



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**Perfil fenotípico de cepas típicas e recombinantes de *Toxoplasma gondii*  
(Nicolle & Manceaux, 1909) isoladas de animais de produção:  
infectividade, cistogênese e relação com a virulência molecular**

**MÜLLER RIBEIRO ANDRADE**

**RECIFE**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**Perfil fenotípico de cepas típicas e recombinantes de *Toxoplasma gondii***  
**(Nicolle & Manceaux, 1909) isoladas de animais de produção:**  
**infectividade, cistogênese e relação com a virulência molecular**

**MÜLLER RIBEIRO ANDRADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal (área de concentração Biotecnologia, na linha de Pesquisa Microbiologia e Parasitologia Aplicada) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

**Orientador:** Dr. Rinaldo Aparecido Mota

**Coorientador:** Dr. Wagner José Nascimento Porto

**RECIFE**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A553p Andrade, Müller Ribeiro  
Perfil fenotípico de cepas típicas e recombinantes de  
*Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) isoladas de  
animais de produção: infectividade, cistogênese e relação com a  
virulência molecular/ Müller  
Ribeiro Andrade. - 2019.  
133 f.: il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.  
Coorientador: Wagner José Nascimento Porto.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife,  
BR-PE, 2019.  
Inclui referências.

1. Toxoplasmose em animais 2. Protozoologia 3. *Toxoplasma  
gondii* 4. Fenótipo 5. Células - Proliferação I. Mota, Rinaldo  
Aparecido, orient. II. Porto, Wagner José Nascimento, coorient.  
III. Título

CDD 636.089

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

---

Müller Ribeiro Andrade

Data de aprovação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota- UFRPE  
Orientador

---

Profa. Dra. Ricardo Wagner Dias Portela - UFBA

---

Profa. Dra. Jaqueline Bianque de Oliveira - UFRPE

---

Profa. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior - UFRPE

---

Dr. Rafael Antonio do Nascimento Ramos - UFRPE

A ela que motiva cada pensamento meu,  
pela amizade, pelo cuidado e  
pelo amor incondicional.

**À “mainha” Maria das Virgens, dedico**

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço ao Mistério Divino por nos permitir existir, viver e evoluir.

“O importante de uma escalada não é o chegar ao cume, mas as ajudas que temos nas dificuldades da subida e o compartilhar da vista no final”. Assim, agradeço a todos que caminharam comigo, sem ordem de importância, pois nessa trajetória fui presenteado com pessoas que me modificaram, ensinaram, deixaram e receberam algo.

Ao Prof. Rinaldo, agradeço-lhe não apenas pelo que aprendi cientificamente, pois isso não se compara com todo ensinamento de humanidade. Seu olhar para o outro é sempre de cuidado e afeto. Obrigado pela amizade e a confiança estabelecida nesses quatro anos.

Prof. Wagner, responsável por minha vinda a UFRPE, obrigado por tudo! Tenho imensa gratidão por tê-lo como coorientador e amigo.

Família do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais (LDIC/UFRPE), membros atuais e passados, obrigado pelas trocas diárias, por fazer a rotina laboral prazerosa e por me ensinar que sempre podemos ser pessoas mais empática. Em especial a Renata e Ceça, parceiras de cultivos, sofrimentos e alegrias e aos PIBICs Jéssica e Renato, pela dedicação e empenho nas atividades.

*Agradezco al grupo de investigación SALUVET (Departamento de Sanidad Animal/ Facultad de Veterinaria/ Universidad Complutense de Madrid), en nombre de Prof. Luis Ortega-Mora y Javier Regidor, por traerme a un proyecto innovador, enseñarme las técnicas desarrolladas en esta tesis y por todos los días felices y agradables que pasé durante mi estancia en España. Gracias a Laura, Marta, Lola, Pili, Carlos, Patri, Laurita, Moreno, Rober, Profa. Gema, Prof. Esther, Prof. Ignacio y, en especial, a Alex que estuvo a mí lado en la rutina de los cultivos celulares y siempre que era solicitado ayuda. ¡Gracias!*

Obrigado Zé Wilson, Adriana e seus filhos João Wilson e Adriele por terem aberto a porta de sua casa para me acolher de forma calorosa e cuidadosa durante a estadia na Espanha, me senti como no Brasil!

Agradeço à minha família, pelo incentivo, apoio, amor imensurável e presença mesmo distante: meus avós Angelita e Pedro, a meu pai Rutivaldo, meu irmão Vinícius, aos meus amáveis sobrinhos João e Clara, tias, tios, primas, primos e todos mais. Com destaque a “Mainha”, a quem dedico não só essa tese, mas cada segundo de minha vida!

À Nil que esteve comigo nos altos e baixos, que arranca meu melhor sorriso e me desperta o sentimento mais valioso, minha eterna gratidão.

Aos amigos vindos dos mais diferentes lugares: Teresinha, Pedro, Ana, Endrigo, Vivi, Marieta, Gabriela, Leila, a Confraria LpLp, a Jefferson, a hermanita Yanina, aos de Cícero Dantas, Sergipe ou qualquer lugar, que na distância emanavam energia para que tudo desse certo.

Também agradeço imensamente àqueles que estavam ao meu lado fisicamente: Cynthia (ou Curi), pela troca infinita de afinidade e carinho e pela recepção inicial; Mariana Valcaccio, por me ensinar que moramos no outro, me dar sentido e sentir junto comigo; Marga, pelo cuidado mútuo e risadas despreziosas e Giva, por trazer luz, leveza e pela cumplicidade construída.

Agradeço à Rozangela Uzêda e Luis Fernando Pita Gondim pelos primeiros passos científicos e me apresentarem o universo dos coccídios.

Obrigado ao PPGBA, a cada colega que convivi, a Coordenação pelo excelente trabalho e à secretária Edna Cherias pela presteza nos serviços.

À UFRPE, por ser uma mãe que apoia e dá suporte.

Obrigado à CAPES, por fomentar o desenvolvimento desse doutorado.

E por fim, as Políticas Públicas Educacionais dos Governos Lula e Dilma que forneceram as oportunidades necessárias para que um menino sonhador do sertão baiano pudesse converter-se em um Doutor sonhador! MEU MUITO OBRIGADO!

Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.  
Al andar se hace el camino,  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.

Antônio Machado

## **FONTE FINANCIADORA**

Discente fomentado pela CAPES, tanto pelo fornecimento da bolsa de pós-graduação durante o tempo de estudo no Brasil, bem como na concessão da bolsa de doutorado sanduíche na Espanha (DGPU/CAPES).

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório que apresenta ciclo lítico compreendido das etapas de reconhecimento, penetração, multiplicação, podendo sair da célula hospedeira ou evadir a resposta imune pelo mecanismo de encistamento, permanecendo no meio intracelular. Essas etapas influenciam na capacidade de infecção do parasito, relacionando-se com sua infectividade e, conseqüentemente, sua virulência. Esse trabalho visa caracterizar fenotipicamente isolados de *T. gondii* obtidos de tecidos de animais de produção de Alagoas, Brasil, sob o aspecto da infectividade (invasão e proliferação) e latência induzida no modelo *in vitro*. As provas de caracterização do comportamento biológico *in vitro* utilizadas foram: capacidade de conversão taquizoíta/bradizoíta, taxa de invasão e prova de proliferação. O primeiro experimento avaliou a eficiência de taquizoítos em alterar o metabolismo para o estágio de bradizoítos e foi conduzida por meio da indução por estresse exógeno (meio com pH alcalino). O teste de invasão avaliou a capacidade de penetração dos isolados em três tempos: 2h, 6h e 48h. E, por fim, a proliferação que consistiu em verificar a capacidade de multiplicação dos isolados em cultivo celular mensurado por real-time PCR. No primeiro experimento, isolados de *T. gondii* associados a abortamento em pequenos ruminantes e classificados como genótipo II (TgGtBrAL01, TgGtBrAL02, TgShSp1 e ME49) foram submetidos a todas as avaliações anteriormente descritas. O isolado TgShSp1 apresentou maior taxa de encistamento e menores taxas de invasão e proliferação e foi considerado de baixa infectividade. Os isolados TgGtBrAL01 e TgGtBrAL02, provenientes de um mesmo surto de abortamento em cabras, diferiram apenas na formação de cistos e apresentaram o perfil fenotípico similar nas outras provas. No segundo experimento, foi avaliada a capacidade de conversão taquizoíta-bradizoíta dos isolados de genótipo recombinante TgCkBrAL01 (#277) e TgCkBrAL03 (#114) provenientes de tecidos de galinhas; TgPigBrAL01, TgPigBrAL02 e TgPigBrAL03 (todos #114), isolados de suínos e cepas de clones RH (tipo I) e ME49 (tipo II). Verificaram-se diferenças nas respostas de formação de cistos de isolados de genótipo recombinantes em comparação aos genótipos típicos, tendo como consequência um aumento na formação de

vacúolos e diminuição das placas de lise. Ainda foi revelado que isolados de mesmo genótipo (#114) manifestam taxas de conversão distintas. No terceiro experimento, os cinco isolados de genótipo recombinante descritos acima, foram caracterizados fenotipicamente nos ensaios de invasão parasitária e proliferação intracelular. Em adicional, foi determinado o perfil dos genes ROP18 e ROP5 de dois isolados de genótipos distintos, TgPigBrAL01 (#114) e TgCkBrAL01 (#277). Os isolados de genótipo recombinantes exibiram baixa taxa de invasão e menor proliferação em relação às cepas RH e ME49, mas não apresentaram diferença entre si. Por fim, as características encontradas de baixa infectividade de dois isolados recombinantes corroboram com o padrão dos genes ROP5/ROP18 (padrão 1/3) que caracteriza um isolado avirulento ou não-letal no modelo murino. O emprego de técnicas de caracterização *in vitro* mostrou-se eficiente para determinar as características da infectividade que estão diretamente relacionadas com a virulência de *T. gondii*.

**PALAVRAS-CHAVES:** Toxoplasmose; Invasão; Proliferação; Encistamento; Ciclo lítico; Comportamento biológico.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite that presents a lytic cycle consisted of stages of recognition, penetration, multiplication, and can leave the host cell or evade the immune response from a mechanism of encystation, remaining in the intracellular space. These stages influence the infection capacity of the parasite, relating to its infectivity and, consequently, its virulence. This work's purpose is to characterize phenotypically isolated *T. gondii* from tissues of animals from Alagoas, Brazil, under the aspect of infectivity (invasion and proliferation) and latency induced in the *in vitro* model. The *in vitro* biological behavior characterization tests chosen were: tachyzoite/bradyzoite conversion capacity, invasion rate and proliferation test. The first test evaluated the efficiency of tachyzoites in altering the metabolism to a stage of bradyzoites and was conducted through exogenous stress induction (medium with alkaline pH). The invasion test evaluated the penetration capacity of the isolates in three times 2h, 6h and 48h. And, finally, the proliferation test that consisted in verifying the multiplication capacity of the isolates in cell culture measured by real-time PCR. In the first article, isolates of *T. gondii* associated with abortion in small ruminants and classified as genotype II (TgGtBrAL01, TgGtBrAL02, TgShSp1 and ME49) were submitted to all the evaluations previously described. The TgShSp1 isolate had a higher rate of encystation and lower rates of invasion and proliferation was considered low infectivity. The isolates TgGtBrAL01 and TgGtBrAL02, coming from the same abortion outbreak in goats, differed only in the formation of cysts and showed the similar phenotypic profile in the other tests. In the second article the tachyzoite-bradyzoite conversion capacity of the recombinant genotypes TgCkBrAL01 (#277) and TgCkBrAL03 (#114) from chicken tissues were evaluated; TgPigBrAL01, TgPigBrAL02 and TgPigBrAL03 (all #114), isolated from pigs and strains of clonal RH (type I) and ME49 (type II). Differences in cyst formation responses of recombinant genotype isolates were observed in comparison to typical genotypes, resulting in an increase in vacuoles formation and decrease in lysis plaques. It was further revealed that isolates of the same genotype (#114) show different conversion rates. In the third article, the five recombinant genotype isolates described above, are characterized

phenotypically in the parasite invasion and intracellular proliferation assays. In addition, the ROP18 and ROP5 gene profiles of two isolates of different genotypes, TgPigBrAL01 (# 114) and TgCkBrAL01 (# 277), were determined. Recombinant genotype isolates had a low rate of invasion and proliferation in relation to the RH and ME49 strains but did not show any differences between them. The infectivity characteristics of two recombinant isolates corroborate with the profile ROP5/ROP18 (1/3) gene, considered to be avirulent or non-lethal in mouse. The use of *in vitro* characterization has shown to be able to reveal characteristics of the infectivity that are directly related to virulence of *T. gondii*.

**KEYWORDS:** Toxoplasmosis; Invasion; Proliferation; Encystation; Lytic cycle; Biological behavior.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
2.1	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	20
2.2	Histórico dos estudos sobre <i>Toxoplasma gondii</i> .....	23
2.3	Organização estrutural, ultraestrutural e funcional dos estágios evolutivos de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	26
2.3.1	Taquizoítos.....	26
2.3.2	Bradizoítos e cistos tissulares .....	30
2.3.3	Esporozoítos .....	32
2.4	Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	33
2.5	Ciclo lítico de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	36
2.5.1	Adesão .....	38
2.5.2	Invasão.....	38
2.5.3	Proliferação .....	40
2.5.4	Egressão .....	43
2.6	Encistamento e manutenção da forma latente.....	43
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
3.1	Objetivo geral.....	47
3.2	Objetivos específicos .....	47
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>ARTIGO 2</b> .....	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>ARTIGO 3</b> .....	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>133</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ultraestrutura e morfologia de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> ... 27	27
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática do complexo apical de <i>Toxoplasma gondii</i> ..... 29	29
<b>Figura 3</b> - Ultraestrutura e morfologia do bradizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> .... 30	30
<b>Figura 4</b> - Morfologia e ultraestrutura de cisto tissular de <i>Toxoplasma gondii</i> . 31	31
<b>Figura 5</b> - Representação das estruturas morfológicas do oocisto de <i>Toxoplasma gondii</i> ..... 33	33
<b>Figura 6</b> - Ciclo, hospedeiros, formas evolutivas e transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i> ..... 35	35
<b>Figura 7</b> - Ciclo lítico de <i>Toxoplasma gondii</i> ..... 37	37
<b>Figura 8</b> - Mecanismo de invasão desenvolvido por <i>Toxoplasma gondii</i> ..... 39	39
<b>Figura 9</b> - Esquema simplificado da divisão por endodiogenia de <i>Toxoplasma gondii</i> ..... 41	41
<b>Figura 10</b> - Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> (cepa ME49) em diferentes horas após infecção..... 42	42
<b>Figura 11</b> - Mecanismos envolvidos com a conversão taquizoíto-bradizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> : ação da TgIF2 $\alpha$ (A) e acetilação de histonas (B). ..... 45	45
<b>Figura 12</b> - Marcação para identificação da parede de cisto de <i>Toxoplasma gondii</i> por aglutinina de <i>Dolichos biflorus</i> -FITC..... 46	46

## ARTIGO 1

<b>Figura 1</b> - Eventos de invasão parasitária (InvP2h, InvP6h, InvPT) determinadas para as cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> do genótipo tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha. .... 75	75
<b>Figura 2</b> - Proporção na formação de vacúolos e placas de lise na InvPT das cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> do genótipo tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha. .... 76	76
<b>Figura 3</b> - Curvas de crescimento exponencial (A), curva da função logarítmica (B), cinética de proliferação (C) e comparação das médias de crescimento populacional as 72 hpi das cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha. .... 77	77
<b>Figura 4</b> - Médias dos valores de doubling time (dT) determinado na proliferação <i>in vitro</i> das cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha. .... 78	78
<b>Figura 5</b> - Quantificação dos diferentes eventos (cistos, vacúolo parasitóforo e placas de lises) e mosaic plot das proporções destes eventos por isolados, resultantes da indução da cistogênese das cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> tipo II	

(#1 e #3; ToxoDB) isolados de de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha. .... 79

## ARTIGO 2

**Figura 1** - Genotipagem por RFLP-PCR e análise filogenética das cepas típicas e recombinantes (#114 e #277) de *Toxoplasma gondii* (quadrados). .... 93

**Figura 2** - Cisto de *Toxoplasma gondii in vitro* induzido por pH alcalino em cultura celular da linhagem MARC-145..... 98

**Figura 3** - *Sunburst chart* das proporções de vacúolos, placas de lises e cistos para cada cepa de *Toxoplasma gondii* com indução (meio com pH 8,0) e sem indução (meio com pH 7,0) do encistamento *in vitro*..... 99

**Figura 4** - Quantitativo dos eventos (cistos, vacúolos e placas de lises) entre o cultivo sem indução (pH 7,0) e com indução (pH 8,0) da conversão taquizoíto-bradizoíto das cepas típicas e recombinantes (#114 e #277) de *Toxoplasma gondii*..... 101

**Figura 5** - Taxa relativa de conversão taquizoíto-bradizoíto entre cepas típicas e recombinantes (#114 e #277) de *Toxoplasma gondii*, em porcentagem. .... 102

## ARTIGO 3

**Figura 1** - Eventos de invasão parasitária para InvP2h (A), as InvP6h (B), InvPT (B) dos isolados recombinantes de *Toxoplasma gondii* (#114 e #277; ToxoDB) isolados de suínos e galinhas. .... 120

**Figura 2** - Curvas de crescimento exponencial, da função logarítmica e comparação das médias de crescimento populacional as 72 hpi dos isolados recombinantes de *Toxoplasma gondii* (#114 e #277; ToxoDB) isolados de suínos e galinhas..... 121

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

**Tabela 1** - Informações sobre as cepas de *Toxoplasma gondii* de genótipo tipo II clássicos e variante isolados de tecidos fetais de pequenos ruminantes ..... 69

**Tabela 2** - Taxas de invasão parasitárias as 2h (InvP2h) e as 6h (InvP6h) em relação a 48h (InvP48h) determinadas para as cepas de *Toxoplasma gondii* do genótipo tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha ..... 74

### ARTIGO 2

**Tabela 1** - Informações sobre os isolados de *Toxoplasma gondii* utilizados no estudo: cepas recombinantes e típicas ..... 92

### ARTIGO 3

**Tabela 1** - Genotipagem por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP-PCR) dos isolados de *Toxoplasma gondii* de genótipo recombinante, obtidos de tecidos de suínos e galinhas ..... 116

**Tabela 2** - Número de passagens *in vitro* das cepas típicas e recombinantes (#114 e #277) de *Toxoplasma gondii* utilizadas no estudo ..... 117

**Tabela 3** - Taxas de invasão parasitária às 2hpi (InvP2h), 6hpi (InvP6h) e 48hpi (InvP48h) dos isolados recombinantes de *Toxoplasma gondii* (#114 e #277; ToxoDB) isolados de suínos e galinhas. .... 119

**Tabela 4** - Caracterização dos alelos dos genes ROP5, ROP18, ROP16 e ROP17 dos isolados TgTgCkBrAL01 (#277) e TgPigBrAL01 (#114) obtidos de galinha e suíno e cepas de referência RH e ME49 ..... 122

# 1 INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um dos patógenos mais bem-sucedidos, capaz de infectar um grande número de espécies animais e provocar a toxoplasmose, uma enfermidade potencialmente fatal para humanos imunocomprometidos e relacionada a problemas produtivos nas espécies caprina, ovina e suína (DUBEY, 2010; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

A patogênese da toxoplasmose é o resultado da penetração celular no tecido hospedeiro, expressiva multiplicação e disseminação do parasito, provocando lesão tecidual, associada à resposta imunológica inflamatória (BHOPALE, 2003; HALONEN et al., 2004; PENG; TAN; LINDSAY, 2015; RANDALL; HUNTER, 2011). A eficiência em reconhecer e se aderir a uma célula, penetrá-la, a velocidade de replicação no ambiente intracelular, a saída e a infecção de nova célula são atributos do comportamento biológico (JENSEN et al., 2015; SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005) que compõe as etapas do ciclo lítico de *T. gondii*, desenvolvido pelos estágios proliferativos, conhecidos como taquizoítos (BLACK; BOOTHROYD, 2000; BLADER et al., 2015). Esses comportamentos se relacionam com a capacidade de migrar por barreiras biológicas, como a transplacentária ou a hematoencefálica (BARRAGAN; SIBLEY, 2002, 2003; TARDIEUX; MENARD, 2008), potencializando sua ação patogênica.

Soma-se a esses fatores a habilidade que *T. gondii* possui de diferenciar-se entre estágios proliferativos e latentes encistados nos tecidos dos hospedeiros, configurando um mecanismo de evasão imunológica (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2009; SULLIVAN; JEFFERS, 2012). O encistamento é o resultado de alterações bioquímicas, morfológicas e estruturais para a proteção dos estágios latentes ou bradizoítos (SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

A capacidade de invasão, proliferação, dispersão nos tecidos hospedeiros, estímulo imunogênico e a habilidade de formar cistos teciduais contribuem para maior ou menor manifestação da virulência de *T. gondii* e estão ligadas ao fenótipo do parasito (APPLEFORD; SMITH, 1997; BARRAGAN; SIBLEY, 2003; CASADEVALL; PIROFSKI, 1999, 2001; KAUFMAN; REMINGTON; JACOBS, 1958; KHAN et al., 2009; LOPES et al., 2016; RADKE

et al., 2001; SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005; SULLIVAN; JEFFERS, 2012). As análises fenotípicas compreendem avaliações *in vivo* e *in vitro* e são empregadas para explicar a expressão das variações genéticas de *T. gondii* (BRENIER-PINCHART et al., 2010; KHAN et al., 2009; LOPES et al., 2016; PFEFFERKORN; KASPER, 1983; RADKE et al., 2005; SIBLEY, 1995; SIBLEY et al., 2002; YANG et al., 2013; ZHOU et al., 2014).

