

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

**Programa de Pós- Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas**

**Análise temporal de RNA-seq revela infiltração de
células B durante a toxoplasmose cerebral crônica**

Gabriel Pereira Diniz Targino

Uberlândia

Julho de 2024

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós- Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Análise temporal de RNA-seq revela infiltração de células B durante a toxoplasmose cerebral crônica

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito à obtenção de título de mestre.

Aluno: Gabriel Pereira Diniz Targino

Orientador: Neide Maria da Silva

Coorientador: Paulo Victor Czarnewski Barenco

Uberlândia

Julho de 2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

2024	T185 Targino, Gabriel Pereira Diniz, 1999- Análise temporal de RNA-seq revela infiltração de células B durante a toxoplasmose cerebral crônica [recurso eletrônico] / Gabriel Pereira Diniz Targino. - 2024. Orientadora: Neide Maria da Silva. Coorientador: Paulo Victor Czarnewski Barenco. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.365 Inclui bibliografia. 1. Imunologia. I. Silva, Neide Maria da, 1961-, (Orient.). II. Barenco, Paulo Victor Czarnewski, 1990-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.
------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o CDU: 612.017

AACR2: Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico nº 298				
Data:	31/07/2024	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17h24min
Matrícula do Discente:	12212IPA004				
Nome do Discente:	Gabriel Pereira Diniz Targino				
Título do Trabalho:	Análise temporal de RNA-seq revela infiltração cerebral de células B durante toxoplasmose crônica				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Relação infecção crônica por Toxoplasma gondii e desenvolvimento de doença neurodegenerativa				

Reuniu -se, em 31 de julho 2024, às 14h00, na sala 2B213, Bloco 2B - UFU - Campus Umarama, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Profa. Dra. Karine Rezende de Oliveira - UFU / Campus Pontal; Prof. Dr. Newton de Medeiros Vidal - ICBIM / UFU; Profa. Dra. Neide Maria da Silva - ICBIM / UFU, (Presidente), orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Profa. Neide Maria da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente, o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADO

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente

ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Neide Maria da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2024, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Newton de Medeiros Vidal, Professor(a) Visitante do Magistério Superior**, em 31/07/2024, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karine Rezende De Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2024, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5553288** e o código CRC **3351B2AD**.

Referência: Processo nº 23117.046794/2024-21

SEI nº 5553288

"If nobody believes in you, and you've lost again and again and again realizing that the lights are going out, keep looking at your dream, reviewing it every day and saying to yourself: 'It's not over until I win!'"

(Les Brown)

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de expressar minha gratidão a Deus, Jesus Cristo, Nossa Senhora Aparecida e São Bento. Com eles, tudo é possível, e só com a força deles fui capaz de chegar ao fim deste ciclo. Serei eternamente grato e devoto a todos, e espero que meu estudo sirva de ajuda para futuras pesquisas e para muitas vidas ao redor do mundo.

Gostaria de agradecer à minha mãe, Marilene Pereira Targino, e ao meu pai, Altamir Diniz Targino, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando a seguir em frente, independentemente dos desafios da vida. Vocês me ajudaram a ficar de pé, não importa o que acontecesse. Sempre os amarei e serei eternamente grato por tudo.

Agradeço à minha irmã, Beatriz Pereira Diniz Targino, que me ajudou a me preparar para todas as minhas apresentações e sempre esteve disposta a ajudar em tudo que eu precisasse. Amarei você para sempre e serei eternamente grato por seu apoio.

Gostaria de homenagear e agradecer a Gabriela Carolina Marion, por estar ao meu lado todos esses anos, me dando forças, sendo minha companheira nas dificuldades e batalhando comigo em todas as adversidades. Sempre serei grato por tudo.

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Neide Maria da Silva, por me conceder a honra de ser orientado por ela e por todo o ensinamento e compreensão que me transmitiu. Agradeço imensamente por todo o tempo dedicado a mim.

Agradeço ao Paulo Czarnewski, pela honra de compartilhar seu aprendizado e tempo comigo. Sou muito grato e, em sua homenagem, transmitirei seu conhecimento a futuros alunos, assim como ele fez comigo.

Gostaria de agradecer a Anna Laura de Jesus Gomes e Iasmin Aparecida Cunha Araujo, que, além de se tornarem grandes amigas, me ensinaram diversas técnicas laboratoriais e manejo de animais.

Por fim, gostaria de agradecer a Karine Rezende de Oliveira e à minha antiga orientadora, Luciana Karen Calábria, por confiarem em mim e por me mostrarem o caminho para a realização do mestrado.

RESUMO

A toxoplasmose crônica é caracterizada pela persistência de *Toxoplasma gondii* no sistema nervoso central, onde os taquizoítos se convertem em bradizoítos e permanecem não detectados. Neste estudo, procuramos identificar marcadores que seriam expressos no cérebro durante infecção crônica precoce (21 e 28 dias) e tardia (3 e 6 meses), realizando análise de sequenciamento de RNA de alta performance usando um conjunto de dados de RNAseq disponíveis publicamente. Mostramos um padrão conservado de expressão gênica causado pela infecção, associado principalmente a respostas imunes pró-inflamatórias contra o parasita e à degeneração neuronal, independentemente dos tempos de infecção. Surpreendentemente, observamos que os genes associados à função das células B aumentaram continuamente ao longo do tempo, enquanto aqueles associados às respostas imunes citotóxicas diminuíram. A inspeção de genes relacionados à imunoglobulinas e a imunomarcção para IgA confirmaram que as células B não foram encontradas nos cérebros de camundongos não infectados, mas após a infecção, concentraram-se nas meninges e nas proximidades dos vasos que penetram no sistema nervoso central e algumas delas conseguiram entrar no parênquima cerebral. Nossos resultados mostram uma expansão anteriormente não descrita de células B produtoras de IgA no cérebro na toxoplasmose crônica.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, RNAseq, células B, toxoplasmose crônica, cérebro, encefalite.

ABSTRACT

Chronic toxoplasmosis is characterized by the persistence of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system, where the tachyzoites convert to bradyzoites and remain undetected. Here, we sought to identify markers that would be expressed in the brain in early (21 and 28 days), and late (3 and 6 months) chronic infection by performing High-throughput RNA sequencing analysis using a publicly available RNAseq dataset. We show a conserved gene expression pattern caused by the infection, primarily associated with pro-inflammatory immune responses against the parasite and neuronal degeneration, regardless of the time points. Surprisingly, we observed that genes associated with B cell function continuously increased over time, while those associated with cytotoxic responses decreased. Inspection of immunoglobulin related genes and immunostaining for IgA confirmed that B cells were not found in the brain of uninfected mice, but after infection, concentrated in the meninges and vicinity of vessels that penetrate the central nervous system and some of them were able to enter the brain parenchyma. Our results show a previously undescribed expansion of B cells producing IgA in the brain in chronic toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, RNAseq, B cell, chronic toxoplasmosis, brain, encephalitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Análise de dados de sequenciamento de RNA em massa da toxoplasmose cerebral	29
Figura 2 – Dinâmica das células B no cérebro durante a infecção crônica por <i>T. gondii</i>	31
Figura 3 – Análise de controle de qualidade dos dados de RNA-seq	32
Figura 4 – Análise de conjuntos de genes das diferenças de expressão temporal.....	34
Figura 5 – Padrões de expressão de módulos de genes e seus respectivos conjuntos de genes	35
Tabela 1 – Lista de genes diferencialmente expressos.....	anexo
Tabela 2 – Análise funcional de conjuntos de genes diferencialmente expressos.....	anexo
Tabela 3 – Lista de genes presentes em cada módulo temporal	anexo
Tabela 4 – Análise funcional de conjuntos de genes por módulo temporal.....	anexo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BeWo	Linha celular de trofoblasto humano
BUVEC	Células endoteliais primárias da veia umbilical bovina
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
DEG	Genes diferencialmente expressos
DHFR	Diidrofolato redutase
DHPS	Dihidropteroato sintetase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
GEO	Gene expression omnibus
GF	Germ-free
H&E	Hematoxilina-eosina
HIV/AIDS	Vírus da Imunodeficiência Humana
I.p.	Intraperitoneal
IFN - γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina a
IgG	Imunoglobulina g
IgM	Imunoglobulina m
IL	Interleucina
ISAGA	Ensaio de aglutinação imunossorvente
IVIG	Imunoglobulina polivalente
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M1 ao 5	Módulo 1 ao 5
Me49	Cepa de toxoplasma gondii
MHC	Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
MLG	Modelo linear generalizado
muMT	Camundongos deficientes em células B
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	Natural killer
NK-DC	Célula natural killer e célula dendrítica

NKG2D	Grupo 2 de receptores de ativação de células NK, membro D
PBS	Tampão fosfato-salino
PC1	Primeiro componente principal
PC2	Segundo componente principal
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ph	Potencial hidrogeniônico
PYR	Pirimetamina
REBIR	Rede de Biotérios de Roedores
RLE	Expressão relativa logarítmica
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
rVVs	Vírus vaccinia recombinantes
SDZ	Sulfadiazina
SNC	Sistema nervoso central
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF- α	Fator de necrose Tumoral Alfa
VLPs	Vírus da influenza (Partícula pseudoviral)

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 A Toxoplasmose	12
1.2 Impacto da Toxoplasmose na Saúde Pública	16
1.3 Ciclo de vida do Parasita	17
1.4 Infecção por <i>T. gondii</i>	19
1.5 Resposta imune a <i>T. gondii</i>	20
1.6 Papel das Células B no Sistema Imunológico	21
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVO.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Condução da Análise Sistemática: Métodos Adotados.....	24
4.1.1 <i>Estratégia de Busca Bibliográfica e base de dados</i>	24
4.1.2 <i>Critérios de Inclusão e Exclusão de Estudos</i>	24
4.1.4 <i>Extração de Dados</i>	25
4.1.5 Análise transcriptômica	25
4.1.6 Disponibilidade de Dados e Código	26
4.2 Experimentos In Vivo	26
4.2.1 <i>Animais</i>	26
4.2.2 <i>Cepa de T. gondii</i>	27
4.2.3 <i>Procedimento Experimental</i>	27
4.2.4 <i>Processamento Histológico</i>	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Exploração da Toxoplasmose Cerebral por Sequenciamento de RNA.....	28
5.2 Genes relacionados às células B estão enriquecidos na toxoplasmose cerebral crônica tardia .31	
5.3 As células B migram para o cérebro na infecção crônica tardia	33
6 DISCUSSÃO.....	34
7 CONCLUSÃO.....	39
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Toxoplasmose

Toxoplasma gondii pertence ao supergrupo Alveolata, Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família Sarcocystidae, sendo a única espécie no gênero *Toxoplasma* (Smith et al., 2021). A descoberta do parasita *Toxoplasma gondii*, responsável pela toxoplasmose, remonta a 1907, quando o cientista Charles Nicolle observou a presença de um organismo em forma de meia-lua nos tecidos de roedores norte-africanos gundi. Em 1908, Nicolle e seu colaborador, Louis Manceaux, publicaram a descrição inicial dessa descoberta. (Nicolle; Manceaux, 1908). No ano seguinte, os cientistas forneceram um relatório mais completo, atribuindo ao organismo a nomenclatura *Toxoplasma gondii*, em decorrência à forma do protozoário no estágio infeccioso e ao hospedeiro original – toxon: arco, plasma: vida; gondii: *Ctenodactylus gundi*. (Nicolle; Manceaux, 1909).

No Brasil, simultaneamente às descobertas internacionais, Alfonso Splendore também identificou o parasita em coelhos (Splendore, 1908). Apesar do interesse inicialmente acadêmico, tais estudos pioneiros foram fundamentais para o entendimento inicial da toxoplasmose e abriram caminho para pesquisas posteriores sobre sua epidemiologia e tratamento.

A década de 1930 marcou o início da investigação e compreensão do ciclo de vida de *T. gondii*. Em 1937, estudos revelaram a capacidade do protozoário de se multiplicar dentro de células, definindo-o como um parasita intracelular obrigatório. Essa descoberta fundamental contribuiu significativamente para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento da toxoplasmose (Sabin; Olitsky, 1937). No mesmo período, registrou-se uma infecção por *Toxoplasma* em um bebê de três dias de idade que estava sofrendo de encefalomielite (Wolf; Cowen, 1937). Abner Wolf e sua equipe, por meio de uma autópsia do tecido cerebral da criança, detectaram organismos parasitários no encéfalo relacionados a lesões necróticas e granulomatosas.

Uma notável técnica sorológica foi desenvolvida por Sabin e Feldman em 1948, possibilitando identificar indivíduos infectados pelo parasita *Toxoplasma*. O teste de corante Sabin e Feldman se baseou na detecção de anticorpos contra *Toxoplasma* no soro de pacientes, alterando a coloração dos taquizoítos. Por meio da titulação, permitiu a quantificação do nível específico de anticorpos, estabelecendo-se como padrão pelo qual outros testes sorológicos seriam avaliados (Sabin; Feldman, 1948). Esse teste possibilitou estudos em larga escala para identificar a infecção por *Toxoplasma* em humanos e animais.

Na década de 1950, a questão de como grandes números de humanos e animais estavam se infectando com *T. gondii* levou à proposta do carnivorismo como um possível mecanismo de infecção (Weiman; Chandler, 1954). No entanto, estudos experimentais que identificaram uma nova forma evolutiva de *Toxoplasma* nas fezes de gatos levou à caracterização do ciclo de vida completo de *T. gondii*, definindo-o como um parasita coccídeo, com o gato como hospedeiro definitivo e qualquer animal de sangue quente como hospedeiro intermediário. Essa descoberta esclareceu como ocorria a ampla infecção em todos os animais de sangue quente, incluindo os humanos (Tenter; Heckeroth; Weiss, 2000).

