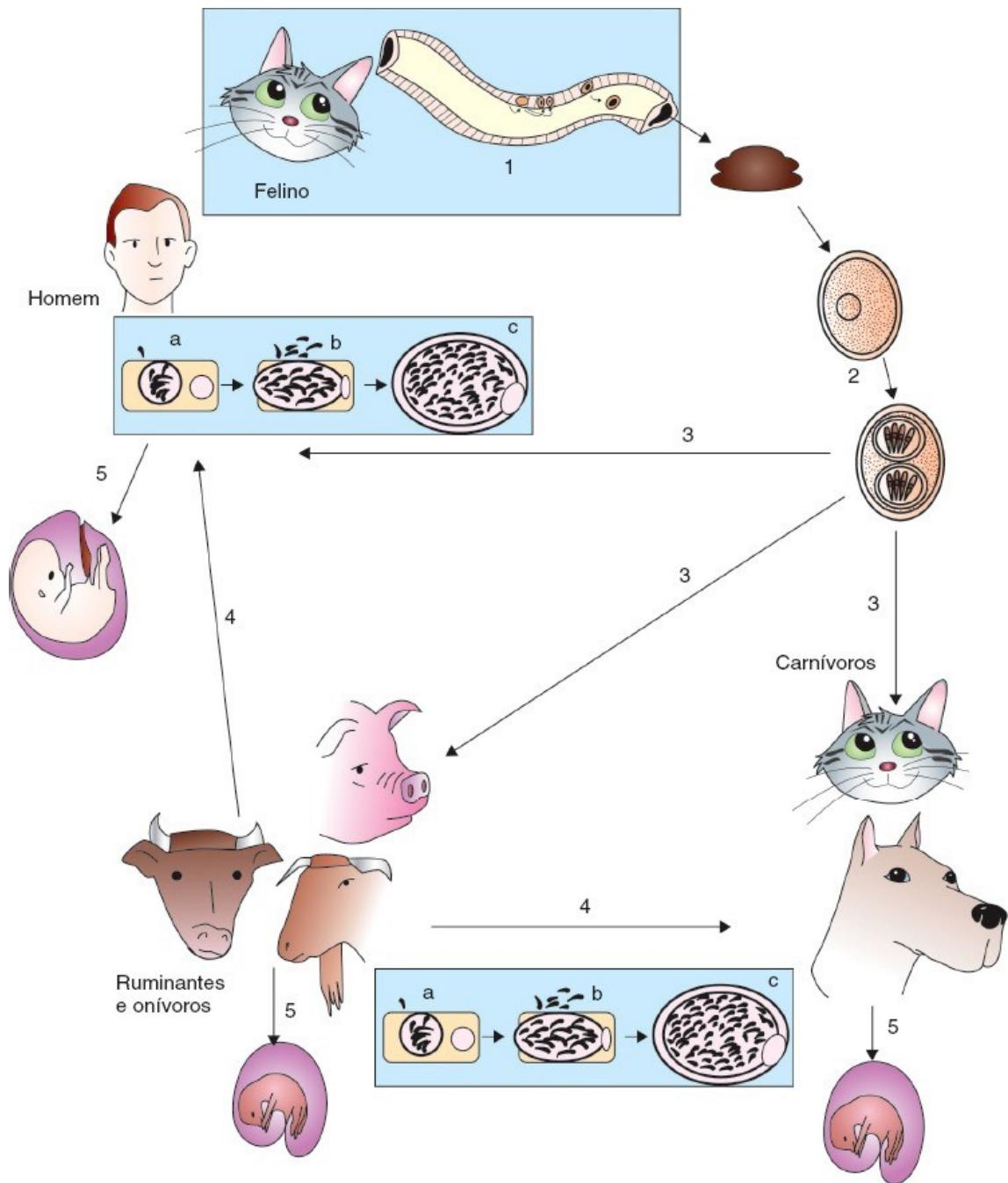
Fonte: Jericó; Neto; Kogika (2023, p. 771).

A. Taquizoítos livres em exsudato peritoneal de camundongos. B. Taquizoítos no citoplasma de células (setas). C. Cistos jovens em tecido cerebral de camundongo (setas). D. Cisto maduro em macerado a fresco de cérebro de camundongo. (A, B e C. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . D. Barra = 50  $\mu\text{m}$ ; cedidas pelos professores Antonio Carlos Farias dos Reis, Milton Hissashi Yamamura e Selwyn Arlington Headley.)

Apresenta três formas evolutivas: os taquizoítos, os bradizoítos e os esporozoítos (Dubey; Lindsay; Speer, 1998; Montoya; Liesenfeld, 2004), sendo possível a visualização dos dois primeiros na Figura 1. O taquizoíto é a forma de multiplicação rápida e ocorre principalmente na fase aguda da infecção (Montoya; Liesenfeld, 2004). O bradizoíto possui um metabolismo mais lento e por isso é a forma de multiplicação lenta, encontrado em cistos teciduais, principalmente na fase crônica da infecção (Montoya; Liesenfeld, 2004). Já o esporozoíto é a forma encontrada nos oocistos excretados pelo hospedeiro definitivo (Montoya; Liesenfeld, 2004), onde ocorre a fase sexuada da infecção, além da assexuada (Rey, 2008, p. 195), ou seja, felídeos infectados (Dubey; Miller; Frankel, 1970; Montoya; Liesenfeld, 2004). Os hospedeiros intermediários de *T. gondii* são todos os outros susceptíveis à infecção pelo protozoário e neles ocorre apenas a fase assexuada do ciclo biológico do parasita (Rey, 2008, p. 195). De forma geral, este parasita apresenta morfologia alongada, encurvada em arco ou crescente, com uma das extremidades mais acentuada, mede de 4-8  $\mu\text{m}$  de comprimento por 2-4  $\mu\text{m}$  de largura (Dubey; Lindsay; Speer, 1998; Rey, 2008, p. 193).

Em geral, apenas 1% dos gatos dentro de uma população em um mesmo momento, estão na fase de excreção de oocistos da doença, uma vez que eles excretam por um curto período de 1 a 2 semanas em toda a sua vida, segundo Hill e Dubey (2002), ou de 1 a 3 semanas, segundo Montoya e Liesenfeld (2004). Em condições experimentais foi percebido que um gato pode excretar oocistos após ser infectado por uma segunda vez com cistos teciduais, mas não se sabe ao certo se isso é algo que ocorre em condições naturais (Hill; Dubey, 2002). E, por mais que a quantidade de gatos que excretam oocistos por vez seja pequena, isso ocorre em grandes quantidades, favorecendo a contaminação ambiental, que é um problema, considerando que oocistos esporulados conseguem sobreviver por longos períodos, de meses ou até anos a depender das condições (Hill; Dubey, 2002). Além disso, foi visto que em algumas espécies de felinos selvagens podem excretar oocistos de maneira intermitente por toda a vida, diferentemente dos gatos domésticos (Milne; Webster; Walker, 2020).

Figura 2 - Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*.



Fonte: Jericó; Neto; Kogika (2023, p. 771).

1. Felino: ciclo enteroepitelial (intestino delgado) – esquizogonia (fase assexuada) e gametogonia (fase sexuada). Eliminação de oocistos não esporulados nas fezes. 2. Meio ambiente: esporogonia ou esporulação (oocisto esporulado). 3. Transmissão fecal-oral (oocistos esporulados – esporozoitos). 4. Transmissão por carnivorismo (cistos teciduais – bradizoítos). 5. Transmissão vertical (mãe-feto-taquizoítos): a. zoíto infecta a célula; b. taquizoítos replicam-se e rompem a célula; c. taquizoítos infectam nova célula e, com a imunidade do hospedeiro, formam cisto tecidual (bradizoítos).

*T. gondii* possui um ciclo de vida heteroxeno facultativo (Fernández-Escobar *et al.*, 2022), representado na Figura 2, o hospedeiro definitivo pode ser infectado por meio da ingestão de oocistos maduros (esporozoitas) ou carne contaminada (bradizoítas), ou mesmo

taquizoítos, o parasita invade as células epiteliais do intestino, onde se multiplica de forma assexuada (reprodução esquizogônica), o que pode ser repetido diversas vezes (Dubey; Lindsay; Speer, 1998; Rey, 2008, p. 195). Alguns esquizontes se diferenciam em gamontes, que produzem macro e microgametas, que se fundem, formando o zigoto, sendo essa a parte sexuada do ciclo biológico (ou gametogônico) (Rey, 2008, p. 195). A partir disso se formam oocistos que saem das células epiteliais ainda imaturos e são eliminados para o meio externo por meio das fezes, onde amadurecem em poucos dias, necessitando, para isso, de oxigênio (Rey, 2008, p. 195). Esse amadurecimento é a produção de esporocistos no interior do oocisto que darão origem a esporozoítas, quando maduros, se tornam infectantes e resistem meses ou anos no ambiente quando em temperatura e umidade adequadas (Rey, 2008, p. 195).

Já o processo assexuado (endodiogenia ou endogenia), que pode ocorrer tanto no hospedeiro definitivo quanto no intermediário, consiste em um mecanismo semelhante ao brotamento interno, em que os restos da célula mãe sofrem degeneração, deixando os novos parasitas livres (Rey, 2008, p. 196). Na fase aguda da infecção, tem-se a multiplicação dos parasitas nas células do hospedeiro dentro do vacúolo parasitóforo, havendo a formação de pseudocistos que se rompem e liberam novos parasitas na forma de taquizoítos (multiplicação rápida) (Rey, 2008, p. 196). Estes, podem infectar demais tecidos, como o Sistema Nervoso Central, o olho, a placenta, o músculo esquelético e o músculo cardíaco (Montoya; Liesenfeld, 2004). Nessa fase aguda da infecção, os taquizoítos podem induzir uma forte resposta inflamatória e destruição tecidual, gerando a sintomatologia da doença (Montoya; Liesenfeld, 2004). Já na fase crônica da infecção, com o desenvolvimento de imunidade por parte do hospedeiro, esse processo continua a ocorrer, mas de forma bem mais lenta (Rey, 2008, p. 196). Por meio da formação de cistos (bradizoítos), que são muito resistentes a medicamentos, podendo durar a vida toda do indivíduo, principalmente aqueles situados no sistema nervoso central (Rey, 2008, p. 196). Diferente de muitos parasitas do filo Apicomplexa, a fase sexual do ciclo biológico de *T. gondii* não é obrigatório para a multiplicação do parasita, de forma que ele consegue ser propagado apenas com a replicação assexual ocorrendo indefinidamente (Beck *et al.*, 2009; Fernández-Escobar *et al.*, 2022).

Dessa forma, a eliminação de oocistos só ocorre a partir do hospedeiro definitivo (felídeos), enquanto os demais animais só conseguem transmitir o parasita se tiverem sua carne (com presença de cistos) servida como alimento para algum outro animal (Rey, 2008, p. 195). Assim, a transmissão pode ocorrer por meio da ingestão de cistos teciduais em carne malcozida ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos (Hill; Dubey, 2002). É

importante ressaltar que existem estudos que mostram que casos transmitidos por oocistos, podem ser mais graves do que aqueles que ocorrem pela ingestão de cistos teciduais (Hill; Dubey, 2002).