O uso do modelo de infecção *in vivo* em camundongos (*Mus musculus*) é amplamente empregado para a determinar a virulência de *T. gondii*, sendo baseada na resposta da infecção frente a uma carga conhecida de parasitos inoculados (DUBEY et al., 2010b; FRENKEL, 1953; INGRAM et al., 2013; PENA et al., 2008; SARAF et al., 2017). Todavia, a extrapolação da ação virulenta de *T. gondii* em modelo murino para as outras espécies animais é dificultosa, caracterizando um limitante no emprego da técnica (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012; SARAF et al., 2017)

Os progressos obtidos no campo da genética molecular têm tentado aclarar o papel de genes individuais nas diferentes etapas da infecção, indicando uma potencial associação de genótipos com a sua virulência (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012). Um exemplo disso são os estudos dedicados a associar virulência e o polimorfismo alélico das proteínas secretadas pelas róprias (ROP18, ROP5, ROP16 e ROP17), organelas do complexo apical envolvidas com o processo interação parasito-hospedeiro e, por conseguinte, na patogênese do agente (SHWAB et al., 2016). É necessário pontuar também, o uso das tecnologias transcriptômicas que vêm se destacando por revelar os mecanismos moleculares desenvolvidos tanto pela célula hospedeira no desafio da infecção por *T. gondii*, assim como aqueles apresentados pelo parasito (FRITZ et al., 2012; RADKE et al., 2005).

Segundo Read (1994), a virulência abrange duas características fundamentais: a infectividade e a gravidade gerada pela infecção. Desse modo, a infectividade pode ser compreendida como a capacidade de um agente etiológico de se estabelecer no hospedeiro, levando à infecção (PUTT, 1987), incluindo dois aspectos: a habilidade de penetrar (invasão), de reproduzir-se (proliferação), de dispersar-se ou manter-se latente dentro do organismo, dependendo da suscetibilidade do hospedeiro ao agente etiológico (THOMAS; ELKINTON, 2004).

Nos últimos anos, diversos grupos de pesquisa se empenharam em isolar *Toxoplasma gondii* de amostras de animais no Brasil (CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013; DE ALMEIDA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2018; DUBEY et al., 2010a; FEITOSA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2012; MELO et al., 2016; PENA et al., 2011; SAMICO-FERNANDES et al., 2017; SILVA et al., 2017; SOUSA et al., 2016; VITALIANO et al., 2014). Obter isolados é basilar para que se possa acessar informações da biologia de *T. gondii*, seja pelas suas características genéticas ou fenotípicas, impulsionando pesquisas que visam o desenvolvimento de biotecnologias voltadas ao diagnóstico, à profilaxia e/ou tratamento da toxoplasmose.

Variações fenotípicas do comportamento biológico de cepas de *T. gondii* em modelos *in vitro* já foram avaliadas (APPLEFORD; SMITH, 1997; SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005), assim como de outros Toxoplasmatíneos como *Neospora caninum* (DELLARUPE et al., 2014; REGIDOR-CERRILLO et al., 2011) e *Besnoitia besnoiti* (FREY et al., 2016). Estudos sobre o desempenho *in vitro* destes coccídios fornecem a vantagem de facilitar a seleção de cepas de *T. gondii* a serem empregadas em experimentos, uma vez que é possível prever o comportamento de uma determinada cepa em um experimento controlado. Outra vantagem é a redução do uso de animais de laboratórios, em cumprimento ao programa 3Rs (do inglês, *Reduction, Refinement e Replacement*), como método alternativo que possa, um dia, substituir os testes de virulência *in vivo* (THREE..., 2000), podendo contribuir, ainda, para a redução do risco de infecção humana acidental no momento da manipulação ou inoculação de animais (CRISTINE et al., 2004).

Apesar do avanço no entendimento da virulência de *T. gondii* nos modelos *in vivo* e molecular, ausente são os estudos dedicados a revelar as características de infectividade associadas ao ciclo lítico ou de latência de linhagens típicas e recombinantes no Brasil. Assim, esse trabalho objetiva caracterizar o perfil fenotípico *in vitro* de isolados de *T. gondii* obtidos a partir de tecidos de animais de produção do Estado de Alagoas, Brasil, por meio da análise do comportamento biológico em etapas-chave do ciclo lítico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* é um protozoário formador de cisto tecidual nos hospedeiros e apresenta reprodução intracelular obrigatória (DUBEY, 2010). Tem um ciclo vital heteroxênico, comportando-se com um parasito eurixeno, infectando e replicando-se, virtualmente, em células nucleadas de qualquer animal endotérmico (DUBEY, 1998; HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; WONG; REMINGTON, 1993).

A taxonomia clássica de *T. gondii* indica a sua inclusão no reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae e gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 2010). Em contrapartida, uma ampla e recente atualização da taxonomia dos organismos vivos proposta por Adl et al. (2012) e reafirmada por Ruggiero et al. (2015) sugere a alteração da taxonomia do agente, baseadas em similaridades filogenéticas e ultraestruturais. Esse parasito passa então a ser incluídos no reino Chromista, sub-reino Harosa (supergrupo SAR, compreendendo: Stramenopiles, Alveolata e Rhizaria), superfilo Alveolata, filo Miozoa, subfilo Myzozoa, infrafilo Apicomplexa, superclasse Sporozoa, classe Coccidiomorpha, sub-classe Coccidia e ordem Eimeriida, juntamente com outros parasitos associados, como *Cyclospora* e *Neospora*. Esses autores argumentam que um grande número de novas ferramentas moleculares produziu dados que exigem um modelo novo e mais robusto para se adequar à nova informação. Nesse sentido, a nova classificação acomodará as mudanças recentes com maior estabilidade no futuro (ADL et al. 2012).

Esse coccídeo apresenta distribuição cosmopolita, com alta prevalência de infecções nos animais e no homem em diferentes regiões do globo (DUBEY, 2010; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). É o agente da toxoplasmose, uma zoonose caracterizada por manifestações clínicas diversas como alterações congênitas em diferentes sistemas, com destaque para distúrbios neurológicos, além de danos reprodutivos (CENCI-GOGA et al., 2011; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; SUKTHANA, 2006), no entanto, a infecção mais

frequentemente descrita é na forma crônica assintomática (DUBEY, 2010). Diferentes fatores são determinantes para o estabelecimento da doença, como: a imunidade do hospedeiro, a via de infecção, a suscetibilidade do hospedeiro e a virulência da cepa de *T. gondii* (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

Indivíduos que apresentam condição de imunossupressão, como os pacientes HIV/AIDS positivos sem tratamento (BASAVARAJU, 2016; GULSHAN UPPAL, MD; CHIEF EDITOR: NIRANJAN N SINGH, MD, 2017) e mulheres gestantes soronegativas para o parasito são populações alvo na prevenção, diagnóstico e tratamento da toxoplasmose humana (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Na Medicina Veterinária, *T. gondii* se destaca por causar prejuízos econômicos devido à redução dos índices reprodutivos de caprinos, ovinos e suínos (BAYARRI et al., 2012; DUBEY, 2009a, 2009b; MCSPORRAN et al., 1985; SILVA et al., 2014), além de provocar quadros fatais de encefalite em diferentes espécies como cetáceos (DI GUARDO et al., 2010; MAZZARIOL et al., 2012; SOLOMON, 2013), marsupiais (DUBEY; CRUTCHLEY, 2008; PARAMESWARAN et al., 2010) e afecções oculares em passeriformes com destaque para canários (DUBEY, 2002; LINDSAY et al., 1995; TURILLI; CORAZZOLA, 1986; WILLIAMS et al., 2001).

Por meio da aplicação de técnicas moleculares de caracterização genética, aplicadas a cepas de *T. gondii* de diferentes regiões do mundo, foi possível a comparação e agrupamento populacional do agente em seis grandes *clusters* (SU et al., 2012), com um quantitativo crescente principalmente nas investigações desenvolvidas na América Central e América do Sul (PENA et al., 2008; RAJENDRAN; SU; DUBEY, 2008;). Isso resulta em um padrão populacional estabelecido pelo parasito em diferentes regiões do mundo (SHWAB et al., 2014).

Isolados europeus e norte-americanos se organizam, classicamente, em três genótipos clonais, as linhagens I, II e III (AJZENBERG et al., 2002b; HOWE; SIBLEY, 1995; SIBLEY et al., 2002; SU; ZHANG; DUBEY, 2006; RAMIREZ; LLEWELLYN, 2014; WEILHAMMER; RASLEY, 2011). Um novo tipo clonal de isolados de animais silvestres nos Estados Unidos foi descrito, denominado de tipo 12 (DUBEY et al., 2011a; KHAN et al., 2011). De modo divergente, os isolados do centro e sul-americanos demonstram elevadas combinações alélicas inéditas, possivelmente motivada pelo alto quantitativo de recombinação durante

a reprodução sexuada nos felídeos, sendo denominadas como linhagens recombinantes (BELTRAME et al., 2012; DUBEY, 2008; DUBEY et al., 2005; RAGOZO et al., 2010; RAJENDRAN; SU; DUBEY, 2012).

As cepas recombinantes apresentam ancestralidade e classes alélicas idênticas às aquelas encontradas nas três linhagens clássicas, mas segregam esses alelos de maneira aleatória entre os *locus* analisados na caracterização molecular (AJZENBERG et al., 2004; DE MELO FERREIRA et al., 2006). O papel da recombinação sexual na estrutura populacional de *T. gondii* parece ser mais importante no Brasil, em comparação com as populações da Europa e Estados Unidos (DE MELO FERREIRA et al., 2006)

Outras cepas de *T. gondii* apresentam polimorfismos únicos e alelos "novos", as chamadas cepas atípicas ou exóticas. Análises filogenéticas revelam que esses genótipos são distribuídos ao longo da árvore sem qualquer estruturação óbvia, podendo ou não ter relação com os haplogrupos típicos (AJZENBERG et al., 2004; SU et al., 2003).

A virulência em modelo murino entre os isolados de *T. gondii* apresenta diferenças biológicas marcantes: a maioria é avirulenta, produzindo infecções crônicas assintomáticas; no entanto, alguns são altamente virulentos e resultam em toxoplasmose aguda fatal (HOWE; SUMMERS; SIBLEY, 1996). A metodologia comumente utilizada para determinar a virulência de um isolado consiste em avaliar a repercussão da infecção em camundongos a partir da inoculação de diferentes doses de taquizoítos, sendo determinada a curva de sobrevivência dos animais até 30 dias após a inoculação (SARAF et al., 2017).

Cruzando os dados dos grupamentos genotípicos com informações da patogênese *in vivo* determinou-se um padrão virulência: cepas do haplogrupo I de *T. gondii* provocam manifestações clínicas aguda ou hiperaguda em murinos com uma LD<sub>100</sub> (dose letal absoluta) <10 indivíduos, ou seja, são necessários menos de 10 taquizoítos do agente para provocar morte de todos camundongos inoculados. As cepas dos tipos II e III são relativamente avirulentas, com um LD<sub>50</sub> (dose letal, 50%) que varia entre 10<sup>2</sup> e 10<sup>5</sup> taquizoítos (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005). As cepas do tipo II são as mais comumente envolvidas na infecção humana, enquanto as cepas do tipo III são mais comuns em animais silvestres e, raramente, isoladas de humanos (HOWE; SIBLEY, 1995). As cepas do tipo I são raras tanto na natureza como em

pacientes humanos; no entanto, infecções em indivíduos imunocompetentes foram associadas a manifestações clínicas graves (AJZENBERG et al., 2002a; BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

Estudos de virulência de cepas recombinantes (tipo II/III) de *T. gondii* revelaram que estes apresentam uma virulência três vezes maior do que as cepas clássicas progenitoras, sugerindo que a recombinação sexual combinando polimorfismos em duas linhas clonais distintas e concorrentes, poderia conduzir a evolução natural da virulência em *T. gondii* (GRIGG et al., 2001a). Recombinações entre cepas dos tipos I e III são frequentes em pacientes humanos com toxoplasmose ocular, demonstrando maior virulência que cepas clássicas tipo II (GRIGG et al., 2001b). Em adicional, esse mesmo genótipo recombinante (I/III) foi responsável por quadro de neurotoxoplasmose em paciente HIV/AIDS positivo, provocando uma grave e incomum encefalite e coriorretinite, associadas à Síndrome Cerebral Perdedora de Sal (SCPS), causando hiponatremia (GENOT et al., 2007).

## **2.2 Histórico dos estudos sobre *Toxoplasma gondii***

As primeiras descrições desse protozoário ocorreram no início do século XX, em 1908, simultaneamente, em tecido de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), no Brasil (SPLENDORE, 2009) e em tecido de roedores da espécie *Ctenodactylus gundi*, na Tunísia (NICOLLE; MANCEAUX, 2009). Ambos estudos atribuíram a descrição do agente parasitário, erroneamente, como pertencente ao gênero *Leishmania*. Todavia, um ano depois, estudos morfológicos desenvolvidos por Nicolle e Manceaux demonstraram que se tratava de um novo protozoário, sendo renomeado como *Toxoplasma gondii*, devido à forma de arco (*toxos*, em grego) e em referência a espécie do roedor africano que albergava o protozoário (FERGUSON, 2009; NICOLLE; MANCEAUX, 2009).

Desde as suas descrições iniciais até a atualidade, *T. gondii* ganhou destaque científico devido à sua importância para a saúde humana e dos animais (DABRITZ; CONRAD, 2010; SCHLUTER et al., 2014; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Nas décadas de 1920 e 1930 foram publicadas descrições de organismos semelhantes a *T. gondii* em diferentes hospedeiros (DUBEY, 2008). As estruturas de cisto tecidual foram primariamente observadas e descritas num

grupo de coelhos e camundongos (LEVADITI et al., 1928 apud WYROSDICK; SCHAEFER, 2015). Entretanto, o agente viável foi isolado de amostra animal somente em 1937 por Sabin e Olitsky (1937) e, anos mais tarde foi isolado de amostra humana por Wolf e Paige (1939). Nessa época, denominava-se a fase proliferativa de *T. gondii* como trofozoíto e os organismos encontrados dentro dos cistos teciduais de cistozoítos.

Nos anos de 1940 a 1960, estudos imunogênicos revelaram o papel de anticorpos na inativação de formas proliferativas de *T. gondii* (SABIN; FELDMAN, 1948) e que a imunidade protetora frente à infecção por esse coccídio era mediada principalmente por células linfóides (FRENKEL, 1967). Em 1958, Goldman, Carver e Sulzer (1958) estudaram o processo de reprodução assexuada de *T. gondii* e sugeriram o termo endodiogenia para denominar o processo de geração de duas células-filhas a partir de uma célula comum ou célula-mãe.

Estudos de caracterização biológica de cistos teciduais elucidaram o papel da parede do cisto e a ação de enzimas proteolíticas sobre elas, bem como evidenciaram a sobrevivência dos “cistozoítos” e a suscetibilidade dos “trofozoítos”. Diante desse dado foi possível a obtenção de isolados viáveis a partir de tecidos de animais cronicamente infectados, submetidos à digestão enzimática (JACOBS; REMINGTON; MELTON, 1960).

Na década de 1960 teve início o uso de metodologias de caracterização fenotípica aplicadas a *T. gondii*. Estudos sobre diferenças na multiplicação de cepas em culturas celulares e a caracterização da curva de crescimento com a identificação de uma fase de repouso após a infecção, seguida por uma fase exponencial de crescimento (similar a bactérias) se destacaram nesse período (HOGAN; YONEDA; ZWEIGART, 1961; KAUFMAN; MALONEY, 1962). Anos depois, a taxa de crescimento e os títulos necessários para infecção de tecidos em cultivo por *T. gondii* foram estudados (LYCKE; LUND, 1964).

Até a década de 1970, apenas formas assexuadas de *T. gondii* eram descritas e não havia sido determinado seu ciclo biológico completo. Foi então que avanços significativos ocorreram com a descrição do ciclo sexuado do parasito e o relato de oocistos excretados nas fezes de felinos, fato que permitiu a elucidação de características de transmissibilidade, medidas preventivas da infecção e controle do agente (DUBEY, 2008, 2009c; FRENKEL, 1970;

HUTCHISON et al., 1971). Em meados de 1973, Frenkel denominou as formas evolutivas de *T. gondii* como conhecemos hoje, ao associar o estágio evolutivo do parasito com a velocidade de multiplicação. Assim, organismos que apresentavam multiplicação rápida passaram a ser denominados de taquizoítos (anteriormente denominado “trofozoíto”), enquanto que as formas que apresentam multiplicação lenta foram denominadas de bradizoítos (antes, “cistozoítos”) (FRENKEL, 1973).

Entre os anos 1980 a 2000, investigações foram desenvolvidas sobre as diversas vertentes de análise aplicada ao *T. gondii*: aspectos morfológicos, epidemiológicos, patológicos, socioeconômicos, entre outros. Destacaram-se, principalmente, os métodos de caracterização para compreender as diferenças entre os isolados de *T. gondii* obtidos de tecidos humanos e de animais (DUBEY, 2008).

A princípio, as investigações desenvolvidas para caracterizar isolados de *T. gondii* baseavam-se em análises antigênicas (APPLEFORD; SMITH, 2000; BOHNE; GROSS; HEESEMANN, 1993; LEE et al., 1995; WARE; KASPER, 1987), na infectividade *in vivo* (GRIMWOOD; SMITH, 1991) e isoenzimáticas (ASAI et al., 1995; DARDE et al., 1992; DARDÉ; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992). Com advento das técnicas moleculares, foram desenvolvidas metodologias mais sensíveis, confiáveis e menos laboriosas para a tipagem de *T. gondii*, a exemplo dos marcadores para microsatélite, *Random Amplified Polymorphic* (RADP-PCR) e, por fim, a *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP-PCR) (AJZENBERG et al., 2002b; DARDÉ, 2004; DE MELO FERREIRA et al., 2004).

A análise por RFLP-PCR tem sido vastamente empregada na genotipagem de *T. gondii* (SU; ZHANG; DUBEY, 2006), porém, esse método subestima a taxa de polimorfismo entre os isolados, havendo um indicativo do emprego do sequenciamento direto de regiões genômicas, incluindo polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphism*) e de pequenas regiões de inserções e deleções para uma genotipagem mais precisa (BAHL et al., 2010; COSTA et al., 2011; YANG et al., 2013).

Saeij, Boyle e Boothroyd (2005) revisaram os aspectos fenotípicos (migração, invasão e taxa de crescimento) relacionados à virulência entre as três principais cepas de *T. gondii* e destacaram diferenças entre elas quanto à

interação com o hospedeiro, sugerindo, assim, a necessidade de experimentos para elucidar melhor esse aspecto.

### **2.3 Organização estrutural, ultraestrutural e funcional dos estágios evolutivos de *Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* apresenta três formas evolutivas distintas em seu ciclo biológico: estágio proliferativo (taquizoítos), estágio latente (bradizoítos) e estágio ambiental (esporozoítos) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

#### **2.3.1 Taquizoítos**

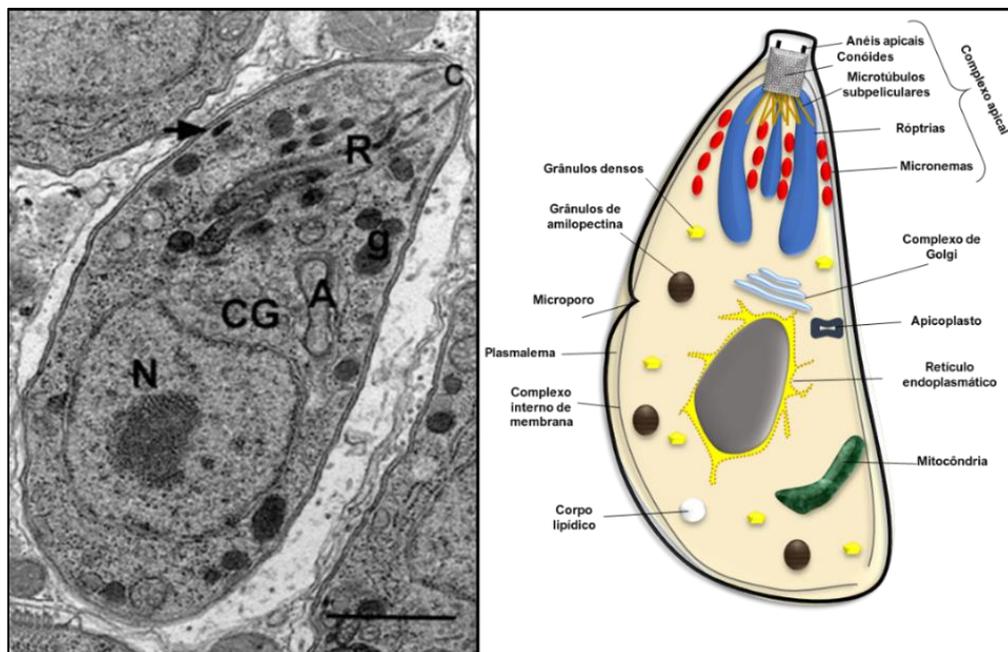
Os taquizoítos (Figura 1) são células arqueadas, alongadas, medindo aproximadamente 6 µm de comprimento por 2 µm de largura. Possuem uma porção posterior arredondada e uma porção anterior com a presença de uma estrutura afilada denominada complexo apical (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; SPEER et al., 1999). Apresentam proliferação rápida e assexuada, denominada endodiogenia (duas células-filhas geradas a partir de uma célula-mãe) (DUBEY, 1998). Possui relação direta com doença, visto que é nesta forma evolutiva que *T. gondii* alcança, penetra e lesiona os diferentes tecidos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

O núcleo celular comumente está localizado na porção média, limitado pelo envoltório nuclear composto pelas ramificações do retículo endoplasmático liso associado aos retículos endoplasmáticos rugosos. Anterior ao núcleo, encontra-se o complexo de Golgi e o apicoplasto. Possui uma única mitocôndria ramificada e uma série de grânulos em quantidade e posição variantes: grânulos densos, acidocalcissomas e amilopectina (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MELO; ATTIAS; DE SOUZA, 2000; SOUZA et al., 2010).