Cerca de um terço da população mundial?? está infectada pelo *T. gondii* (Molan et al., 2019). A contaminação por meio da ingestão alimentos com formas evolutivas do agente, transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos contendo taquizoítas e/ou bradizoítas têm sido identificados como possíveis vias de transmissão do parasita (Smith et al., 2021).

A prevalência de *T. gondii* ou da toxoplasmose? varia de acordo com os hábitos alimentares e de higiene de uma população, sugerindo que a via oral é a principal fonte de infecção. Os humanos também podem contrair *T. gondii* ao ingerir carne crua ou mal-cozida, especialmente de suínos, ovinos e bovinos – cujos tecidos musculares estejam infectados com cistos, ou ao consumir água e alimentos contaminados com oocistos eliminados por fezes de gatos infectados, hospedeiros definitivos do parasita (Montoya; Liesenfeld, 2004). A transmissão vertical durante a gestação é uma preocupação, já que o parasita pode ser transmitido da mãe para o feto, resultando em infecção congênita (Kochanowsky; Koshy, 2018).

Os sintomas de infecção por *T. gondii* são: dores de cabeça, fadiga e dores musculares, que podem ocorrer em diferentes partes do corpo e são frequentemente associadas à inflamação dos gânglios linfáticos (Smith et al., 2021; Anderson, 2019).

O reconhecimento precoce dos sintomas é crucial para um tratamento efetivo e para prevenir complicações graves. Estudos revelaram que o diagnóstico precoce possibilita o início imediato de um tratamento específico, que envolve a administração de medicamentos antiparasitários direcionados às formas evolutivas presentes no hospedeiro (Dunay et al., 2018). Além disso, a detecção precoce dos sintomas possibilita a adoção de medidas preventivas para evitar a disseminação do parasito para outras pessoas (Smith et al., 2021). Em gestantes, se não tratada adequadamente, a toxoplasmose resulta a complicações graves, como morte fetal, parto prematuro, retardo no crescimento intrauterino, hepatoesplenomegalia, trombocitopenia, coriorretinite, meningoencefalite, hidrocefalia, microcefalia, calcificações de áreas previamente necrosadas e surdez (Aguirre et al., 2019). Porém, a similaridade desses sintomas com outras patologias pode dificultar o diagnóstico precoce da toxoplasmose (Anderson, 2019).

Ao contrário da infecção por *Toxoplasma* em indivíduos imunocompetentes, a contaminação pelo agente representa sempre uma ameaça à vida em pacientes imunocomprometidos, independentemente da cepa, sendo o contexto imunológico do hospedeiro de extrema importância. Vários fatores que resultam em uma imunidade celular profundamente comprometida, tais como a infecção pelo HIV/AIDS e terapias imunossupressoras, podem levar ao desenvolvimento de toxoplasmose grave (Robert-Gangneux; Darde, 2012). A reativação de uma infecção latente por *Toxoplasma* em pessoas com comprometimento do sistema imunológico pode levar ao desenvolvimento de encefalite, miocardite e pneumonite toxoplásmicas, as quais podem ser fatais (Eza; Lucas, 2006).

A toxoplasmose está associada a problemas oculares, sendo a inflamação na retina uma das manifestações mais comuns. Essa inflamação pode levar à diminuição da acuidade visual e comprometer a visão de forma permanente se não for tratada adequadamente (Anderson, 2019). Além disso, outras alterações oculares como uveíte e coriorretinite podem ocorrer em hospedeiros imunocompetentes. A toxoplasmose ocular pode ocorrer em casos onde se observa a toxoplasmose congênita, e a manifestação ocular pode não ser aparente até a adolescência ou o início da idade adulta (Dunay et al., 2018). Comprometimentos no sistema nervoso central associados à infecção por *T. gondii* podem incluir encefalite, meningite, mielite, neurite óptica, além de sintomas neuropsiquiátricos como depressão, ansiedade, esquizofrenia e transtorno obsessivo-compulsivo (Mendez; Koshy, 2017).

Os exames mais utilizados para diagnóstico, incluem a sorologia para detecção de anticorpos específicos, como a IgM e a IgG, e a detecção do DNA do parasita por meio de técnicas moleculares, como a PCR. Além disso, a importância da realização de exames laboratoriais em amostras de líquido amniótico de gestantes, sangue do cordão umbilical e sangue do recém-nascido é enfatizada para o diagnóstico precoce da toxoplasmose

congenita (Pomares, Montoya, 2016). Os resultados dos testes sorológicos podem variar dependendo da fase da infecção pelo *T. gondii*. Na fase aguda da toxoplasmose, é previsto um aumento nos níveis de anticorpos IgM, sinalizando uma infecção recente. A detecção de IgM e a avaliação de sua avidade desempenham um papel crucial no diagnóstico e manejo da fase aguda da doença (Liu et al., 2015). Por outro lado, na fase crônica, os níveis de anticorpos IgG tendem a ser mais elevados, sugerindo uma infecção mais antiga ou latente. A presença simultânea de ambos os tipos de anticorpos pode sugerir uma infecção ativa, sendo portanto, importante a avaliação da avidade de IgM (Fleck, 1989).

Estudos epidemiológicos têm mostrado maiores taxas de toxoplasmose em países em desenvolvimento. Isso porque essas regiões frequentemente enfrentam desafios significativos em termos de infraestrutura de saúde, acesso a cuidados médicos e medidas de controle de doenças; a latente falta de recursos e a infraestrutura precária também contribuem para a prevalência mais alta da doença, bem como para o aumento da transmissão de *T. gondii* (Smith et al., 2021).

A partir do diagnóstico da presença de *T. gondii* no organismo, vários métodos são empregados no tratamento da toxoplasmose, com destaque para o uso de medicamentos antiparasitários, uma das abordagens mais comuns já mencionadas anteriormente. Dentre os fármacos utilizados para controlar o crescimento do parasita, pode-se citar a pirimetamina (PYR) e a sulfadiazina (SDZ). A pirimetamina age inibindo a diidrofolato redutase (DHFR), uma enzima crucial na síntese de folato. Sem folato, *T. gondii* não pode sintetizar DNA e proteínas, levando à morte celular do parasita. A sulfadiazina, por sua vez, inibe a dihidropteroato sintetase (DHPS), outra enzima essencial na síntese de folato. A sulfadiazina potencializa o efeito da pirimetamina, aumentando sua eficácia contra o parasita (Dunay et al., 2018). Outras terapias combinam a pirimetamina com clindamicina, azitromicina ou atovaquona, ou trimetoprim com sulfametoxazol. No entanto, todos os tratamentos geralmente estão associados a efeitos colaterais adversos e toxicidade, como mostra o estudo de Konstantinovic et al. (2019).

1.2 Impacto da Toxoplasmose na Saúde Pública

A toxoplasmose, doença provocada pelo parasita *T. gondii*, tem a capacidade de impactar e comprometer diversos sistemas e órgãos no corpo humano. Do ponto de vista clínico, a infecção por *T. gondii* pode passar despercebida ou manifestar sinais e sintomas que variam conforme o estado imunológico do paciente e o contexto clínico (Montoya; Liesenfeld, 2004). A toxoplasmose em adolescentes ou adultos imunocompetentes geralmente é leve ou assintomática. Infecções leves podem resultar em linfadenopatia, febre, fadiga e mal-estar, todos os quais geralmente se resolvem em semanas a meses sem tratamento específico. No entanto, a infecção em pessoas imunocomprometidas pode ser grave, podendo causar encefalopatia difusa, dores de cabeça, confusão, fraqueza, dormência, descoordenação e convulsões. Manifestações extracerebrais, como problemas respiratórios e visuais, também podem ocorrer (Lopez et al., 2000. Konstantinovic et al., 2019. Elsheikha; Marra; Zhu, 2020).

Os atuais padrões de mudança ambiental e social provocados pelo homem, tais como mudanças climáticas, perda de biodiversidade, poluição e escassez de recursos naturais, distribuição desigual de benefícios econômicos e acesso a serviços básicos facilitam a transmissão e propagação desses patógenos, bem como contribuem para atrasos e falta de recursos para diagnóstico e tratamento precoce da doença (Aguirre et al., 2019. Dunay et al., 2018).

Essas infecções, portanto, têm consequências significativas que afetam a mortalidade e a qualidade de vida das pessoas acometidas (Aguirre et al., 2019). Torgerson e Mastroiacovo (2013) estimaram a incidência global e a carga da toxoplasmose congênita em 190.100 casos por ano, com uma taxa de incidência de 1,5 casos por 1.000 nascidos vivos por ano. Com o intuito de minimizar o número de casos e mitigar seus impactos na saúde pública, autoridades de saúde vêm adotando estratégias de controle e prevenção da toxoplasmose. Por meio de departamentos de saúde e/ou agricultura, muitos governos têm disponibilizado orientações claras e sites educativos explicando como os indivíduos podem prevenir a toxoplasmose (Smith et al., 2021).

1.3 Ciclo de vida do Parasita

O ciclo de vida de *T. gondii* envolve múltiplos estágios e mecanismos de transmissão. Existem três formas principais de infecção: transmissão congênita, infecção adquirida por meio da ingestão de cistos de tecido de hospedeiros intermediários cronicamente infectados, e infecção por meio da ingestão de oocistos esporulados resultantes da contaminação de alimentos ou água com fezes de gatos infectados (Ferguson, 2009).

Os oocistos são originados no intestino do hospedeiro definitivo, predominantemente gatos, e excretados nas fezes do animal. Inicialmente não esporulados, os oocistos podem passar pelo processo de esporulação fora do hospedeiro, adquirindo assim a capacidade infectante. Os oocistos contêm 2 esporocistos e cada um desses contém 4 esporozoítos. Ao serem eliminados nas fezes, esses oocistos são liberados no ambiente, permanecendo viáveis por períodos prolongados e constituindo uma fonte significativa de infecção para outros animais, incluindo humanos. Quando ingeridos, os oocistos liberam esporozoítos, dando início ao ciclo de infecção, que pode evoluir para a forma de replicação ativa do parasita, conhecida como taquizoítos (Dubey; Lindsay; Speer, 1998. Montoya e Liesenfeld 2004).

Os bradizoítos, formas de desenvolvimento do parasita *T. gondii*, desempenham um papel essencial na transmissão para hospedeiros carnívoros, sendo encontrados em cistos teciduais e demonstrando resistência à digestão ácido-pepsina. Essa forma latente e de baixa taxa de divisão celular é responsável pela persistência da infecção nos hospedeiros. Sua capacidade de converter-se para a forma ativa do parasita, taquizoíto, em resposta a mudanças no sistema imunológico é crucial na patogênese da toxoplasmose. Além disso, os bradizoítos apresentam desafios terapêuticos devido à sua resistência, destacando a importância de compreender a biologia e dinâmica dessa fase para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra a toxoplasmose, conforme discutido por Ferguson (2019) e Smith et al. (2021).

Os taquizoítos, por sua vez, desempenham um papel crucial no ciclo de vida do parasita *T. gondii*. A presença de taquizoítos nos tecidos do hospedeiro desencadeia uma resposta imunológica significativa, sendo um ponto focal de pesquisa para compreender a patogênese e o tratamento da toxoplasmose (Ferguson, 2009; Montoya, Liesenfeld, 2004).

T. gondii demonstra uma notável capacidade de infectar qualquer célula nucleada em animais de sangue quente, embora essa característica esteja restrita à fase assexuada intermediária de seu ciclo de vida (Dubet et al., 1998).

Durante a fase sexual, apenas felídeos podem servir como hospedeiros definitivos devido a uma deficiência única, entre os mamíferos, na atividade da *delta-6-saturase* intestinal em gatos (Smith et al., 2021). Portanto, o ciclo de vida de *T. gondii* inicia-se com a ingestão de formas infectivas pelo hospedeiro definitivo, o gato. Dentro do sistema digestivo, ocorre a liberação de bradizoítos ou esporozoítos, que invadem as células intestinais, dando início à replicação assexuada e formação de taquizoítos. Esses taquizoítos podem disseminar-se pelo corpo do felino, formando cistos teciduais em órgãos específicos (Dubey; Lindsay; Speer, 1998. Ferguson, 2009).

Algumas formas diferenciam-se em estágios sexuais, resultando na formação de oocistos que são excretados nas fezes dos gatos. Com o tempo, esses oocistos esporulam, tornando-se infectivos. A contaminação ambiental ocorre quando esses oocistos são eliminados no ambiente, afetando solo, água e alimentos. Hospedeiros intermediários, incluindo humanos, podem ser infectados ao ingerir oocistos ou cistos teciduais, concluindo o ciclo de vida complexo de *T. gondii* (Elsheikha; Marra; Zhu, 2020. Ferguson, 2009).

Para sobreviver dentro das células hospedeiras, *T. gondii* emprega várias estratégias para obter nutrientes; a modificação da membrana vacuolar intracelular para permitir a difusão livre de pequenas moléculas, como aminoácidos, nucleobases e cofatores, por exemplo. O parasita secreta uma grande quantidade de proteínas das roptrias e de organelas secretoras chamadas grânulos densos, muitas das quais são direcionadas para a membrana vacuolar, contribuindo para a permeabilidade observada. Além disso, *Toxoplasma* recruta organelas do hospedeiro, como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, para obter acesso a nutrientes. O parasita também desenvolve sistemas elaborados para a aquisição de lipídios do hospedeiro, incluindo a absorção de colesterol através da via de recuperação de LDL, contornando as rotas normais de endossomos tardios e lisossomos. Essas estratégias de aquisição de nutrientes e lipídios são fundamentais para a sobrevivência e crescimento do parasita dentro das células hospedeiras (Sibley, 2003).