Acredita-se que *T. gondii* possa favorecer que seu ciclo de vida seja completado é por meio da manipulação do hospedeiro, como no caso de roedores, que perdem seu medo inato de gatos e são atraídos pela urina desses animais (Berdoy.; Webster; Macdonald, 2000; Vyas *et al.*, 2007). Isso também já foi observado e sugerido em outros táxons, como os primatas e pássaros (Poirotte *et al.*, 2016; Aguirre *et al.*, 2019). Além disso, foi sugerido que *T. gondii* faria com que roedores infectados, além de perder o medo de gatos, poderiam perder o medo de outros carnívoros, facilitando que a infecção chegasse a esses animais (Dubey *et al.*, 2021).

Há uma grande diversidade genética e fenotípica nas populações de *T. gondii* pelo mundo. Havendo três linhagens clonais predominantes, I, II e III (Montoya; Liesenfeld, 2004) e diversos genótipos atípicos (Américas e China), de forma que hoje se tem alguns outros sendo descobertos em algumas populações ao redor do mundo (Ajzenberg *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2005; Aguirre *et al.*, 2019). Antes se acreditava que *T. gondii* era clonal com baixa variabilidade genética e agrupado apenas nas três linhagens citadas anteriormente, mas em estudos mais recentes, foi mostrado que há uma grande diversidade genética dentro dessa espécie, principalmente em alguns isolados na América do Sul (Dubey *et al.*, 2016).

## 2.2 TOXOPLASMOSE

Essa doença é considerada uma antropozoonose (Salomão, 2017). Havendo, assim, uma importância especial da visão da Saúde Única, que são esforços multidisciplinares que buscam melhorar a condição de saúde das pessoas, dos animais, das plantas e do meio ambiente, uma vez que, estão todos conectados (Aguirre *et al.*, 2019). Sendo assim, importante a visão do médico veterinário, um importante participante dessa cadeia. A toxoplasmose, afeta de maneira significativa a saúde humana, de animais domésticos e animais silvestres e dos ecossistemas, além de ser um perigo para pessoas que se alimentam de produtos de origem animal (Aguirre *et al.*, 2019), de forma que se faz necessária a prevenção em animais de produção (Fernández-Escobar *et al.*, 2022).

Cistos podem ser encontrados em vários animais usados para a ingestão de carne por parte do ser humano, como ovelhas, suínos, coelhos, sendo menos comum em bovinos, bubalinos e equinos (Hill; Dubey, 2002) e mais comum nos dois primeiros (Montoya; Liesenfeld, 2004). Teoricamente, qualquer parte comestível dos animais pode conter *T. gondii*.

de forma viável (Hill; Dubey, 2002). É importante ressaltar, que o risco de infecção por meio da ingestão de leite não pasteurizado ou fervido é quase nulo no leite de vaca, sendo mais comum com leite de cabra (Hill; Dubey, 2002).

A maioria das infecções humanas são assintomáticas, de forma que a manifestação clínica vai depender do status imune do hospedeiro (Montoya; Liesenfeld, 2004). Assim, em algumas situações específicas como em imunocomprometidos e na infecção congênita, pode haver efeitos deletérios maiores (Hill; Dubey, 2002). A infecção congênita, ocorre quando a mulher é infectada especificamente durante o período gestacional, aquelas adquiridas no primeiro trimestre da gestação são mais graves para o feto/embrião que aquelas adquiridas posteriormente, no entanto, as mães costumam ser assintomáticas (Hill; Dubey, 2002; Milne; Webster; Walker, 2020). De forma geral, a infecção fetal, de início se dá de forma sistêmica, em seguida se tornando mais localizada no sistema nervoso central, podendo causar menos comumente a hidrocefalia, além de convulsões, calcificações intracerebrais e doenças oculares, sendo a última, a sequela mais comum (Hill; Dubey, 2002). Além disso, a transmissão transplacentária pode gerar abortos, fetos natimortos, morte neonatal ou anormalidades fetais/neonatais (Bigna *et al.*, 2020). A transmissão vertical ocorre principalmente quando a primeira infecção da gestante é aquela durante a gestação, com o risco de transmissão aumentando significativamente com o passar da idade gestacional, sendo que a situação é agravada quando há imunodeficiência (Bigna *et al.*, 2020). Diante de tal gravidade para os fetos, em alguns países, como no Brasil, o exame para essa doença faz parte dos exames de rotina de mulheres gestantes (Hill; Dubey, 2002; Brasil, 2012). De forma que o diagnóstico sorológico (IgM) deve ser obtido antes ou no início da gestação, sendo importante que um especialista interprete o resultado corretamente, para diferenciar uma infecção aguda de uma crônica, que ocorre em 60% das mulheres testadas nos Estados Unidos (Montoya; Liesenfeld, 2004).

A linfadenopatia (aumento de linfonodos) é o principal sinal clínico em humanos, podendo ainda haver febre, fadiga, dor muscular, dor de garganta e dor de cabeça (Hill; Dubey, 2002). Considerando os indivíduos imunocomprometidos, a encefalite toxoplasmica é a manifestação clínica mais importante, uma vez que é a mais danosa (Hill; Dubey, 2002). Nesses pacientes, podem ocorrer dor de cabeça, desorientação, sonolência, hemiparesia, mudanças dos reflexos, convulsões e coma (Hill; Dubey, 2002). A toxoplasmose é uma das principais doenças causadoras de morte em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), em que o órgão mais acometido é o cérebro (Hill; Dubey, 2002). Além disso, nesses pacientes, pode ocorrer pneumonia, coriorretinite, ou envolvimento de vários órgãos ao mesmo tempo,

levando a uma falha respiratória aguda e anormalidades na hemodinâmica do paciente, similarmente ao que ocorre no choque séptico (Montoya; Liesenfeld, 2004).

É também válido citar que *T. gondii* já foi associado a uma série de doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, como a esquizofrenia, o transtorno obsessivo compulsivo, o transtorno bipolar, a doença de Alzheimer, epilepsia, sendo que nem todos foram confirmados (Milne; Webster; Walker, 2020). Essas associações são, provavelmente, devidas a uma série de mecanismos, relacionados à desregulação de neurotransmissores e endócrina, além da própria forma de interação do sistema imune do hospedeiro com o parasita (Milne; Webster; Walker, 2020).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

As taxas de infecção por *T. gondii* em gatos refletem o nível de infecção em populações de aves e roedores locais, uma vez que, gatos podem se contaminar pela ingestão desses animais (Hill; Dubey, 2002). Isso também é notado no caso de alguns carnívoros selvagens, como alguns canídeos, uma vez que muitos deles podem atuar como hospedeiros sentinelas para a infecção por esse parasita (Dubey *et al.*, 2021). Sendo assim, as informações acerca da infecção desses animais por *T. gondii*, são relevantes no âmbito clínico, epidemiológico e ecológico (Dubey *et al.*, 2021). Além disso, foi observado que a soropositividade no caso desses animais, varia muito de acordo com o tamanho da amostra, da localização em que o animal estava, do método utilizado para o diagnóstico e varia também de acordo com o objetivo da coleta da amostra, se elas foram coletadas como uma forma de monitoração epidemiológica previamente pensada ou não (Dubey *et al.*, 2021). Uma forma de vigilância epidemiológica seria por meio da detecção de oocistos em fezes de gatos, no entanto, essa não é a melhor forma, uma vez que não é prático, sendo assim a detecção de prevalência sorológica é uma opção melhor nesses casos (Hill; Dubey, 2002). Uma vez que se presume que, gatos soropositivos já eliminaram oocistos de *T. gondii* em algum momento da vida (Hill; Dubey, 2002).

Além disso, foi identificado em um estudo de revisão sistemática com metanálise e análise de modelagem que o Brasil, em termos de prevalência predita é o terceiro país com maior soroprevalência de IgG para *T. gondii* em mulheres gestantes, com cerca de 53,8% (Bigna *et al.*, 2020). O mesmo estudo mostrou que os países com maiores valores estão nas regiões da OMS da África e do Mediterrâneo Oriental (Bigna *et al.*, 2020). A prevalência da doença varia muito de lugar para lugar, sendo que as estimativas de soroprevalência podem variar mesmo dentro de regiões de um mesmo país e isso tende a estar correlacionado aos hábitos de dieta e

de higiene da população local (Hill; Dubey, 2002; Montoya; Liesenfeld, 2004; Bigna *et al.*, 2020). Isso leva a se pensar, que a principal via de infecção é a oral (Montoya; Liesenfeld, 2004), por meio do consumo de carne crua ou mau cozida ou consumo de vegetais e frutas não lavadas ou contato com as fezes de gatos (Bigna *et al.*, 2020). Um exemplo disso, é o caso da França, em que a prevalência de anticorpos contra *T. gondii* em humanos é muito alta, e isso parece estar associado em parte ao hábito de consumo de alguns produtos cárneos crus ou mau cozidos (Hill; Dubey, 2002).

Não foi notada diferença entre soroprevalência entre sexos diferentes, mas foi visto que ela aumenta com a idade (Montoya; Liesenfeld, 2004). E ainda, foi mostrado que a soroprevalência é menor em regiões frias, quentes e áreas áridas ou de alta altitude (Montoya; Liesenfeld, 2004). Além disso, foi percebido que uma maior população rural aumenta a soropositividade na região, visto que, no geral, foi visto a menor adesão a medidas preventivas dessa parcela da população (Gao *et al.*, 2012; Bigna *et al.*, 2020).

#### 2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii*

Após a digestão de parede de cistos teciduais ou oocistos, *T. gondii* infecta enterócitos, o que serve de gatilho para o recrutamento e ativação de células imunes inatas, como monócitos e células dendríticas, que então, podem ser infectadas pelo parasita (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2020). A infecção por taquizoítos induzem forte resposta imune inata, com a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que leva à ativação da resposta imune adaptativa por células T e B (Sasai; Pradipta; Yamamoto, 2018). Monócitos infectados são induzidos à uma migração exagerada, levando a alterações do citoesqueleto de actina, regulação positiva do receptor de quimiocina CCR5 e ativação da sinalização do receptor de GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) (Fuks *et al.*, 2012; Weidner *et al.*, 2013; Wohlfert; Blader; Wilson, 2017). A ativação da imunidade adaptativa estimula ainda mais a resposta imune celular autônoma em células infectadas para interromper a multiplicação do protozoário nessas células, ajudando a diminuir sua proliferação no hospedeiro, no entanto isso induz a conversão de taquizoítos em bradizoítos, o que, eventualmente leva à uma infecção crônica (Sasai; Pradipta; Yamamoto, 2018). Além disso, com a infecção, as células do sistema imunológico presentes no intestino delgado, como as células linfóides inatas, são estimulados à produção de inúmeras substâncias, como citocinas, sendo as principais, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), além de fatores de transcrição e quimiocinas, sendo as principais CCL2 e CXCL2 (Sasai; Pradipta; Yamamoto, 2018). Essa resposta imune trabalha de forma efetiva

em infecção aguda, no entanto, ela também contribui para a manutenção da latência do parasita (Beumer *et al.*, 2012). Além disso, foi visto que quando os monócitos e células dendríticas estão infectadas e ativadas simultaneamente, as células Th1 são estimuladas como parte da resposta imune adaptativa (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2020). Camundongos C57BL/6 são muito suscetíveis a infecção por *T. gondii*, sendo que esses animais infectados por via oral, apresentam uma resposta intestinal exacerbada levando a lesões teciduais. Sendo que a patologia no intestino na toxoplasmose é mediada por uma potente resposta celular do tipo Th1, que ocorre principalmente pelo aumento de células T CD4<sup>+</sup> e pela produção exacerbada de IFN $\gamma$ , TNF e óxido nítrico (Liesenfeld *et al.*, 1996, 1999). Assim o controle da toxoplasmose aguda é feito principalmente pela produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , que são gerados na resposta inata e adaptativa do sistema imune (Ibrahim *et al.*, 2014).