Todo esse agrupamento de organelas está contornado pela película, uma estrutura composta de três membranas: o plasmalema (membrana plasmática) e por duas membranas intimamente interpostas, denominadas de complexo interno de membrana (SHEFFIELD; MELTON, 1968). Esse complexo interno apresenta interrupção em três porções: na anterior próximo ao anel polar, na

porção média pela presença do microporo e na extremidade posterior (DUBEY et al.,1998).

**Figura 1** - Ultraestrutura e morfologia de taquizóitos de *Toxoplasma gondii*.



**Fonte:** Elaborado pelo autor com base em Souza et al. (2010) e Dubey, Lindsay e Speer (1998). Imagem de microscopia eletrônica de Souza et al. (2010). N – núcleo; CG – complexo de Golgi; A – apicoplasto; g – grânulos densos; R – róptrias; c – conóide; seta – vacúolo parasitóforo. Barra: 1  $\mu$ m.

Associada à membrana plasmática, encontra-se um complexo protéico formado por filamentos de actina e miosina, que, presumivelmente, interagem para produzir a força necessária para a motilidade do parasito (DOBROWOLSKI; CARRUTHERS; SIBLEY, 1997; DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1997). Há uma íntima relação da película com o citoesqueleto, conjunto de fibras e túbulos protéicos, garantindo a manutenção da integridade mecânica (CINTRA; DE SOUZA, 1985; LEMGRUBER et al., 2009).

Como os apicomplexas não possuem organelas especializadas em locomoção (FRENAL; SOLDATI-FAVRE, 2013; HARDING; MEISSNER, 2014), é a ação de uma emaranhada rede de microtúbulos e outras macromoléculas que permite com que esses organismos desenvolvam um movimento de locomoção denominado deslizamento (do inglês, *gliding*) (MEHTA; SIBLEY, 2011; SKILLMAN et al., 2011). O deslizamento é desempenhado pelo glideossomo, um complexo formado pela interação de um grupo de proteínas

adesivas: as MIC2 (proteínas de micronemas) que interagem na sua porção citoplasmática aos filamentos dinâmicos de actina, e estes com a miosina de cadeia leve (MLC1), a miosina de classe XIV (TgMyo) e as GAP45 e GAP50, que ancoram todo esse complexo protéico (GILK et al., 2009; PAREDES-SANTOS; DE SOUZA; ATTIAS, 2012; SOLDATI; DUBREMETZ; LEBRUN, 2001; SOUZA et al., 2010). A motilidade depende da polimerização e da despolimerização da actina para gerar a força de deslizamento e, também para a penetração ativa do parasito na célula hospedeira (SIBLEY et al., 2013).

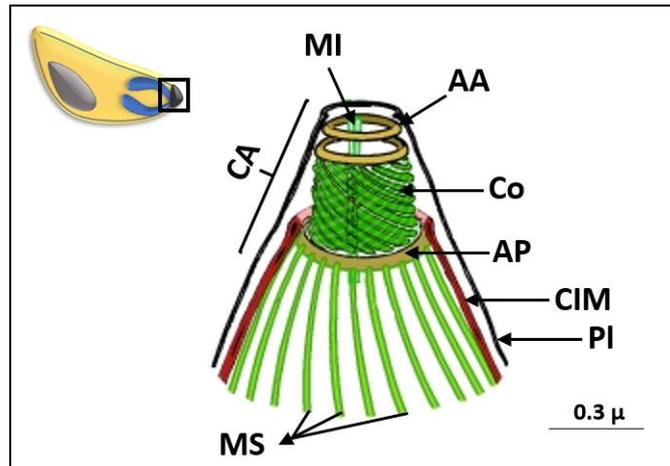
Abaixo da membrana plasmática, na extremidade anterior do parasito, o citoesqueleto apresenta dois anéis apicais seguidos de um anel polar, onde se localiza o centro organizador de microtúbulos (SOUZA et al., 2010). A partir dela, surgem 22 microtúbulos subpeliculares periféricos e outros dois microtúbulos internos de 400 nm de comprimento que se estendem até cerca de dois terços, longitudinalmente, do corpo celular mantendo o arcabouço citoesquelético do parasito. Em adicional, acima dos anéis polares situam-se o conóide, estrutura em forma de cone, retrátil que parece agir como uma sonda durante a invasão e a saída, mas seu papel precisa ser melhor compreendido (Figura 2) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; LEMGRUBER et al., 2009; SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

O complexo apical, além das estruturas citoesqueléticas, apresentam organelas vesiculares com ação secretora, a saber: micronemas e róptrias (CARRUTHERS; TOMLEY, 2008; NGÔ; YANG; JOINER, 2004; PAREDES-SANTOS; DE SOUZA; ATTIAS, 2012). Micronemas são pequenas vesículas localizadas na região anterior do parasito que armazenam proteínas glicosiladas (MIC). Funcionalmente, as proteínas do micronema intermediam interações do parasito com a célula alvo, sendo liberadas durante o processo inicial de adesão e regulado pela ação de  $Ca^{2+}$  (CARRUTHERS; TOMLEY, 2008; DUBREMETZ et al., 1988).

As róptrias apresentam-se como clavas, com alargamento da região posterior e afilamento na porção anterior. No estágio proliferativo, *T. gondii* apresenta cerca de oito unidades que armazenam no seu interior uma variedade de proteínas denominadas ROPs (localizadas no bulbo da organela) e RONS (localizadas na região afilada da organela), ambas excretadas no processo de

invasão, juntamente com proteínas das micronemas (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008).

**Figura 2** - Representação esquemática do complexo apical de *Toxoplasma gondii*



**Fonte:** Elaborado pelo autor, baseado em Heaslip, Ems-Mcclung e Hu (2009). MI: microtúbulos internos; AA: anel apical; Co: conóide; AP: anel polar; CIM: complexo interno da membrana; PI: plasmalema; MS: microtúbulos subpeliculares periféricos; CA: complexo apical.

Durante a entrada na célula, os parasitos carregam consigo parte da membrana do hospedeiro formando o vacúolo parasitóforo (VP), estrutura que o protege no ambiente intracelular (DUBREMETZ, 1998). A manutenção e estabilidade do VP ocorrem na presença de proteínas dos grânulos densos, as GRA, que atuam de forma significativa nas interações intracelulares hospedeiro-parasito (GOLD et al., 2015; TRAVIER et al., 2008). Os grânulos densos são organelas arredondadas com alta concentração protéica distribuídas pelo citosol de *T. gondii* (MICHELIN et al., 2009).

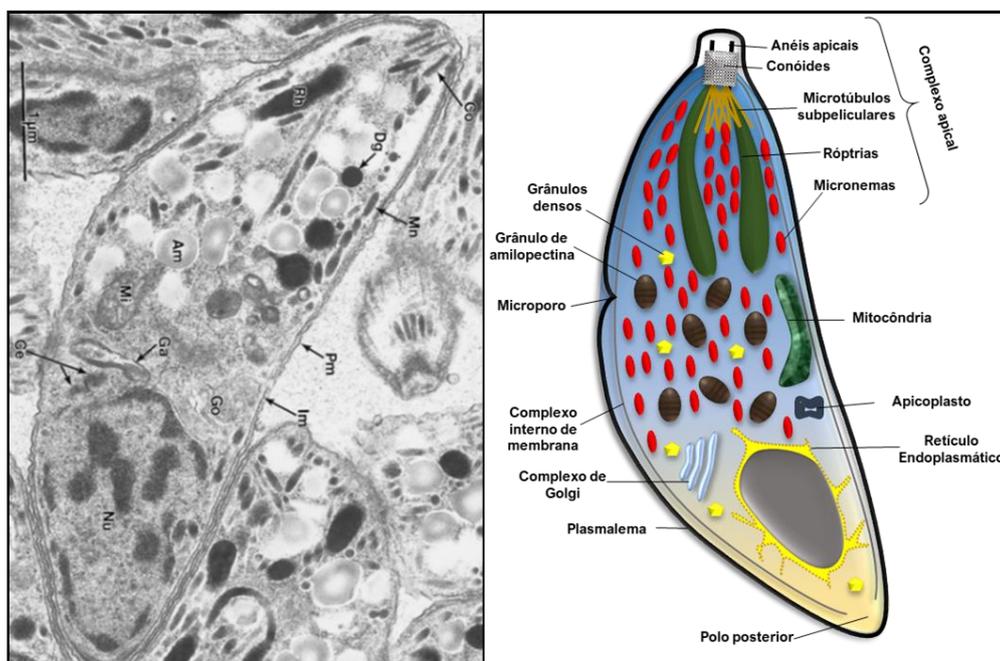
Ainda existe a presença de outras organelas granulares, como os acidocalcissomos e os corpos lipídicos. Os primeiros são organelas ácidas com alta concentração de fósforo como pirofosfato (PPi) e polifosfato (poli P) complexado ao  $\text{Ca}^{2+}$  e outros cátions como Zn, Cl, O, Mg, K. Apresentam-se como estruturas vesiculares com 10 unidades dispersas na célula. Algumas das funções dos acidocalcissomos são a de armazenar cátions e fósforo, realizar a homeostase de cálcio, a manutenção do pH intracelular e a osmorregulação (MORENO; DOCAMPO, 2009).

Os corpos lipídicos são estruturas de armazenamento energético, organelas conservadas que atuam como estoques intracelulares de lipídios neutros, como ésteres de colesterol e triacilgliceróis, e como plataformas para o metabolismo lipídico. Estão, ainda, envolvidos em um mecanismo de aquisição de nutrientes a partir da atração de organelas da célula do hospedeiro para próximo do vacúolo parasitóforo (HU; BINNS; REESE, 2017; TOLEDO; D'AVILA; MELO, 2016).

### 2.3.2 Bradizoítos e cistos tissulares

Bradizoítos são formas evolutivas que se dividem de forma assíncrona, lenta e assexuada (FERGUSON et al., 2009; DZIERSZINSKI et al., 2004; SULLIVAN; JEFFERS, 2012). Medem 7  $\mu\text{m}$  de comprimento por 1,5  $\mu\text{m}$  de largura e diferem ultraestruturalmente dos taquizoítos por possuírem um núcleo localizado na porção posterior, róptrias sólidas, ausência de corpos lipídicos e numerosos micronemas e amilopectina (ricos em polissacarídeos, principalmente glicose) (Figura 3) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

**Figura 3** - Ultraestrutura e morfologia do bradizoíto de *Toxoplasma gondii*

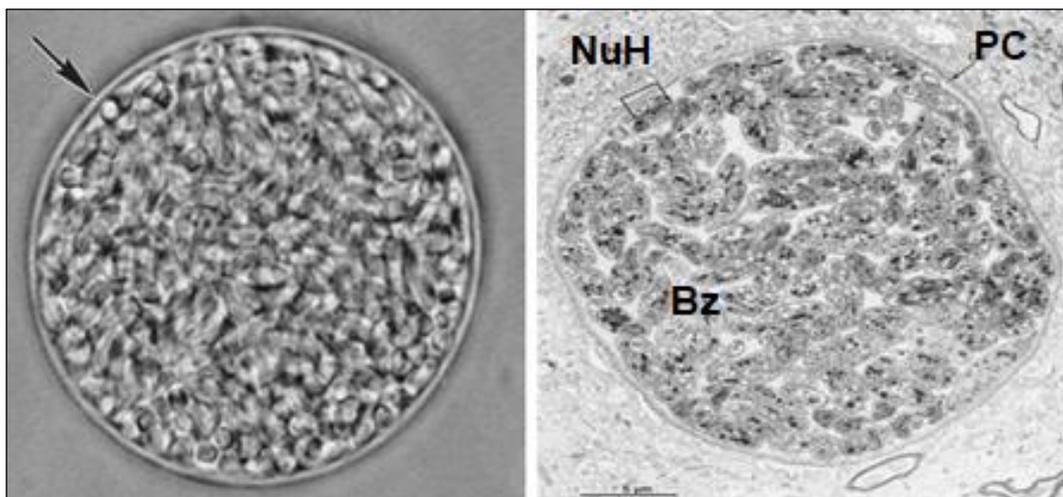


**Fonte:** Elaborado pelo autor com base em Dubey, Lindsay e Speer (1998). Imagem de microscopia eletrônica de Dubey, Lindsay e Speer (1998). Am – amilopectina; Ce – centríolos; Dg – grânulos densos; Ga – apicoplasto; Go – complexo de Golgi; Im – complexo interno de membrana; Mi – mitocôndria; Mn – micronema; Nu – núcleo; Pm – Plasmalema; Rh – róptrias.

Os bradizoítos residem no interior de células hospedeiras dentro de cistos tissulares, estruturas relativamente não-imunogênicas que persistem por um longo período num estado ativo (WEISS; KIM, 2000). Os cistos apresentam tamanhos variados, dependente do tempo, da célula hospedeira, da cepa de *T. gondii* e do método utilizado para a medição. Um cisto maduro possui em média de 50 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro e uma grande quantidade de bradizoítos em seu interior (Figura 4).

A parede fornece integridade ao cisto para permanecer no interior da célula hospedeira, sendo formada pelas modificações bioquímicas do vacúolo parasitóforo por ação do parasito que produz e secreta quitina e glicoproteínas (BOOTHROYD et al., 1997).

**Figura 4** - Morfologia e ultraestrutura de cisto tissular de *Toxoplasma gondii*



**Fonte:** Adaptado de Dubey, Lindsay e Speer (1998). Seta e PC – parede do cisto; Bz – bradizoítos; NuH – núcleo da célula hospedeira.

Nutricionalmente, os taquizoítos e bradizoítos também possuem diferentes exigências, enquanto a membrana do vacúolo parasitóforo atua como uma peneira molecular para os taquizoítos, a parede do cisto pode reduzir consideravelmente a disponibilidade de materiais exógenos para os bradizoítos para um modo de vida mais auxotrófico (BHOPALE, 2003).

Os bradizoítos permanecem ativos se proliferando de forma assexuada nos cistos (DUBEY, 2010), enquanto os taquizoítos se multiplicam por endodiogenia, os bradizoítos apresentam uma variação dessa forma de proliferação. Assim, a recorrência de ciclos de multiplicação do DNA com

repetidas divisões nucleares (similar a endodiogenia), resultará na formação de um número variável de células-filhas no interior de uma célula-mãe, processo denominado endopoligenia (FERGUSON et al., 2009). Curiosamente, outros Apicomplexa a exemplo de *Sarcocystis* spp., apresentam multiplicação assexuada por endopoligenia, porém, com uma diferença marcante da verificada em *Toxoplasma* onde não ocorre divisão do núcleo celular após a replicação repetida e cíclica do material genético, de maneira que a formação dos novos indivíduos de *Sarcocystis* está associada à fragmentação do núcleo da célula-mãe (DUBEY et al., 2001).

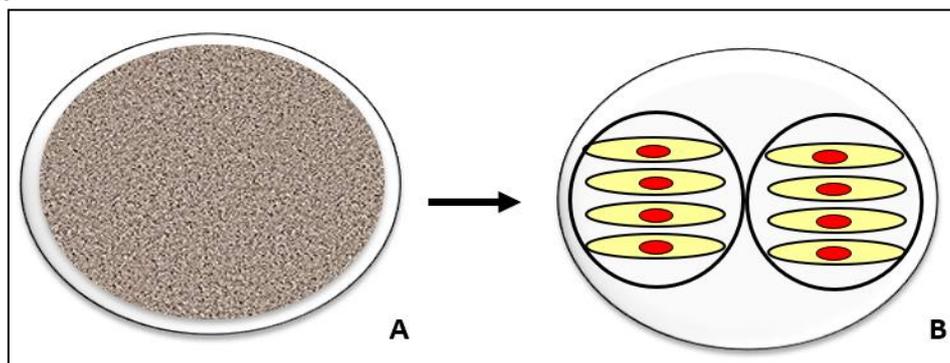
### 2.3.3 Esporozoítos

O resultado da reprodução sexuada que ocorre no trato intestinal dos hospedeiros definitivos é a formação de estruturas denominadas oocistos não-esporulados ou imaturos (forma de resistência no meio extracelular) que se apresentam com formato esferóides ou sub-esferóides, parede celular resistente e uma massa interna compacta não uniforme (Figura 5a) (DABRITZ; CONRAD, 2010; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; SPEER et al., 1999).

Após a excreção, os oocistos não esporulados são incapazes de infectar um hospedeiro sendo necessário a esporulação que é um processo assexuado dependente de temperatura, umidade e oxigenação, que ocorre entre um e cinco dias após a excreção do oocisto no ambiente. Os oocistos passam então a apresentar no seu interior duas estruturas císticas (esporocistos), cada uma delas albergando quatro organismos denominados esporozoítos que são as formas evolutivas infectantes do parasito (Figura 5b) (DUBEY et al., 2011b; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Os esporozoítos possuem núcleo subterminal com 6-8µm de comprimento por 2 µm de largura e são similares aos taquizoítos, mas apresentam maior quantitativo de micronemas, rôptrias e grânulos de amilopectina (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

**Figura 5** - Representação das estruturas morfológicas do oocisto de *Toxoplasma gondii*.



**Fonte:** Elaborada pelo autor. (A) oocisto não esporulado. (B) oocisto esporulado, apresentando dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos cada.

## 2.4 Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

Potencialmente, todos os animais homeotérmicos (mamíferos e aves) podem atuar como hospedeiros intermediários de *T. gondii*, favorecendo a manutenção do ciclo em diferentes *habitats* (DUBEY, 2010; HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005). Esse coccídio possui como hospedeiros definitivos ou completos os felídeos, com destaque para o gato doméstico por conta da sua estreita relação com a população humana e sua ampla dispersão mundial (ELMORE et al., 2010; WEISS; KIM, 2000).

O ciclo heteroxeno de *T. gondii* (Figura 6) pode ser segmentado em três distintas fases: no hospedeiro definitivo (Figura 6a), no ambiente (Figura 6b) e no hospedeiro intermediário (Figura 6c) (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Exclusivamente nos felídeos, ocorre tanto a reprodução assexuada (intestinal e extraintestinal) (Figura 6a.1), quanto a reprodução sexuada (Figura 6a.2) como resultado da ingestão de formas evolutivas de *T. gondii*, seja pelo consumo de tecidos de hospedeiros intermediários infectados (taquizoítos ou bradizoítos encistados), ou pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocisto esporulados.

Durante a replicação sexuada, as formas evolutivas alcançam e infectam as células do epitélio intestinal do hospedeiro definitivo, sofrem alterações metabólicas e assumem distintos estágios na forma de esquizonte por meio de um processo de replicação haplóide (esquizogonia). Na continuação, ocorre a diferenciação em macrogameta e microgameta por meio da gametogênese, que finalmente se fundem para formar um zigoto que dará origem ao oocisto não

esporulado (Figura 6b.3) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; FERGUSON et al., 1974; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Após a infecção primária, os felinos eliminam milhões de oocistos não esporulados que perdura por cerca de duas a três semanas cessando a eliminação (DAVIS; DUBEY, 1995; DUBEY, 1995).