1.4 Infecção por *T. gondii*

Em indivíduos imunocompetentes a infecção frequentemente é assintomática ou pode causar sintomas leves. Menos de 10% das infecções podem resultar em uma síndrome semelhante à mononucleose, com sintomas como dor de cabeça, mal-estar, febre, linfadenopatia cervical e fadiga (Elsheikha; Marra; Zhu, 2020). Os taquizoítos causadores da doença são tipicamente rapidamente suprimidos pela resposta imunológica, principalmente pela ação do interferon-gama (IFN- γ) produzido por células T CD4+, com o apoio de diversas outras células imunológicas e citocinas (Smith et al., 2021).

T. gondii pode entrar no sistema nervoso central (SNC) por meio de vários mecanismos. Estudos sugerem que o parasita pode atravessar a barreira hematoencefálica por meio de migração paracelular, transmigração transcelular e até mesmo por meio de um mecanismo de "cavalo de Tróia" através de células imunes infectadas. Além disso, o parasita pode interagir com diferentes tipos de células no cérebro, incluindo astrócitos e neurônios, e estudos recentes indicam que *T. gondii* predominantemente interage com neurônios durante a infecção do SNC. No entanto, ainda existem questões em aberto sobre a importância relativa de cada modo de entrada e como diferentes mecanismos de entrada podem afetar quais regiões do SNC são infectadas ou mesmo quais células do SNC interagem diretamente com *T. gondii* (Elsheikha; Marra; Zhu, 2020. Mendez; Koshy, 2017).

Os sintomas da toxoplasmose cerebral podem incluir encefalopatia difusa, dores de cabeça, confusão, fraqueza, dormência, incoordenação, convulsões, problemas respiratórios e visuais. Além disso, a infecção por *T. gondii* tem sido associada a modificações comportamentais e distúrbios neuropsiquiátricos. A doença pode ter consequências graves, incluindo danos cerebrais em crianças infectadas durante a gestação e recorrência da infecção em pacientes imunossuprimidos, como aqueles com HIV/AIDS, onde o parasita pode se reativar e causar danos neurológicos graves. (Elsheikha; Marra; Zhu, 2020. Ferguson, 2009; Correia et al., 2013).

O diagnóstico diferencial da toxoplasmose cerebral é um desafio clínico importante. Portanto, a combinação de dados clínicos, imagens de neuroimagem e testes sorológicos é essencial para estabelecer um diagnóstico preciso. Em resumo, a toxoplasmose cerebral é uma condição séria que requer um entendimento aprofundado de sua patogênese, diagnóstico, tratamento e prevenção. A pesquisa contínua e a colaboração

interdisciplinar são essenciais para melhorar o manejo da doença e melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados.

1.5 Resposta imune a *T. gondii*

A resposta imune a *T. gondii* envolve tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, que desempenham papéis cruciais na defesa contra a infecção.

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do corpo contra *T. gondii* e é ativada imediatamente após a infecção. Essa resposta envolve células como macrófagos, células dendríticas e células NK, que reconhecem e eliminam patógenos de forma não específica. Durante a fase inicial da infecção, essas células ajudam a controlar a multiplicação do parasita e moldam a resposta imune adaptativa subsequente (Braga-Silva et al., 2016).

Na resposta imune adaptativa, as células T CD4⁺ são essenciais para a resistência ao *T. gondii*. Pacientes com HIV/AIDS, que apresentam um declínio no número de células T CD4⁺, por exemplo, frequentemente desenvolvem toxoplasmose grave. Em modelos de camundongos, a falta dessas células está associada a uma maior suscetibilidade durante a fase crônica da infecção (Fatoohi et al., 2004). As células T CD4⁺ contribuem para aperfeiçoamento de respostas de células B e células T CD8⁺ e produzem citocinas como interferon-gama (IFN- γ), que ativam macrófagos e outras células inatas (Braga-Silva et al., 2016).

A relação entre a toxoplasmose e o sistema imunológico é de suma importância para a compreensão dos mecanismos desencadeados pelo parasita *T. gondii*: quando um indivíduo é infectado por *T. gondii*, o parasito interage com o sistema imunológico do hospedeiro ao adentrar em suas células hospedeiras, resultando na ativação de uma resposta imune inata e adaptativa (Sayles; Gibson e Johnson, 2000. Lee et al. 2019).

Uma resposta imune exacerbada ou desregulada pode causar danos nos tecidos e inflamação sistêmica. Por outro lado, uma resposta imune inadequada ou enfraquecida pode resultar em infecção crônica, reativação de parasitas latentes e aumento da suscetibilidade a formas graves de toxoplasmose, como toxoplasmose ocular e encefalite. Essas respostas incorretas comprometem a saúde do hospedeiro, destacando a importância de compreender os mecanismos imunológicos para desenvolver estratégias eficazes de modulação do sistema imunológico e melhorar os resultados em indivíduos

infectados (Chen et al., 2000. Montoya; Liesenfeld, 2004).

A resposta imunológica à toxoplasmose cerebral pode variar entre os indivíduos. Essa variação é influenciada por polimorfismos genéticos em genes relacionados ao sistema imunológico, tais como os que codificam citocinas, receptores de padrão de reconhecimento (por exemplo PAMPS) e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), os quais podem influenciar a resposta imune do hospedeiro. Além disso, a variação genética pode impactar a intensidade e o tipo de resposta inflamatória desencadeada durante a infecção, bem como a capacidade de regulação imunológica, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Amerizadeh et al. 2013).

1.6 Papel das Células B no Sistema Imunológico

As células B são um tipo de linfócito, um componente essencial do sistema imunológico adaptativo. Elas desempenham um papel crucial na resposta imune, produzindo anticorpos que ajudam a combater patógenos, autoantígenos e tumores e são importantes na resposta em esquemas de vacinação. São encontradas nos tecidos linfóides e têm a capacidade de se diferenciar em células produtoras de anticorpos, chamadas de plasmócitos, e em células de memória que fornecem imunidade duradoura contra patógenos previamente encontrados (Park et al., 2019).

A interação entre células B e outros componentes do sistema imune, como células T e citocinas, é crucial para a modulação da resposta imune e controle do parasita durante a fase aguda da infecção, conforme evidenciado pelos estudos de Montorsi; Siu e Spencer (2022).

Enquanto a imunidade mediada por células é importante para combater a infecção por *Toxoplasma*, o papel das células B e anticorpos na imunidade humoral contra *T. gondii* também é significativo. As células B, portanto, produzem anticorpos que podem bloquear a infecção de células hospedeiras pelo parasita, contribuindo para a proteção do hospedeiro (Sayles; Gibson e Johnson, 2000).

A imunoglobulina A (IgA) é um tipo de anticorpo produzido principalmente nas membranas mucosas do trato respiratório, gastrointestinal e geniturinário, desempenhando um papel importante na defesa contra patógenos que entram em contato com essas superfícies. A detecção de IgA específica para *T. gondii*, pode ser realizada

por meio de ensaios laboratoriais, como ELISA (ensaio imunoenzimático) e

ISAGA (ensaio de aglutinação imunossorvente). A presença de IgA específica pode ser indicativa de uma resposta imune ativa contra o patógeno, considerando que esta imunoglobulina pode ser uma referência importante para o diagnóstico e monitoramento da infecção (Pomares; Montoya, 2016). A imunoglobulina isótipo IgA pode persistir por períodos prolongados no corpo. Testes para a detecção de IgA mostraram ser mais sensíveis do que aqueles para a detecção de anticorpos IgM em fetos e recém-nascidos. Além disso, IgA pode ser particularmente útil na identificação de pacientes em risco de reativação, como aqueles com AIDS ou os que passaram por transplantes de medula óssea (Montoya; Liesenfeld, 2004). Imunoglobulina A específica foi detectada no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com AIDS e encefalite toxoplásmica (Pinon et al., 1995).

O estudo de Lee et al. (2019) mostrou que a vacinação com partículas semelhantes a vírus contendo múltiplas proteínas antigênicas *T. gondii* induziu níveis mais elevados de resposta de IgA em fezes em comparação com o grupo controle não vacinado. Isso sugere que a vacinação com essas partículas pode desempenhar um papel na indução de uma resposta imune eficaz contra o parasita.

A interação entre os plasmócitos produtores de IgA e as células epiteliais das mucosas é crucial para a imunidade mucosa. As células epiteliais das mucosas secretam a IgA, que desempenha um papel fundamental na primeira defesa das superfícies mucosas contra patógenos. Esses plasmócitos produtores de IgA presentes nas mucosas, portanto, são estimulados pela presença de antígenos e produzem IgA específica para esses antígenos. Essa, por sua vez, é então transportada através das células epiteliais das mucosas e liberada na superfície mucosa, onde pode neutralizar patógenos e impedir sua adesão e invasão. Essa interação é essencial para a defesa eficaz das mucosas contra infecções (Khan; Noordin, 2019).

Diversas estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas visando potencializar a resposta dos plasmócitos produtores de IgA na toxoplasmose, como a administração de agentes imunomoduladores que estimulem a produção de IgA. Isso pode incluir o uso de probióticos, que têm sido associados ao aumento da produção de IgA nas mucosas, bem como a administração de certos tipos de vacinas que visam especificamente aumentar a resposta de IgA. Além disso, a terapia com imunoglobulina polivalente (IVIG) também pode ser considerada em casos de deficiência de IgA. Estas estratégias terapêuticas visam fortalecer a imunidade mucosa e proteger contra infecções em mucosas, como as causadas

pelo *T. gondii* (Khan; Noordin, 2019). Além disso, a vacinação com essas partículas também induziu respostas de células T e B de memória, incluindo citocinas e células secretoras de anticorpos, contribuindo para a proteção eficaz contra a infecção por *T. gondii*.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente vários estudos de meta-análise tem associado o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas e infecção crônica por *T. gondii*. Considerando a carência de estudos que comparem os genes expressos no cérebro em diferentes espécies de animais infectados com *Toxoplasma*, este trabalho visou investigar a expressão de genes diferencialmente expressos em tecido cerebral de camundongos experimentalmente infectados com *T. gondii*. Esta abordagem multidisciplinar visou lançar luz sobre os aspectos genéticos e imunológicos subjacentes à infecção por *Toxoplasma*, evidenciando o contexto da infecção cerebral por *Toxoplasma gondii*, oferecendo insights cruciais para futuras estratégias terapêuticas.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo investigar e analisar, por meio da revisão de produções científicas das bases de dados NCBI GEO, Pubmed e EBI, a expressão de genes relacionados à resposta imune cerebral à *Toxoplasma gondii*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Realizar busca bibliográfica em banco de dados aberto como PubMed, NCBI GEO e EBI *ArrayExpress* de estudos relacionados a expressão genica cerebral de camundongos infectados com *T. gondii*;

3.2.2 Após a seleção do estudo mais apropriado, investigar a expressão de genes diferencialmente expressos em tecido cerebral de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii* em relação aos não infectados;

3.2.3 Análise criteriosa dos dados obtidos para seleção dos genes diferencialmente expressos mais relevantes e não estudados anteriormente;

3.2.4 Após essa etapa de seleção do gene específico dentre outros diferencialmente expressos (gene de switch de classe de cadeia pesada de imunoglobulina) e não estudado anteriormente, infecção de animais com *T. gondii* e análise na fase crônica da infecção de resposta imune relacionada (detecção de células IgA⁺ no tecido cerebral);

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condução da Análise Sistemática: Métodos Adotados

4.1.1 Estratégia de Busca Bibliográfica e base de dados

Para realizar a busca de dados, foram empregadas as seguintes palavras-chaves "cerebral + toxoplasmosis" e "Neural + toxoplasmosis".

Foram utilizadas apenas estudos realizados no período de 2019 até 2022. Os bancos de dados consultados foram o PubMed, NCBI GEO.

4.1.2 Critérios de Inclusão e Exclusão de Estudos

Foram estabelecidos critérios de inclusão rigorosos para garantir a coerência e relevância dos estudos selecionados, descritos abaixo:

- a) Linguagem: Somente artigos publicados em língua inglesa foram considerados para evitar barreiras linguísticas e facilitar a comparação entre os estudos.
- b) Tipo de estudo: Foram incluídos estudos clínicos e experimentais que examinassem a resposta imunológica frente à toxoplasmose cerebral.
- c) População: Foi priorizado a inclusão de estudos que envolvessem camundongos infectados por *Toxoplasma gondii*.

Alguns aspectos foram levados em consideração para excluir determinados estudos:

- a) Formas específicas da doença: Artigos que explorassem apenas formas oculares, auditivas ou pulmonares da toxoplasmose foram excluídos, pois o foco desta revisão é a resposta imunológica frente à toxoplasmose geral e cerebral.
- b) Infecção em animais: Estudos que se limitavam à ocorrência da toxoplasmose em animais domésticos ou silvestres foram excluídos, já que esta revisão teve como objetivo entender a resposta imunológica em seres humanos.
- c) Outras condições: Artigos que discutiam situações clínicas diferentes da toxoplasmose, como infecções virais ou bacterianas, foram excluídos.

4.1.4 Extração de Dados

Foi realizada uma análise de categorização de toxoplasmose, por meio da construção de uma tabela que relacionou cada artigo analisado com categorias específicas, incluindo genes, células, e contexto da doença (aguda, crônica, congênita). Essa abordagem permitiu a identificação e comparação das respostas imunes consideradas em cada estudo revisado, contribuindo para uma compreensão mais abrangente das diferentes abordagens e descobertas na área da toxoplasmose.