Além das células já citadas, vários outros tipos celulares estão envolvidos na infecção por *T. gondii*, sendo os neutrófilos e monócitos inflamatórios células importantes para o controle dessa infecção (Sasai; Pradipta; Yamamoto, 2018). Esses leucócitos são induzidos a migrar ao intestino (sítio de infecção) pela presença de quimiocinas, como CCL2 e CXCL2, produzidas por células apresentadoras de antígeno, uma vez que essas reconhecem a presença do patógeno (Sasai; Pradipta; Yamamoto, 2018). No cérebro há a barreira hematoencefálica, composta por células endoteliais, com maior número de junções oclusivas e uma membrana basal, além de células de astrócitos ao redor (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2020). Essa barreira dificulta a passagem de patógenos do sangue para o parênquima cerebral e existem várias hipóteses para tentar explicar o mecanismo de como esse parasita consegue realizar tal feito (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2020). Com as células do sistema imune ativadas e a migração rápida para o cérebro por meio do sangue, elas conseguem comprometer o funcionamento da barreira hematoencefálica facilitando a passagem dessas células (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2020). Além disso, já foi visto que alguns taquizoítos conseguem evadir do sistema imune e chegar até o cérebro por meio de transcitose (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2020).

## 2.5 RECEPTOR CCR5

O receptor de quimiocinas CCR5 (receptor de quimiocinas cisteína-cisteína 5), associado à resposta Th1, é expresso em vários tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas, células NK, células NKT e células T (Aliberti *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2009; Ibrahim *et al.*, 2010). Durante processos inflamatórios, como no caso da toxoplasmose, ocorre uma grande expressão de ligantes de CCR5, sendo que as principais quimiocinas ligantes desse

receptor são CCL3, CCL4 e CCL5 (RANTES), que possuem importante papel durante o recrutamento de células para o local da inflamação (Loetscher *et al.*, 1998; Appay, Rowland-Jones, 2001). Apesar de haver expressão de CCR5 durante a infecção experimental por *T. gondii* (Bonfá *et al.*, 2014), seu papel na imunopatologia da doença ainda não é muito bem definido. Estudos demonstraram que animais deficientes para esse receptor são mais suscetíveis à infecção por *T. gondii* e apresentam maior carga parasitária, além de maiores extensões de injúrias teciduais nos sítios alvo de infecção pelo protozoário, mostrando esse receptor como essencial para a manutenção da homeostasia do hospedeiro durante a infecção pelo parasita (Bonfá *et al.*, 2014). Essa maior susceptibilidade dos animais deficientes para CCR5 se deve às injúrias intestinais causadas na ausência desse receptor (Bonfá *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado que o CCR5 é essencial no controle da infecção por *T. gondii* e para manter a integridade metabólica, hepática e intestinal (Bonfá *et al.*, 2014). A ligação em receptores CCR5 geram sinais para indução da produção de IL-12 por células CD8α+, que, como já foi dito anteriormente, é uma forma importante de se estabelecer resistência a *T. gondii* dependente de IFN-γ (Aliberti *et al.*, 2000). Isso é importante pois a IL-12 direciona o desenvolvimento seletivo de um tipo de linfócito T de resposta Th1 e resposta celular imune a agentes infecciosos (Aliberti *et al.*, 2000). Uma proteína produzida pelo parasita chamada de ciclofilina-18 (TgCyp18) também pode se ligar ao CCR5, de forma a induzir a ativação de células apresentadoras de antígeno após consequente produção de IL-12, além de induzir a migração de linfócitos CD8+ para a região intraepitelial do intestino delgado, o que pode ser essencial para o controle da resposta inflamatória exacerbada induzida pelo parasita por meio da produção de TGF-β (Buzoni-Gatel *et al.*, 2001; Aliberti *et al.*, 2003; Luangsay *et al.*, 2003). Já foi relatado que uma forma recombinante da ciclofilina-18 consegue otimizar a expressão de RANTES em macrófagos, de forma a controlar a migração dessas células (Ibrahim *et al.*, 2010, 2014). No estudo de Ibrahim *et al.* (2014) foi visto que existem várias formas de *T. gondii* completar seu ciclo de infecção, sendo que uma dessas formas é dependente de CCR5, e outras envolvem a produção de quimiocinas mediadas pela ciclofilina-18 de uma maneira independente de CCR5.

### 3 JUSTIFICATIVA

*Toxoplasma gondii* é um dos parasitas mais bem estudados no mundo, uma vez que ele apresenta grande importância para a medicina humana e veterinária (Dubey, 2010), podendo infectar, teoricamente, qualquer animal de sangue quente, como animais de produção, o ser humano e mamíferos marinhos (Dubey, 2010). Sua importância no âmbito da medicina veterinária está principalmente relacionada ao fato de se tratar de uma zoonose, que pode ser transmitida aos seres humanos por meio da carne de animais infectados (Munoz-Zanzi *et al.*, 2010). E, também, às perdas econômicas trazidas por esse parasita, uma vez que, é responsável por causar problemas reprodutivos em várias espécies domésticas, como as ovelhas e as cabras, além de se mostrar como um problema para animais silvestres, sendo letais para algumas espécies (Fernández-Escobar *et al.*, 2022).

Como foi dito anteriormente, muitos estudos têm associado a infecção latente por *T. gondii* a várias condições neuropsiquiátricas e comportamentais (Flegr, 2013a, 2013b). Sendo que alguns desses estudos estimam que essa infecção pode estar relacionada a aproximadamente 17% de acidentes de trânsito e 10% das tentativas de suicídio (Sutterland *et al.*, 2019). Dessa forma, é percebido que muito provavelmente os impactos desse parasita nas populações globais são muito maiores do que o imaginado anteriormente, não estando relacionado apenas à toxoplasmose congênita, ou à infecção aguda em imunocomprometidos (Milne; Webster; Walker, 2020).

Já foi mostrado que em infecções agudas, o receptor para quimiocinas CCR5 é muito importante para que ocorra a resposta imunológica adequada (Bonfá *et al.*, 2014). Diante de tal cenário, se vê a necessidade do estudo da atuação desse receptor em algumas etapas da resposta imunológica no camundongo, procurando entender os mecanismos e alterações histológicas associadas a esse parasita, para se ter uma visão melhor do que ele causa às populações de alguns tipos celulares no intestino delgado e entender qual importância o receptor CCR5 pode exercer nesse contexto.

#### **4      OBJETIVO**

Esse trabalho tem como objetivo detectar alterações morfológicas na mucosa do intestino delgado na fase aguda da infecção, sítio de entrada do parasita e verificar o papel de CCR5 nesse processo.

## 5 METODOLOGIA

Camundongos, C57BL/6 (controles) e CCR5<sup>-/-</sup> (geneticamente deficientes em CCR5). foram infectados por via oral com 5 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Esses animais foram obtidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR), da Universidade Federal de Uberlândia-UFU, mantidos em condições livres de patógenos específicos. Os animais foram mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C), em ciclos de 12 horas luz/escuro e com água filtrada e ração *ad libitum*. O protocolo para utilização dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da UFU (CEUA 055/17). Para a realização dos experimentos, os camundongos C57BL/6 e CCR5<sup>-/-</sup> foram divididos em grupos para realização de protocolos experimentais diferentes e, ainda, parte dos animais foram utilizados para análise da taxa de sobrevivência e parte foi eutanasiada para coleta de material. Os animais foram pesados duas vezes por semana e esse peso foi computado, além disso, foram avaliados diariamente os escores de morbidade (Bartley *et al.*, 2006) e a sobrevivência até o dia 80 após a infecção. A parte dos animais que foram submetidas à eutanásia, aos 5 e 7 dias de infecção foram anestesiados pela via intraperitoneal com a combinação de Cetamina (Syntec Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil) e Xilazina (Schering-Plough Coopers, Cotia, SP, Brasil) e, então, eutanasiados por deslocamento cervical e o intestino delgado foi coletado e fixado em formol 10% para posterior análise histológica e de parasitismo intestinal. Grupos de animais C57BL/6 e CCR5<sup>-/-</sup> não infectados também foram avaliados da mesma forma. O material foi incluído em parafina, e então, os blocos foram cortados em micrótomo *Leica* RM2125 RTS (*Leica* Biosystems Pathology Imaging, Nussloch – Alemanha) e os cortes histológicos corados para análise histológica. Foram feitas quantificações das alterações histológicas, quantificação de células de Paneth e de linfócitos intraepiteliais por coloração por Hematoxilina & Eosina, a quantificação de células caliciformes por coloração por Alcian blue (pH 1,0) e a quantificação de mastócitos por coloração por Azul de Toluidina. Após as colorações as células foram quantificadas nos cortes teciduais corados. O parasitismo tecidual foi avaliado por imuno-histoquímica.

Para as análises realizadas em amostras de intestino delgado de animais agudamente infectados, eles foram dispostos em “rolos” separados em quatro regiões distintas, duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Além disso, cada rolo foi dividido em quatro quadrantes e cada análise foi feita de uma forma. Para a análise dos linfócitos intraepiteliais, esses foram quantificados em 12 vilosidades por quadrante, totalizando 48 vilosidades por rolo, portanto, para cada porção do intestino delgado, sendo contabilizadas as células de 192 vilosidades por

animal. De forma que se pode visualizar a individualização dos resultados de cada região do intestino delgado. As células de Paneth, foram quantificadas em 12 campos (aumento de 40x) em cada quadrante, contabilizando a quantidade de criptas em cada campo, além de células de Paneth, assim, foram contados 48 campos por rolo, portanto para cada porção do intestino delgado e 192 campos por animal. As células caliciformes foram contabilizadas da mesma forma que as de Paneth. As análises de linfócitos intraepiteliais, mastócitos e células caliciformes foram realizadas no software *Aperio Image Scope* 12.4.5.5003 (Leica Biosystems Pathology Imaging, Nussloch – Alemanha) por meio de lâminas escaneadas no aparelho *Aperio Scanscope AT Turbo* (Leica Biosystems Pathology Imaging, Nussloch – Alemanha), enquanto as análises de células de Paneth foram realizadas em microscópio óptico e posteriormente os dados foram dispostos em uma planilha do *Excel*. Posteriormente, foi feita a montagem de gráficos e realização de testes estatísticos no programa *GraphPad Prism* 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego – CA, EUA) e interpretação dos resultados.

Para a interpretação dos gráficos de todas as análises com os resultados vamos considerar os grupos determinados da seguinte forma: C57BL/6 NI como o grupo não deficiente para CCR5 não infectado, C57BL/6 5 DPI, como o grupo não deficiente para CCR5 com 5 dias de infecção, C57BL/6 7 DPI, como o grupo não deficiente para CCR5 com 7 dias de infecção, CCR5<sup>-/-</sup> NI como o grupo geneticamente deficiente para CCR5 não infectado, CCR5<sup>-/-</sup> 5 DPI como o grupo geneticamente deficiente para CCR5 com 5 dias de infecção e CCR5<sup>-/-</sup> 7 DPI como o grupo geneticamente deficiente para CCR5 com 7 dias de infecção.

## 5.1 AVALIAÇÃO DO ESCORE DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL

A análise histológica do intestino delgado, foi feita baseada no trabalho de Benevides *et al.* (2013), em lâminas coradas por Hematoxilina & Eosina, no aumento de 10 x. Nessa avaliação, as lesões inflamatórias foram graduadas de acordo com a presença e extensão de infiltrados inflamatórios na lâmina própria e submucosa, alargamento das vilosidades e aumento em sua espessura, assim como presença de necrose em toda a secção tecidual. Os escores inflamatórios foram representados como unidades arbitrárias, sendo classificados em suave (0-2), moderado (2-4), grave (4-6) e muito grave (acima de 6).