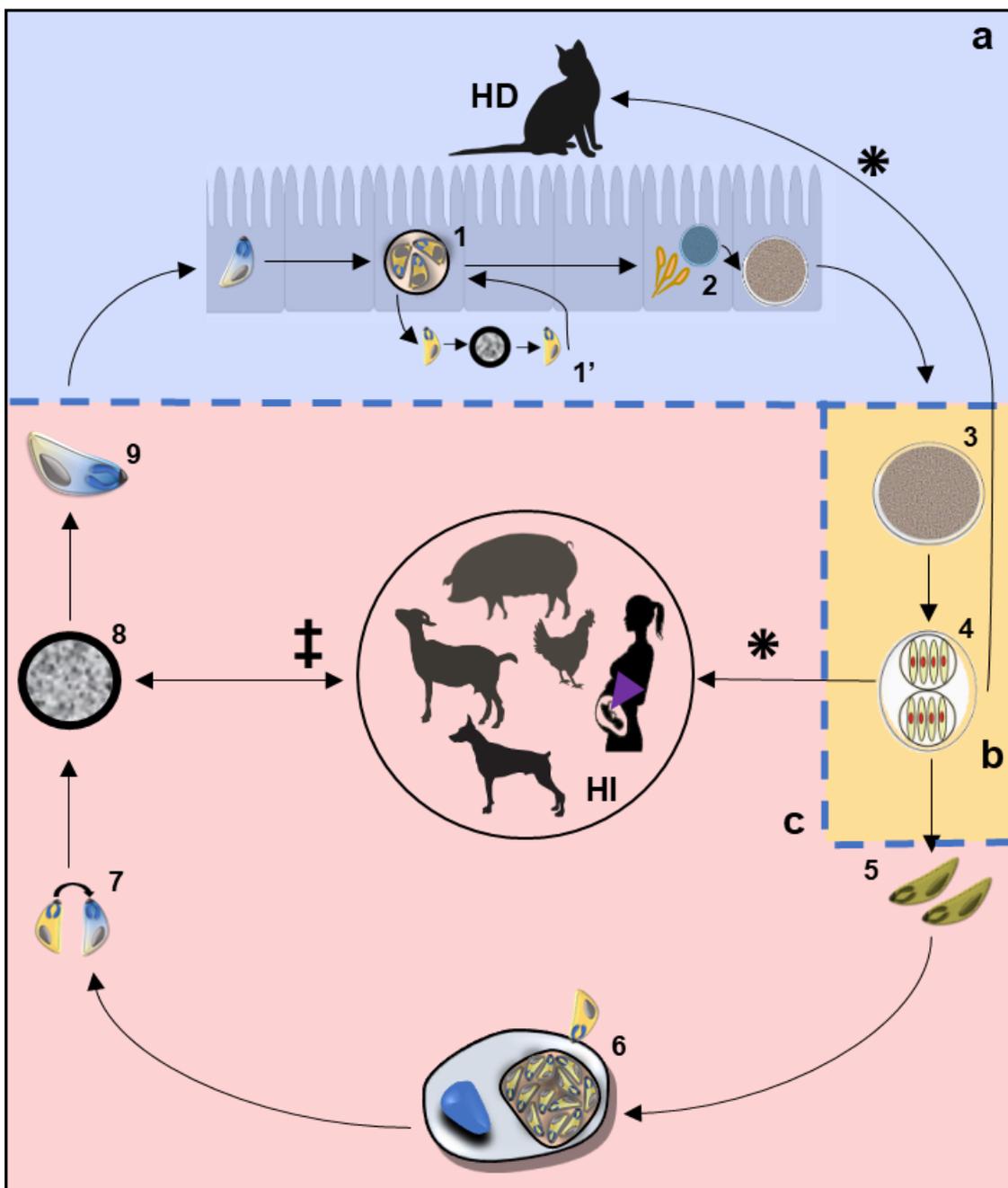
A fase ambiental (Figura 6b) se caracteriza pela contaminação do solo, da água ou de alimentos por oocistos (DABRITZ; CONRAD, 2010; TORREY; YOLKEN, 2013; WANG et al., 2014). Após a excreção dos oocistos não esporulados, ocorre o processo assexuado de esporulação influenciado por fatores ambientais, gerando os oocistos esporulados (Figura 6b.4) que quando ingeridos pelos hospedeiros intermediários (Figura 6c), ou até mesmo definitivo, alcançam a luz intestinal destes e se excistam, liberando os esporozoítos (Figura 6c.5), que invadem os enterócitos, assumindo a forma evolutiva de taquizoítos (Figura 6c.6), alcançando a corrente sanguínea e dispersando-se por via leucogênica para os mais diversos tecidos (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Nos tecidos-alvo, os taquizoítos penetram ativamente as células, formando o vacúolo parasitóforo e a partir daí o parasito pode seguir por diferentes vias dependendo competência imunológica do hospedeiro (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBREMETZ, 1998; KIM; WEISS, 2004; MORISAKI; HEUSER; SIBLEY, 1995). Em quadros de imunossupressão do hospedeiro, *T. gondii* continuará na forma de taquizoíto infectando novas células o que pode desencadear quadros clínicos de toxoplasmose, devido à lesão tecidual associada à replicação e saída da célula parasitada (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2010).

Se o parasito encontra um hospedeiro imunocompetente, com resposta imune mediada por células produtoras de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), por exemplo, este se converte em bradizoítos (Figura 6c.7). Nesse estágio, o parasito forma cistos teciduais (Figura 6.c.8) que podem permanecer por longos períodos sem provocar estímulo imunológico significativo, lesão tecidual ou processo patológico (SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

Todavia, os cistos teciduais se rompem quando da ausência de uma resposta imune eficiente e liberam os bradizoítos (Figura 6c.9) que se reconvertem em taquizoítos e estes podem se multiplicar, disseminar e causar a toxoplasmose aguda, processo conhecido por reativação ou recrudescência.

**Figura 6** - Ciclo, hospedeiros, formas evolutivas e transmissão de *Toxoplasma gondii*.



**Fonte:** Elaborado pelo autor baseado em Dubey (2010). Área em azul (a): Fase no hospedeiro definitivo (HD); 1: Multiplicação assexuada de taquizoítos nos enterócitos do HD; 1': ciclo extraintestinal pode ocorrer pela penetração dos tecidos, encistamento e recrudescência; 2: Fase sexual, com formação do microgameta e macrogameta, seguida de fecundação e formação de oocistos não-esporulados; Área amarela (b): fase ambiental; 3: Oocisto não-esporulado eliminado juntamente as fezes do HD; 4: Oocisto esporulado; Área em vermelho (c): Fase no hospedeiro intermediário (HI); \*: Transmissão oral de oocisto esporulado; ‡: Transmissão oral de cisto tecidual; 5: Esporozoítos; 6: Taquizoítio penetrando e em vacúolo parasitóforo em uma célula hospedeira; 7: Conversão de taquizoítos para bradizoítos; 8: formação de cisto tecidual; 9: Bradizoítos; seta roxa: Transmissão transplacentária.

Desse modo, a conversão de taquizoítos em bradizoítos é a chave para o estabelecimento de uma infecção crônica, e o inverso pode provocar quadro patológico potencialmente fatal (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010; SOETE et al., 1993; SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

*T. gondii* é transmitido entre seus hospedeiros de forma horizontal e/ou vertical (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005). A forma horizontal consiste na ingestão de oocistos esporulados que contaminam alimentos e água (Figura 6c,\*) e pelo consumo de bradizoítos em cistos teciduais de hospedeiros infectados cronicamente (Figura 6c, ‡), este beneficiado pelo carnivorismo mantido pelos hospedeiros definitivo e por alguns hospedeiros intermediários (DUBEY, 1998).

A transmissão transplacentária (Figura 6c, seta roxa) representa a passagem do agente dos tecidos maternos para os tecidos fetais (BUXTON et al., 2006). Em humanos, a infecção dos fetos provoca uma série de sequelas neurológicas e oftalmológicas, conduzindo ao abortamento (RORMAN et al., 2006). Ela também está relacionada com a manutenção do agente em rebanhos animais resultando em quadros de alterações reprodutivas, com destaque para as criações de ovinos, caprinos e suínos (DUBEY, 2009a, 2009b; DUBEY et al., 2011c; HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; TENTER HECKEROTH; WEISS, 2000).

Na literatura, há descrições da infecção por *T. gondii* em humanos por vias menos habituais como transplante de órgãos (HERMANNNS et al., 2001; KHURANA; BATRA, 2016; ROBERT-GANGNEUX et al., 2018), transfusão de sangue (HALONEN et al., 2004) e acidentes laborais (WONG; REMINGTON, 1993).

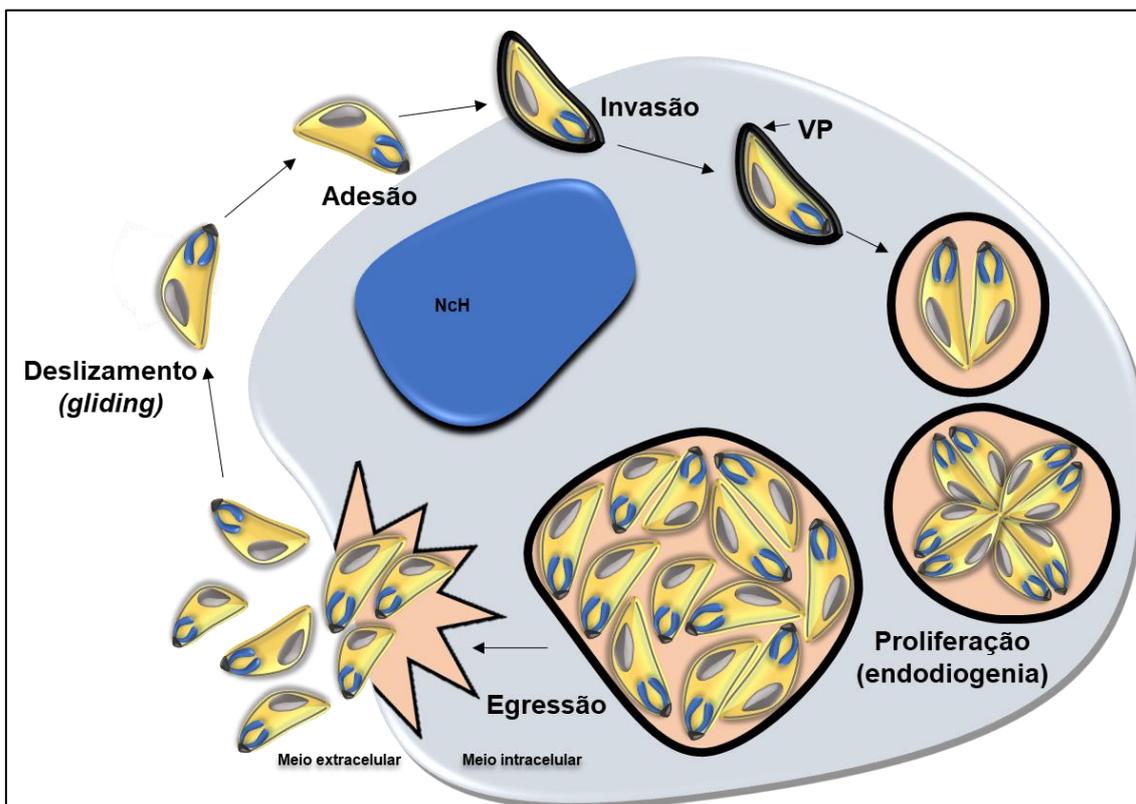
## **2.5 Ciclo lítico de *Toxoplasma gondii***

Após alcançar o organismo de um hospedeiro, *T. gondii* realiza uma estratégia de dispersão pelos tecidos desempenhada pelos taquizoítos, em um processo denominado de ciclo lítico (Figura 7) relacionado com a patogenia deste coccídio (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Inicialmente, taquizoítos extracelulares deslizam sobre a superfície de uma célula hospedeira, reconhecendo e estabelecendo uma ligação firme com

a superfície celular (adesão) (PFAFF et al., 2005). Em seguida, penetram no citoplasma celular e forma o vacúolo parasitóforo por meio da invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Vários ciclos de replicação ocorrem dentro do compartimento vacuolar (proliferação) e após o consumo da maioria dos recursos da célula hospedeira, os taquizoítos saem da célula (egressão). Essas etapas dependem do tamanho da célula hospedeira, e uma vez que um vacúolo contenha 64-128 taquizoítos (>36 horas), eles saem, provocando o rompimento da célula hospedeira e seguem invadindo novas células (BLACK; BOOTHROYD, 2000; NISHI et al., 2008).

**Figura 7** - Ciclo lítico de *Toxoplasma gondii*.



**Fonte:** Elaborada pelo autor, baseado em Black e Boothroyd (2000). NcH – núcleo da célula hospedeira; VP – vacúolo parasitóforo.

Durante o curso da infecção, os parasitos extracelulares são incapazes de se multiplicar, são móveis e secretam expressiva quantidade de proteínas de organelas apicais; em oposição, os intracelulares se dividem, são imóveis e não secretam proteínas de organelas como as micronemas (BLADER et al., 2015). A transição entre essas condições, extra e intracelular é acompanhada por

mudanças drásticas na concentração de íons, disponibilidade de nutrientes, comportamento mitocondrial, produção protéica e expressão gênica (BRUNET et al., 2008; GAJI et al., 2011; OVCIARIKOVA et al., 2017; RADKE et al., 2001). A habilidade de sobreviver fora da célula hospedeira, se movimentar e depois invadir uma nova célula é crítico para o comportamento e a virulência de cepas de *T. gondii* (OVCIARIKOVA et al., 2017).

### 2.5.1 Adesão

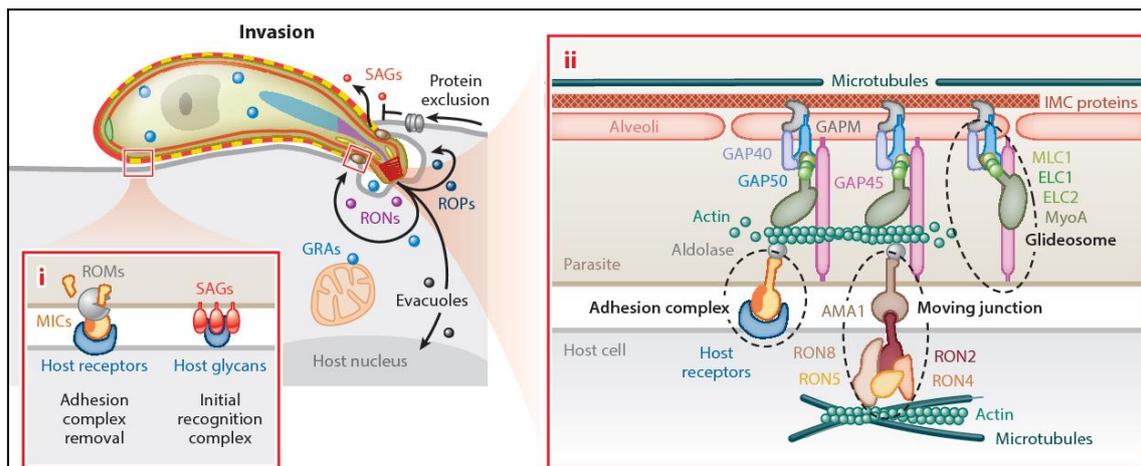
Uma vez realizado o contato inicial, os parasitos secretam proteínas de micronemas (MICs) mediados pela liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular. Muitas das MICs são secretadas como a TgMIC2 e uma proteína acessória (TgMIC2-TgMIC2-AP), TgMIC4, TgMIC6, TgMIC1 e a TgAMA1. Essa última interage com proteínas de róprias, enquanto que as TgMIC2 e o TgMIC6 se associam à aldolase, que são capazes de atuar junto da actina-miosina do glideossomo para o sucesso da invasão celular (CARRUTHERS; TOMLEY, 2008; ZHENG et al., 2009).

### 2.5.2 Invasão

A invasão de células hospedeiras por *T. gondii* envolve uma sequência de eventos (Figura 8), controlados exclusivamente pelo parasito (invasão ativa) e não por mecanismos fagocíticos do hospedeiro, o que pode justificar o fato de qualquer célula nucleada ser uma potencial célula hospedeira (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Os mecanismos de invasão executado por protozoários Apicomplexa são amplamente conservados, diferindo na escolha das células hospedeiras, dependendo do reconhecimento de receptores específicos na superfície celular (MITAL; WARD, 2008).

*Toxoplasma gondii* reconhece os proteoglicanos genéricos presentes em todas as células nucleadas. O reconhecimento inicial da célula hospedeira é mediado por antígenos fixados na superfície do parasito, conhecidos como SAGs (*Surface antigen*), que reconhecem e se ligam aos glicanos do hospedeiro, formando o complexo inicial de reconhecimento (Figura 8).

**Figura 8** - Mecanismo de invasão desenvolvido por *Toxoplasma gondii*



Fonte: Black e Boothroyd (2000).

Após a adesão, intermediada pelas MICs, o parasito secreta as RONs que são proteínas presentes na região afilada ou “pescoço” das rôptrias. A ação conjunta das RONs (TgRON2, 4, 5 e 8) com a TgAMA1 estabelece um ponto de contato justo entre o parasito e a membrana plasmática do hospedeiro, conhecido como junção em movimento (JM), visto que a integração dessas proteínas interage com o glideossomo, gerando remodelação dos filamentos de actina-miosina do parasito (ALEXANDER et al., 2005; BLADER et al., 2015; BOUCHER; BOSCH, 2015; FRENAL et al., 2010; GIOVANNINI et al., 2011).

Nesse estágio, *T. gondii* movimenta-se ativamente, projetando-se para o interior da célula e gerando uma invaginação na membrana plasmática da célula, atravessa a JM e forma o vacúolo parasitóforo. Ao mesmo tempo, classes de ROPs são injetadas no citosol da célula hospedeira para atuarem de maneiras variadas: estabilidade do vacúolo parasitóforo recém-formado, inativação de mecanismos apoptóticos, resistência à imunidade inata, gerando alterações funcionais nesta célula (BLACK; BOOTHROYD, 2000; SHARMA; CHITNIS, 2013). Diferentes proteínas de rôptrias (ROP5, ROP18, ROP16, ROP17) foram relacionadas como influenciadoras da virulência de *T. gondii*, participando ativamente dos processos de infectividade (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008; DUBREMETZ, LEBRUN, 2012; HÅKANSSON; CHARRON; SIBLEY, 2001; SHWAB et al., 2016).

A ROP18, considerada a proteína mais importante na virulência de *T. gondii*, é uma serino-treonina quinase que se liga à superfície externa do vacúolo parasitóforo, fosforilando enzimas hidrolíticas (IRGs da família das GTPases)

que atuam danificando o vacúolo parasitóforo e inviabilizando a continuidade do ciclo lítico do parasito. Quando fosforiladas, as IRGs perdem a habilidade de degradação vacuolar e o parasito permanece preservado e multiplicando-se (KHAN et al., 2009). A ação da ROP18 é potencializada pela ROP5, que é uma pseudoquinase (BEHNKE et al., 2015; FOX et al., 2016), logo, a combinação de alelos dessas proteínas polimórficas é considerada um importante preditivo da virulência de cepas típicas e atípicas de *T. gondii* (SHWAB et al., 2016; RÊGO et al., 2017). Mesmo na ausência de ROP18, alelos específicos de ROP5 podem reduzir a produção de IFN- $\gamma$  induzida pelas IRGs (NIEDELMAN et al., 2012), ao passo que, a inativação das IRGs por ROP18 é dependente da expressão de alelos virulentos de ROP5 (BEHNKE et al., 2015). Uma outra proteína, a ROP17, tem sido relacionada como fator de virulência por agir sinergicamente a ROP18, evitando o recrutamento de IRG para o vacúolo parasitóforo, protegendo assim o parasito da ação em macrófagos ativado por INF- $\gamma$  (ETHERIDGE et al., 2014). Por fim, a ROP16, que diferente das outras quinases, age na manipulação transcricional, fosforilando as vias STAT3/6, que culmina na redução da resposta Th1, por controle da produção de citocinas pró-inflamatórias (BUTCHER et al., 2011).

A invasão e a motilidade pelos tecidos compõem ações fundamentais para a infecção de barreiras biológicas, como o epitélio intestinal, a barreira hematoencefálica ou a placenta (BARRAGAN; SIBLEY, 2002; MITAL; WARD, 2008). Portanto, além de invadir as células circulantes, a motilidade ativa do parasito também pode fornecer um meio efetivo de disseminação (SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005).

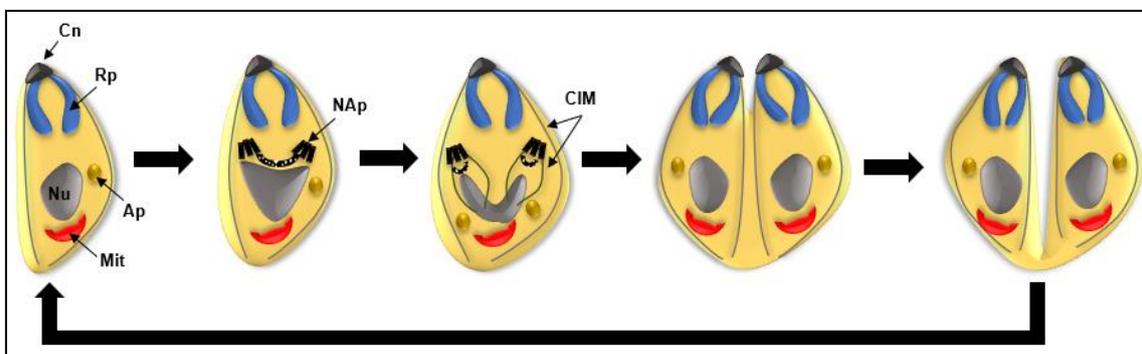
### **2.5.3 Proliferação**

Após a invasão, os taquizoítos de *T. gondii* instauram a replicação por endodiogenia, onde uma célula-mãe gera, ao final do processo assexuado, duas células filhas (Figura 9) (BLACK; BOOTHROYD, 2000; RADKE et al., 2001).