4.1.5 Análise transcriptômica

A análise de dados foi conduzida usando a linguagem de programação R no ambiente RStudio. Os conjuntos de dados coletados foram normalizados e combinados em uma única matriz para possibilitar a análise de genes específicos. Dos conjuntos de dados obtidos, apenas o estudo de Garfoot et al. 2019, conjunto de dados (GSE117504), foi ajustado ao nosso objetivo, pois os outros estudos coletados não se adequavam nos

seguintes aspectos: havia infecção conjunta de outro microrganismo junto ao *Toxoplasma gondii*, não era infecção crônica, não era infecção por animais modelos desejados (camundongos) ou após a normalização dos dados os conjuntos não possuíram um “p value” significativo.

4.1.6 Disponibilidade de Dados e Código

O conjunto de dados de encefalite crônica por *T. gondii* está publicamente disponível no GEO sob a referência GSE117504. O código usado para gerar a análise está disponível no repositório do Github:

(https://github.com/czarnewski/toxoplasma_kinetics).

4.2 Experimentos In Vivo

4.2.1 Animais

Para conduzir os experimentos *in vivo*, utilizamos camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com uma idade de oito semanas. Os animais foram alojados nas instalações da Universidade Federal de Uberlândia, especificamente na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR/UFU). Durante todo o período experimental, os camundongos permaneceram em ciclos regulares de 12 horas de luz e 12 escuro, com acesso contínuo a uma dieta balanceada e água filtrada.

Os procedimentos envolvendo os animais foram conduzidos em conformidade com os princípios éticos estabelecidos pelo governo brasileiro. Todos os protocolos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo número 011/21.

4.2.2 Cepa de *T. gondii*

A manutenção da cepa ME49 de *T. gondii* foi feita em *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae), os quais foram previamente inoculados por via intraperitoneal com 10 cistos de *T. gondii*. Após um período de aproximadamente um mês pós-infecção, o cérebro dos animais foi coletado e os cistos da cepa ME49 foram quantificados e ajustados para uma concentração de 10 cistos, os quais foram suspensos em 0,2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS; concentração de 0,1 mol/L, pH 7,2).

Esta solução, contendo os cistos foi utilizada para a infecção de camundongos experimentais por meio de administração intraperitoneal (i.p.).

4.2.3 Procedimento Experimental

Camundongos BALB/c, machos e fêmeas, foram infectados i.p. com 10 cistos de *T. gondii*. No 30º dia após a infecção, grupos de camundongos foram anestesiados com Ketamina (Syntec Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil) e Xilazina (Schering-Plough Coopers, Cotia, SP, Brasil) por via intraperitoneal e foram eutanasiados por deslocamento cervical. Amostras de sangue foram coletadas para ensaios sorológicos, e cérebros foram coletados, fixados em formalina tamponada a 10% e processados rotineiramente para inclusão em parafina e corte histológico.

4.2.4 Processamento Histológico

As seções de tecido cerebral com 4 µm de espessura foram coradas com hematoxilina- eosina (H&E) para análise histológica junto a microscopia de luz. As células positivas para IgA foram avaliadas no cérebro por meio de imunohistoquímica. As seções de tecido desparafinizadas foram colocadas em uma câmara umidificada, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de H₂O₂ e o resgate antigênico foi realizado em tampão citrato (pH 6,0) em forno micro-ondas por 7 minutos. Em

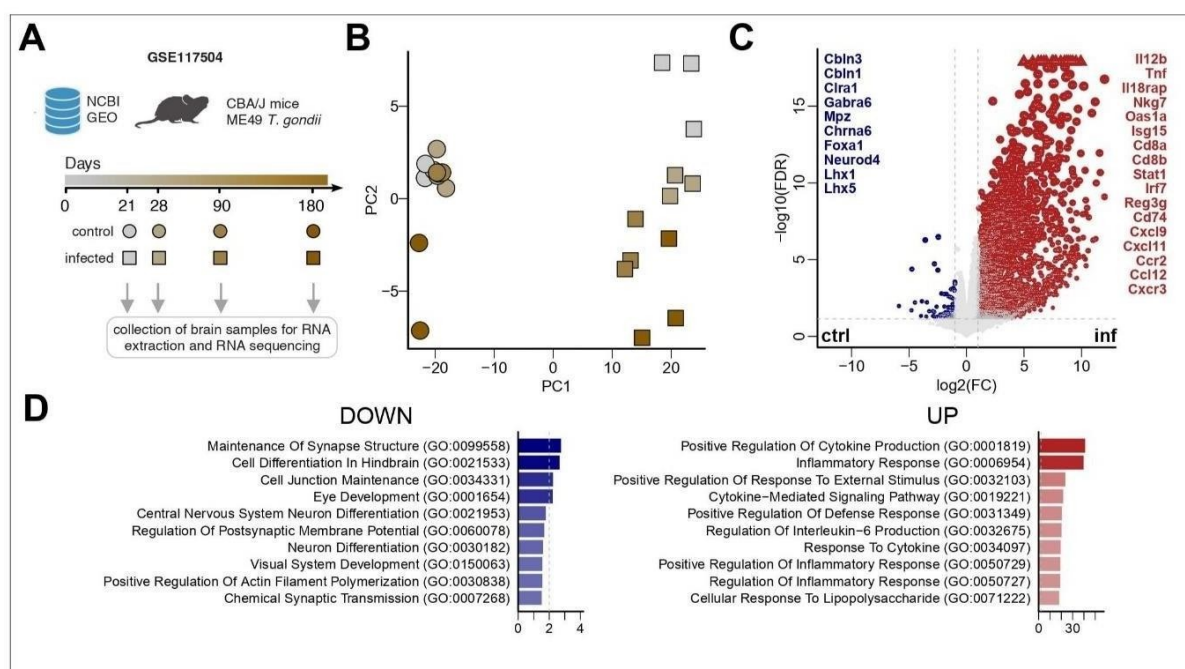
seguida, as marcações inespecíficas foram reduzida incubando as lâminas com 0,3% de leite desnatado (Molico, Nestlé®, São Paulo, SP, Brasil) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) à temperatura ambiente. Posteriormente, as seções foram permeabilizadas usando 0,01% Triton X-100 e incubadas a 4 °C durante a noite com anticorpo de cabra anti-IgA de camundongo (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) diluído em 0,01% saponina. Em seguida, as seções foram incubadas com anticorpo biotilado de jumento anti -cabra (Jackson ImmunoResearch Inc., West Groove, PA, EUA), respectivamente. A sensibilidade do ensaio foi amplificada pela adição do complexo avidina-biotina (kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) diluído 1:100. As reações foram desenvolvidas usando 3,3'-diaminobenzidina tetrahydroclorida (Sigma). Controles positivos e negativos para a presença do parasito no tecido foram incluídos para controle de qualidade das reações. As seções foram contracoradas com hematoxilina de Harris e examinadas sob um microscópio de luz usando uma objetiva de 40×. As células IgA positivas foram quantificadas por seção tecidual.

5 RESULTADOS

5.1 Exploração da infecção cerebral por *T. gondii* por meio de Sequenciamento de RNA

Para caracterizar imparcialmente a dinâmica temporal da expressão gênica no cérebro durante a infecção crônica, buscamos primeiro analisar os dados públicos GSE117504 (Garfoot et al 2019) (Figura 1A). Esse conjunto abrange uma coleção de dados transcriptômicos derivados da toxoplasmose cerebral experimental, proporcionando um recurso valioso para desvendar os intrincados mecanismos moleculares que sustentam essa doença complexa. Ele compreende uma variedade diversificada de amostras representando vários pontos no tempo durante a infecção. Notavelmente, o conjunto de dados exibiu uma qualidade robusta, evidenciada por mais de 20 milhões de leituras por amostra (Figura 1A) e valores de expressão relativa log (RLE) consistentemente estáveis após a normalização das contagens (Figura 1B). Esses resultados indicam que o GSE117504 possui boa qualidade geral das amostras.

Figura 1 – Análise de dados de sequenciamento de RNA em massa da toxoplasmose cerebral ¹



Fonte: Autor, 2024. ¹ (A) Ilustração esquemática do desenho experimental usado para coletar amostras de cérebro de camundongos infectados e não infectados sob toxoplasmose crônica. Os pontos temporais são indicados com 2-3 camundongos por grupo. (B) Análise do componente principal de todas as amostras, destacando a separação das amostras infectadas (quadrados) dos controles (círculos) e a duração da infecção (gradiente de cor). (C) Gráfico de vulcão para a assinatura conservada sob a infecção em todos os pontos temporais, onde genes significativamente regulados para cima (vermelho) e para baixo (azul) são mostrados. Genes com $-\log_{10}(\text{Pvalue})$ acima de 2 e $\log_2(\text{FC})$ acima de ± 1 (linhas tracejadas) são considerados significativos. Alguns genes selecionados estão destacados. (D) Análise funcional do conjunto de genes para genes regulados para cima e para baixo usando a Gene Ontology. Termos com $-\log_{10}(\text{Pvalue})$ acima de 2 (linhas tracejadas) são considerados significativos.

Em seguida, calculamos a variância gênica nas contagens normalizadas para identificar imparcialmente os genes cujas expressões são potencialmente alteradas ao longo do tempo e da infecção (Figura 1C). Os 500 genes mais variáveis foram selecionados para redução dimensional não supervisionada via análise de componentes principais (PCA) para visualização e exploração de dados (Figura 2B). Essa análise revelou uma segregação distinta das amostras, principalmente impulsionada pelo status da infecção ao longo do primeiro componente principal (PC1), compreendendo mais de 80% de toda a variação encontrada no conjunto de dados.

Por outro lado, a duração da infecção foi o principal fator da separação das amostras ao longo do segundo componente principal (PC2), com cerca de 5% da variância retida (Figura 2B). Essa separação sugere o papel fundamental desempenhado pela infecção na modelagem do complexo panorama molecular associado à toxoplasmose cerebral, e também que a infecção crônica não é homogênea.

Para entender o efeito da infecção a partir da duração da infecção, utilizamos um modelo linear generalizado (MLG) com EdgeR {<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>}, que é um método estatístico flexível para permitir a separação dos efeitos da infecção da variável tempo. Em outras palavras, os MLGs consideram a expressão gênica de qualquer gene como uma combinação dos efeitos das variáveis (neste caso, infecção e tempo):

$$EXP \sim infection + time$$

Com essa abordagem, identificamos mais de 2500 genes diferencialmente expressos (DEGs) em cérebros infectados versus controles não infectados, independentemente do tempo de infecção (Figura 2C). Esse número elevado de DEGs induzido pela infecção está, portanto, alinhado com os resultados da PCA, onde a infecção contribuiu mais para o PC1. O grupo de genes que aumentaram a expressão estava notavelmente associado a vias envolvidas na sinalização de citocinas (Il12b, Tnf, Il18rap), resposta imune do tipo 1 (Nkg7, Oas1a, Isg15, Cd8a/b, Stat1, Irf7), resposta a estímulos microbianos (Reg3g, Cd74, Tnf) e quimiotaxia celular (Cxcl9, Cxcl11, Ccr2, Ccl12, Cxcr3), chamando a atenção para a complexa resposta imune do hospedeiro à toxoplasmose cerebral (Figura 2D). Por outro lado, os genes que diminuíram a expressão estavam intrinsecamente ligados a vias que influenciam a estrutura sináptica (Cbln3, Cbln1), transmissão sináptica química (Gla1, Gabra6, Mpz, Chrna6, Cbln1) e desenvolvimento neuronal (Foxa1, Neurod4, Lhx1, Lhx5), sugerindo possíveis interrupções nas vias de sinalização neuronal induzidas pela infecção (Figura 2D). A lista completa de genes diferencialmente expressos e o enriquecimento das vias são apresentados nas Tabelas 1 e 2.[†] Esses achados fornecem conhecimentos sobre a complexa interação heterogênea entre a resposta imune do hospedeiro e as alterações neurofisiológicas no contexto da toxoplasmose cerebral.