## 5.2 AVALIAÇÃO DO PARASITISMO TECIDUAL

O parasitismo tecidual foi avaliado por imuno-histoquímica. Os cortes teciduais desparafinizados, foram incubados com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% para bloqueio da

peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito em tampão citrato, pH 6,0, em forno micro-ondas durante 7 minutos e os sítios não específicos bloqueados pela incubação dos cortes com leite desnatado 0,3% por 30 minutos (Molico; Nestlé Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Feito isso, os cortes foram incubados com 0,1% de Triton X-100 em citrato de sódio 0,1% por 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados durante a noite toda, com anticorpo primário produzido em coelho Anti-*T. gondii* (*Termofisher*) diluído em PBS contendo saponina 0,01%. Como anticorpo secundário, foi utilizado imunoglobulina G (IgG) de cabra anti-IgG de coelho biotinilado (Sigma). 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 contracorados com Hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula e examinados em microscópio de luz. O parasitismo tecidual foi avaliado contando-se o número de vacúolos parasitóforos e cistos presentes em toda a secção tecidual de cada órgão, utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento.

### 5.3 QUANTIFICAÇÕES DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE CÉLULAS DE PANETH E DE LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS

Para as quantificações das alterações histológicas de Paneth e de Linfócitos intraepiteliais, foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina. Foi feita a desparafinização dos cortes histológicos, que consiste na passagem das lâminas por três recipientes com xitol, mantendo em cada um deles por 15 minutos. A cada etapa foi retirado o excesso da solução anterior para que as lâminas fossem colocadas na seguinte. Realização da hidratação dos cortes histológicos por meio de uma bateria decrescente de álcoois, mantendo 1 minuto em cada álcool, sendo que os três primeiros são álcoois absolutos, seguidos de álcoois à 95%, 85% e 70%. Passado em água corrente por 10 minutos e água destilada por 5 minutos. Foi retirado o excesso da água e submergida as lâminas em Hematoxilina de Harris (filtrada previamente) por 30 segundos a 2 minutos, a depender do tempo de uso do corante. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e água destilada por 5 minutos. Logo após as lâminas foram coradas por Eosina-Floxina por 1 minutos e meio à 2 minutos, a depender do tempo de uso do corante, mergulhadas 4 vezes em água corrente para retirar o excesso do corante, e em seguida foi realizada a desidratação dos cortes histológicos por meio de uma bateria crescente de álcoois, passando 10 segundos em cada um, sendo eles em sequência, 70%, 85%, 95%, e três álcoois absolutos. Retirado o excesso de álcool, foi realizada a diafanização dos cortes, passando por

três xilóis, por 10 minutos cada, e em seguida realizada a montagem das lâminas com lamínulas e Entellan ou Goma de Dammar.

#### 5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CALICIFORMES

Para isso, foi realizada coloração por Alcian Blue em pH 1,0, assim, foi feita a desparafinização dos cortes histológicos, que consiste na passagem das lâminas por três recipientes com xilol, mantendo em cada um deles por 15 minutos. A cada etapa foi retirado o excesso da solução anterior para que as lâminas fossem colocadas na seguinte. Na sequência foi feita a hidratação dos cortes histológicos por meio de uma bateria decrescente de álcoois, mantendo 1 minuto em cada álcool, sendo que os três primeiros são álcoois absolutos, seguidos de álcoois à 95%, 85% e 70%. Passado em água corrente por 10 minutos e água destilada por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram tratadas por ácido glacial a 3% durante 7 minutos. Passadas pelo corante Alcian Blue (previamente filtrado) a 1% por 4 horas à 45°C. Em seguida, foram realizadas mais duas passagens por água destilada, 1 minutos em cada uma. Corados com Eosina-Floxina por 30 a 50 segundos, realizadas mais duas passagens por água destilada, 1 minuto em cada, a desidratação em uma bateria de álcoois de concentrações crescentes mantendo 10 segundos em cada álcool, sendo sequencialmente à 70%, 85%, 95% e três álcoois absolutos. Realizada a diafanização na bateria de xilóis, mantendo 10 minutos em cada xilol, sendo três no total. Ao fim, foi realizada a montagem das lâminas com lamínulas usando goma de Dammar.

#### 5.5 QUANTIFICAÇÃO TECIDUAL DE MASTÓCITOS

Para a quantificação tecidual de mastócitos, foi realizada a coloração por Azul de Toluidina. O processo se iniciou com a desparafinização dos cortes histológicos, que consiste na passagem das lâminas por três recipientes com xilol durante 15 minutos cada. A cada etapa foi retirado o excesso da solução anterior para que as lâminas fossem colocadas na seguinte. Na sequência foi feita a hidratação dos cortes histológicos por meio de uma bateria decrescente de álcoois, mantendo 1 minuto em cada álcool, sendo que os três primeiros são álcoois absolutos, seguidos de álcoois à 95%, 85% e 70%. Passado em água corrente por 10 minutos e água destilada por 5 minutos. As lâminas foram submersas em tampão fosfato-citrato em pH 3,0 por 5 minutos, e em seguida foram mergulhadas por 3 minutos no Azul de Toluidina 0,5% em tampão fosfato citrato pH 3,0. Foram lavadas em tampão fosfato-citrato em pH 3,0, realizada a desidratação dos cortes histológicos por meio de uma bateria crescente de álcoois, passando 10 segundos em cada um, sendo eles em sequência, 70%, 85%, 95%, e três álcoois absolutos. E a diafanização

dos cortes foi feita, passando por três xilóis, por 10 minutos cada, seguida da montagem das lâminas com lamínulas com Goma de Dammar.

### 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

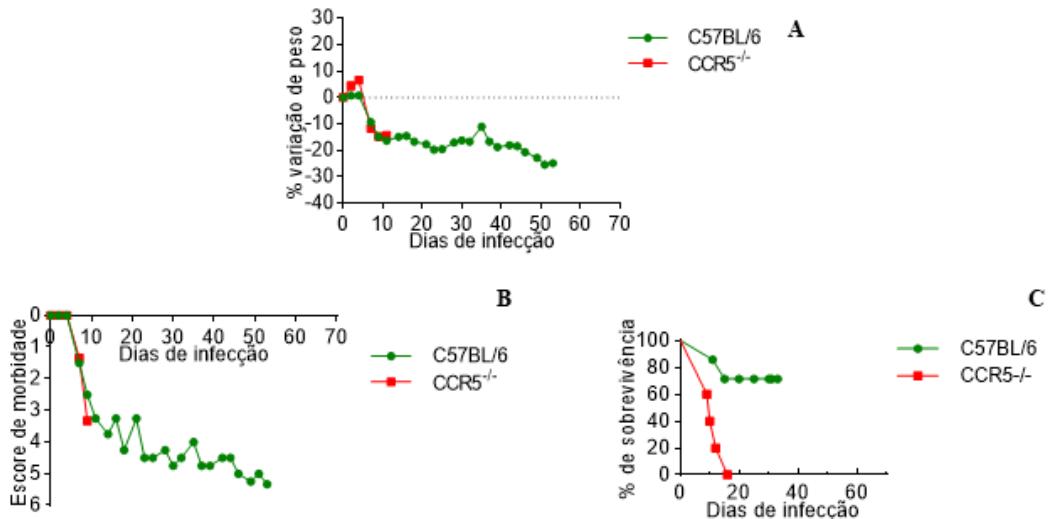
Para realização de análise estatística foi utilizado o programa *GraphPad Prism 8.0.1* (GraphPad Software, Inc., San Diego – CA, EUA), de forma que os valores de cada análise foram submetidos à testes de normalidade. Para comparações múltiplas entre mais de dois grupos foi usado o teste *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Sidak, ou teste de Kruskal-Wallis com o teste de múltiplas comparações de Dunn para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A taxa de sobrevivência foi analisada pelo teste do Chi-quadrado; a perda de peso e o escore de morbidade foram analisados pelo teste *Two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de já ter sido observado que camundongos geneticamente deficientes para CCR5 conseguem controlar certas infecções, como a tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), a listeriose (*Listeria monocytogenes*) e a diminuir a incidência de malária cerebral (*Plasmodium berghei* ANKA), já foi visto também a maior susceptibilidade desses animais ao *T. gondii* (Beloua *et al.*, 2003; Scott Algood *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2004; Bonfá *et al.* 2014). De forma que esses animais apresentam maior carga parasitária e número de lesões em tecidos alvos desse parasita, havendo menor integridade intestinal, por exemplo, o que causa essa maior susceptibilidade (Bonfá *et al.*, 2014). Além disso, foi também verificado um aumento de expressão de CCR5 e de seus ligantes no íleo de animais controles infectados (Bonfá *et al.*, 2014).

Os animais C57BL/6 e CCR5<sup>-/-</sup> apresentaram perda de peso e um aumento do escore de morbidade quando infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* por via oral (FIG. 3 A e B). Os animais CCR5<sup>-/-</sup> foram mais suscetíveis que os controles C57BL/6 quando infectados, apresentando 100% de mortalidade aos 16 dias de infecção (FIG. 3C). Resultados similares foram obtidos por Bonfá *et al.* (2014) que notaram uma mortalidade de 100% dos animais deficientes para CCR5 infectados após 16 dias de infecção, enquanto 70% dos animais infectados C57BL/6 sobreviveram até o dia 30 de infecção. Similar a esses resultados, Benevides *et al.* (2013), também notaram maior susceptibilidade nos animais geneticamente deficientes ao CCR5 infectados com 100 cistos de *T. gondii* ME-49, quando comparados aos animais controles, de forma que por volta do dia 7 após a infecção os animais geneticamente deficientes para CCR5 começaram a morrer, e todos morreram até o dia 11.

Figura 3 – Comparação de parâmetros de morbidade e sobrevivência entre camundongos C57BL/6 e CCR5<sup>-/-</sup> infectados por *T. gondii*.