A carga parasitária de *T. gondii* é um importante para a patogênese deste parasito em camundongos, relacionado à superestimulação do sistema imune, conduzindo a altos níveis de citocinas Th1 que aumentam a apoptose e

produzem danos orgânicos (MORDUE et al., 2001; SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005; SARAF et al., 2017).

**Figura 9** - Esquema simplificado da divisão por endodiogenia de *Toxoplasma gondii*.



**Fonte:** Elaborado pelo autor com base em Blader et al. (2015) e Black e Boothroyd (2000). Cn: conóide; Rp: róptrias; Nu: núcleo; Ap: apicoplasto; Mit: mitocôndria; Nap: novos complexos apicais; CIM: complexo interno da membrana

Estudo de imunomarcção de organelas durante o processo de replicação de taquizoítos, desenvolvido por Nishi et al. (2008) revelaram que inicialmente há distensão do apicoplasto e do Complexo de Golgi e divisão do centrômero. Ocorre então, o aparecimento de duas membranas peliculares que começam a se formar a partir do centro da célula primária e definem as secundárias dentro do citoplasma em pontos que se assemelham a um conóide rudimentar e um centro organizador de microtúbulos. À medida que o complexo da membrana interna se estende, a célula-mãe se torna mais esférica e as róptrias e micronemas são formadas nos dois polos anteriores das células filhas em crescimento.

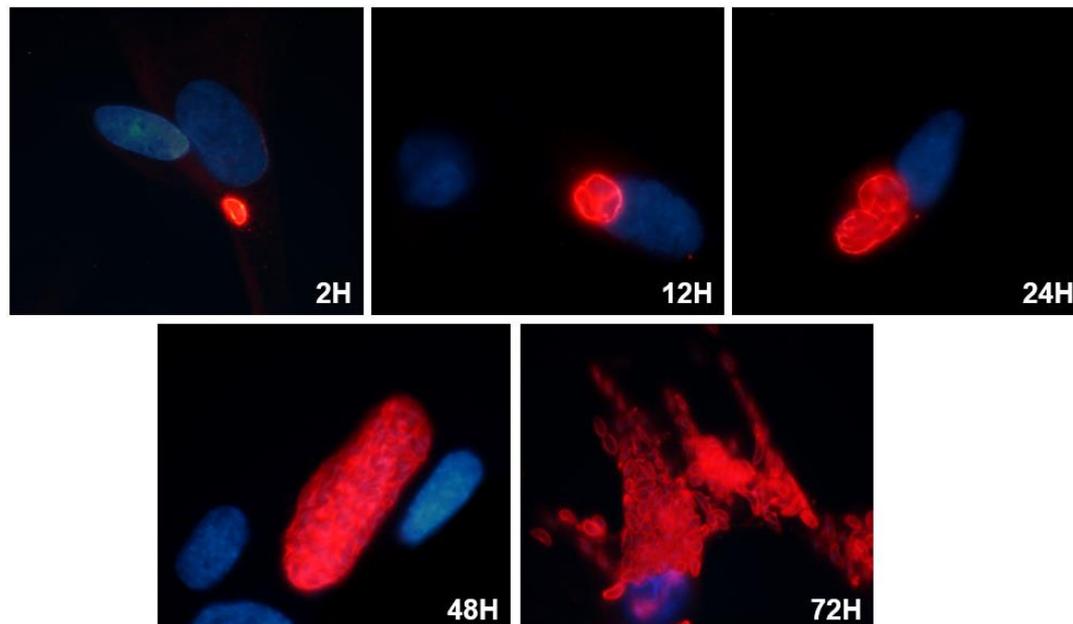
O material genético nuclear é duplicado e a cromatina se distribui para ambos os polos do fuso intranuclear e se cliva mantendo intacto o envelope nuclear, assim como o apicoplasto. A mitocôndria única da célula mãe, reparte-se entre as filhas, sendo a última organela a ser agregada. Cada célula descendente matura-se até que o citoplasma e todo conteúdo seja dividido (BLACK; BOOTHROYD, 2000; HU, 2008; SHEFFIELD; MELTON, 1968; SOUZA et al., 2010).

Taquizoítos de *T. gondii* possuem genoma haplóide (1N) assim como outros eucariotos. Na fase S do ciclo celular ocorre a replicação do DNA cromossômico, seguido da mitose e citocinese (fase M). Em *T. gondii*, a fase G2,

e conseqüentemente seu *check-in point*, parece ser inexistente ou é curta, enquanto a fase G1 é mais expressiva. Dessa forma, a progressão do ciclo celular de *T. gondii* é caracterizada por três diferentes momentos, considerado assim um ciclo trifásico: a fase G1, onde é mantido o metabolismo normal e há duplicação de organelas e as fases S e M que promovem a replicação do DNA, mantendo ativo o citoesqueleto e genes de organelas relacionadas com a invasão e clivagem celular propriamente dita (BLADER et al., 2015; RADKE et al., 2001).

O tempo relativo às principais fases do ciclo celular de *T. gondii* foi estimado por Radke e White (1998), revelando a duração da fase S em cerca de 2h e a de G2+M menor que 1h e a de G1 de aproximadamente 4h, totalizando 7h para que o parasito possa completar o ciclo celular. Ao longo do cultivo *in vitro* observa-se o crescimento exponencial no quantitativo de parasitos com o passar do tempo (Figura 10).

**Figura 10** - Multiplicação *in vitro* de *Toxoplasma gondii* (cepa ME49) em diferentes horas após infecção.



**Fonte:** O autor. Microfotografia de cultivo da cepa ME49 de *Toxoplasma gondii* em células da linhagem MARC-145 imunomarcada com anticorpo primário (IgG de camundongo anti- *T. gondii*) e anticorpo secundário (IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor® 594, vermelho). 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi utilizado para marcar moléculas de DNA; as estruturas de coloração azul intenso representam o núcleo da célula hospedeira. Imagens capturadas no laboratório SALUVET, Madrid, Espanha.

#### 2.5.4 Egressão

O fato de *T. gondii* manter o citoesqueleto e organelas intactas durante a maior parte da endodiogenia favorece a capacidade de imediatamente realizar a saída da célula infectada e invadir uma nova célula, mantendo uma maior eficiência da infecção (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

A egressão consiste no evento de saída dos taquizoítos de um vacúolo maduro, bem como a transição de uma forma intracelular imóvel para uma forma extracelular móvel. Esse evento compartilha muitos mecanismos com o aspecto de invasão do ciclo lítico envolvendo liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular, movimentação de deslizamento e secreção de micronema. Todavia, na saída da célula não há participação das ROPs ou RONs (EIDELL; BURKE; GUBBELS, 2010).

#### 2.6 Encistamento e manutenção da forma latente

A interconversão taquizoíto-bradizoíto além de beneficiar a dispersão do parasito entre hospedeiros por meio do carnivorismo, é a chave para o estabelecimento da infecção crônica ou do aparecimento de sinais clínicos agudos após a recrudescência. O encistamento no tecido dos hospedeiros compromete a virulência e a patogenicidade do parasito (DUBEY, 2010; LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002; SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

Em indivíduos infectados, os cistos são mais frequentes nos tecidos nervoso, muscular esquelético e cardíaco. No entanto, os cistos também podem ser detectados em órgãos viscerais, incluindo os pulmões, fígado, rins e até na medula óssea (WEISS; KIM, 2000). A permanência de cistos em tecidos de hospedeiros infectados com *T. gondii* é variável, e acredita-se que podem permanecer por anos em condições dependentes da resposta imune do hospedeiro. Portanto, em imunocompetentes, a presença desses cistos não provoca lesões, mas representa um risco futuro (LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002; SULLIVAN; JEFFERS, 2012), de forma que a persistência ou a reativação de bradizoítos encistados são as principais causas do aparecimento de toxoplasmose em humanos (KIM; WEISS, 2004).

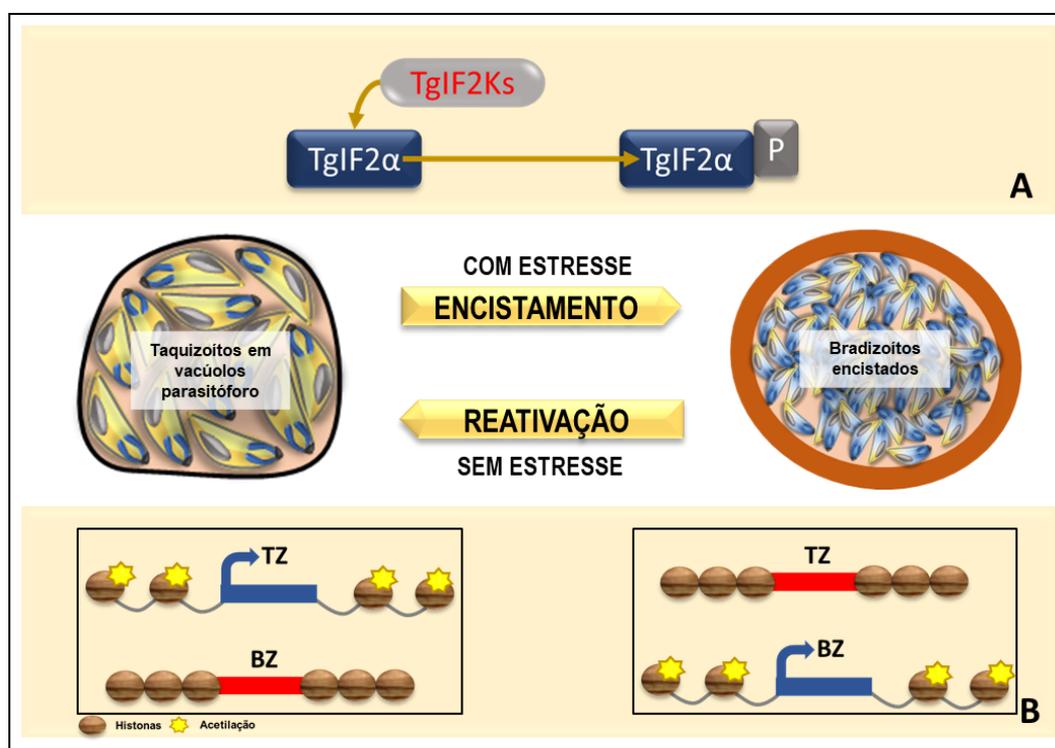
Taquizoítos convertem-se em bradizoítos (encistamento) em resposta a uma grande variedade de estímulos estressantes ou imunológicos do hospedeiro, e o inverso ocorre (reativação) quando esse estímulo é eliminado ou em prejuízo da função imunológica (SULLIVAN; JEFFERS, 2012). Fatores imunológicos produzidos em resposta à infecção por *T. gondii* como IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO) são associados à cistogênese (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010; TAKACS; SWIERZY; LUDER, 2012). No entanto, as condições que levam à imunodeficiência de humanos e animais, como o tratamento com agentes imunossupressores e quimioterápicos (CANER et al., 2008; CONG et al., 2015), a imunomodulação gestacional (ROBERT-GANGNEUX et al., 2011; VIDIĆ et al., 2007; WALLON et al., 2013), ou infecções por agentes que provoquem dano direto ao sistema imunológico (BASAVARAJU, 2016; PEREIRA-CHIOCCOLA; VIDAL; SU, 2009) estimulam a reativação desses cistos. A espécie do hospedeiro intermediário também pode afetar a capacidade de diferenciação ou de persistência dos cistos teciduais. Bovinos e búfalos apresentam resistência à manutenção da infecção, enquanto que suínos, ovinos e caprinos destacam-se como espécies produtivas suscetíveis a *T. gondii*, associada a alterações reprodutivas, motivados principalmente pelo recrudescimento da infecção (DUBEY, 2010).

Os controles moleculares da interconversão entre fases evolutivas de *T. gondii* está ligada à resposta ao estresse. Um desses mecanismos descritos envolve o controle translacional pela fosforilação da subunidade  $\alpha$  do Factor de Iniciação Eucariótico-2 (TgIF2 $\alpha$ ), mediada por quinases ativadas por estresse (conhecidas como TgIF2Ks). O TgIF2 $\alpha$ , abundante em bradizoítos, quando fosforilado reprime a tradução global, permitindo a tradução preferencial de um subconjunto de mRNAs que codificam fatores responsivos ao estresse (SULLIVAN Jr. et al., 2014) (Figura 11A). Adicionalmente, mecanismos epigenéticos têm sido associados à conversão taquizoíto-bradizoíto, a exemplo da acetilação de histonas que contribui para a reestruturação da cromatina criando um ambiente mais propício para a expressão gênica de genes promotores específicos de taquizoítos ou de bradizoítos (Figura 11B) (SAKSOUK et al., 2005; SULLIVAN; JEFFERS, 2012; VANAGAS et al., 2012).

Em condições de cultura *in vitro*, diferentes estímulos estressantes de taquizoítos promovem a formação de cistos de *T. gondii* e a diferenciação em

bradizoítos, a saber: o óxido nítrico exógeno (NO) (BOHNE; HEESEMANN; GROSS, 1994), arsenito de sódio, choque térmico, pH alcalino (pH=8,0) (SOETE; CAMUS; DUBRAMETZ, 1994), privação de arginina (FOX; GIGLEY; BZIK, 2004), depleção de pirimidina em parasitos deficientes em uracilo fosforibosiltransferase com baixo CO<sub>2</sub> (BOHNE; ROOS, 1997) e, mais recentemente, estímulos que causam estresse no retículo endoplasmático (NARASIMHAN et al., 2008) ou que interferem na saída induzida por Ca<sup>2+</sup> (NAGAMUNE et al., 2008a, 2008b).

**Figura 11-** Mecanismos envolvidos com a conversão taquizoíto-bradizoíto de *Toxoplasma gondii*: ação da TgIF2 $\alpha$  (A) e acetilação de histonas (B).

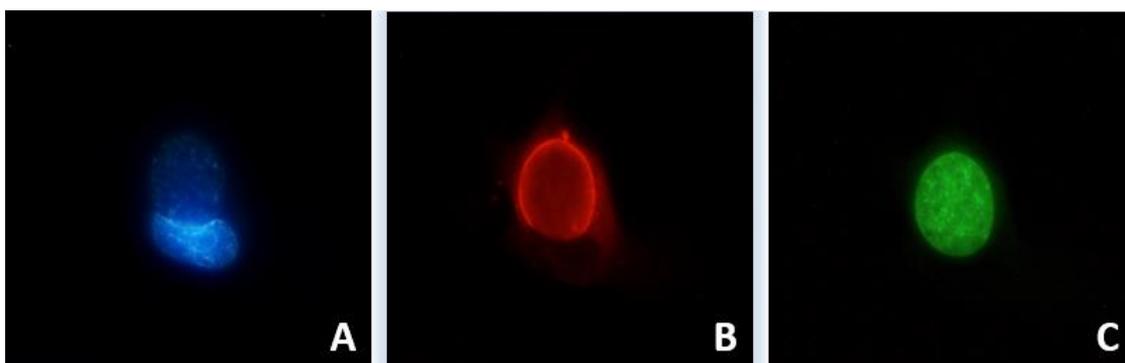


**Fonte:** Elaborada pelo autor com base em Sullivan e Jeffers (2012). A fosforilação de TgIF2 $\alpha$ , dependente da quinase TgIF2K, molda a tradução de mRNA associados a estímulos estressantes (A). A acetilação de histonas afrouxa a cromatina disponibilizando genes para a transcrição (barra em azul) dependendo se a condição é não-estressante (genes específicos de taquizoítos) ou estressante (genes específicos de bradizoítos), enquanto que a desacetilação inibe a expressão desses genes (barra em vermelho).

A presença das glicoproteínas na parede cística permite o estabelecimento de marcadores de encistamento *in vitro* a partir da ligação estável com lectinas. Cistos de *T. gondii* foram identificados a partir do emprego de concanavalina A, que possui especificidade para resíduos de D-manose ou D-glicose; aglutinina germinativa de trigo, com especificidade para resíduos de N-acetil-D-

glucosamina; aglutinina de soja, ligando-se a resíduos de N-acetil-D-galactosamina (SETHI et al., 1977) e a aglutinina da leguminosa *Dolichos biflorus* (Figura 12), com especificidade para acoplar numa glicoproteína de 116-kDa chamada de CST1 (ZHANG et al., 2001).

**Figura 12** - Marcação para identificação da parede de cisto de *Toxoplasma gondii* por aglutinina de *Dolichos biflorus*-FITC.



**Fonte:** O autor. Cepa ME49 induzida para conversão taquizoíto-bradizoíto por estresse alcalino (pH 8.2) por 4 dias. (A) 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) intercalado a moléculas de DNA; estrutura abaixo da formação arredondada de coloração azul intenso representa o núcleo da célula hospedeira; estrutura arredondada, coloração azul atenuado representa formação cística do *T. gondii*. (B) Marcação com anticorpo primário (IgG de camundongo anti- *T. gondii*) e anticorpo secundário (IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor® 594, vermelho), confirma a infecção *T. gondii* na célula hospedeira. (C) Marcação por lectina de *Dolichos biflorus* conjugada com FITC, confirma a conversão *in vitro* do agente por marcação de glicoproteínas de cisto. Imagens capturadas no laboratório SALUVET, Madrid, Espanha.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar fenotipicamente, sob o aspecto da infectividade *in vitro* e indução da cistogênese, isolados típicos e recombinantes de *Toxoplasma gondii* obtidos de tecidos de animais de produção.

#### 3.2 Objetivos específicos

Avaliar as diferenças no perfil fenotípico *in vitro* de cepas de *T. gondii* de mesmo genótipo (tipo II), isolados de abortos de pequenos ruminantes do Brasil e Espanha;

Comparar a capacidade de conversão induzida *in vitro* de taquizoítos para bradizoítos em cepas de genótipo recombinantes I/III (#114) e I/II/III (#277) de *T. gondii* de galinhas e suínos do Estado de Alagoas, Brasil;

Relacionar os achados da caracterização fenotípica *in vitro* (invasão e proliferação) com marcadores genéticos de virulência (ROP5, ROP18, RIO16, ROP17) em cepa de genótipo recombinante de *T. gondii*, isolados de galinhas e suínos do Estado de Alagoas, Brasil.

## 4 REFERÊNCIAS

- ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; LANE, C. E.; LUKES, J.; BASS, D.; BOWSER, S. S.; BROWN, M. W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; LE GALL, L.; LYNN, D. H.; MCMANUS, H.; MITCHELL, E. A. D.; MOZLEY-STANRIDGE, S. E.; PARFREY, L. W.; PAWLOWSKI, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SCHOCH, C.L.; SMIRNOV, A.; SPIEGEL, F. W. The Revised Classification of Eukaryotes. **J Eukaryot Microbiol**, v. 59, p. 429–493, 2012.
- AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M.-H.; THULLIEZ, P.; FILISSETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M.-L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 5, p. 684–689, 2002a.
- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; TIBAYRENC, M.; DARDÉ, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 27–38, 2002b.
- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMÈTRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185–1196, 2004.
- ALEXANDER, D. L.; MITAL, J.; WARD, G. E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J. C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 2, p. e17, 2005.
- APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. **Acta Tropica**, v. 65, n. 2, p. 97–104, 1997.
- APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 11, p. 1187–1191, 2000.
- ASAI, T.; MIURA, S.; SIBLEY, L. D.; OKABAYASHI, H.; TAKEUCHI, T. Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 19, p. 11391–11397, 1995.
- BAHL, A.; DAVIS, P. H.; BEHNKE, M.; DZIERSZINSKI, F.; JAGALUR, M.; CHEN, F.; SHANMUGAM, D.; WHITE, M. W.; KULP, D.; ROOS, D. S. A novel multifunctional oligonucleotide microarray for *Toxoplasma gondii*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 603, 2010.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 12, p. 1625–1633, 2002.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426–430, 2003.
- BASAVARAJU, A. Toxoplasmosis in HIV infection: An overview. **Tropical**

**Parasitology**, v. 6, n. 2, p. 129, 2016.

BAYARRI, S.; GRACIA, M. J.; PEREZ-ARQUILLUE, C.; LAZARO, R.; HERRERA, A. *Toxoplasma gondii* in commercially available pork meat and cured ham: a contribution to risk assessment for consumers. **Journal of food protection**, v. 75, n. 3, p. 597–600, 2012.

BEHNKE, M. S.; KHAN, A.; LAURON, E. J.; JIMAH, J. R.; WANG, Q.; TOLIA, N. H.; SIBLEY, L. D. Rhoptry Proteins ROP5 and ROP18 Are Major Murine Virulence Factors in Genetically Divergent South American Strains of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 8, p. 1–22, 2015.

BELTRAME, M. A. V.; PENA, H. F. J.; TON, N. C.; LINO, A. J. B.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; PEREIRA, F. E. L. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espirito Santo state, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3–4, p. 225–230, 2012.

BHOPALE, G. M. Pathogenesis of toxoplasmosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, p. 213–222, 2003.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607–623, 2000.

BLADER, I. J.; COLEMAN, B. I.; CHEN, C. T.; GUBBELS, M.-J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 463–85, 2015.