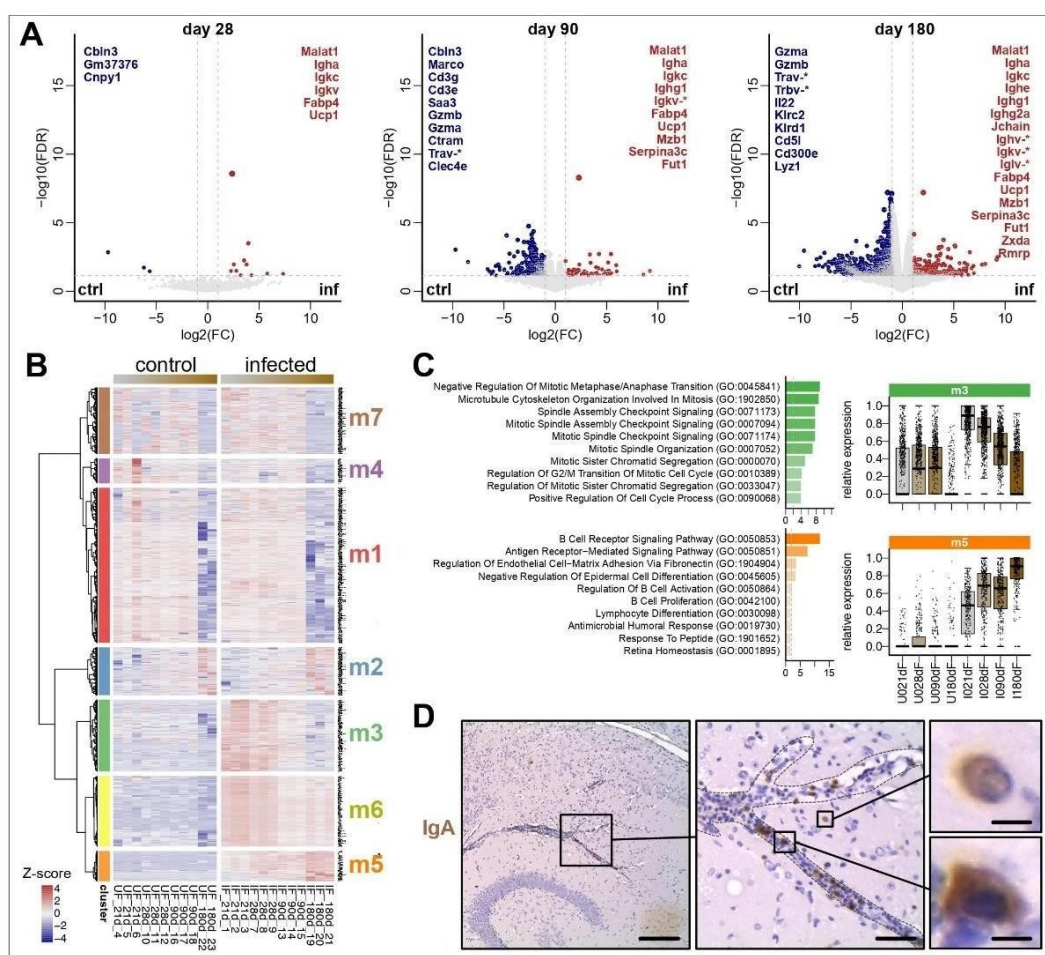
[†] **Tabela 1.** Lista de genes diferencialmente expressos.

Tabela 2. Análise funcional de conjuntos de genes diferencialmente expressos.

Tabela 3. Lista de genes presentes em cada módulo temporal.

Tabela 4. Análise funcional de conjuntos de genes por módulo temporal.

Figura 2 – Dinâmica das células B no cérebro durante a infecção crônica por *T. gondii* ²



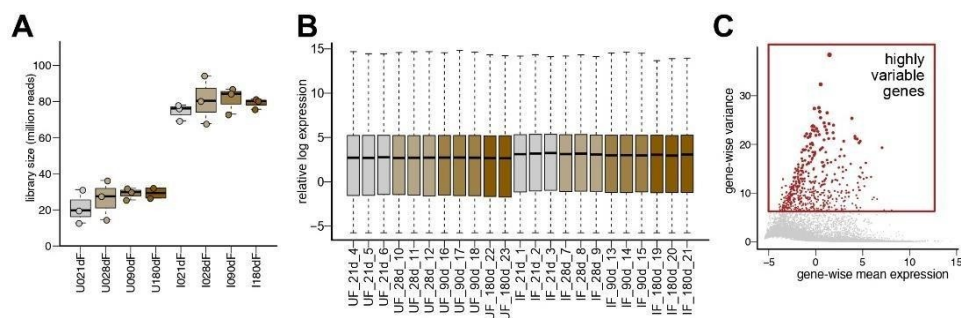
Fonte: Autor, 2024. ² (A) Gráficos de vulcão para genes que são diferencialmente expressos em cada ponto temporal, em relação aos camundongos no dia 21 da infecção. Genes selecionados regulados para cima e para baixo são mostrados. (B) Mapa de calor para todos os genes afetados temporariamente pela infecção, que foram agrupados em 7 módulos de genes distintos (m1-m7). A cor representa a expressão gênica escalonada entre as amostras (Z-score). (C) Tendência de expressão temporal e análise do conjunto de genes para os módulos de genes selecionados m3 e m5. Cada ponto representa a expressão normalizada de um gene, para todos os genes naquele módulo de gene por grupo de amostras. (D) Coloração por imunohistoquímica para IgA no cérebro de camundongos no dia 32 da infecção como realizado no estudo base. A região delimitada pela linha tracejada cinza representa o plexo coroide. Os boxplots representam os quantis 5°, 25°, 50°, 75° e 95°, respectivamente.

5.2 Genes (que tipo de genes?) relacionados às células B são destaque na toxoplasmose cerebral crônica tardia

Tendo identificado os principais genes diferencialmente expressos (DEGs) impulsionados pela infecção por *T. gondii* pelo modelo MLG, buscamos agora investigar a heterogeneidade da infecção crônica, mostrada no PC2 (Figura 2B). Portanto, calculamos a expressão diferencial ao longo dos pontos temporais, incluindo amostras de infecção crônica inicial (dia 21 e 28) e infecção crônica tardia (dias 90 e 180). Em

comparação ao dia 21, quando os primeiros taquizoítos chegam e começam a colonizar o cérebro (Zenner et al, 1998), camundongos infectados no dia 28 apresentaram apenas uns poucos genes diferencialmente expressos (11 regulados positivamente e 3 regulados negativamente) (Figura 3A). Surpreendentemente, amostras dos dias 90 e 180 de infecção apresentaram níveis muito mais elevados de DEGs, incluindo tanto regulados positivamente quanto negativamente (Figura 3A). Também observamos que muitos dos genes identificados ao longo dos pontos temporais estão significativamente desregulados, mas em diferentes níveis, incluindo genes relacionados à redução do fuso mitótico (Cdc20, Cenpf, Nuf2, Bub1b, Ttk) e diminuição da imunidade das células T (Trbc1, Nkg7, Cd3g, Cd3e, Cd3d) e citotoxicidade de células NK (Il21, Ncr1, Klrk1, Klrc2, Klrd1, Klrc1) (FigS2). Esses resultados destacam que, após a fase inicial de cronificação (cerca de 21 a 28 dias), os níveis de células T e células imunes diminuíram, o que está em linha com a interconversão de taquizoítos para bradizoítos e sua evasão da resposta imune (Zhao, 2020) e com o controle do período mitótico inicial na célula durante a diferenciação dos bradizoítos (Radke JR, 2003).

Figura 3 - Análise de controle de qualidade dos dados de RNA-seq.³



Fonte: autoria própria.³(A) Boxplot dos tamanhos das bibliotecas para cada grupo de amostras no conjunto de dados de RNA-seq. (B) Expressão relativa logarítmica (RLE) para todos os genes detectados em cada amostra. (C) Gráfico de média-variância dos genes usado para a identificação dos genes altamente variáveis no conjunto de dados. Os 500 genes mais variáveis estão destacados. Em todos os gráficos, os boxplots representam os quantis de 5%, 25%, 50%, 75% e 95%, respectivamente.

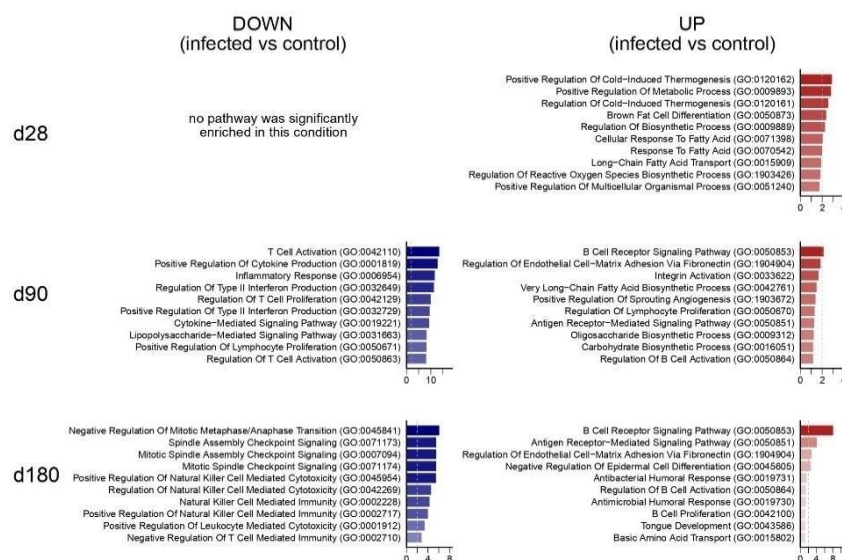
Entre os genes regulados positivamente nos dias 90 e 180 de infecção, foram identificados genes associados à função das células B, incluindo diferenciação de células B (Mzb1, Cd79a/b), genes associados a mudança de classe de anticorpos (Igha, Ighe, Ighg, Ighg2c, Jchain) e vários receptores de células B (Igkv, Ighv, Igkc, Ighe) (Figura 3A-B). Esses achados são particularmente surpreendentes porque, até onde sabemos, nunca foi descrito que as células B expandem ou migram para o cérebro sob infecção por

Toxoplasma. Elas foram relatadas em outras patologias, especialmente quando Cxrc3 e Cxcl9 são produzidos no cérebro, induzindo a diapedese das células B (Jain RW, 2022). De fato, ambas essas moléculas estavam entre os principais DEGs encontrados em cérebros cronicamente infectados (Figura 2C).

5.3 As células B migram para o cérebro na infecção crônica tardia

Decidimos investigar mais a fundo se as descobertas acima poderiam ser impulsionadas puramente pelo envelhecimento natural dos animais ou pela maturação da resposta imune sob infecção por *T. gondii*. Para isso, selecionamos todos os genes diferencialmente expressos em qualquer ponto temporal e os agrupamos em módulos de genes temporalmente coerentes (Figura 4). Entre eles, 3 módulos se destacaram: Um módulo foi enriquecido para genes na regulação negativa da resposta imune citotóxica (m6), um módulo enriquecido para assinatura de células B (m5) e um módulo enriquecido para controle da divisão celular (m3) (Figura 3B). Apenas o módulo m2 apresentou um padrão enriquecido em camundongos de 6 meses de idade (independentemente da infecção), sugerindo uma rede gênica associada à senescência/maturação. O módulo de células B m5 não apresentou genes detectados em camundongos não infectados, indicando que a expansão de células B é um fenômeno desencadeado pela inflamação (Figura 3B).

Figura 4. - Análise de conjuntos de genes das diferenças de expressão temporal.



Fonte: autoria própria⁴. O enriquecimento funcional usando Gene Ontology (versão 2023) para genes regulados para baixo e para cima é mostrado para os dias 28, 90 e 180 de infecção. Termos com um $-\log_{10}(\text{Pvalue})$ acima de 2 (linhas tracejadas) são considerados significativos.

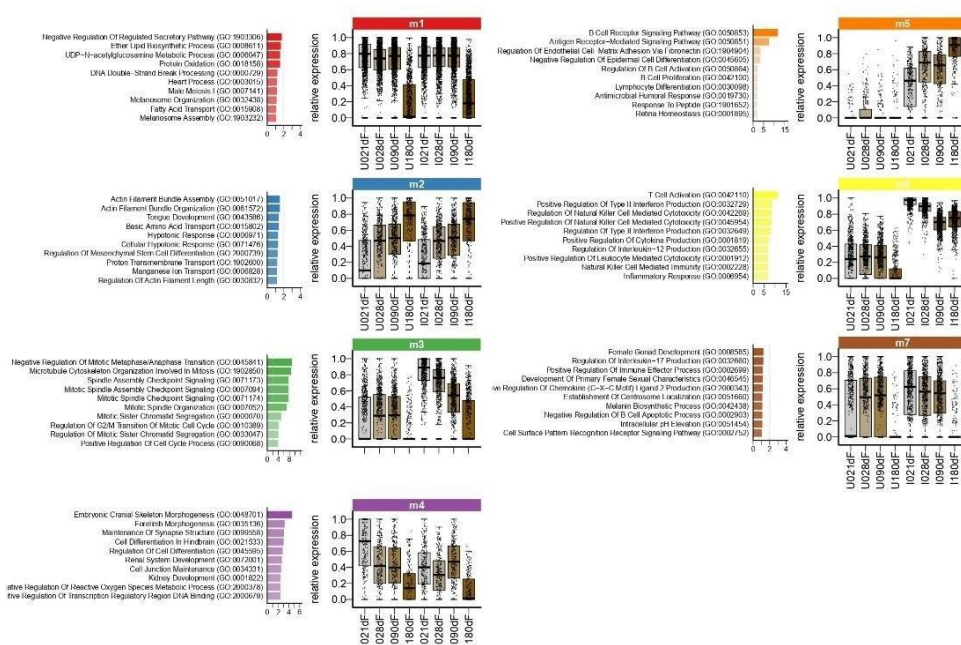
A partir desses resultados, decidimos verificar a presença de células IgA⁺ no cérebro dos animais infectados. De fato, a imunodeteção de IgA⁺ no cérebro por imuno- histoquímica mostrou que as células B são encontradas principalmente nas proximidades dos vasos da pia-máter (Figura 3D) e meninges, e uma pequena quantidade de células no parênquima (Figura 3D). Células IgA⁺ não foram detectadas no cérebro de animais não infectados. Em conclusão, mostramos pela quantificação de transcritos de células B no conjunto de dados de RNA-seq disponíveis em banco de dados e pela detecção direta de células IgA⁺ no cérebro que as células B estão ausentes no cérebro saudável e são capazes de infiltrar o cerebral sob infecção.