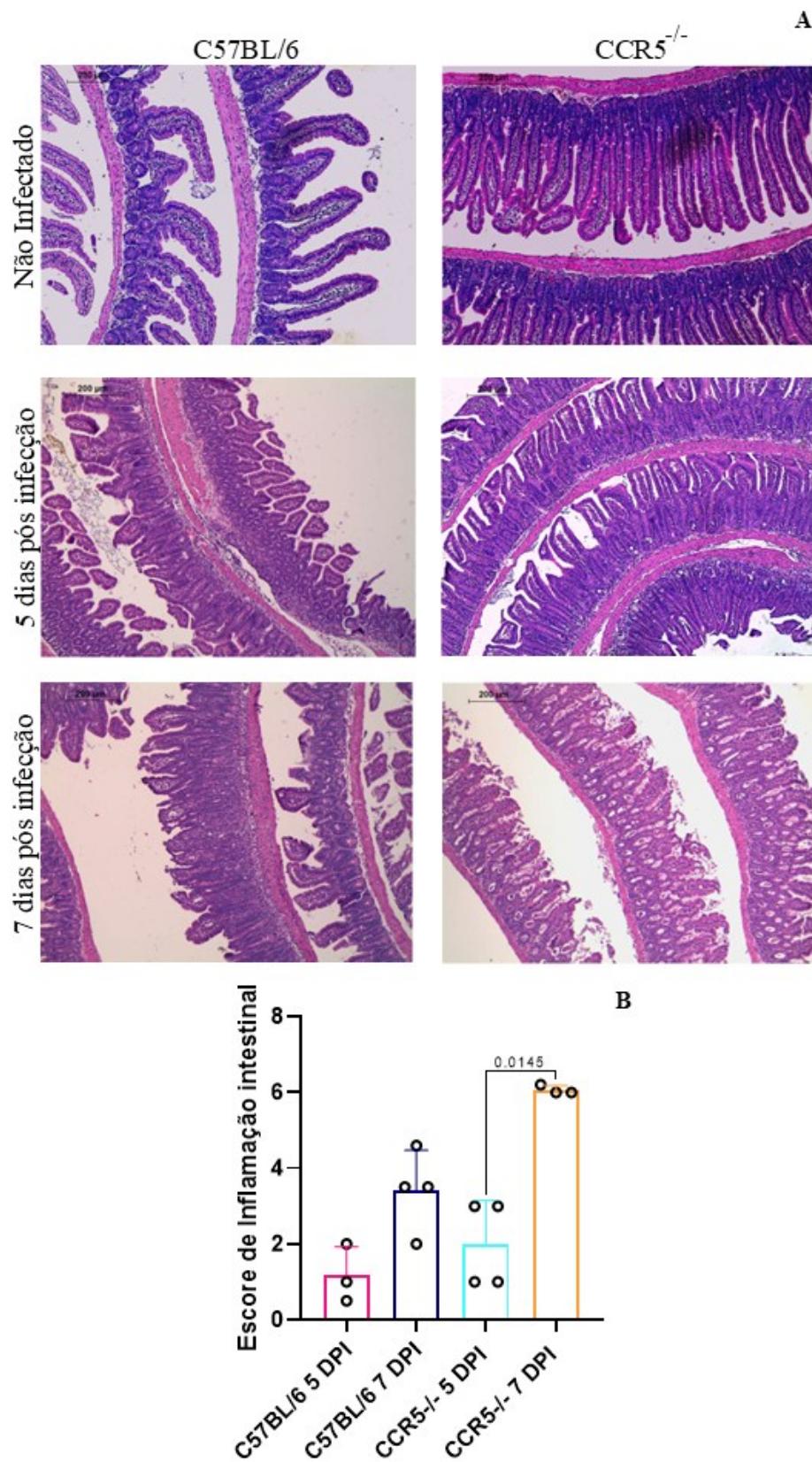


Fonte: A autora.

A, Porcentagem de variação de peso diário dos animais, uma comparação entre os dois grupos. B, Variação de escore de morbidade diário dos animais, uma comparação entre os dois grupos. C, Taxa de sobrevivência dos animais infectados dos dois grupos. A taxa de sobrevivência foi analisada pelo teste do Chi-quadrado; a perda de peso e o escore de morbidade foram analisados pelo teste *Two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

Em relação às alterações histológicas intestinais, camundongos de ambas as linhagens apresentaram alterações inflamatórias suaves no intestino delgado aos 5 dias de infecção (FIG. 4). No entanto, aos 7 dias de infecção, camundongos C57BL/6 infectados com 5 cistos de *T. gondii* apresentaram infiltrados inflamatórios na lámina própria (LP) e na submucosa. Em algumas áreas, observamos encurtamento e perda da arquitetura das vilosidades (FIG. 4A). Os animais CCR5<sup>-/-</sup> apresentaram lesões mais graves no intestino delgado, com infiltrados inflamatórios intensos na LP e submucosa, com perda da arquitetura das vilosidades e necrose em diversas localidades. Essas lesões foram observadas majoritariamente no jejun e íleo (FIG. 4A e B). De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, Bonfá *et al.* (2014) também observaram lesões intestinais semelhantes aos obtidos no presente trabalho, quando os animais foram infectados com 5 cistos de *T. gondii*, ME-49 e avaliados aos 7 dias de infecção.

Figura 4 – Alterações inflamatórias no intestino delgado de camundongos C57BL/6 e CCR5<sup>-/-</sup> infectados com 5 cistos de *T. gondii* por via oral.



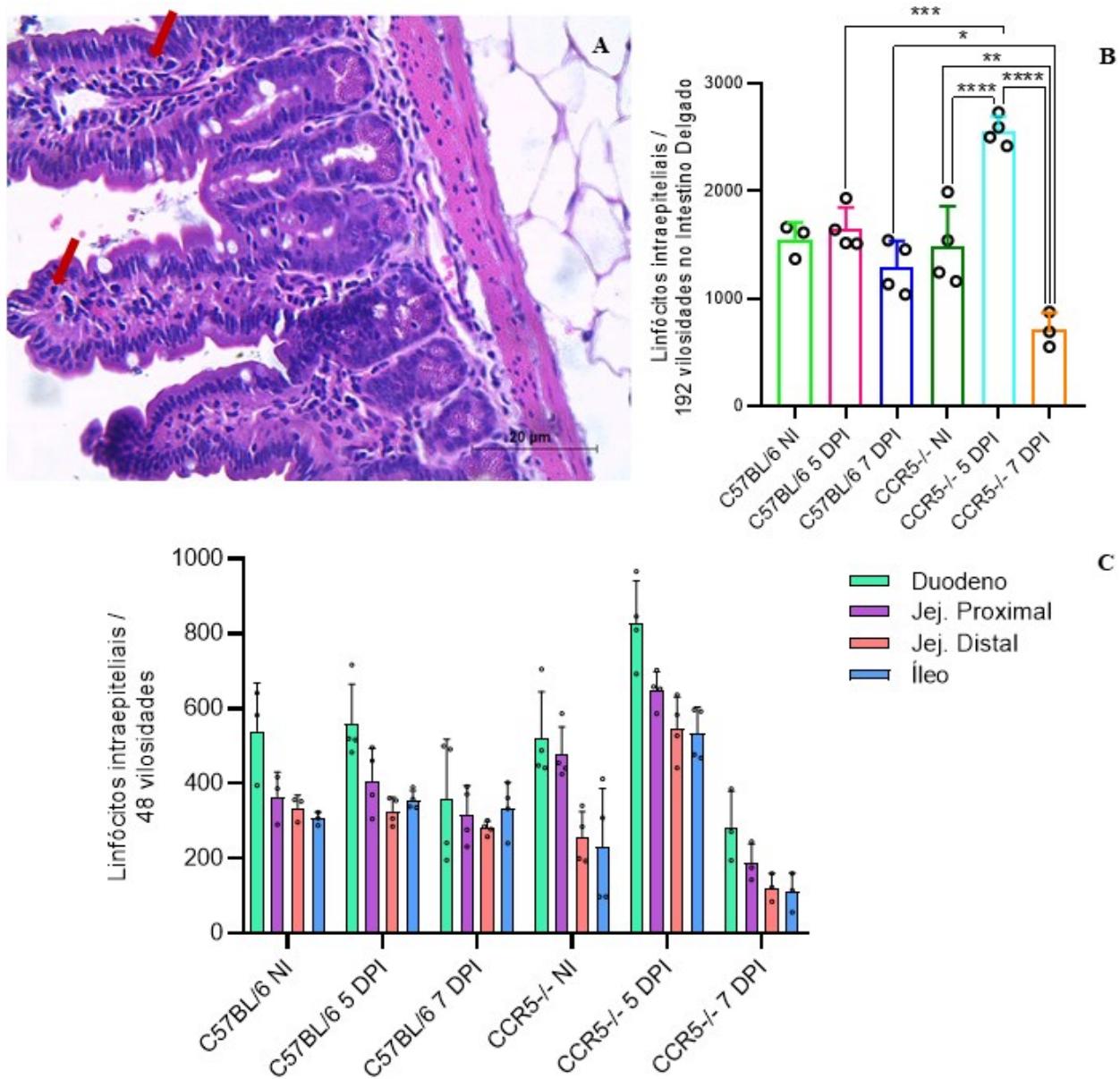
Fonte: A autora.

A, Fotomicrografias de intestino delgado de diferentes grupos de camundongos demonstrando as alterações inflamatórias induzidas pela infecção oral com 5 cistos de *T. gondii*, coloração por Hematoxilina & Eosina, Objetiva de 10X. B, Escore de inflamação do intestino delgado comparando os diferentes grupos de animais infectados. Os dados são representativos de 3 a 4 animais por grupo, e estão apresentados como a média

de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis foi usado para análise estatística. \*  $p < 0,05$ .

Na sequência, a infiltração de linfócitos intraepiteliais foi quantificada no intestino delgado de animais de ambas as linhagens infectados com *T. gondii*. Os animais C57BL/6 não apresentaram alteração na quantidade de linfócitos intraepiteliais aos 5 ou 7 dias de infecção em relação aos animais da mesma linhagem não infectados (FIG. 5B). No entanto, os animais CCR5<sup>-/-</sup> apresentaram um aumento desses linfócitos aos 5 dias de infecção e grande diminuição aos 7 dias de infecção (FIG. 5B). O duodeno foi a porção intestinal que apresentou maiores quantidades dessas células, independente da linhagem de camundongos (FIG. 5C). Assim como foi visto no presente trabalho (FIG. 5B), Luangsay *et al.* (2003) observaram diminuição dos linfócitos intraepiteliais ao se comparar animais controles infectados com o grupo de animais geneticamente deficiente para CCR5 infectados. Além disso, Luangsay *et al.* (2003) enfatizaram a importância do papel desse receptor como um componente na migração de linfócitos intraepiteliais T CD8<sup>+</sup> e na regulação da resposta inflamatória ao parasita e chegaram a conclusões que sugerem que o CCR5 determina o tipo de linfócito intraepitelial que migra para o intestino delgado, exercendo um importante papel no controle da infiltração celular no processo inflamatório da lâmina própria. Ademais, Ibrahim *et al.* (2014) e Khan *et al.* (2006) observaram que o CCR5 também tem um papel na migração de células NK e que sem a chegada dessas células, os tecidos de animais CCR5<sup>-/-</sup> apresentaram menor capacidade de gerar uma resposta inflamatória e havia maior carga parasitária. No presente trabalho esse pode ser o caso. Portanto, experimentos adicionais são necessários para se determinar o perfil e a cinética de linfócitos intraepiteliais que migraram aos 5 dias de infecção que não induziram proteção, comparando as mudanças nesses parâmetros entre 5 e 7 dias de infecção.

Figura 5 – Quantificação de linfócitos intraepiteliais, no intestino delgado de camundongos dos grupos analisados.