BOHNE, W.; GROSS, U.; HEESEMANN, J. Differentiation between mouse-virulent and -avirulent strains of *Toxoplasma gondii* by a monoclonal antibody recognizing a 27-kilodalton antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 1641–1643, 1993.

BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1761–7, 1994.

BOHNE, W.; ROOS, D. S. Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 88, n. 1–2, p. 115–126, 1997.

BOOTHROYD, J. C.; BLACK, M.; BONNEFOY, S.; HEHL, A.; KNOLL, L. J.; MANGER, I. D.; ORTEGA-BARRIA, E.; TOMAVO, S. Genetic and biochemical analysis of development in *Toxoplasma gondii*. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 352, n. 1359, p. 1347–1354, 1997.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: Do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438–442, 2002.

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 79–88, 2008

BOUCHER, L. E.; BOSCH, J. The apicomplexan glideosome and adhesins - Structures and function. **Journal of Structural Biology**, v. 190, n. 2, p. 93–114,

2015.

BRENIER-PINCHART, M. P.; BERTINI, R. L.; MAUBON, D.; PELLOUX, H. *In vitro* differential phenotypic characteristics among Type-II *Toxoplasma gondii* strains from congenital toxoplasmosis in humans. **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 798–799, 2010.

BRUNET, J.; PFAFF, A. W.; ABIDI, A.; UNOKI, M.; NAKAMURA, Y.; GUINARD, M.; KLEIN, J.-P.; CANDOLFI, E.; MOUSLI, M. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 908–920, 2008.

BUTCHER, B. A.; FOX, B. A.; ROMMEREIM, L. M.; KIM, S. G.; MAURER, K. J.; YAROVINSKY, F.; HERBERT, D. R.; BZIK, D. J.; DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002236, 2011.

BUXTON, D.; RODGER, S. M.; MALEY, S. W.; WRIGHT, S. E. Toxoplasmosis: The possibility of vertical transmission. **Small Ruminant Research**, v. 62, n. 1–2, p. 43–46, 2006.

CANER, A.; DOSKAYA, M.; KARASU, Z.; DEGIRMENCI, A.; GUY, E.; KILIC, M.; ZEYTUNLU, M.; FRANCIS, J.; BOZOKLAR, A.; GURUZ, Y. Incidence and diagnosis of active *Toxoplasma* infection among liver transplant recipients in Western Turkey. **Liver transplantation**, v. 14, n. 10, p. 1526–1532, 2008.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 83–89, 2007.

CARRUTHERS, V. B.; TOMLEY, F. M. Microneme proteins in apicomplexans. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 47, p. 33–45, 2008.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 3703–13, 1999.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 3, p. 337–344, 2001.

CENCI-GOGA, B. T.; ROSSITTO, P. V.; SECHI, P.; MCCRINDLE, C. M. E.; CULLOR, J. S. *Toxoplasma* in Animals, Food, and Humans: An Old Parasite of New Concern. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 7, p. 751–762, 2011.

CINTRA, W. M.; DE SOUZA, W. Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in the cell membranes of *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Cell Biology**, v. 37, p. 63–9, 1985.

CLEMENTINO ANDRADE, M. M.; PINHEIRO, B. V.; CUNHA, M. M.; CARNEIRO, A. C. A. V.; ANDRADE NETO, V. F.; VITOR, R. W. A. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 587–589, 2013.

CONG, W.; LIU, G.-H.; MENG, Q.-F.; DONG, W.; QIN, S.-Y.; ZHANG, F.-K.; ZHANG, X.-Y.; WANG, X.-Y.; QIAN, A.-D.; ZHU, X.-Q. *Toxoplasma gondii* infection in cancer patients: prevalence, risk factors, genotypes and association

- with clinical diagnosis. **Cancer Letters**, v. 359, n. 2, p. 307–313, 2015.
- COSTA, J.-M.; CABARET, O.; MOUKOURY, S.; BRETAGNE, S. Genotyping of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* using high-resolution melting analysis of the repeated B1 gene. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 3, p. 357–363, 2011.
- CRISTINE, K.; CAZARIN, C.; CORRÊA, C. L.; AILTON, F.; ZAMBRONE, D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 289–299, 2004.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **The Journal of Parasitology**, v. 78, n. 5, p. 786–794, 1992.
- DARDÉ, M. L.; RIAHI, H.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of *Hammondia hammondi* and *Toxoplasma gondii* sporozoites **The Journal of Parasitology**, v. 78, n. 4, p. 731–734, 1992.
- DARDÉ, M.-L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 40, n. 1, p. 57–63, 2004.
- DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and *Toxoplasma*: Implications for public health. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 1, p. 34–52. 2010.
- DAVIS, S. W.; DUBEY, J. P. Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 882–886, 1995.
- DE ALMEIDA, J. C.; DE MELO, R. P. B.; DE MORAIS PEDROSA, C.; DA SILVA SANTOS, M.; DE BARROS, L. D.; GARCIA, J. L.; PORTO, W. J. N.; MOTA, R. A. First isolation and RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from crab-eating fox (*Cerdocyon thous*—Linnaeus, 1766). **Acta Tropica**, v. 169, p. 26–29, 2017.
- DE MELO FERREIRA, A.; VITOR, R. W. A.; CARNEIRO, A. C. A. V.; BRANDÃO, G. P.; MELO, M. N. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 131–142, 2004.
- DE MELO FERREIRA, A.; VITOR, R. W. A.; GAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR–RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 1, p. 22–31, 2006.
- DE OLIVEIRA, J. M. B.; DE ALMEIDA, J. C.; DE MELO, R. P. B.; DE BARROS, L. D.; GARCIA, J. L.; ANDRADE, M. R.; PORTO, W. J. N.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L. M.; OLIVEIRA, A. A. da F.; MOTA, R. A. First description of clonal lineage type II (genotype #1) of *Toxoplasma gondii* in abortion outbreak in goats. **Experimental Parasitology**, v. 188, p. 21–25, 2018.
- DELLARUPE, A.; REGIDOR-CERRILLO, J.; JIMÉNEZ-RUIZ, E.; SCHARES, G.; UNZAGA, J. M.; VENTURINI, M. C.; ORTEGA-MORA, L. M. Comparison of host cell invasion and proliferation among *Neospora caninum* isolates obtained

from oocysts and from clinical cases of naturally infected dogs. **Experimental Parasitology**, v. 145, p. 22–28, 2014.

DI GUARDO, G.; PROIETTO, U.; DI FRANCESCO, C. E.; MARSILIO, F.; ZACCARONI, A.; SCARAVELLI, D.; MIGNONE, W.; GARIBALDI, F.; KENNEDY, S.; FORSTER, F.; IULINI, B.; BOZZETTA, E.; CASALONE, C. Cerebral toxoplasmosis in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Ligurian Sea coast of Italy. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 2, p. 245–253, 2010.

DOBROWOLSKI, J. M.; CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**, v. 26, n. 01, p. 163–173, 1997.

DOBROWOLSKI, J.; SIBLEY, L. D. The role of the cytoskeleton in host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Behring Inst Mitt**, n. 99, p. 90–96, 1997.

DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 410, 1995.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 3–31, 1998.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 121–153, 2002.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep – The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1–2, p. 1–14, 2009a.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs – The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 164, n. 2–4, p. 89–103, 2009b.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877–882, 2009c.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2a ed ed. Florida: CRC Press, 2010. v. 363

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. 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.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SAVILLE, W. J. A.; REED, S. M.; GRANSTROM, D. E.; SPEER, C. A. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM), **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2–4, p. 89–131, 2001.

DUBEY, J. P.; EDELHOFER, R.; MARCET, P.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 299–306, 2005.

DUBEY, J. P.; CRUTCHLEY, C. Toxoplasmosis in wallabies (*Macropus rufogriseus* and *Macropus eugenii*): blindness, treatment with atovaquone, and isolation of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 94, n. 4, p. 929–933, 2008.

- DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G. C.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; QU, D.; SU, C.; MARVULO, M. F. V.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 709–712, 2010a.
- DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; SINNETT, D.; MAJUMDAR, D.; SU, C. A new atypical highly mouse virulent *Toxoplasma gondii* genotype isolated from a wild black bear in Alaska. **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 713–716, 2010b.
- DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; RAJENDRAN, C.; YABSLEY, M. J.; THOMAS, N. J.; BECKMEN, K. B.; SINNETT, D.; RUID, D.; HART, J.; FAIR, P. A.; MCFEE, W. E.; SHEARN-BOCHSLER, V.; KWOK, O. C. H.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; FARIA, E. B.; ZHOU, H.; FELIX, T. A.; SU, C. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. **International journal for Parasitology**, v. 41, n. 11, p. 1139–1147, 2011a.
- DUBEY, J. P.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; JONES, J. L. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in different types of commercial cat litter. **The Journal of Parasitology**, v. 97, n. 5, p. 751–754, 2011b.
- DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; VILLENA, I.; ZHOU, H.; SU, C.; JONES, J. L. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 8, p. 827–833, 2011c.
- DUBREMETZ, J. F. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 27–30, 1998.
- DUBREMETZ, J. F.; RÉGUET, N. G.; CONSIEL, V.; FOURMAUX, M. N. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1007–1013, 1998.
- DUBREMETZ, J. F. F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes and infection**, v. 14, n. 15, p. 1403–1410, 2012.
- DZIERZINSKI, F.; NISHI, M.; OUKO, L.; ROOS, D. S. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. **Eukaryotic cell**, v. 3, n. 4, p. 992–1003, 2004.
- EIDELL, K. P.; BURKE, T.; GUBBELS, M.-J. Development of a screen to dissect *Toxoplasma gondii* egress. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 171, n. 2, p. 97–103, 2010.
- ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190–196, 2010.
- ETHERIDGE, R. D.; ALAGANAN, A.; TANG, K.; LOU, H. J.; TURK, B. E.; SIBLEY, D.; SIBLEY, L. D. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. **Cell host & Microbe**, v. 15, n. 5, p. 537–550, 2014.
- FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; BEZERRA DE MELO, L. R.; DE ALMEIDA

NETO, J. L.; DE OLIVEIRA SOUTO, D. V.; DE MORAIS, D. F.; ATHAYDE, A. C. R.; AZEVEDO, S. S.; DE JESUS PENA, H. F.; DE MELO, L. R.; DE ALMEIDA NETO, J. L.; SOUTO, D. V.; DE MORAIS, D. F.; ATHAYDE, A. C. R.; AZEVEDO, S. S.; PENA, H. F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3–4, p. 305–309, 2014.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133–148, 2009.

FERGUSON, D. J. P.; HUTCHISON, W. M.; DUNACHIE, J. F.; SIIM, J. C. Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 82 B, n. 2, p. 167–181, 1974.

FERREIRA-DA-SILVA, M. da F.; RODRIGUES, R. M.; ANDRADE, E. F. De; CARVALHO, L. De; GROSS, U.; LUDER, C. G. K.; BARBOSA, H. S. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 196–200, 2009.

FOX, B. A.; GIGLEY, J. P.; BZIK, D. J. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 323–331, 2004.

FRENAL, K.; POLONAI, V.; MARQ, J.-B.; STRATMANN, R.; LIMENITAKIS, J.; SOLDATI-FAVRE, D. Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. **Cell host & Microbe**, v. 8, n. 4, p. 343–357, 2010.

FRENAL, K.; SOLDATI-FAVRE, D. Un complexe moléculaire unique à l'origine de la motilité et de l'invasion des Apicomplexes. **Médecine/Sciences**, v. 29, p. 2013, 2013.

FRENKEL, J. K. Host, strain and treatment variation as factors in the pathogenesis of toxoplasmosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, n. 3, p. 390–415, 1953.

FRENKEL, J. K. Adoptive Immunity to Intracellular Infection No Title. **Journal of Immunology**, v. 98, n. 6, p. 1309–1319, 1967.

FRENKEL, J. K. Pursuing *Toxoplasma*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 122, n. 6, p. 553–559, 1970.

FRENKEL, J. K. *Toxoplasma* in and around Us. **BioScience**, v. 23, n. 6, p. 343–352, 1973.

FREY, C. F.; REGIDOR-CERRILLO, J.; MARREROS, N.; GARCÍA-LUNAR, P.; GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, D.; SCHARES, G.; DUBEY, J. P.; GENTILE, A.; JACQUIET, P.; SHKAP, V.; CORTES, H.; ORTEGA-MORA, L. M.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G. *Besnoitia besnoiti* lytic cycle *in vitro* and differences in invasion and intracellular proliferation among isolates. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

FRITZ, H.M.; BUCHHOLZ, K.R.; CHEN, X.; DURBIN-JOHNSON, B.; ROCKE, D.M.; CONRAD, P.A.; BOOTHROYD, J.C. Transcriptomic analysis of

*Toxoplasma* development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e29998, 2012.

GAJI, R. Y.; BEHNKE, M. S.; LEHMANN, M. M.; WHITE, M. W.; CARRUTHERS, V. B. Cell cycle-dependent, intercellular transmission of *Toxoplasma gondii* is accompanied by marked changes in parasite gene expression. **Molecular microbiology**, v. 79, n. 1, p. 192–204, 2011.

GENOT, S.; FRANCK, J.; FOREL, J.-M.; REBAUDET, S.; AJZENBERG, D.; DE PAULA, A. M.; DARDÉ, M.-L.; STEIN, A.; RANQUE, S. Severe *Toxoplasma gondii* I/III recombinant-genotype encephalitis in a human immunodeficiency virus patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3138–40, 2007.

GILK, S. D.; GASKINS, E.; WARD, G. E.; BECKERS, C. J. M. GAP45 phosphorylation controls assembly of the *Toxoplasma* myosin XIV complex. **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 2, p. 190–196, 2009.

GIOVANNINI, D.; SPATH, S.; LACROIX, C.; PERAZZI, A.; BARGIERI, D.; LAGAL, V.; LEBUGLE, C.; COMBE, A.; THIBERGE, S.; BALDACCI, P.; TARDIEUX, I.; MENARD, R. Independent roles of apical membrane antigen 1 and rhoptry neck proteins during host cell invasion by apicomplexa. **Cell host & Microbe**, v. 10, n. 6, p. 591–602, 2011.

GOLD, D. A.; KAPLAN, A. D.; LIS, A.; BETT, G. C. L.; ROSOWSKI, E. E.; CIRELLI, K. M.; BOUGDOUR, A.; SIDIK, S. M.; BECK, J. R.; LOURIDO, S.; EGEE, P. F.; BRADLEY, P. J.; HAKIMI, M.-A.; RASMUSSEN, R. L.; SAEIJ, J. P. J. The *Toxoplasma* dense granule proteins GRA17 and GRA23 mediate the movement of small molecules between the host and the parasitophorous vacuole. **Cell host & Microbe**, v. 17, n. 5, p. 642–652, 2015.

GOLDMAN, M.; CARVER, R. K.; SULZER, A. J. Reproduction of *Toxoplasma gondii* by Internal Budding. **The Journal of Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 161–171, 1958.

GONÇALVES, I. N.; UZÊDA, R. S.; LACERDA, G. a.; MOREIRA, R. R. N.; ARAÚJO, F. R.; OLIVEIRA, R. H. M.; CORBELLINI, L. G.; GONDIM, L. F. P. Molecular frequency and isolation of cyst-forming coccidia from free ranging chickens in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 1–2, p. 74–79, 2012.

GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, n. 5540, p. 161–165, 2001a.

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual Abundance of Atypical Strains Associated with Human Ocular Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 5, p. 633–639, 2001b.

GRIMWOOD, J.; SMITH, J. E. Kinetics of the growth and variation in infectivity of *Toxoplasma gondii* in mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 85, n. 6, p. 659–61, 1991.

GULSHAN UPPAL, MD; CHIEF EDITOR: NIRANJAN N SINGH, MD, D. **CNS Toxoplasmosis in HIV: Overview, Pathophysiology, Epidemiology**. 2017. Disponível em: <<https://emedicine.medscape.com/article/1167298-overview>>. Acesso em: 14 de setembro de 2018.

- HÅKANSSON, S.; CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* vacuoles: A two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **EMBO Journal**, v. 20, n. 12, p. 3132–3144, 2001.
- HALONEN, S. K.; WEISS, L. M.; MONTOYA, J.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, Netherlands, v. 363, n. 9425, p. 1965–1976, 2004.
- HARDING, C. R.; MEISSNER, M. The inner membrane complex through development of *Toxoplasma gondii* and Plasmodium. **Cellular Microbiology**, England, v. 16, n. 5, p. 632–641, 2014.
- HEASLIP, A. T.; EMS-MCCLUNG, S. C.; HU, K. TgICMAP1 is a novel microtubule binding protein in *Toxoplasma gondii*. **PloS One**, v. 4, n. 10, p. e7406, 2009.
- HERMANN, B.; BRUNN, A.; SCHWARZ, E. R.; SACHWEH, J. S.; SEIPELT, I.; SCHRDER, J. M.; VOGEL, U.; SCHOENDUBE, F. A.; BUETTNER, R. Fulminant toxoplasmosis in a heart transplant recipient. **Pathology Research and Practice**, v. 197, n. 3, p. 211–215, 2001.
- HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 01, p. 41–61, 2005.
- HOGAN, M. J.; YONEDA, C.; ZWEIGART, P. Growth of *Toxoplasma* strains in tissue culture. **American Journal of Ophthalmology**, v. 51, n. 5, p. 920/48-930/58, 1961.
- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises of parasite three clonal lineages : correlation with human disease genotype. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561–6, 1995.
- HOWE, D. K.; SUMMERS, B. C.; SIBLEY, L. D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 12, p. 5193–8, 1996.
- HU, K. Organizational changes of the daughter basal complex during the parasite replication of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 1, p. e10, 2008.
- HU, X.; BINNS, D.; REESE, M. L. The coccidian parasites *Toxoplasma* and *Neospora* dysregulate mammalian lipid droplet biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 26, p. 11009–11020, 2017.
- HUTCHISON, W. M.; DUNACHIE, J. F.; WORK, K.; CHR. SIIM, J. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 3, 1971.
- INGRAM, W. M.; GOODRICH, L. M.; ROBEY, E. A.; EISEN, M. B. Mice infected with low-virulence strains of *Toxoplasma gondii* lose their innate aversion to cat urine, even after extensive parasite clearance. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e75246, 2013.
- JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. The Resistance of the Encysted Form of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 46, n. 1, p. 11, 1960.
- JENSEN, K. D. C.; CAMEJO, A.; MELO, M. B.; CORDEIRO, C.; JULIEN, L.;

- GROTENBREG, G. M.; FRICKEL, E.-M.; PLOEGH, H. L.; YOUNG, L.; SAEIJ, J. P. J. *Toxoplasma gondii* superinfection and virulence during secondary infection correlate with the exact ROP5/ROP18 allelic combination. **MBio**, v. 6, n. 2, p. e02280, 2015.
- KAUFMAN, H. E.; REMINGTON, J. S.; JACOBS, L. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **American Journal of Ophthalmology**, v. 46, p. 255–261, 1958.
- KAUFMAN, H. E.; MALONEY, E. D. Multiplication of Three Strains of *Toxoplasma gondii* in Tissue Culture. **The Journal of Parasitology**, v. 48, n. 3, p. 358, 1962.
- KHURANA, S.; BATRA, N. Toxoplasmosis in organ transplant recipients: Evaluation, implication, and prevention. **Tropical Parasitology**, v. 6, n. 2, p. 123, 2016.
- KHAN, A.; BEHNKE, M. S.; DUNAY, I. R.; WHITE, M. W.; SIBLEY, L. D. Phenotypic and gene expression changes among clonal type I strains of *Toxoplasma gondii*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 12, p. 1828–1836, 2009.
- KHAN, A.; DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **Int J Parasitol**, v. 41, n. 6, p. 645–55, 2011
- KHAN, A., GRIGG, M.E. *Toxoplasma gondii*: Laboratory maintenance and growth. **Current Protocols in Microbiology**, v. 44, p. 1–20, 2018.
- KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 423–432, 2004.
- LEE, Y. H.; KIM, K. Y.; KANG, M. S.; SHIN, D. W. Detection of *Toxoplasma* antigens and antibodies in mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 201–210, 1995.
- LEMGRUBER, L.; KLOETZEL, J. A.; SOUZA, W. De; VOMMARO, R. C. *Toxoplasma gondii*: further studies on the subpellicular network. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 706–709, 2009.
- LINDSAY, D. S.; GASSER, R. B.; HARRIGAN, K. E.; MADILL, D. N.; BLAGBURN, B. L. Central-Nervous-System toxoplasmosis in roller canaries. **Avian Diseases**, v. 39, p. 204–207, 1995.
- LOPES, C. S.; FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; SILVA, D. A. O.; FERRO, E. A. V.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; MINEO, J. R. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 09, p. 1865–1875, 2016.
- LYCKE, E.; LUND, E. A tissue culture method for titration of infectivity and determination of growth rate of *Toxoplasma gondii*. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 60, p. 209–220, 1964.
- LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite–bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 198–201, 2002.
- MAZZARIOL, S.; MARCER, F.; MIGNONE, W.; SERRACCA, L.; GORIA, M.;

- MARSILI, L.; DI GUARDO, G.; CASALONE, C. Dolphin Morbillivirus and *Toxoplasma gondii* coinfection in a Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 20, 2012.
- McSPORRAN, K. D. D.; McCAUGHAN, C.; CURRALL, J. H. S. H.; DEMSTEEGT, A. Toxoplasmosis in goats. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 33, n. 3, p. 39–40, 1985.
- MEHTA, S.; SIBLEY, L. D. Actin depolymerizing factor controls actin turnover and gliding motility in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 22, n. 8, p. 1290–1299, 2011.
- MELO, E. J. L.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Structural Biology**, v. 130, n. 1, p. 27–33, 2000.
- MELO, R. P. B.; ALMEIDA, J. C.; LIMA, D. C. V.; PEDROSA, C. M.; MAGALHÃES, F. J. R.; ALCÂNTARA, A. M.; BARROS, L. D.; VIEIRA, R. F. C.; GARCIA, J. L.; MOTA, R. A. Atypical *Toxoplasma gondii* genotype in feral cats from the Fernando de Noronha Island, northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 224, p. 92–95, 2016.
- MICHELIN, A.; BITTAME, A.; BORDAT, Y.; TRAVIER, L.; MERCIER, C.; DUBREMETZ, J.-F.; LEBRUN, M. GRA12, a *Toxoplasma* dense granule protein associated with the intravacuolar membranous nanotubular network. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 3, p. 299–306, 2009.
- MITAL, J.; WARD, G. E. Current and emerging approaches to studying invasion in apicomplexan parasites. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 47, p. 1–32, 2008.
- MORDUE, D. G.; MONROY, F.; LA REGINA, M.; DINARELLO, C. A.; SIBLEY, L. D. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 8, p. 4574–4584, 2001.
- MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Seminar**. v.363, p.1965-1976, 2004.
- MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 208–213, 2009.
- MORISAKI, J. H.; HEUSER, J. E.; SIBLEY, L. D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2457–64, 1995.
- NAGAMUNE, K.; HICKS, L. M.; FUX, B.; BROSSIER, F.; CHINI, E. N.; SIBLEY, L. D. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 207–210, 2008b.
- NAGAMUNE, K.; MORENO, S. N.; CHINI, E. N.; SIBLEY, L. D. Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 47, p. 70–81, 2008a.
- NARASIMHAN, J.; JOYCE, B. R.; NAGULESWARAN, A.; SMITH, A. T.; LIVINGSTON, M. R.; DIXON, S. E.; COPPENS, I.; WEK, R. C.; SULLIVAN, W. J. J.; JR. Translation regulation by eukaryotic initiation factor-2 kinases in the development of latent cysts in *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 24, p. 16591–16601, 2008.