6 DISCUSSÃO

A infecção por *T. gondii* induz uma imunidade inata que representa a primeira linha de defesa contra o patógeno. No entanto, o parasita desenvolveu estratégias para evadir dessa resposta e persistir como uma infecção crônica, principalmente no sistema

nervoso central (SNC), sendo a resposta imune adaptativa essencial para a sobrevivência do hospedeiro infectado (Denkers EY, 1998). Para identificar fatores de imunidade, o conjunto de dados de perfil genômico do transcriptoma cerebral obtido do estudo de Garfoot et al. 2019 foi analisado para identificar genes diferencialmente expressos no cérebro nos dias 28, 90 e 180 de camundongos cronicamente infectados por *T. gondii*.

Figura 5 - Padrões de expressão de módulos de genes e seus respectivos conjuntos de genes enriquecidos.



Fonte: autoria própria.⁵ A tendência de expressão para cada módulo é mostrada para cada gene individual por réplica (pontos pretos) e para o grupo experimental como um boxplot. Os boxplots representamos quantis de 5%, 25%, 50%, 75% e 95%, respectivamente. Termos enriquecidos com um $-\log_{10}(P\text{value})$ acima de 2 (linhas tracejadas) são considerados significativos.

Amostras dos dias 90 e 180 de infecção apresentaram níveis muito mais elevados de DEGs, que estavam relacionados ao fuso mitótico das células hospedeiras, imunidade de células T e citotoxicidade de células NK. Como um parasita intracelular, *T. gondii* manipula uma ampla gama de funções celulares do hospedeiro, como a divisão celular. Os dados publicados relacionados ao ciclo celular são controversos. Alguns estudos com fibroblastos de prepúcio humano imortalizados indicam a mudança impulsionada pela infecção de G0/G1 para a fase S, com acúmulo de células hospedeiras na fase S (Lavine MD, 2009; Molestina RE, 2008) e em uma linha celular de trofoblasto humano (BeWo)

parada na fase G2/M (Brunet J, 2008), refletindo, muito provavelmente, reações específicas de tipo celular. Em células endoteliais primárias da veia umbilical bovina (BUVEC), *T. gondii* desregula o ciclo celular do hospedeiro, parando o ciclo celular em G2/M através de alterações funcionais, como erros de segregação cromossômica, alteração do fuso mitótico e bloqueio da progressão da citocinese (Velásquez ZD, 2019). Assim, como nos estudos in vitro, esses dados obtidos da análise transcriptômica sugerem que *T. gondii* é capaz de alterar o ciclo celular no cérebro infectado.

O papel e a ativação dos linfócitos T na infecção crônica por *T. gondii* estão bem caracterizados (Gazzinelli R, 1992; Kang HJ, 2019). Em relação às células NK, foi demonstrado que há um papel crítico do NKG2D das células NK na interação NK-DC, que é importante para a geração de uma imunidade robusta de células T CD8⁺ contra a infecção por *T. gondii*, protegendo os camundongos contra a alta carga parasitária no cérebro (Guan H, 2008). No entanto, as células NK regulam negativamente as células T CD8 para promover exaustão imune e persistência do parasita e infecção crônica no cérebro (Ivanova DL, 2020). Assim, as interações de longo prazo entre o parasita e o hospedeiro na infecção crônica tardia levam à diminuição dos transcritos dos linfócitos T e das células NK no órgão mais afetado na infecção crônica tardia.

Em relação às células B, seu papel na infecção por *T. gondii* é menos compreendido, principalmente no SNC. Estudos anteriores mostraram que camundongos deficientes em células B (muMT) infectados com a cepa ME-49 por via oral sobreviveram à infecção aguda, no entanto, morreram na infecção crônica inicial, com replicação do parasita e patologia em seus cérebros (Kang H, 2000). Além disso, mesmo quando vacinados com a cepa ts-4 RH, os camundongos muMT foram altamente suscetíveis ao desafio com a cepa RH, em contraste com os camundongos controles (Sayles PC, 2000). Em ambos os experimentos, a susceptibilidade dos camundongos deficientes em células B não foram relacionados a funções deficientes das células T ou capacidade diminuída de produzir IFN- γ . Curiosamente, quando os camundongos C57BL/6 muMT foram infectados oralmente com a cepa Fukaya e sofreram transferência intraperitoneal de células B-1, mas não células B-2, de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*, eles sobreviveram mais de 5 meses (Chen M, 2003). No entanto, foi demonstrado que a imunidade humoral a *T. gondii*, que é regulada por Nfkbid, um regulador nuclear de NF-

κ B, é necessária para a proteção completa contra o parasita e requer células B-1 e B-2 (Souza SP, 2021). Assim, as células B estão envolvidas na proteção contra a infecção por *T. gondii*, principalmente no cérebro cronicamente infectado. O conjunto de dados do transcriptoma cerebral obtidos por Garfoot et al. 2019 analisado neste estudo mostrou que genes associados à diferenciação de células B e troca de classe de cadeias pesadas de anticorpos estão regulados positivamente desde o dia 28 de infecção e principalmente nos dias 90 e 180. Entre as expressões dos genes de cadeias de anticorpos com troca de classe no cérebro de camundongos cronicamente infectados estavam *IGHA*, *IGHE*, *IGHGA*, *IGHG2C* e *JCHAIN*.

Há evidências de que os anticorpos podem funcionar de forma protetora *in vivo* contra a infecção por *T. gondii*. O soro imune ao *Toxoplasma* melhorou a resistência dos camundongos muMT vacinados com ts-4 (Sayles PC, 2000) ou deficientes em CD4 (Johnson LL, 2002) após um desafio com taquizoítos da cepa RH. Em ambos os casos, o soro imune continha isotipos específicos de IgG para *T. gondii*. Camundongos deficientes em células B (suprimidos neonatalmente) foram altamente suscetíveis ao desafio com *T. gondii*, no entanto, a transferência de anticorpos anti-*Toxoplasma* induziu proteção parcial, principalmente na infecção crônica (Frenkel JK, 1982).

Em relação à IgA, este é um isotipo de anticorpo predominantemente produzido nas superfícies mucosas. Portanto, a expressão do gene da cadeia pesada de anticorpo da classe IgA, *Igha*, no SNC em infecção crônica por *T. gondii* foi surpreendente. Assim, infectamos camundongos com *T. gondii* e examinamos o cérebro no dia 30 (32) de infecção para procurar células IgA⁺ no órgão. Foram observadas células IgA⁺ no cérebro de camundongos BALB/c aos 30 dias de infecção, e estas estavam localizadas principalmente nas meninges (pia mater) e nas proximidades de alguns vasos das meninges.

As meninges são compostas por três camadas celulares: a dura-máter, que é adjacente ao crânio, a aracnoide e a pia-máter, que é a camada logo acima do parênquima cerebral e da medula espinhal. Além disso, a superfície do cérebro é atravessada por veias e artérias não fenestradas envoltas pelos pés dos astrócitos (Rua R, 2018). Ao contrário

das populações endoteliais durais, a vasculatura das leptomeníngeas (aracnoide + pia- máter) apresenta junções oclusivas (Rua R, 2018). Com o protocolo utilizado no presente estudo, as células IgA⁺ estavam nas proximidades dos vasos da pia-máter, pois em nossos protocolos de dissecação cerebral, a dura + aracnoide permanecem no crânio.

A maioria das células B na dura-máter é célula B2 e uma grande fração delas são células B imaturas geradas na medula óssea do crânio (Brioschi S, 2021). Algumas células B na dura-máter são células IgA⁺ (Schafflick D, 2021). Em um estado estável de imunidade humoral meníngea, verificou-se que as meninges não desafiadas, especificamente na dura-máter de camundongos, a maioria plasmócitos peri-sinusais foram positivas para IgA (Fitzpatrick Z, 2020). Além disso, plasmócitos IgA⁺ estavam quase completamente ausentes nas meninges de camundongos germ-free (GF), mas sua presença foi restaurada em camundongos GF reconstituídos com um microbioma intestinal murino ou humano ou infectados com *Citrobacter rodentium* enteropatogênico, sugerindo que essas células podem surgir de células B no intestino e se diferenciarem em plasmócitos na dura-máter ou que essas células podem se diferenciar no intestino e migrar para a dura-máter (Fitzpatrick Z, 2020). Em camundongos deficientes em IgA infectados com *Candida*, observou-se um aumento na disseminação fúngica para o parênquima cerebral, confirmando a importância das células IgA⁺ nas meninges (Fitzpatrick Z, 2020). Assim, as células IgA⁺ podem migrar do intestino para a dura-máter e serem protetoras contra patógenos no SNC. De acordo com essa afirmação, Rojas et al. mostraram a presença no cérebro e medula espinhal de plasmócitos IgA⁺ produtores de IL10, durante inflamação em um modelo murino de esclerose múltipla (encefalomielite autoimune experimental-EAE) e essas eram derivadas do intestino, e a remoção de plasmablastos e/ou plasmócitos resultou em EAE exacerbada, que foi normalizada pela introdução de plasmócitos IgA⁺ derivados do intestino (Rojas OL, 2019). No presente estudo, as células IgA⁺ detectadas no cérebro de camundongos cronicamente infectados poderiam terem sido geradas na medula óssea do crânio e terem migrado para as meninges ou poderiam terem surgido da periferia e terem entrado no cérebro de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*. Experimentos adicionais são necessários para verificar essas hipóteses e se essas células são protetoras.

A detecção sorológica de IgA específica para *T. gondii* tem sido usada como biomarcador diagnóstico de infecção ocular (de Jesus LN, 2016) e recente em mulheres

gestantes (Olariu TR, 2019). Vários estudos têm detectado os isotipos de IgG e subclasses de IgA de forma sistêmica e nas fezes em diferentes protocolos de vacinação por vias intranasal, intramuscular ou oral, utilizando partículas semelhantes ao vírus da influenza (VLPs) ou vírus vaccinia recombinantes (rVVs) expressando diferentes proteínas antigênicas de *T. gondii* ou proteínas recombinantes de *T. gondii* (Yin LT, 2023; Kang HJ, 2019; Kang H, 2000; Lee DH, 2016; Yoon KW, 2022). Além disso, nós e outros detectamos IgA nas fezes de camundongos infectados oralmente com *T. gondii* (Zorgi NE, 2011; Araujo ECB, 2021; Araujo ECB, 2022). Foi demonstrado que a SIgA do leite humano foi capaz de inibir a replicação de *T. gondii* em enterócitos *in vitro* (Mack DG, 1992). No entanto, o papel efetivo da IgA na periferia ou no SNC na infecção por *T. gondii* ainda não é conhecido.

No parênquima cerebral, apenas um estudo mostrou a detecção de IgA específica para *T. gondii* nos homogeneizados cerebrais de camundongos infectados ou imunizados e infectados com *T. gondii* (Kang HJ, 2019). No entanto, a detecção de células IgA⁺ no cérebro de camundongos infectados com *T. gondii* nunca foi demonstrada antes. Assim, experimentos adicionais são necessários para desvendar a origem das células IgA⁺ e seus papéis nos cérebros de animais cronicamente infectados.

7 CONCLUSÃO

Ao analisar um conjunto de dados públicos sobre encefalite por *Toxoplasma*, mostrou-se que *T. gondii* promove a expressão de genes relacionados a uma potente resposta inflamatória no cérebro. Surpreendentemente, vias relacionadas ao ciclo celular, à resposta imune citotóxica e genes relacionados às células B foram alteradas temporalmente durante a cronificação da infecção. Finalmente, validamos que plasmócitos IgA⁺ são raramente encontradas no cérebro de camundongos saudáveis, mas são capazes de infiltrar o parênquima em infecção por *T. gondii*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>

AHMED, J. et al. The role of Interleukines-6, 12 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in the immune response to type 2 diabetic patients infected with toxoplasmosis. **Biochemical and Cellular Archives**, v. 19, n. 2, p. 2919-2922, 2019.

ALI, H. L.; MUSLIM, W. A. Role of MIF and HSP70 proteins in immune response for patients infected with toxoplasmosis. **Central Asian Journal of Medical and Natural Sciences**, v. 4, n. 6, p. 1273–1280, 2016.

AMERIZADEH, A. et al. Identification and real-time expression analysis of selected *Toxoplasma gondii* in-vivo induced antigens recognized by IgG and IgM in sera of acute toxoplasmosis patients. **BMC infectious diseases**, v. 13, p. 287, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-287>

ANDERSON, L. B. Fatigue and muscle pain in toxoplasmosis: insights from clinical cases. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 76, p. 45-52, 2019.