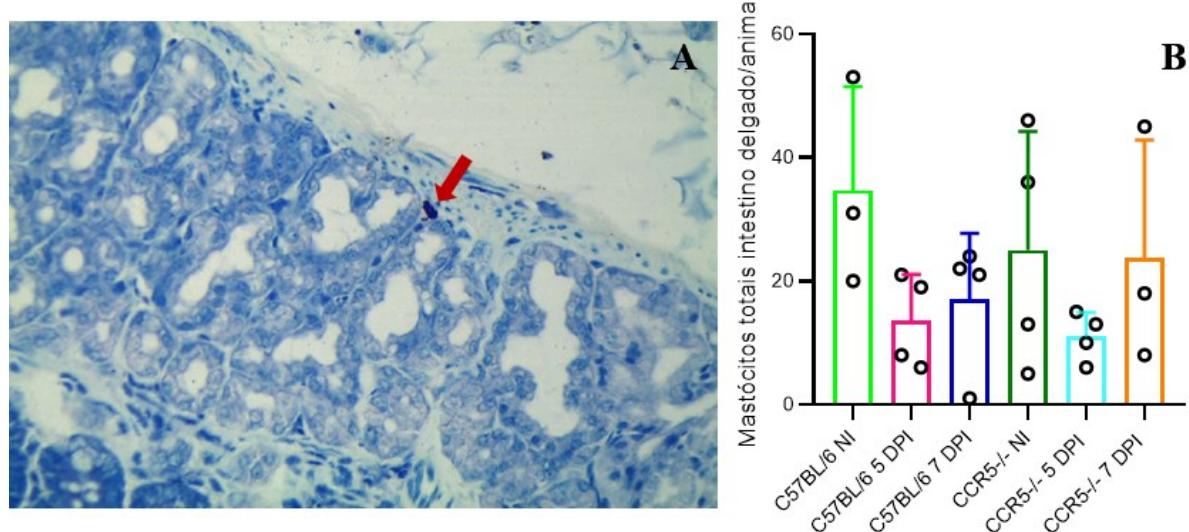
Fonte: A autora.

A, Vilosidades intestinais de intestino delgado de camundongo CCR5<sup>-/-</sup> infectado com *T. gondii* 5 dias após a infecção. As setas em vermelho apontam os linfócitos intraepiteliais. Coloração por Hematoxilina & Eosina. Objetiva de 40X. B, Quantificação de linfócitos intraepiteliais no intestino delgado como um todo comparando os resultados obtidos em cada grupo de animais. C, Quantificação de linfócitos intraepiteliais nas diferentes regiões do intestino delgado, comparando os valores de cada grupo. Os dados são representativos de 3 a 4 animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo ± erro padrão da média. One-way ANOVA foi usado para análise estatística. \*p < 0,05. \*\*p < 0,005. \*\*\*p < 0,0005. \*\*\*\*p < 0,0001.

Já foi observado por Cruz *et al.* (2014) que os mastócitos são importantes no estabelecimento de uma resposta Th1 rápida e eficiente, de forma que, na ausência dessas células, ocorre uma replicação descontrolada do parasita. Isso se deve, provavelmente, à ocorrência de uma secreção tardia de IL-12 e IFN- $\gamma$ , que são importantes para uma resposta imune eficaz e rápida a esse parasita (Cruz *et al.*, 2014). No presente trabalho verificamos que

o receptor CCR5 não estava envolvido migração, proliferação ou ativação de mastócitos intestinais, já que não se observou qualquer alteração no número dessas células em animais infectados ou não de ambas as linhagens (FIG. 6B).

Figura 6 – Quantificação de mastócitos, no intestino delgado de camundongos dos grupos analisados.



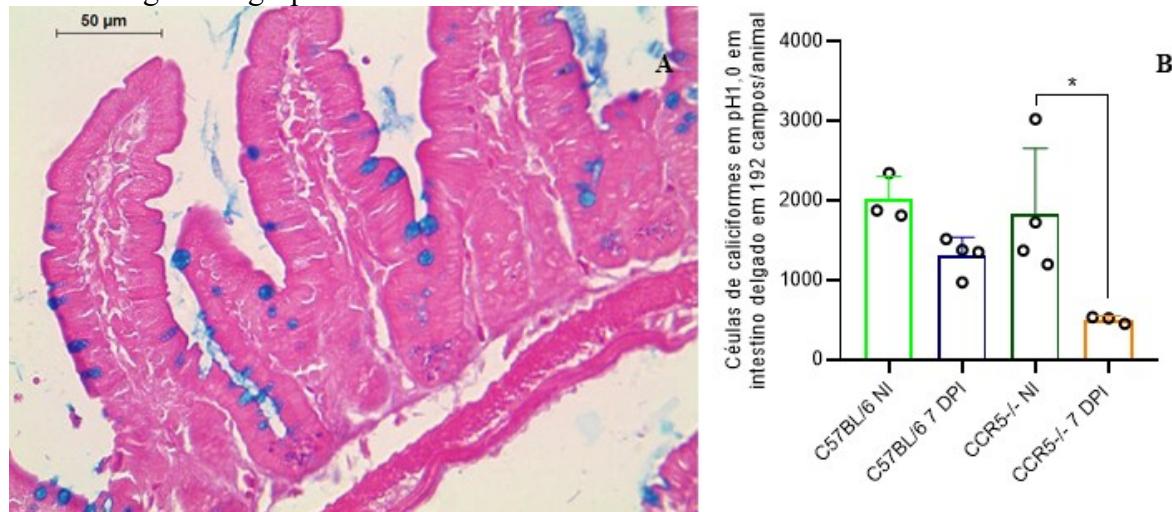
Fonte: A autora.

A, Base das vilosidades intestinais de intestino delgado de um camundongo infectado por *T. gondii*, 5 dias após a infecção. É possível observar a seta em vermelho apontando um mastócito. Coloração por Azul de Toluidina. Objetiva de 40X. B, Quantificação de mastócitos em intestino delgado nos diferentes grupos de animais do estudo. Os dados são representativos de 3 a 4 animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo ± erro padrão da média. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis foi usado para análise estatística, em que não ocorreu diferença estatística.

Células caliciformes são células intestinais responsáveis pela produção e pela liberação de mucinas, que formam um filme para lubrificar e proteger o epitélio intestinal (Miller *et al.*, 1987). No presente estudo, foi verificado que a infecção por *T. gondii* diminuiu o número dessas células positivas para sulfomucinas (Alcian blue pH 1,0) em animais de ambas as linhagens (FIG. 7B) e essa diminuição foi maior nos animais CCR5<sup>-/-</sup> infectados, apesar de não haver uma diferença estatística. De acordo com nossos resultados foi observado anteriormente por Miranda *et al.* (2021) e Nascimento *et al.* (2022) uma menor quantidade de células caliciformes no intestino delgado após 8 e 7 dias de infecção por *T. gondii* respectivamente. Briceno *et al.* (2022) observaram diminuição do número de células caliciformes positivas para sialomucinas (Alcian blue pH 2,5) em todos os segmentos do intestino delgado aos 7 dias de infecção. Portanto, a infecção por *T. gondii* induz uma diminuição de células caliciformes produzindo sialomucinas e sulfomucinas e essa diminuição foi ainda maior nos animais CCR5<sup>-/-</sup> aos 7 dias

de infecção coincidindo com maior patologia observada no órgão desses animais infectados em relação aos animais controles infectados.

Figura 7 – Quantificação de células caliciformes com sulfomucinas, no intestino delgado de camundongos dos grupos analisados.



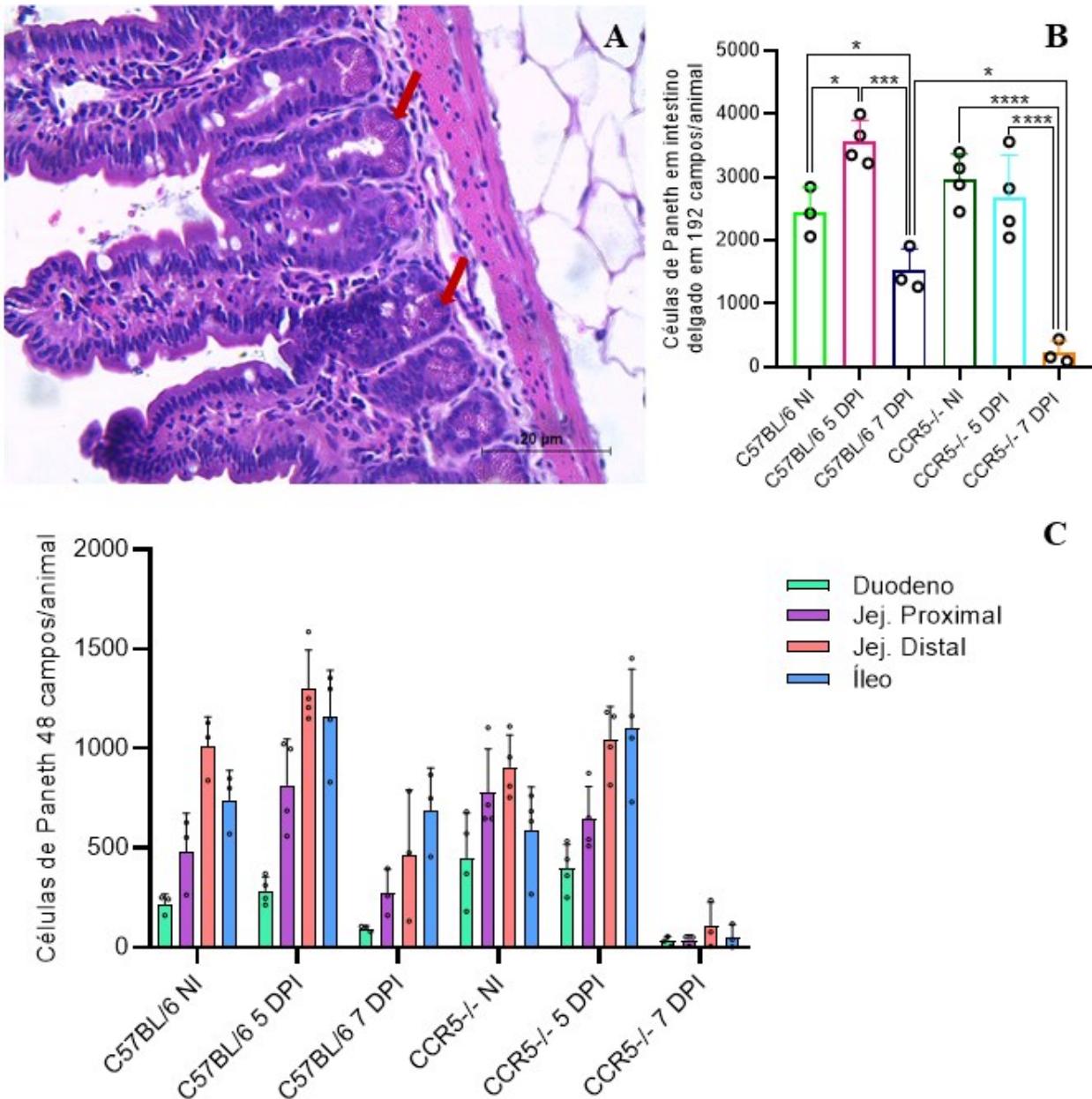
Fonte: A autora.

A, Intestino delgado de um camundongo deficiente geneticamente para o receptor CCR5 infectado por *T. gondii*, 7 dias após a infecção. É possível observar as sulfomucinas nas células caliciformes marcadas em azul no tecido. Alcian Blue em pH 1,0. Objetiva de 40X. B, Quantificação de células caliciformes em pH 1,0 em intestino delgado de animais dos grupos infectados. Os dados são representativos de 3 a 4 animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média. One-way ANOVA foi usado para análise estatística. \*  $p < 0,05$ .