- NGÔ, H. M.; YANG, M.; JOINER, K. A. Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1531-41, 2004.
- NICOLLE, M. C.; MANCEAUX, L. On a new protozoan in gundis (*Toxoplasma* N. Gen). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 1–3, 2009.
- NIEDELMAN, W.; GOLD, D. A.; ROSOWSKI, E. E.; SPROKHOLT, J. K.; LIM, D.; FARID ARENAS, A.; MELO, M. B.; SPOONER, E.; YAFFE, M. B.; SAEIJ, J. P. J. The rhoptry proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, p. e1002784, 2012.
- NISHI, M.; HU, K.; MURRAY, J. M.; ROOS, D. S. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 121, p. 1559–1568, 2008.
- OVCARIKOVA, J.; LEMGRUBER, L.; STILGER, K. L.; SULLIVAN, W. J.; SHEINER, L. Mitochondrial behaviour throughout the lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017.
- PARAMESWARAN, N.; THOMPSON, R. C. A.; SUNDAR, N.; PAN, S.; JOHNSON, M.; SMITH, N. C.; GRIGG, M. E. Non-archetypal Type II-like and atypical strains of *Toxoplasma gondii* infecting marsupials of Australia. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 6, p. 635–640, 2010.
- PAREDES-SANTOS, T. C.; DE SOUZA, W.; ATTIAS, M. M. Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Structural Biology**, v. 177, n. 2, p. 420–430, 2012.
- PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561–569, 2008.
- PENA, H. F. J.; MARVULO, M. F. V.; HORTA, M. C.; SILVA, M. A.; SILVA, J. C. R.; SIQUEIRA, D. B.; LIMA, P.-A. C. P.; VITALIANO, S. N.; GENNARI, S. M. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3–4, p. 377–381, 2011.
- PENG, H.-J.; TAN, F.; LINDSAY, D. S. Pathogenesis of *Toxoplasma gondii* in Humans. In: **Human Emerging and Re-emerging Infections**. Hoboken, New Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons, 2015. p. 303–317.
- PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; VIDAL, J. E.; SU, C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. **Future Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1363–1379, 2009.
- PFEFFERKORN, E. R.; KASPER, L. H. *Toxoplasma gondii*: genetic crosses reveal phenotypic suppression of hydroxyurea resistance by fluorodeoxyuridine resistance. **Experimental Parasitology**, v. 55, n. 2, p. 207–218, 1983.
- PUTT, S. N. H. **Veterinary epidemiology and economics in Africa : a manual for use in the design and appraisal of livestock health policy**. Veterinary Epidemiology and Economics Research Unit, Dept. of Agriculture, University of Reading, 1987.

RADKE, J. R.; WHITE, M. W. A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 94, n. 2, p. 237–247, 1998.

RADKE, J. R.; STRIEPEN, B.; GUERINI, M. N.; JEROME, M. E.; ROOS, D. S.; WHITE, M. W. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 165–175, 2001.

RADKE, J. R.; BEHNKE, M. S.; MACKEY, A. J.; RADKE, J. B.; ROOS, D. S.; WHITE, M. W. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. **BMC Biology**, v.3, n. 26, p. 1-18, 2005.

RAGOZO, A. M. A.; PENA, H. F. J.; YAI, L. E. O.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 307–312, 2010.

RAJENDRAN, C.; SU, C.; DUBEY, J. P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 359–368, 2012.

RAMIREZ, J. D.; LLEWELLYN, M. S. Reproductive clonality in protozoan pathogens--truth or artefact? **Molecular Ecology**, v. 23, n. 17, p. 4195–4202, 2014.

RANDALL, L. M.; HUNTER, C. A. Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. **European Journal of Microbiology & Immunology**, v. 1, n. 1, p. 3–9, 2011.

READ, A. F. The evolution of virulence. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 73–6, 1994.

REGIDOR-CERRILLO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; SODUPE, I.; ADURIZ, G.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; DEL POZO, I.; ORTEGA-MORA, L. M. *In vitro* invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. **Veterinary Research**, v. 42, p. 41, 2011.

RÊGO, W. M. F.; COSTA, J. G. L.; BARAVIERA, R. C. A.; PINTO, L. V.; BESSA, G. L.; LOPES, R. E. N.; VITOR, R. W. A. Association of ROP18 and ROP5 was efficient as a marker of virulence in atypical isolates of *Toxoplasma gondii* obtained from pigs and goats in Piauí, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 247, p. 19–25, 2017.

ROBERT-GANGNEUX, F.; MERONI, V.; DUPONT, D.; BOTTEREL, F.; AGUADO GARCIA, J. M.; BRENIER-PINCHART, M. P.; ACCOCEBERRY, I.; AKAN, H.; ABBATE, I.; BOGGIAN, K.; BRUSCHI, F.; CARRATALÀ, J.; DAVID, M.; DRGONA, L.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; FARINAS, M. C.; GENCO, F.; GKRIANIA-KLOTSAS, E.; GROLL, A. H.; GUY, E.; HIRZEL, C.; KHANNA, N.; KURT, Ö.; JUNIE, L. M.; LAZZAROTTO, T.; LEN, O.; MUELLER, N. J.; MUNOZ, P.; PANA, Z. D.; ROILIDES, E.; STAJNER, T.; VAN DELDEN, C.; VILLENA, I.; PELLOUX, H.; MANUEL, O. Toxoplasmosis in transplant recipients, Europe, 2010–2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 8, p. 1497–1504, 2018.

ROBERT-GANGNEUX, F.; MURAT, J.-B.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M.-P.; GANGNEUX, J.-P.; PELLOUX, H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 12, p. 530–536, 2011.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 458–72, 2006.

RUGGIERO, M. A.; GORDON, D. P.; ORRELL, T. M.; BAILLY, N.; BOURGOIN, T.; BRUSCA, R. C.; CAVALIER-SMITH, T.; GUIRY, M. D.; KIRK, P. M. A higher level classification of all living organisms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, s0119248, 2015.

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, 1948.

SABIN, A. B.; OLITSKY, P. K. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. **Science**, v. 85, n. 2205, p. 336–338, 1937.

SAEIJ, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 10, p. 476-81, 2005.

SAKSOUK, N.; BHATTI, M. M.; KIEFFER, S.; SMITH, A. T.; MUSSET, K.; GARIN, J.; SULLIVAN, W. J.; CESBRON-DELAUW, M.-F.; HAKIMI, M.-A.; HAKIMI, M.-A. Histone-modifying complexes regulate gene expression pertinent to the differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 23, p. 10301–14, 2005.

SAMICO-FERNANDES, E. F. T.; SAMICO-FERNANDES, M. F. T.; DE ALBUQUERQUE, P. P. F.; DE ALMEIDA, J. C.; SANTOS, A. D. S.; DA ROCHA MOTA, A.; NETO, O. L. D. S.; MOTA, R. A. *Toxoplasma gondii* in backyard pigs: Seroepidemiology and mouse bioassay. **Acta Parasitologica**, v. 62, n. 2, p. 466–470, 2017.

SARAF, P.; SHWAB, E. K.; DUBEY, J. P.; SU, C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. **Experimental Parasitology**, v. 174, p. 25–30, 2017.

SCHLUTER, D.; DAUBENER, W.; SCHARES, G.; GROSS, U.; PLEYER, U.; LUDER, C. Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 917–929, 2014.

SETHI, K. K.; RAHMAN, A.; PELSTER, B.; BRANDIS, H. Search for the presence of lectin-binding sites on *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 63, n. 6, p. 1076–80, 1977.

SHARMA, P.; CHITNIS, C. E. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 432–437, 2013.

SHEFFIELD, H. G.; MELTON, M. L. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 54, n. 2, p. 209, 1968.

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

- mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 2, p. 141–146, 2016.
- SHWAB, E. K.; ZHU, X.-Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 04, p. 453–461, 2014.
- SIBLEY, D. L.; CHARRON, A.; HÅKANSSON, S.; MORDUE, D. **Invasion and Intracellular Survival by *Toxoplasma***. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6450/>>. Acesso em 10 de Abril de 2018.
- SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 82–85, 1992.
- SIBLEY, L. D. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 3, p. 129–132, 1995.
- SIBLEY, L. D.; MORDUE, D. G.; SU, C.; ROBBEN, P. M.; HOWE, D. K. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 29, n. 357, p. 81-8, 2002.
- SILVA, A. F.; BRANDÃO, F. Z.; CARLOS, F.; OLIVEIRA, R.; MARIA, A.; FERREIRA, R. *Toxoplasma gondii* in the sheep industry: a global overview and the situation in Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v. 20, p. 179–188, 2014.
- SILVA, J. C. R.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; AJZENBERG, D.; MARVULO, M. F. V.; MAGALHÃES, F. J. R.; FILHO, C. D. F. L.; OLIVEIRA, S.; SOARES, H. S.; FEITOSA, T. F.; AIZAWA, J.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J. Cat-rodent *Toxoplasma gondii* Type II-variant circulation and limited genetic diversity on the Island of Fernando de Noronha, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 2-6, 2017.
- SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v. 107, n. 2, p. 253–260, 2010.
- SKILLMAN, K. M.; DIRAVIYAM, K.; KHAN, A.; TANG, K.; SEPT, D.; SIBLEY, L. D. Evolutionarily divergent, unstable filamentous actin is essential for gliding motility in apicomplexan parasites. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 10, p. e1002280, 2011.
- SOETE, M.; CAMUS, D.; DUBRAMETZ, J. F. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 78, n. 4, p. 361–370, 1994.
- SOETE, M.; FORTIER, B.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: Kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 259-264, 1993
- SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: Structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for**

**Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1293-302. 2001.

SOLOMON, C. How kitty is killing the dolphins. **Scientific American**, v. 308, p. 72–77, 2013.

SOUSA, I. C.; PENA, H. F. J.; SANTOS, L. S.; GENNARI, S. M.; COSTA, F. N. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens on São Luis island, Maranhão state, Brazil, with a new genotype described. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 159–164, 2016.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, É. S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. **Scientia**, v. 20, n. 1, p. 131–143, 2010.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P.; MCALLISTER, M. M.; BLIXT, J. A. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1509–1519, 1999.

SPLENDRE, A. M. D. On a new protozoan parasite of rabbits. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 1–2, 2009.

SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 414–416, 2003.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 841–848, 2006.

SU, C.; DUBEY, J. P.; AJZENBERG, D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; MAJUMDAR, D.; DARDE, M.-L.; ZHU, X.-Q.; SIBLEY, L. D.; ZHOU, P. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 15, p. 5844–5849, 2012.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: Beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 3, p. 137–42, 2006.

SULLIVAN JR., W. J.; NARASIMHAN, J.; BHATTI, M. M.; WEK, R. C. Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control. **Biochemical Journal**, v. 380, p. 523–531, 2004.

SULLIVAN, W. J. J.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 717–733, 2012.

TAKACS, A. C.; SWIERZY, I. J.; LUDER, C. G. K. Interferon-gamma restricts *Toxoplasma gondii* development in murine skeletal muscle cells via nitric oxide production and immunity-related GTPases. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e45440, 2012.

TARDIEUX, I.; MENARD, R. Migration of Apicomplexa across biological barriers: the *Toxoplasma* and *Plasmodium* rides. **Traffic**, v. 9, n. 5, p. 627–635, 2008.

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.

THREE Rs Declaration of Bologna. In: BALLS, M.; VAN ZELLER, A.-M.; HALDER, M., eds. **Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation**. Amsterdam: Elsevier, 2000. p. 15.

THOMAS, S. R.; ELKINTON, J. S. Pathogenicity and virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 3, p. 146–151, 2004.

TOLEDO, D. A. M.; D'AVILA, H.; MELO, R. C. N. Host lipid bodies as platforms for intracellular survival of protozoan parasites. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 174, 2016.

TORREY, E. F.; YOLKEN, R. H. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 380–384, 2013.

TRAVIER, L.; MONDRAGON, R.; DUBREMETZ, J. F.; MUSSET, K.; MONDRAGON, M.; GONZALEZ, S.; CESBRON-DELAUW, M. F.; MERCIER C. Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 7, p. 757–773, jun. 2008.

TURILLI, C.; CORAZZOLA, S. Spontaneous toxoplasmosis in canaries (*Serinus canaria*) and other small passerine cage birds. **Avian Pathology**, v. 15, n. 2, p. 183–197, 1986.

VANAGAS, L.; JEFFERS, V.; BOGADO, S. S.; DALMASSO, M. C.; SULLIVAN, W. J.; ANGEL, S. O.; ANGEL, S. O. *Toxoplasma* histone acetylation remodelers as novel drug targets. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 10, n. 10, p. 1189–201, 2012.

VIDIĆ, B.; SAVIĆ-JEVĐENIĆ, S.; GRGIĆ, Z.; BUGARSKI, D.; MALJKOVIĆ, M. Infectious abortion in sheep. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 23, n. 5-6-1, p. 383–389, 2007.

VITALIANO, S. N.; SOARES, H. S.; MINERVINO, A. H. H.; SANTOS, A. L. Q.; WERTHER, K.; MARVULO, M. F. V.; SIQUEIRA, D. B.; PENNA, H. F. J.; SOARES, R. M.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 276–283, 2014.

WALLON, M.; PEYRON, F.; CORNU, C.; VINAULT, S.; ABRAHAMOWICZ, M.; KOPP, C. B.; BINQUET, C. Congenital *Toxoplasma* infection: monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 9, p. 1223–1231, 2013.

WANG, M.; MENG, P.; YE, Q.; PU, Y.-H.; YANG, X.-Y.; LUO, J.-X.; ZHANG, N.-Z.; ZHANG, D.-L. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in soils in northwestern China using a new semi-nested PCR assay. **BMC Veterinary Research**, v. 10, p. 238, 2014.

WARE, P. L.; KASPER, L. H. Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 3, p. 778–783, 1987.

WEILHAMMER, D. R.; RASLEY, A. Genetic approaches for understanding

- virulence in *Toxoplasma gondii*. **Briefings in Functional Genomics**, v. 10, n. 6, p. 365–373, 2011.
- WEISS, L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, n. 4, p. D391–D405, 2000.
- WILLIAMS, S. M.; FULTON, R. M.; RENDER, J. A.; MANSFIELD, L.; BOULDIN, M. Ocular and encephalic toxoplasmosis in canaries. **Avian Diseases**, v. 45, n. 1, p. 262–267, 2001.
- WOLF, D. C.; PAIGE, B. Human Toxoplasmosis : occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. **Science**, v. 89, n. 2306, p. 226–227, 1939.
- WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*, **AIDS**, v. 7, n. 3, p. 299-316, 1993.
- WYROSDICK, H. M.; SCHAEFER, J. J. *Toxoplasma gondii*: History and diagnostic test development. **Animal Health Research Reviews**, v. 16, n. 2, p. 150–162, 2015.
- YANG, N.; FARRELL, A.; NIEDELMAN, W.; MELO, M.; LU, D.; JULIEN, L.; MARTH, G. T.; GUBBELS, M.-J.; SAEIJ, J. P. J. Genetic basis for phenotypic differences between different *Toxoplasma gondii* type I strains. **BMC Genomics**, v. 14, p. 467, 2013.
- ZHANG, Y. W.; HALONEN, S. K.; MA, Y. F.; WITTNER, M.; WEISS, L. M. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 501–507, 2001.
- ZHENG, B. et al. MIC6 associates with aldolase in host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 105, n. 2, p. 441–445, 2009.
- ZHOU, D.-H.; ZHAO, F.-R.; NISBET, A. J.; XU, M.-J.; HUANG, S.-Y.; ZHU, X.-Q. Comparative proteomic analysis of different *Toxoplasma gondii* genotypes by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis combined with mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 35, n. 4, p. 533–545, 2014.

## 5 ARTIGO 1

***Toxoplasma gondii* do tipo II variante (#3) apresenta fenótipo de infectividade diferente de cepas do tipo II clássico (#1)**

**Artigo a ser submetido para o periódico Comparative Immunology,  
Microbiology & Infectious Diseases**

## ***Toxoplasma gondii* do tipo II variante (#3) apresenta fenótipo de infectividade diferente de cepas do tipo II clássico (#1)**

**Resumo:** O ciclo lítico de *T. gondii* (adesão, invasão, proliferação e egressão) e a habilidade de converter-se em bradizoítos encistados representam etapas-chave para o sucesso do processo de infecção e gravidade da patogênese da toxoplasmose. Nesse estudo objetivou-se caracterizar cepas de *T. gondii* do genótipo tipo II clássica e variante, quanto à capacidade de invasão, proliferação e encistamento. As cepas previamente isoladas em surtos de abortamento de pequenos ruminantes no Brasil (TgGtBrAL01 e TgGtBrAL02; #1 ToxoDB), na Espanha (TgShSp1; #3 ToxoDB) e a cepa ME49 (cepa referência) foram submetidas às provas de caracterização fenotípica utilizando um modelo *in vitro*. As quatro cepas avaliadas mostraram maior taxa de penetração nas células hospedeiras entre 2 e 6 hpi (InvP6h). Não houve diferença marcante no padrão fenotípico entre as cepas ME49, TgGtBrAL01 e TgGtBrAL02, entretanto a cepa TgShSp01 apresentou um fenótipo distinto: menor capacidade de invasão, baixa proliferação e elevada taxa de encistamento. Conclui-se que cepas do tipo II variante possuem comportamento biológico heterogêneo em relação tipo II clássico.

**Palavras-chaves:** Toxoplasmose, ciclo lítico, modelo *in vitro*.

### **1. Introdução**

*Toxoplasma gondii* é um parasito eurixeno, capaz de infectar virtualmente todos os animais de sangue quente. É o agente etiológico da toxoplasmose, enfermidade de caráter zoonótico, amplamente difundida no mundo [1].

Em pequenos ruminantes, a toxoplasmose caracteriza-se principalmente por alterações reprodutivas (reabsorção embrionária, repetição de cio, abortamento, nascimento de filhotes congenitamente infectados sintomáticos ou assintomáticos), levando a prejuízos econômicos significativos na cadeia produtiva [2]. A infecção pode se apresentar na forma subclínica crônica, configurando a manifestação mais comum, na forma branda oligossintomática ou até na forma fatal, com diferentes variáveis que podem interferir nessa evolução [3,4]. Fatores associados ao hospedeiro, ao ambiente e ao agente têm

sido propostos como cruciais no desenvolvimento dessas formas clínicas [5], a exemplo da virulência do parasito [6].