Antinori A, Larussa D, Cingolani A, Lorenzini P, Bossolasco S, Finazzi MG, et al. Italian Registry Investigative NeuroAIDS. Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2004 Dec 1;39(11):1681-91. doi: 10.1086/424877. Epub 2004 Nov 5. PMID: 15578371. <https://doi.org/10.1086/424877>

Araujo ECB, Briceño MPP, Cariaco Y, Oliveira MC, Almeida MPO, de Miranda NC, et al. *Toxoplasma gondii* Infection Decreases Intestinal 5-Lipoxygenase Expression, while Exogenous LTB4 Controls Parasite Growth. *Infect Immun*. 2022 Jul 21;90(7):e0002922. doi: 10.1128/iai.00029-22. Epub 2022 Jun 6. PMID: 35658510; PMCID: PMC9302167. <https://doi.org/10.1128/iai.00029-22>

Araujo ECB, Cariaco Y, Paulo Oliveira Almeida M, Patricia Pallete Briceño M, Neto de Sousa JE, Rezende Lima W et al. Beneficial effects of *Strongyloides venezuelensis* antigen extract in acute experimental toxoplasmosis. *Parasite Immunol*. 2021 Apr;43(4):e12811. doi: 10.1111/pim.12811. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33247953. <https://doi.org/10.1111/pim.12811>

ASHBURN, D. et al. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy? **Journal of Clinical Pathology**, v. 51, n. 4, p. 312–315,. 1998. <https://doi.org/10.1136/jcp.51.4.312>

BASTOS, L. M. et al. *Toxoplasma gondii*-derived synthetic peptides containing B-and T-cell epitopes from GRA2 protein are able to enhance mice survival in a model of experimental toxoplasmosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 59, 2016. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00059>

Bayani M, Riahi SM, Bazrafshan N, Ray Gamble H, Rostami A. *Toxoplasma gondii* infection and risk of Parkinson and Alzheimer diseases: A systematic review and meta-analysis on observational studies. *Acta Trop*. 2019 Aug;196:165-171. doi:

10.1016/j.actatropica.2019.05.015. Epub 2019 May 15. PMID: 31102579.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.015>

BERTOZZI, L. C.; SUZUKI, L. A.; ROSSI, C. L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, p. 175–7, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651999000300008>

BESSIERES, M. H. et al. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 7, p. 605–608, 1992. <https://doi.org/10.1136/jcp.45.7.605>

Bhandage AK, Kanatani S, Barragan A. Toxoplasma-Induced Hypermigration of Primary Cortical Microglia Implicates GABAergic Signaling. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Mar 20;9:73. doi: 10.3389/fcimb.2019.00073. PMID: 30949457; PMCID: PMC6436526. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00073>

BRAGA-SILVA et al. Biotherapeutic of *Toxoplasma gondii* reduces parasite load, improves experimental infection, protects myenteric neurons and modulates the immune response in mice with toxoplasmosis. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8, n. 5, p. 865–874, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2016.08.167>

Brioschi S, Wang WL, Peng V, Wang M, Shchukina I, Greenberg ZJ, et al. Heterogeneity of meningeal B cells reveals a lymphopoietic niche at the CNS borders. *Science*. 2021 Jul 23;373(6553):eabf9277. doi: 10.1126/science.abf9277. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34083450; PMCID: PMC8448524. <https://doi.org/10.1126/science.abf9277>

Brunet J, Pfaff AW, Abidi A, Unoki M, Nakamura Y, Guinard M, et al. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. *Cell Microbiol*. 2008 Apr;10(4):908–20. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01093.x. Epub 2007 Nov 14. PMID: 18005238. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01093.x>

Cabral CM, Tuladhar S, Dietrich HK, Nguyen E, MacDonald WR, Trivedi T et al. Neurons are the Primary Target Cell for the Brain-Tropic Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*. 2016 Feb 19;12(2):e1005447. doi: 10.1371/journal.ppat.1005447. PMID: 26895155; PMCID: PMC4760770. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005447>

Castaño Barrios L, Da Silva Pinheiro AP, Gibaldi D, Silva AA, Machado Rodrigues E Silva P, et al. Behavioral alterations in long-term *Toxoplasma gondii* infection of C57BL/6 mice are associated with neuroinflammation and disruption of the blood brain barrier. *PLoS One*. 2021 Oct 5;16(10):e0258199. doi: 10.1371/journal.pone.0258199. PMID: 34610039; PMCID: PMC8491889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258199>

Chao CC, Gekker G, Hu S, Peterson PK. Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. *J Immunol*. 1994 Feb 1;152(3):1246–52. PMID: 8301129. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.152.3.1246>

Chen M, Mun HS, Piao LX, Aosai F, Norose K, Mohamed RM, et al. Induction of protective immunity by primed B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected B cell-deficient mice. *Microbiol Immunol*. 2003;47(12):997–1003. doi: 10.1111/j.1348-0421. Sep 2003.tb03460.x.

PMID: 14695450. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03460.x>

CHEN, M. et al. Anti-HSP70 Autoantibody formation by B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4893–4899, 2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4893-4899.2000>

CORREA, D. et al. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 651–660, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00982.x>

CORREIA, C. et al. Features to validate cerebral toxoplasmosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 373–376, 2013. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-1202-2013>

COSTA, J. G.; DURÉ, A. B. Immunochemical evaluation of two *Toxoplasma gondii* GRA8 sequences to detect acute toxoplasmosis infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 229–236, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.09.021>

Daher, D., Shaghlil, A., Sobh, E., Hamie, M., Hassan, M.E., Moumneh, M.B., Itani, S., El Hajj, R., Tawk, L., El Sabban, M. and El Hajj, H., 2021. Comprehensive overview of *Toxoplasma gondii*-induced and associated diseases. *Pathogens*, 10(11), p.1351. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111351>

de Jesus LN, Tonini Ade C, Barros GB, Coelho-dos-Reis JG, Béla SR, Antonelli LR, et al. IgA and IgG1 reactivities assessed by flow cytometry mirror clinical aspects of infants with ocular congenital toxoplasmosis. *J Immunol Methods*. 2016 Jan;428:1-8. doi: 10.1016/j.jim.2015.11.004. Epub 2015 Nov 22. PMID: 26592658. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.11.004>

DECOSTER, A. et al. IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 332, n. 8620, p. 1104–1107, 1988. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)90523-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)90523-5)

Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Oct;11(4):569-88. doi: 10.1128/CMR.11.4.569. PMID: 9767056; PMCID: PMC88897. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.569>

DESESTRET, V. et al. CSF IgA NMDAR antibodies are potential biomarkers for teratomas in anti-NMDAR encephalitis. **Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation**, v. 2, n. 6, p. e166, 2015. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000166>

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. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

DUNAY, I. R. et al. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 2018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-17>

ELSHEIKHA, H. M.; MARRA, C. M.; ZHU, X.-Q. Epidemiology, pathophysiology,

diagnosis, and management of cerebral toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.1128/CMR.00115-19>

EZA, D.; LUCAS, S. Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. **HIV Medicine**, v. 7, n. 6, p. 415–420, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1293.2006.00393.x>

FATOOHI, A. F. et al. Heterogeneity in cellular and humoral immune responses against *Toxoplasma gondii* antigen in humans. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 136, n. 3, p. 535–541, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02466.x>

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 104, n. 2, p. 133–148, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200003>

Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Gross U, Hadding U. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol Res.* 1997 Apr;83(7):637-41. doi: 10.1007/s004360050311. PMID: 9272550. <https://doi.org/10.1007/s004360050311>

Fitzpatrick Z, Frazer G, Ferro A, Clare S, Bouladoux N, Ferdinand J et al. Gut-educated IgA plasma cells defend the meningeal venous sinuses. *Nature*. 2020 Nov;587(7834):472-476. doi: 10.1038/s41586-020-2886-4. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33149302; PMCID: PMC7748383. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2886-4>

FLECK, D. G. Annotation: Diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, n. 2, p. 191–193, 1989. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.2.191>

FOUDRINIER et al. Value of specific immunoglobulin a detection by two immunocapture assays in the diagnosis of toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 585–590, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF01690729>

Frenkel JK, Taylor DW. Toxoplasmosis in immunoglobulin M-suppressed mice. *Infect Immun.* 1982 Oct;38(1):360-7. doi: 10.1128/iai.38.1.360-367.1982. PMID: 6982863; PMCID: PMC347738. <https://doi.org/10.1128/iai.38.1.360-367.1982>

Garfoot AL, Cervantes PW, Knoll LJ. Transcriptional Analysis Shows a Robust Host Response to *Toxoplasma gondii* during Early and Late Chronic Infection in Both Male and Female Mice. *Infect Immun.* 2019 Apr <https://doi.org/10.1101/523183>

Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1992 Jul 1;149(1):175-80. PMID: 1351500. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.149.1.175>

GIRALDO, M. et al. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *toxoplasma gondii* differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1453–60, 2000. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.4.1453-1460.2000>

GÓMEZ-CHÁVEZ, F. et al. Maternal immune response during pregnancy and vertical transmission in human toxoplasmosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00285>

Guan H, Moretto M, Bzik DJ, Gigley J, Khan IA. NK cells enhance dendritic cell response against parasite antigens via NKG2D pathway. *J Immunol.* 2007 Jul 1;179(1):590-6. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.590. PMID: 17579080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.590>

GUTIÉRREZ, J. et al. Detection of IgA and low-avidity IgG antibodies for the diagnosis of recent active toxoplasmosis. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 3, n. 6, p. 658–662, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1997.tb00474.x>

Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996 Nov;55(11):1150-6. doi: 10.1097/00005072-199611000-00006. PMID: 8939198. DOI: 10.1097/00005072-199611000-00006. <https://doi.org/10.1097/00005072-199611000-00006>

HERNÁNDEZ-DE-LOS-RÍOS, A. et al. Influence of two major *Toxoplasma gondii* virulence factors (ROP16 and ROP18) on the immune response of peripheral blood mononuclear cells to human toxoplasmosis infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 4 dez. 2019. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00413>

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634–640, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>

Ivanova DL, Krempels R, Denton SL, Fettel KD, Saltz GM, Rach D, et al. NK Cells Negatively Regulate CD8 T Cells to Promote Immune Exhaustion and Chronic *Toxoplasma gondii* Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Jul 8;10:313. doi: 10.3389/fcimb.2020.00313. PMID: 32733814; PMCID: PMC7360721. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00313>

J, Remington JS, Montoya JG. Role of *Toxoplasma* IgA as Part of a Reference Panel for the Diagnosis of Acute Toxoplasmosis during Pregnancy. *J Clin Microbiol.* 2019 Jan 30;57(2):e01357-18. doi: 10.1128/JCM.01357-18. PMID: 30463899; PMCID: PMC6355551. <https://doi.org/10.1128/JCM.01357-18>

Jain RW, Yong VW. B cells in central nervous system disease: diversity, locations and pathophysiology. *Nat Rev Immunol.* 2022 Aug;22(8):513-524. doi: 10.1038/s41577-021-00652-6. Epub 2021 Dec 13. PMID: 34903877; PMCID: PMC8667979. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00652-6>

Johnson LL, Sayles PC. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect Immun.* 2002 Jan;70(1):185-91. doi: 10.1128/IAI.70.1.185-191.2002. PMID: 11748181; PMCID: PMC127596. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.185-191.2002>

JOHNSON, A. B. *Toxoplasma gondii* infection in humans: a comprehensive review. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 1-17, 2018.

- Kang H, Remington JS, Suzuki Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol*. 2000 Mar 1;164(5):2629-34. doi: 10.4049/jimmunol.164.5.2629. PMID: 10679102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2629>
- Kang HJ, Chu KB, Lee SH, Kim MJ, Park H, Jin H, et al. Virus-like Particle Vaccine Containing *Toxoplasma gondii* Rhoptry Protein 13 Induces Protection against *T. gondii* ME49 Infection in Mice. *Korean J Parasitol*. 2019 Oct;57(5):543-547. doi: 10.3347/kjp.2019.57.5.543. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31715698; PMCID: PMC6851246. <https://doi.org/10.3347/kjp.2019.57.5.543>
- Khan IA, Hwang S, Moretto M. *Toxoplasma gondii*: CD8 T Cells Cry for CD4 Help. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 May 1;9:136. doi: 10.3389/fcimb.2019.00136. PMID: 31119107; PMCID: PMC6504686. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00136>
- KHAN, A. H.; NOORDIN, R. Serological and molecular rapid diagnostic tests for *Toxoplasma* infection in humans and animals. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 1, p. 19–30, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03680-2>
- KHAN, I. A.; MORETTO, M. Immune responses to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion in Immunology**, v. 77, p. 102226, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102226>
- KOCHANOWSKY, J. A.; KOSHY, A. A. *Toxoplasma gondii*. **Current Biology**, v. 28, n. 14, p. R770–R771, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.035>
- Lavine MD, Arrizabalaga G. Induction of mitotic S-phase of host and neighboring cells by *Toxoplasma gondii* enhances parasite invasion. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 Mar;164(1):95-9. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.11.014. Epub 2008 Dec 6. PMID: 19111577; PMCID: PMC2654716. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.11.014>
- Lee DH, Lee SH, Kim AR, Quan FS. Virus-Like Nanoparticle Vaccine Confers Protection against *Toxoplasma gondii*. *PLoS One*. 2016 Aug 22;11(8):e0161231. doi: 10.1371/journal.pone.0161231. PMID: 27548677; PMCID: PMC4993474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161231>
- LEE, S.-H. et al. Virus-like particles containing multiple antigenic proteins of *Toxoplasma gondii* induce memory T cell and B cell responses. **PloS One**, v. 14, n. 8, p. e0220865, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220865>
- Li ZY, Guo HT, Calderón-Mantilla G, He JJ, Wang JL, Bonev BB, et al. Immunostimulatory efficacy and protective potential of putative TgERK7 protein in mice experimentally infected by *Toxoplasma gondii*. *Int J Med Microbiol*. 2020 Jul;310(5):151432. doi: 10.1016/j.ijmm.2020.151432. Epub 2020 May 30. PMID: 32654774. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151432>

LI, S. et al. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. **Clinical and Laboratory Immunology**, v. 7, n. 4, p. 781–787, 2000. <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.5.781-787.2000>

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

LOPEZ, A. et al. Preventing congenital toxoplasmosis. MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. **Recommendations and reports**, v. 49, n. RR-2, p. 59–68, 2000.