As células de Paneth são células especializadas que ocorrem no intestino delgado e produzem moléculas antimicrobianas importantes para a manutenção da homeostase intestinal (Kurashima *et al.*, 2017). A forte resposta Th1 provocada pelo parasita leva a uma produção de IFN- $\gamma$ , provocando a morte de células de Paneth (Raetz *et al.*, 2013). Isso culmina na diminuição da secreção de peptídeos antimicrobianos, o que, consequentemente, leva ao desenvolvimento da disbiose, que aumenta o grau de alterações patológicas intestinais, observadas na infecção por *T. gondii* (Raetz *et al.*, 2013). Além disso, já foi visto também que, além de IFN- $\gamma$ , TNF também tem um papel importante relacionado a perda de células de Paneth (Raetz *et al.*, 2013; Burger *et al.*, 2018; Araujo *et al.*, 2022). No presente trabalho, observamos um aumento dessas células nos animais controles infectados aos 5 dias de infecção e uma diminuição de células de Paneth aos 7 dias de infecção em animais de ambas as linhagens e essa diminuição foi maior nos animais CCR5<sup>-/-</sup> (FIG. 8B). Resultados semelhantes foram observados por Araujo *et al.* (2021), Oliveira *et al.* (2020), Briceno *et al.* (2022) e Nascimento *et al.* (2022) em animais C57BL/6 infectados por via oral com 5 cistos de *T. gondii*. Esses resultados demonstram a

importância dessas células na proteção do epitélio intestinal em infecção oral por *T. gondii*, e o aumento dessas células aos 5 dias de infecção nos animais controles pode ter contribuído para os melhores resultados nesses animais.

Figura 8 – Quantificação de células de Paneth, no intestino delgado de camundongos dos grupos analisados.



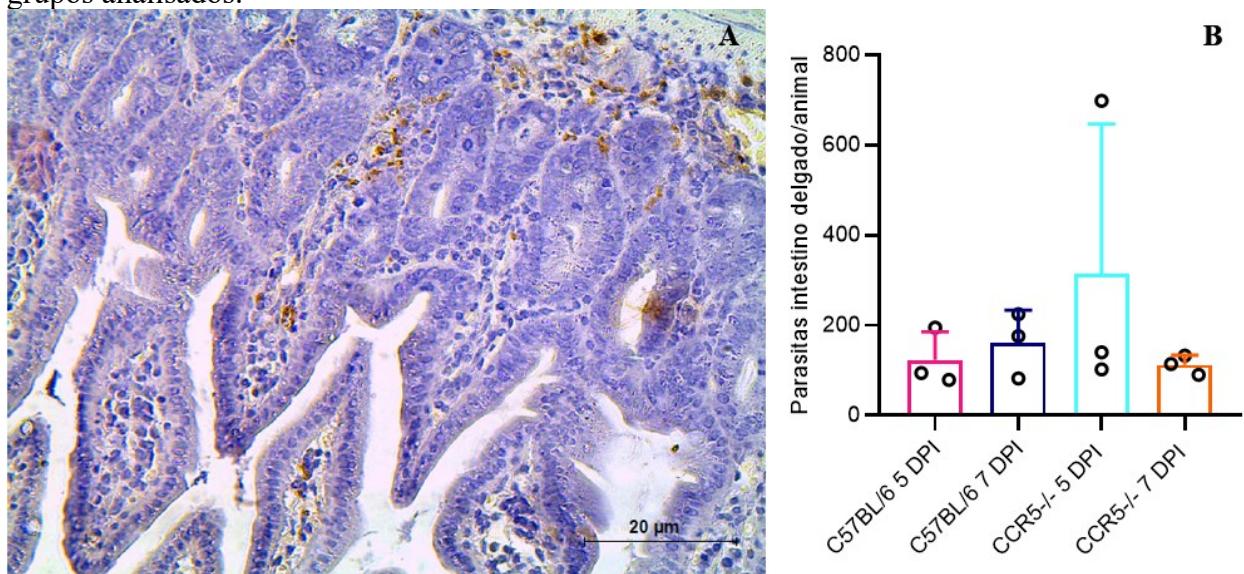
Fonte: A autora.

A, Vilosidades intestinais de intestino delgado de um camundongo geneticamente deficiente para CCR5 infectado por *T. gondii*, 5 dias após a infecção. É possível observar as setas em vermelho as setas apontando as células de Paneth. Coloração por Hematoxilina & Eosina. Objetiva de 40X. B, Quantificação de células de Paneth em intestino delgado como um todo comparando os resultados obtidos em cada grupo de animais. C, Quantificação de células de Paneth nas diferentes regiões do intestino delgado, comparando os valores de cada grupo. Os dados são representativos de 3 a 4 animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média. One-way ANOVA foi usado para análise estatística. \*  $p < 0,05$ . \*\*\*  $p < 0,0005$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Apesar de não haver diferença estatística entre o parasitismo tecidual dos diferentes grupos (FIG. 9), é perceptível, por meio dos resultados obtidos, que os animais infectados e geneticamente deficientes para CCR5 apresentaram o tecido intestinal mais lesionado do que os animais do grupo C57BL/6 infectados (FIG. 4B). Além de haver uma contagem menor das células quantificadas relacionadas à resposta imune ao parasita, de forma geral, nos grupos infectados CCR5<sup>-/-</sup> do que nos C57BL/6 (FIG. 5, 6, 7, 8). Luangsay *et al.* (2003) notaram, inflamação mais intensa com maior dano tecidual em animais CCR5<sup>-/-</sup> infectados com a cepa 76K de *T. gondii* e essas lesões foram correlacionadas a uma maior produção de citocinas inflamatórias nesses animais. De forma diferente, Bonfá *et al.* (2014) observaram menor detecção de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF em animais CCR5<sup>-/-</sup> quando comparado aos animais controles infectados aos 7 dias de infecção o que correlacionou com maior parasitismo no intestino delgado detectado por meio da quantificação de DNA de *T. gondii*.

Além disso, Luangsay *et al.* (2003), não encontraram diferença estatística entre o parasitismo do grupo infectado deficiente para o receptor e o grupo infectado controle.

Figura 9 – Quantificação de parasitismo tecidual, no intestino delgado de camundongos dos grupos analisados.



Fonte: A autora.

A, Intestino delgado de um camundongo deficiente geneticamente para o receptor CCR5 infectado por *T. gondii*, 5 dias após a infecção. É possível observar os parasitas pelas imunomarcações no tecido. Técnica de imuno-histoquímica. Objetiva de 40X. B, Quantificação de parasitismo tecidual em intestino delgado de animais dos grupos infectados. Os dados são representativos de 3 a 4 animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo  $\pm$  erro padrão da média. One-way ANOVA foi usado para análise estatística, em que não houve diferença estatística.

## 6.1 DISTRIBUIÇÃO DA NORMALIDADE DOS DADOS

Quando submetido à análise estatística, os dados da contagem de linfócitos intraepiteliais totais, de linfócitos intraepiteliais no jejun proximal, jejun distal e íleo apresentaram uma distribuição paramétrica de dados, enquanto a contagem de linfócitos intraepiteliais no duodeno se apresentou não paramétrica (FIG. 5). Quanto à contagem de mastócitos (FIG. 6), quando submetido à análise estatística, sua distribuição se apresentou não paramétrica e sem diferenças estatísticas entre os grupos. Já na quantificação de células de Paneth (FIG. 8), quando submetida a análises estatísticas, a quantificação dessas células no intestino delgado como um todo, no duodeno, no jejun distal e no íleo apresentaram distribuições paramétricas, enquanto no jejun proximal apresentou uma distribuição não paramétrica. Os dados resultados da quantificação de células caliciformes à pH 1,0 se mostraram paramétricos (FIG. 7).

## 7 CONCLUSÃO

O receptor de quimiocinas CCR5, está, ao menos parcialmente, envolvido na proteção contra as alterações morfológicas no intestino delgado em infecção por *T. gondii*. O receptor é importante para proliferação/preservação de células caliciformes e de Paneth no intestino delgado em infecção por *T. gondii*, importantes células na proteção contra o parasita. Além disso, o receptor é importante para infiltração de linfócitos intraepiteliais específicos no intestino delgado que atuariam na proteção contra as lesões induzidas pela infecção com o parasita.

## REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, A. A. *et al.* The one health approach to toxoplasmosis: epidemiology, control, and prevention strategies. **EcoHealth**, v. 16, n. 2, p. 378-390, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6682582/>. Acesso em: 20 fev. 2024.
- AJZENBERG, D. *et al.* Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 1, p. 27-38, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00301-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00301-0). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751901003010?via%3Dihub>. Acesso em 01 mai. 2025.
- ALIBERTI, J. *et al.* CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 $\alpha$ + dendritic cells. **Nature immunology**, v. 1, n. 1, p. 83-87, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/76957>. Disponível em: [https://www.nature.com/articles/ni0700\\_83](https://www.nature.com/articles/ni0700_83). Acesso em: 27 mar. 2024.
- ALIBERTI, J. *et al.* Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. **Nature immunology**, v. 4, n. 5, p. 485-490, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni915>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni915>. Acesso em 30 abr. 2025.
- APPAY, V.; ROWLAND-JONES, S. L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. **Trends in immunology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 83-87, 2001. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906\(00\)01812-3](https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906(00)01812-3). Acesso em: 30 abr. 2025.
- ARAUJO, E. C. B. *et al.* Beneficial effects of *Strongyloides venezuelensis* antigen extract in acute experimental toxoplasmosis. **Parasite Immunology**, v. 43, n. 4, p. e12811, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12811>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33247953/>. Acesso em 28 abr. 2025.
- ARAUJO, E. C. B. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection decreases intestinal 5-lipoxygenase expression, while exogenous LTB4 controls parasite growth. **Infection and Immunity**, v. 90, n. 7, p. e00029-22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00029-22>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9302167/>. Acesso em 28 abr. 2025.
- BARTLEY, P.M. *et al.* Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* *in vivo*. **Parasitology**, v.135, n. 4, p.421-432, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182006000539>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/abs/longterm-passage-of-tachyzoites-in-tissue-culture-can-attenuate-virulence-of-neospora-caninum-in-vivo/7290952D9112DCB5CEAC0DE92CC4367D>. Acesso em 30 mar. 2024.
- BECK, H. P. *et al.* Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 2, p. 175-189, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.10.001>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002075190800386X?via%3Dhub> Acesso em 01 mai. 2025.

BELNOUE, E. *et al.* CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4253-4259, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1493>. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/101/11/4253/16909/CCR5-deficiency-decreases-susceptibility-to>. Acesso em 27 abr. 2025.

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. e75138, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075138>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075138>. Acesso em 22 abr. 2025.

BERDOY, M.; WEBSTER, J. P.; MACDONALD, D. W. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1452, p. 1591-1594, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1182>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1690701/>. Acesso em: 10 mar. 2024.

BEUMER, W. *et al.* The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. **Journal of leukocyte biology**, v. 92, n. 5, p. 959-975, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0212100>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22875882/>. Acesso em: 01 mai. 2025.

BIGNA, J. J. *et al.* Global, regional, and country seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women: a systematic review, modelling and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12102, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69078-9>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7374101/>. Acesso em: 15 fev. 2024.

BONFÁ, G. *et al.* CCR5 controls immune and metabolic functions during *Toxoplasma gondii* infection. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104736, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104736>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0104736>. Acesso em: 19 mar. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica. Atenção ao pré-natal de baixo risco. In: **Cadernos de Atenção Básica**: Atenção ao pré-natal de baixo risco. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2012. p. 69-70.

BRICENO, M. P. *et al.* Effects of Notch signaling pathway inhibition by dibenzazepine in acute experimental toxoplasmosis. **Tissue and Cell**, v. 79, p. 101952, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101952>. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040816622002245?fr=RR-2&ref=pdf\\_download&rr=935ec6c8fb5f60aa](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040816622002245?fr=RR-2&ref=pdf_download&rr=935ec6c8fb5f60aa). Acesso em: 27 abr. 2025.

BURGER, E. *et al.* Loss of Paneth cell autophagy causes acute susceptibility to *Toxoplasma gondii*-mediated inflammation. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 2, p. 177-190. e4, 2018. DOI:

[10.1016/j.chom.2018.01.001](https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.001). Disponível em:  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6179445/>. Acesso em: 23 abr. 2025.

BUZONI-GATEL, D. *et al.* Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF- $\beta$ -producing intraepithelial lymphocytes. **Gastroenterology**, v. 120, n. 4, p. 914-924, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1053/gast.2001.22432a>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508501077381>. Acesso em: 01 mai. 2025.

CRUZ, A. *et al.* Mast cells are crucial in the resistance against *Toxoplasma gondii* oral infection. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 10, p. 2949-2954, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.201344185>. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201344185>. Acesso em: 29 abr. 2025.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of parasitology**, p. 447-456, 1970. DOI: <https://doi.org/10.2307/3277601>. Disponível em: [https://www.jstor.org/stable/3277601?read-now=1&seq=1#page\\_scan\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/3277601?read-now=1&seq=1#page_scan_tab_contents). Acesso em: 01 mai. 2025.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Inc., 1988.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press., 2010.

DUBEY, J. P. *et al.* Experimental toxoplasmosis in rats induced orally with eleven strains of *Toxoplasma gondii* of seven genotypes: tissue tropism, tissue cyst size, neural lesions, tissue cyst rupture without reactivation, and ocular lesions. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0156255, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156255>. Disponível em:  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0156255>. Acesso em: 20 fev. 2024.

DUBEY, J. P. *et al.* Recent epidemiologic and clinical *Toxoplasma gondii* infections in wild canids and other carnivores: 2009–2020. **Veterinary Parasitology**, v. 290, p. 109337, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109337>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401720303174>. Acesso em: 20 fev. 2024.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmrr.11.2.267>. Disponível em:  
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/cmrr.11.2.267>. Acesso em: 25 fev. 2024.

FERNÁNDEZ-ESCOBAR, M. *et al.* *Toxoplasma gondii* genotyping: A closer look into Europe. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 842595, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.842595>. Disponível em:  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.842595/full>. Acesso em: 5 mar. 2024.

FLEGR, J. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. **Trends in parasitology**, v. 29, n. 4, p. 156-163, 2013a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.01.007>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(13\)00020-2](https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(13)00020-2). Acesso em: 30 abr. 2025.

FLEGR, J. Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*-human model in studying the manipulation hypothesis. **Journal of experimental Biology**, v. 216, n. 1, p. 127-133, 2013b. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.073635>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23225875/>. Acesso em 01 mai. 2025.

FUKS, J. M. *et al.* GABAergic signaling is linked to a hypermigratory phenotype in dendritic cells infected by *Toxoplasma gondii*. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 12, p. e1003051, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003051>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003051>. Acesso em: 01 mai. 2025.

GAO, X.-J. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. **Parasitology**, v. 139, n. 2, p. 139-147, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182011001880>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/toxoplasma-gondii-infection-in-pregnant-women-in-china/A3CD5FBF9189D29DC7988DA15D7BD164>. Acesso em 19 mar. 2024.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical microbiology and infection**, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X1462509X>. Acesso em: 16 mar. 2024.

IBRAHIM, Hany M. *et al.* *Toxoplasma gondii* cyclophilin 18-mediated production of nitric oxide induces bradyzoite conversion in a CCR5-dependent manner. **Infection and immunity**, v. 77, n. 9, p. 3686-3695, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00361-09>. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2737997/>. Acesso em: 01 mai. 2025.

IBRAHIM, Hany M.; XUAN, Xuenan; NISHIKAWA, Yoshifumi. *Toxoplasma gondii* cyclophilin 18 regulates the proliferation and migration of murine macrophages and spleen cells. **Clinical and vaccine immunology**, v. 17, n. 9, p. 1322-1329, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.00128-10>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2944453/>. Acesso em: 01 mai. 2025.

IBRAHIM, H. M. *et al.* Overproduction of *Toxoplasma gondii* cyclophilin-18 regulates host cell migration and enhances parasite dissemination in a CCR5-independent manner. **BMC microbiology**, v. 14, p. 1-15, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186%2F1471-2180-14-76>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3987834/>. Acesso em: 25 mar. 2024.

JENKINS, E. J. *et al.* Wildlife parasites in a One Health world. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 5, p. 174-180, 2015. DOI: 10.1016/j.pt.2015.01.002. [s.l.]. Disponível em: <https://PMC7106350/>. Acesso em: 30 abr. 2025.

JERICÓ, Márcia M.; NETO, João Pedro de A.; KOGIKA, Márcia M. Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. E-book. p.771. ISBN 9788527739320. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527739320/>. Acesso em: 26 out. 2025.

JONES, J. L. *et al.* Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 56, n. 5, p. 296-305, 2001. [s.l.]. Disponível em: [https://journals.lww.com/obgynsurvey/abstract/2001/05000/congenital\\_toxoplasmosis\\_a\\_rev\\_iew.25.aspx](https://journals.lww.com/obgynsurvey/abstract/2001/05000/congenital_toxoplasmosis_a_rev_iew.25.aspx). Acesso em: 30 abr. 2025.

KHAN, A. *et al.* Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 9, p. 2980-2992, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gki604>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/33/9/2980/2401468?login=false>. Acesso em: 01 mai. 2025.

KHAN, I. A. *et al.* CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 6, p. e49, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020049>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0020049>. Acesso em 28 abr. 2025.

KHAN, A. *et al.* Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 37, p. 14872-14877, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0702356104>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0702356104>. Acesso em: 01 mai. 2025.

KURASHIMA, Y. *et al.* Mucosal mesenchymal cells: secondary barrier and peripheral educator for the gut immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1787, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01787>. Disponível em: <https://PMC5733542/>. Acesso em: 28 abr. 2025.

LEHMANN, T. *et al.* Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11423-11428, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0601438103>. Disponível em: <https://PMC1544101/>. Acesso em: 01 mai. 2025.

LIESENFELD, O. *et al.* Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 2, p. 597-607, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.597>. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article-abstract/184/2/597/51027/Association-of-CD4-T-cell-dependent-interferon>. Acesso em: 30 abr. 2025.

LIESENFELD, O. *et al.* TNF- $\alpha$ , nitric oxide and IFN- $\gamma$  are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Parasite immunology**, v. 21, n. 7, p. 365-376, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00237.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3024.1999.00237.x>. Acesso em: 30 abr. 2025.

LOETSCHER, P. *et al.* CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 344-345, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1038/34814>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/34814>. Acesso em 30 abr. 2025.

LUANGSAY, S. *et al.* CCR5 mediates specific migration of *Toxoplasma gondii*—primed CD8+ lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 125, n. 2, p. 491-500, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00903-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00903-X). Diponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001650850300903X>. Acesso em: 27 abr. 2025.

MILLER, S. A. DYKES, D. D., POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 3, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114019>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC334765/>. Acesso em: 28 abr. 2025.

MILNE, G.; WEBSTER, J. P.; WALKER, M. *Toxoplasma gondii*: an underestimated threat?. **Trends in parasitology**, v. 36, n. 12, p. 959-969, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.005>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(20\)30221-X](https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(20)30221-X). Acesso em 20 mar. 2024.

MIRANDA, N. C. *et al.* Anti-parasitic activity of *Annona muricata* L. leaf ethanolic extract and its fractions against *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 273, p. 114019, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874121002464?via%3Dihub>. Acesso em 28 abr. 2025.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X). Diposnível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067360416412X?via%3Dihub>. Acesso em: 19 mar. 2024.

MUÑOZ-ZANZI, C. A. *et al.* *Toxoplasma gondii* oocyst-specific antibodies and source of infection. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 10, p. 1591, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1610.091674>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3294384/>. Acesso em: 01 mai. 2025.

NASCIMENTO, L. A. C. *et al.* The ethanolic extract of the fungus *Trichoderma stromaticum* decreases the *Toxoplasma gondii* replication in vitro and ameliorates the experimental toxoplasmosis in vivo. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100173, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100173>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666517422000700>. Acesso em: 28 abr. 2025.

NISHIMURA, M. *et al.* CCR5 is involved in interruption of pregnancy in mice infected with *Toxoplasma gondii* during early pregnancy. **Infection and immunity**, v. 85, n. 9, p. 10.1128/iai.00257-17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FIAI.00257-17>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5563560/>. Acesso em: 27 mar. 2024.

OLIVEIRA, M. C. *et al.* The availability of iron is involved in the murine experimental *Toxoplasma gondii* infection outcome. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 560, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040560>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7232304/>. Acesso em 28 abr. 2025.

ORTIZ-GUERRERO, G. *et al.* Pathophysiological mechanisms of cognitive impairment and neurodegeneration by *Toxoplasma gondii* infection. **Brain sciences**, v. 10, n. 6, p. 369, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/brainsci10060369>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3425/10/6/369>. Acesso em: 24 mar. 2024.

POIROTTE, C. *et al.* Morbid attraction to leopard urine in *Toxoplasma*-infected chimpanzees. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. R98-R99, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.020>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26859275/>. Acesso em: 11 mar. 2024.

RAETZ, M. *et al.* Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- $\gamma$ -dependent elimination of Paneth cells. **Nature immunology**, v. 14, n. 2, p. 136-142, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.2508>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3552073/>. Acesso em 28 abr. 2025.

REY, L. **Parasitologia**. 4<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3346298/>. Acesso em: 30 abr. 2025.

SALOMÃO, R. **Infectologia: Bases clínicas e tratamento**. São Paulo: Gen, 2017.

SASAI, M.; PRADIPTA, A.; YAMAMOTO, M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 113-119, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy004>. Disponível em: <https://academic.oup.com/intimm/article/30/3/113/4835044?login=false>. Acesso em: 24 mar. 2024.

SCOTT-ALGOOD, H. M.; FLYNN, J. L. CCR5-deficient mice control Mycobacterium tuberculosis infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3287-3296, 2004. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3287>. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/173/5/3287/36530>. Acesso em: 27 abr. 2025.

SUTTERLAND, A. L. *et al.* Driving us mad: the association of *Toxoplasma gondii* with suicide attempts and traffic accidents—a systematic review and meta-analysis. **Psychological medicine**, v. 49, n. 10, p. 1608-1623, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0033291719000813>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31010440/>. Acesso em 01 mai. 2025.

TORREY, E. F. *et al.* Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis. **Schizophrenia bulletin**, v. 33, n. 3, p. 729-736, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/schbul/sbl050>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2526143/>. Acesso em: 30 abr. 2025.

VYAS, A. *et al.* Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 15, p. 6442-6447, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0608310104>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1851063/>. Acesso em: 17 mar. 2024.

WEIDNER, J. M. *et al.* Rapid cytoskeleton remodelling in dendritic cells following invasion by *Toxoplasma gondii* coincides with the onset of a hypermigratory phenotype. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 10, p. 1735-1752, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/cmi.12145>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cmi.12145>. Acesso em: 01 mai. 2025.

WOHLFERT, E. A.; BLADER, I. J.; WILSON, E. H. Brains and brawn: toxoplasma infections of the central nervous system and skeletal muscle. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 7, p. 519-531, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.001>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(17\)30102-2?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492217301022%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(17)30102-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492217301022%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em 01 mai. 2025.

ZHONG, M. X. *et al.* Chemokine receptor 5 is dispensable for innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes* infection. **Infection and immunity**, v. 72, n. 2, p. 1057-1064, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.72.2.1057-1064.2004>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/iai.72.2.1057-1064.2004>. Acesso em 27 abr. 2025.