LU, F.; HUANG, S.; KASPER, L. H. CD4 + T cells in the pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. **infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 4966–4972, set. 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.4966-4972.2004>

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*. 1992 Aug;15(2):211-22. doi: 10.1093/clinids/15.2.211. PMID: 1520757. <https://doi.org/10.1093/clinids/15.2.211>

Mack DG, McLeod R. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. *J Clin Invest*. 1992 Dec;90(6):2585-92. doi: 10.1172/JCI116153. PMID: 1469104; PMCID: PMC443418. <https://doi.org/10.1172/JCI116153>

Matta SK, Rinkenberger N, Dunay IR, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Jul;19(7):467-480. doi: 10.1038/s41579-021-00518-7. Epub 2021 Feb 24. PMID: 33627834. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00518-7>

MENDEZ, O. A.; KOSHY, A. A. *Toxoplasma gondii*: entry, association, and physiological influence on the central nervous system. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 7, p. e1006351, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006351>

Milne, G., Webster, J. P., & Walker, M., 2020. *Toxoplasma gondii*: an underestimated threat?. *Trends in parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.005>

Molan A, Nosaka K, Hunter M, Wang W. Global status of *Toxoplasma gondii* infection: systematic review and prevalence snapshots. *Trop Biomed*. 2019 Dec 1;36(4):898-925. PMID: 33597463.

Molestina RE, El-Guendy N, Sinai AP. Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. *Cell Microbiol*. 2008 May;10(5):1153-65. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01117.x. Epub 2008 Jan 7. PMID: 18182087; PMCID: PMC2647804. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01117.x>

MONTORSI, L.; SIU, J. H. Y.; SPENCER, J. B. B cells in human lymphoid structures. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 210, n. 3, p. 240–252, 31 dez. 2022. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac101>

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004 Jun 12;363(9425):1965-76.

doi: 10.1016/S0140-6736(04)16412-X. PMID: 15194258. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. Supplement_1, p. S73–S82, 2002. <https://doi.org/10.1086/338827>

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n° 9425, p. 1965-1976, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

NASCIMENTO, F. S. et al. Toxoplasma-specific IgG subclass antibody response in cerebrospinal fluid samples from patients with cerebral toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. 5, p. 439–442, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500013>

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 148, p. 369-372, 1909.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1908.

OLARIU, T. R. et al. Role of Toxoplasma IgA as part of a reference panel for the diagnosis of acute toxoplasmosis during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 2, 2019. <https://doi.org/10.1128/JCM.01357-18>

Ortiz-Guerrero G, Gonzalez-Reyes RE, de-la-Torre A, Medina-Rincón G, Nava-Mesa MO. Pathophysiological Mechanisms of Cognitive Impairment and Neurodegeneration by Toxoplasma gondii Infection. *Brain Sci.* 2020 Jun 12;10(6):369. doi: 10.3390/brainsci10060369. PMID: 32545619; PMCID: PMC7349234. <https://doi.org/10.3390/brainsci10060369>

Ortiz-Guerrero, G., Gonzalez-Reyes, R.E., de-la-Torre, A., Medina-Rincón, G. and Nava-Mesa, M.O., 2020. Pathophysiological mechanisms of cognitive impairment and neurodegeneration by Toxoplasma gondii infection. *Brain sciences*, 10(6), p.369. <https://doi.org/10.3390/brainsci10060369>

PARK, J. et al. Impact of Interleukin-27p28 on T and B cell responses during toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 12, p. e00668-19, 2019. <https://doi.org/10.1128/IAI.00455-19>

PINON, J. M. et al. Evaluation of risk and diagnostic value of quantitative assays for anti-Toxoplasma gondii immunoglobulin A (IgA), IgE, and IgM and analytical study of specific IgG in immunodeficient patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 878–884, 1995. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.4.878-884.1995>

POMARES, C.; MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2448–2454, 2016. <https://doi.org/10.1128/JCM.00487-16>

PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses).

Disponível em: <https://www.prisma-statement.org/>. Acesso em: 20 fev. 2024.

Radke JR, Guerini MN, Jerome M, White MW. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Oct;131(2):119-27. doi: 10.1016/s0166-6851(03)00198-1. PMID: 14511810. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00198-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00198-1)

RADKE, J. R. et al. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 119–127, out. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00198-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00198-1)

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M.-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

RODRIGUES, S. et al. *Toxoplasma gondii* infection damages the perineuronal nets in a murine model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200007>

Rojas OL, Pröbstel AK, Porfilio EA, Wang AA, Charabati M, Sun T, et al. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell*. 2019 Jan 24;176(3):610-624.e18. doi: 10.1016/j.cell.2018.11.035. Epub 2019 Jan 3. Erratum in: *Cell*. 2019 Apr 4;177(2):492-493. PMID: 30612739; PMCID: PMC6903689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.035>

Rua R, McGavern DB. Advances in Meningeal Immunity. *Trends Mol Med*. 2018 Jun;24(6):542-559. doi: 10.1016/j.molmed.2018.04.003. Epub 2018 May 3. PMID: 29731353; PMCID: PMC6044730. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.04.003>

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science*, v. 108, n. 2815, p. 660–663, 10 dez. 1948. <https://doi.org/10.1126/science.108.2815.660>

SABIN, A. B.; OLITSKY, P. K. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science*, v. 85, n. 2205, p. 336–338, 1937. <https://doi.org/10.1126/science.85.2205.336>

Sadeghi M, Riahi SM, Mohammadi M, Saber V, Aghamolaie S, Moghaddam SA, et al. An updated meta-analysis of the association between *Toxoplasma gondii* infection and risk of epilepsy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2019 Aug 1;113(8):453-462. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz025>

SAKAMOTO, K. P.; DE MELO, G. D.; MACHADO, G. F. T and B lymphocytes in the brains of dogs with concomitant seropositivity to three pathogenic protozoans: *Leishmania chagasi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 1, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-226>

SANA, M. et al. Immune response against toxoplasmosis—some recent updates RH: *Toxoplasma gondii* immune response. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 36, p. 039463202210784, 2022. <https://doi.org/10.1177/03946320221078436>

SARAF, P. et al. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. **Experimental Parasitology**, v. 174, p. 25–30, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.01.009>

Sasai M, Yamamoto M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Mol Med*. 2019 Dec 11;51(12):1-10. doi: 10.1038/s12276-019-0353-9. PMID: 31827072; PMCID: PMC6906438. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0353-9>

Sayles PC, Gibson GW, Johnson LL. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2000 Mar;68(3):1026-33. doi: 10.1128/IAI.68.3.1026-1033.2000. PMID: 10678903; PMCID: PMC97244. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1026-1033.2000>

SAYLES, P. C.; GIBSON, G. W.; JOHNSON, L. L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1026–1033, 1 mar. 2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1026-1033.2000>

Schafflick D, Wolbert J, Heming M, Thomas C, Hartlehnert M, Börsch AL, et al. Single-cell profiling of CNS border compartment leukocytes reveals that B cells and their progenitors reside in non-diseased meninges. *Nat Neurosci*. 2021 Sep;24(9):1225-1234. doi: 10.1038/s41593-021-00880-y. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34253922. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00880-y>

SHALLBERG, L. A. et al. Impact of secondary TCR engagement on the heterogeneity of pathogen-specific CD8⁺ T cell response during acute and chronic toxoplasmosis. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 6, p. e1010296–e1010296, 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010296>

SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. **Traffic**, v. 4, n. 9, p. 581–586, 2003. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00117.x>

SINGH, J. et al. *Toxoplasma* IgG and IgA, but not IgM, antibody titers increase in sera of immunocompetent mice in association with proliferation of tachyzoites in the brain during the chronic stage of infection. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 14-15, p. 1252–1257, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.07.016>

SMITH, N. C. et al. Control of human toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 2-3, p. 95–121, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.001>

Souza SP, Splitt SD, Sánchez-Arcila JC, Alvarez JA, Wilson JN, Wizzard S, et al. Genetic mapping reveals Nfkbid as a central regulator of humoral immunity to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*. 2021 Dec 6;17(12):e1010081. doi: 10.1371/journal.ppat.1010081. PMID: 34871323; PMCID: PMC8675933. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010081>

SPLENDORE, A. Un nuovo protozooario parasitico de' conigli. Incontrati nelle lesioni anatomiche di una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. **a Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo**, v. 3, p. 109–112, 1908.

STROEHLE, A. et al. Performance of a Western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 561–563, 2005. <https://doi.org/10.1645/GE-423R>

Sutterland AL, Fond G, Kuin A, Koeter MW, Lutter R, van Gool T, et al. Beyond the association. *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand*. 2015 Sep;132(3):161-79. doi: 10.1111/acps.12423. Epub 2015 Apr 15. PMID: 25877655. <https://doi.org/10.1111/acps.12423>

TAIT, E. D.; HUNTER, C. A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 201-209, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200013>

TAKAHASHI, E. E.; ROSSI, C. L. IgM and IgA antibody responses in 12 cases of human acquired toxoplasmosis. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 39, n. 6, p. 327–331, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651997000600004>

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217–1258, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

TORRES-MORALES, E. et al. Th1 and Th2 immune response to P30 and ROP18 peptides in human toxoplasmosis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, n. 5, p. 315–322, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0339-0>

Velásquez ZD, Conejeros I, Larrazabal C, Kerner K, Hermosilla C, Taubert A. *Toxoplasma gondii*-induced host cellular cell cycle dysregulation is linked to chromosome missegregation and cytokinesis failure in primary endothelial host cells. *Sci Rep*. 2019 Aug 29;9(1):12496. doi: 10.1038/s41598-019-48961-0. PMID: 31467333; PMCID: PMC6715697. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48961-0>

WÄLCHLI, T. et al. Shaping the brain vasculature in development and disease in the single-cell era. **Nature Reviews Neuroscience**, p. 1–28, 2023.

WEINMAN, D.; CHANDLER, A. H. Toxoplasmose nos suínos e roedores. Transmissão oral recíproca e potencial perigo para o homem. **Experimental Biology and Medicine**, v. 87, n. 1, p. 211–216, 1954. <https://doi.org/10.3181/00379727-87-21337>

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. H. Fetal encephalomyelitis: prenatal inception of infantile toxoplasmosis. **Science**, v. 93, n. 2423, p. 548-549, 6 jun. 1941. <https://doi.org/10.1126/science.93.2423.548>

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. H. Toxoplasmic encephalomyelitis: III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. **The American Journal of Pathology**, v. 15, n. 6, p. 657-694, 1939.

Yin LT, Ren YJ, You YJ, Yang Y, Wang ZX, Wang HL. Intranasal immunisation with recombinant *Toxoplasma gondii* uridine phosphorylase confers resistance against acute toxoplasmosis in mice. *Parasite*. 2023 Nov;30:46. doi: 10.1051/parasite/2023047. Epub 2023 Nov 2. PMID: 37921620; PMCID: PMC10624161. <https://doi.org/10.1051/parasite/2023047>

Yin, K., Xu, C., Zhao, G. and Xie, H., 2022. Epigenetic manipulation of psychiatric behavioral disorders induced by *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, p.803502. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.803502>

Yoon KW, Chu KB, Kang HJ, Kim MJ, Eom GD, Quan FS. Orally Administrated Recombinant Vaccinia Virus Displaying ROP4 Induces Protection against *Toxoplasma gondii* Challenge Infection. *Vaccines*. 2022 Jan 20;10(2):152. doi: 10.3390/vaccines10020152. PMID: 35214611; PMCID: PMC8878533. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020152>

Zenner L, Darcy F, Capron A, Cesbron-Delauw MF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. *Exp Parasitol*. 1998 Sep;90(1):86-94. doi: 10.1006/expr.1998.4301. PMID: 9709034. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4301>

ZENNER, L. et al. Infection with *toxoplasma gondii* RH and prugniaud strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection. *Pathology - Research and Practice*, v. 195, n. 7, p. 475–485, jan. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(99\)80051-X](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(99)80051-X)

ZENNER, L. et al. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 86–94, set. 1998. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4301>

Zhao XY, Ewald SE. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J Clin Invest*. 2020 Jul 1;130(7):3370-3380. doi: 10.1172/JCI136226. PMID: 32609097; PMCID: PMC7324197. <https://doi.org/10.1172/JCI136226>

ZHAO, X.-Y.; EWALD, S. E. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 7, p. 3370–3380, 2020. <https://doi.org/10.1172/JCI136226>

ZHENG, W. et al. Identification of hub genes associated with bladder cancer using bioinformatic analyses. **Translational Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. 1330–1343, 1 maio 2022.

Zorgi NE, Costa A, Galisteo AJ Jr, do Nascimento N, de Andrade HF Jr. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. *Immunol Lett*. 2011 Aug 30;138(2):187-96. doi: 10.1016/j.imlet.2011.04.007. Epub 2011 Apr 25. PMID: 21545808.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais



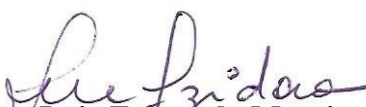
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Avaliação do estresse oxidativo em doença neurodegenerativa desenvolvida na infecção experimental crônica por *Toxoplasma gondii* em modelo murino”**, protocolo nº **011/21**, sob a responsabilidade de **Neide Maria da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA)** da **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**, em reunião 01 de dezembro de 2023.

(We certify that the project entitled **“Avaliação do estresse oxidativo em doença neurodegenerativa desenvolvida na infecção experimental crônica por *Toxoplasma gondii* em modelo murino”**, protocol **011/21**, under the responsibility of **Neide Maria da Silva** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of December 01th, 2023).

Vigência do Projeto	Início: 01/10/2021 Término: 01/08/2026
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico C57BL/6 Camundongo isogênico BALB/c
Número de animais	288
Peso / Idade	18g a 22g/ 8 – 12
Sexo	Fêmea
Origem / Local	REBIR – UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR - UFU

Alteração realizada: Alteração na data término de 01/10/2024 para 01/08/2026.


Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais
Coordenador da CEUA
Portaria R Nº 4028/2023