O padrão para avaliar a virulência de *T. gondii* é determinar a dose letal 50 (DL50) no modelo murino, utilizando como principais critérios a taxa de infecção, taxa de mortalidade, carga parasitária e o tempo de sobrevivência dos camundongos infectados [7]. Já é sabido que a infecção por cepas clonais de *T. gondii* do tipo I (DL100 ~1 taquizoíto) são geralmente fatais em camundongos (cepa hipervirulenta), enquanto que as infecções por cepas do tipo II (DL50 ~10<sup>3</sup>) e III (DL50 ~10<sup>5</sup>) produzem infecções que podem ser controladas (cepas hipo ou avirulentas) [8,9].

No Brasil, a diversidade genética de isolados de *T. gondii* em pequenos ruminantes é alta [10], enquanto que a presença de linhagens clonais clássicas como a do tipo II, é rara [11]. Cepas dessa linhagem são predominantes em infecções de pacientes humanos imunocomprometidos (infecções pelo HIV), na toxoplasmose congênita e na ocular [12], sendo relatada com constância na África, Europa e América do Norte [13]. Linhagem clonal tipo II já foi relatada em quadros de abortamentos por toxoplasmose em ovinos no Reino Unido, Itália [14,15] e, mais recentemente, na Espanha [16], resultando no isolamento da cepa TgShSp1, que demonstrou ser avirulenta. Em abortamentos caprinos, o genótipo tipo II foi descrito pela primeira vez no Brasil por Oliveira et al. [17], sendo isoladas as cepas TgGtBrAL01 e TgGtBrAL02, que demonstraram um fenótipo intermediário de virulência.

Etapas do ciclo lítico, como invasão e proliferação intracelular [18–20], além da habilidade de converter-se em bradizoítos encistados como mecanismo de escape imunológico [21,22] são a chave para a compreensão da virulência e da patogênese de Toxoplasmatíneos. Essas características biológicas são avaliadas com sucesso no modelo *in vitro*, uma vez que esses mecanismos são expressos fenotipicamente no curso da infecção da célula cultivada [19,23,24].

O objetivo deste estudo foi caracterizar fenotipicamente cepas de *T. gondii* de genótipo tipo II clássico e variante, isoladas de fetos de pequenos ruminantes abortados, quanto à capacidade de invasão parasitária, proliferação intracelular e encistamento induzido.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Seleção das cepas de *T. gondii*, manutenção e cultura celular

Foram avaliadas três cepas de *T. gondii* previamente isoladas de tecidos fetais de caprinos e ovino, provenientes de surtos de abortamento que ocorreram no Brasil (TgGtBrAL01 e TgGtBrAL02) e na Espanha (TgShSp1). Os dados sobre a identificação dos isolados, hospedeiro, número de passagem em cultura celular e origem geográfica estão na tabela 1. A cepa ME49 foi incluída como referência. A genotipagem classificou os isolados TgGtBrAL01 e TgGtBrAL02 como genótipo #1 (ToxoDB), considerado tipo II clássico, enquanto o isolado espanhol foi caracterizado como genótipo #3 (ToxoDB), tipo II variante.

**Tabela 1** - Informações sobre as cepas de *Toxoplasma gondii* de genótipo tipo II clássicos e variante isolados de tecidos fetais de pequenos ruminantes.

Cepas	Animal	Passagens <i>in vitro</i> <sup>b</sup>	País	ToxoDB	Referência
TgGtBrAL01	Caprino	6-13	Brasil	#1	De Oliveira et al. [17]
TgGtBrAL02	Caprino	3-9R <sup>c</sup>	Brasil	#1	De Oliveira et al. [17]
TgShSp1	Ovino	5-12	Espanha	#3	Sánchez-Sánchez et al. [16]
ME49 <sup>a</sup>	Ovino	4-11 <sup>d</sup>	EUA	#1	Cepa de referência

<sup>a</sup> Cepa referência; <sup>b</sup> Intervalo do número de passagens utilizadas nos experimentos desse estudo; <sup>c</sup> Número de passagem após reisolamento em cultivo celular a partir de camundongo, por suspeita de contaminação por *Mycoplasma*; <sup>d</sup> Número de passagens após descongelamento da cepa mantida no SALUVET, Madrid, Espanha.

Linhagens celulares de MARC-145 e *Human Foreskin Fibroblast* (HFF) foram mantidas de acordo com Regidor-Cerrillo et al. [22]. Após 3 dias de infecção em cultivo de célula MARC-145, os taquizoítos das cepas de *T. gondii* foram observados e avaliados quanto à presença de vacúolos parasitóforos e formação de placas de lise. A purificação dos taquizoítos foi realizada quando a maioria dos vacúolos parasitóforos estavam preservados, através das colunas decartáveis PD-10 Desalting (G.E. Healthcare) [16]. A viabilidade das cepas foi determinada pelo teste de exclusão do Azul de Trypan [25]. Nos ensaios de invasão e proliferação foram utilizadas as células da linhagem HFF e para os ensaios de conversão taquizoíto-bradizoíto utilizou-se a MARC-145.

Controle do cultivo celular contra contaminação por *Mycoplasma* spp. era realizado rotineiramente pelo teste de DAPI e pela PCR da cultura, utilizando um

Kit comercial. Uma das passagens de TgGtBrAL02, apresentou PCR positiva para *Mycoplasma* spp., apesar de não ser visualizado marcações fluorescentes indicativas de contaminação no teste de DAPI. Para sanar quaisquer dúvidas, optou-se pela reinoculação em modelo murino (foram realizadas duas passagens em camundongos, a primeira durou 9 dias e a segunda 7 dias), e reisolamento *in vitro*. Todas das outras cepas e passagens celulares foram negativas no teste DAPI e na PCR para *Mycoplasma* spp.

## **2.2. Caracterização fenotípica *in vitro***

As provas de caracterização de comportamento biológico *in vitro* utilizadas nesse estudo foram: ensaio de invasão parasitária, prova de proliferação intracelular e capacidade de conversão taquizoíto/bradizoíto.

### **2.2.1. Ensaio de invasão parasitária**

A taxa de invasão parasitária nos tempos 2 hpi (InvP2h) e 6 hpi (InvP6h) foi determinada pela relação entre a média de eventos gerados por cada isolado e o número de taquizoítos inoculados em cada poço. A taxa total de invasão parasitária (InvPT) foi determinada com a média do número de eventos por poço nas culturas de 48 horas. Foram realizados em quadruplicatas, com dois ensaios independentes. O ensaio foi conduzido segundo metodologia descrita por Dellarupe [20], com modificações.

Em três placas de 24 poços, semeou-se  $2 \times 10^5$  células da linhagem celular HFF, incubadas por 24 horas a 37°C em estufa úmida, com saturação de 5% de CO<sub>2</sub> para formação de monocamada com confluência de 80-90%. A estes cultivos, foram inoculados  $5 \times 10^2$  taquizoítos purificados de cada isolado por poço, reincubando as culturas sob as condições já descritas. Duas horas pós infecção (InvP2h) uma placa foi lavada com solução salina fosfatada tamponada (PBS 1X) por três vezes, visando a remoção dos taquizoítos no meio extracelular. Esse procedimento foi repetido, em outra placa, as 6 hpi (InvP6h) e uma terceira placa foi mantida sem lavagens por 48 hpi (InvPT).

Ao final de 48 horas de incubação, as placas (2, 6 e 48 hpi) foram fixadas por 10 minutos com paraformaldeído a 3% e glutaraldeído a 0,05%, boqueada durante 5 minutos com borohidreto de sódio (50mg/50mL) e, finalmente, submetidas à imunomarcagem para permitir a visualização e contagem de todos

os eventos de invasão (vacúolos parasitóforos e placas de lise). A contagem foi realizada em microscópio de fluorescência invertido no aumento de 20x.

### **2.2.2. Ensaio de proliferação intracelular**

A proliferação dos taquizoítos *in vitro* foi determinada pela quantificação do número de taquizoítos em distintos tempos (2; 12; 24; 48; 72 hpi) por PCR quantitativa (qPCR), similar ao procedimento proposto por Frey et al. [24]. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas em 2 ensaios independentes.

Em placas de 24 poços, células da linhagem HFF foram cultivadas na concentração  $2,5 \times 10^5$  células/poço e mantidas em estufa úmida por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Taquizoítos de *T. gondii* dos três distintos isolados estudados foram adicionados à monocamada celular, na concentração  $2 \times 10^3$  taquizoítos/poço e incubados nas condições já descritas. Após 2h da inoculação, os taquizoítos do meio extracelular foram retirados através de 3 lavagens com PBS 1X, sendo as culturas novamente incubadas.

As placas referentes a cada um dos tempos avaliados (2; 12; 24; 48; 72 hpi) eram retiradas da incubação e executou-se a lise das culturas para extração de DNA utilizando o *kit* comercial DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen, USA), segundo recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram armazenadas -80°C até realização da qPCR. Culturas de células HFF não infectadas foram utilizadas como controle negativo na análise por qPCR.

Foram determinadas as curvas de proliferação, cinética de crescimento (fase lag e log do ciclo celular do parasito) e o *doubling time* (dT), tempo necessário para as cepas dobrarem sua população inicial de taquizoítos.

### **2.2.3. Ensaio de conversão taquizoíto/bradizoíto**

Foi avaliada a capacidade de conversão taquizoíto-bradizoíto dos isolados *in vitro* por meio da alcalinização do pH do meio. Cada condição foi avaliada em quadruplicata e os experimentos foram realizados em dois ensaios independentes. A taxa de conversão total (ConvT) foi determinada pela contagem dos eventos. Enquanto que a taxa de conversão relativa (ConvR), foi obtida pela subtração da porcentagem de encistamento nas culturas com estímulo estressante (pH 8,0), da taxa de cisto nas culturas sem estresse (pH 7,2). Exclusivamente para o isolado TgShSp1, dados de conversão

taquizoíto/bradizoíto foram importados do estudo realizado por Sánchez-Sánchez et al. [16].

Cultura de células MARC-145 foram semeadas na concentração  $5 \times 10^4$  células/poço, em placas de 24 poços nas mesmas condições já descritas anteriormente. Taquizoítos purificados de *T. gondii* foram adicionados às culturas na concentração de  $2 \times 10^3$  taquizoítos/poço e incubados com meio DMEM pH 7,2. Após 8h pós-inoculação, as culturas celulares foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e adicionou-se meio DMEM com pH 8.0. As culturas foram incubadas em estufa úmida a 37°C, na ausência de CO<sub>2</sub>, por 72 horas, tendo o meio trocado diariamente para manutenção do pH alcalino. Controles negativos da conversão compreendiam a incubação dos isolados com DMEM pH 7,2 a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>.

Todas as placas foram fixadas após as 72 hpi em condições descritas acima, e seguiu-se com a imunomarcção e contagem dos eventos (vacúolos parasitóforo, placas de lise ou cistos teciduais), sendo contados 100 eventos em cada poço. A contagem foi realizada em microscópio de fluorescência invertido, no aumento de 200x.

### **2.3. Marcação por imunofluorescência**

A imunomarcção foi realizada para avaliar os ensaios de invasão parasitária e conversão taquizoíto-bradizoíto. Após a fixação, as células foram lavadas por 3 vezes com PBS e permeabilizadas utilizando uma solução de 0,25% de Triton 100X em PBS e incubados por 30 minutos a 37°C. Seguiu-se com o bloqueio com PBS a 3% de BSA em condições de incubação similares a descrita; essa etapa evitou a autofluorescência ou ligações protéicas inespecíficas.

A imunomarcção usada para o ensaio *in vitro* de invasão seguiu o protocolo descrito por Regidor-Cerrillo et al. [22] com modificações. Os parasitos foram marcados com soro de camundongo hiperimune anti-taquizoíto de *Toxoplasma gondii* na diluição 1:400. Esse soro era composto de um *pool* de amostras de animais infectados com a cepa ME49. Foi utilizado anticorpo caprino IgG anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor® 488 (diluição 1:250, cor verde; Life Technologies, EUA).

Para os ensaios de conversão taquizoítos-bradizoítos, as culturas foram duplamente marcadas. Para confirmar a formação de cistos (bradizoítos), utilizou-se lectina aglutinina de *Dolichos biflorus* - biotinizada (DBA) (diluição 1:150; Vector Laboratories, EUA) e para marcar a presença de vacúolos parasitóforos ou placas de lise (taquizoítos) incubou-se soro de camundongo hiperimune anti-*T. gondii* (diluição 1:1600), seguido de IgG de caprino anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor® 594 (diluição de 1: 250; Life Technologies, EUA). O DBA se excita quando submetido à luz UV, revelando fluorescência verde, enquanto Alexa Fluor® 594 apresenta fluorescência na cor vermelha, permitindo diferenciar os distintos eventos.

Na continuidade, em ambos os ensaios, foi realizada nova lavagem (3 vezes com PBS 1X), acompanhada de uma última marcação com DAPI (1:10.000) que se intercala com DNA e revela os núcleos celulares. Por fim, as placas foram lavadas com PBS 1X e mantidas com água destilada e armazenadas sob refrigeração até a leitura.

#### **2.4. PCR quantitativa**

O número de taquizoítos de *T. gondii* foi determinado pela interpolação do valor Ct (*Cycle threshold value* que representa o número de ciclo fractacional que reflete um resultado PCR positivo) sobre duas curvas padrões.

Inicialmente, o DNA de *T. gondii* foi das amostras foi mensurado a partir da amplificação da região repetida de 529bp; os *primers* e o perfil térmico usado foram descritos por Edvinsson et al. [26]. Também foi executada a curva padrão composta pela quantificação de diferentes concentrações de DNA do parasito na base 10 ( $10^4$  a  $10^{-1}$  taquizoítos) nem uma solução de DNA genômico da célula cultivada (concentração de 20ng/ $\mu$ L).

Para normalizar a quantificação dos parasitos em cada amostra, o gene endógeno  $\beta$ -actina foi empregado de acordo com o protocolo de Gutierrez et al. [27] e uma segunda curva padrão foi constituída com diferentes quantidades de DNA genômico da célula cultivada (320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 ng de DNA). Os resultados foram expressos pela relação entre a quantidade de DNA do parasito e DNA da célula ( $R^2 \geq 0.99$ ; valores *slope* variaram entre -3.42 a -3.27).

## 2.5. Análise estatística

Foram empregados o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn para investigar a diferença na taxa de infecção nas InvP2h, InvP6h e InvPT. Diferenças na frequência de detecção de DNA do parasito pelo qPCR foram avaliadas usando o  $\chi^2$  ou o teste exato de Fisher. O teste ANOVA two-way, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, foram realizados para estudar a influência da cepa e a indução da conversão. A correção de Bonferroni foi usada para eliminar o erro associado à realização de comparações múltipla. Significância estatística foi estabelecida como  $p < 0,05$ . O software GraphPad Prism 5 v.5.01 foi utilizado para realizar as análises.

## 3. Resultados

### 3.1. Taxa de invasão parasitária

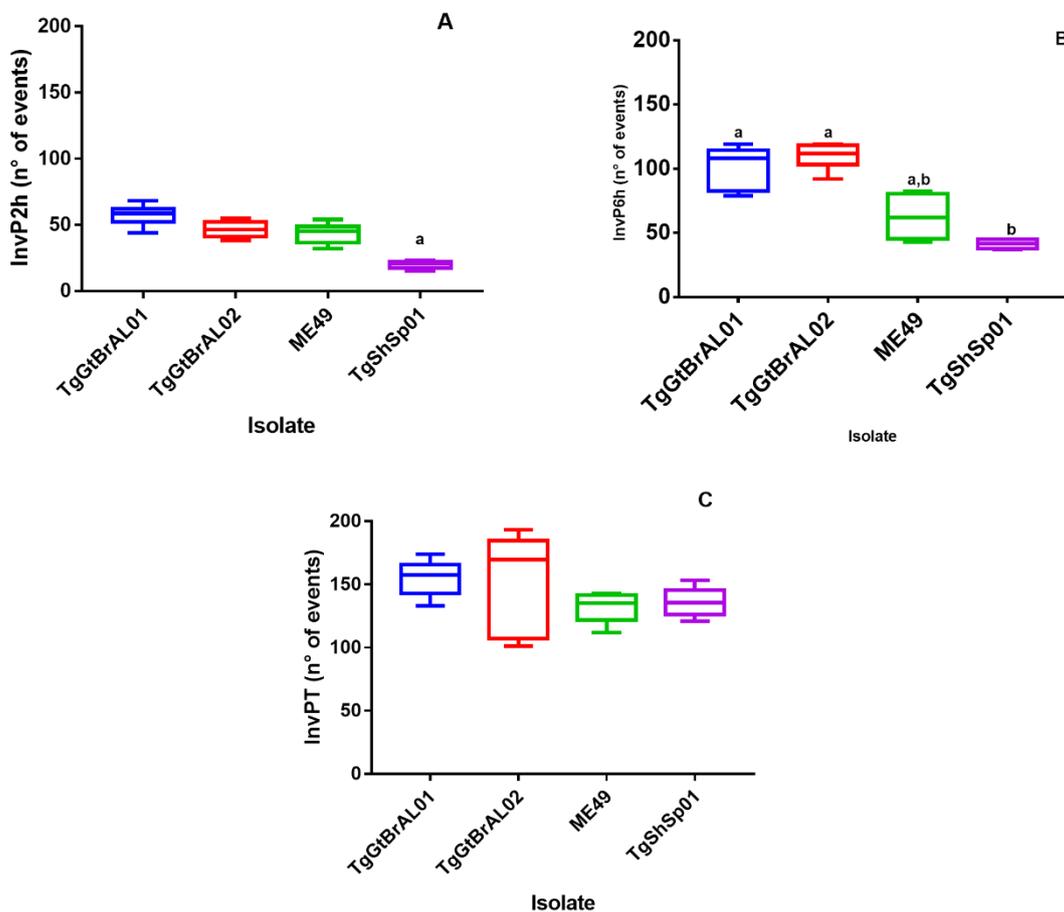
Todos os quatro isolados apresentaram maior taxa de entrada celular entre o intervalo de tempo de 2 a 6 horas pós-inoculação (hpi; InvP6h) do que no intervalo entre 0 a 2 hpi (InvP2h) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Taxas de invasão parasitárias as 2h (InvP2h) e as 6h (InvP6h) em relação a 48h (InvP48h) determinadas para as cepas de *Toxoplasma gondii* do genótipo tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha.

Isolates	InvP2h (%)	InvP6h (%)
ME49	33,0	47,4
TgShSp01	14,6	30,4
TgGtBrAL01	36,9	65,6
TgGtBrAL02	25,7	60,8

O isolado espanhol (TgShSp1) diferiu significativamente dos outros isolados na invasão parasitárias em InvP2h e InvP6h. Os genótipos TgGtBrAL01 e TgGtBrAL02 foram mais eficientes na InvP6h que ME49 e TgShSp1. Não houve diferença entre os quatro isolados na invasão total a 48 hpi (InvPT) (Figura 1).

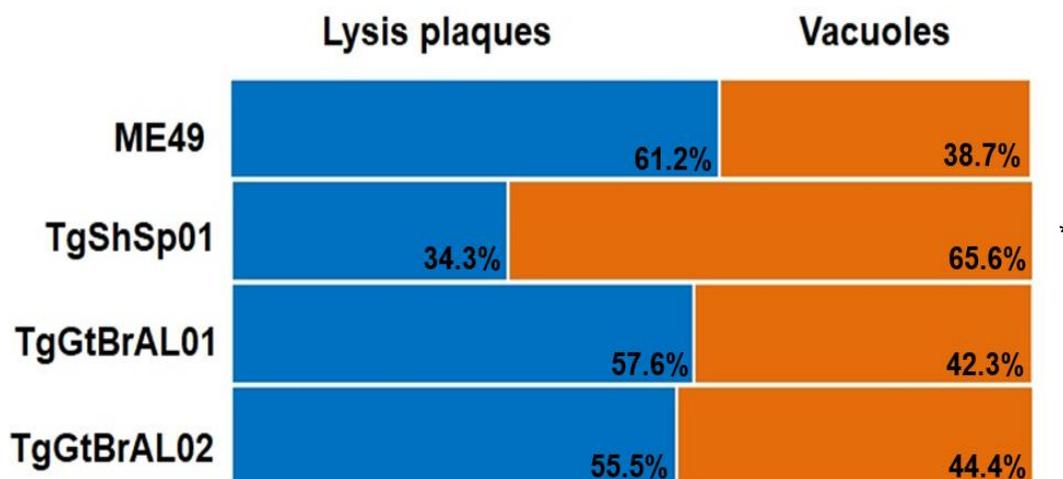
**Figura 1** - Eventos de invasão parasitária (InvP2h, InvP6h, InvPT) determinadas para as cepas de *Toxoplasma gondii* do genótipo tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha.



Box-plot representando as medianas, os quartis inferior e superior (caixas) e valores mínimos e máximos (barras) de invasão parasitária (InvP) avaliados *in vitro* às 2 hpi (InvP2h) (A), às 6hpi (InvP6h) (B) e às 48 hpi (InvPT) (C). Diferentes letras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Na contagem dos eventos (placas de lise e formação de vacúolo parasitóforo) na InvPT, houve uma diferença no padrão da infecção de TgShSp1 (Figura 2), apresentando maior proporção de vacúolos parasitóforos do que placa de lise, em comparação aos demais isolados.

**Figura 2** - Proporção na formação de vacúolos e placas de lise na InvPT das cepas de *Toxoplasma gondii* do genótipo tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha.



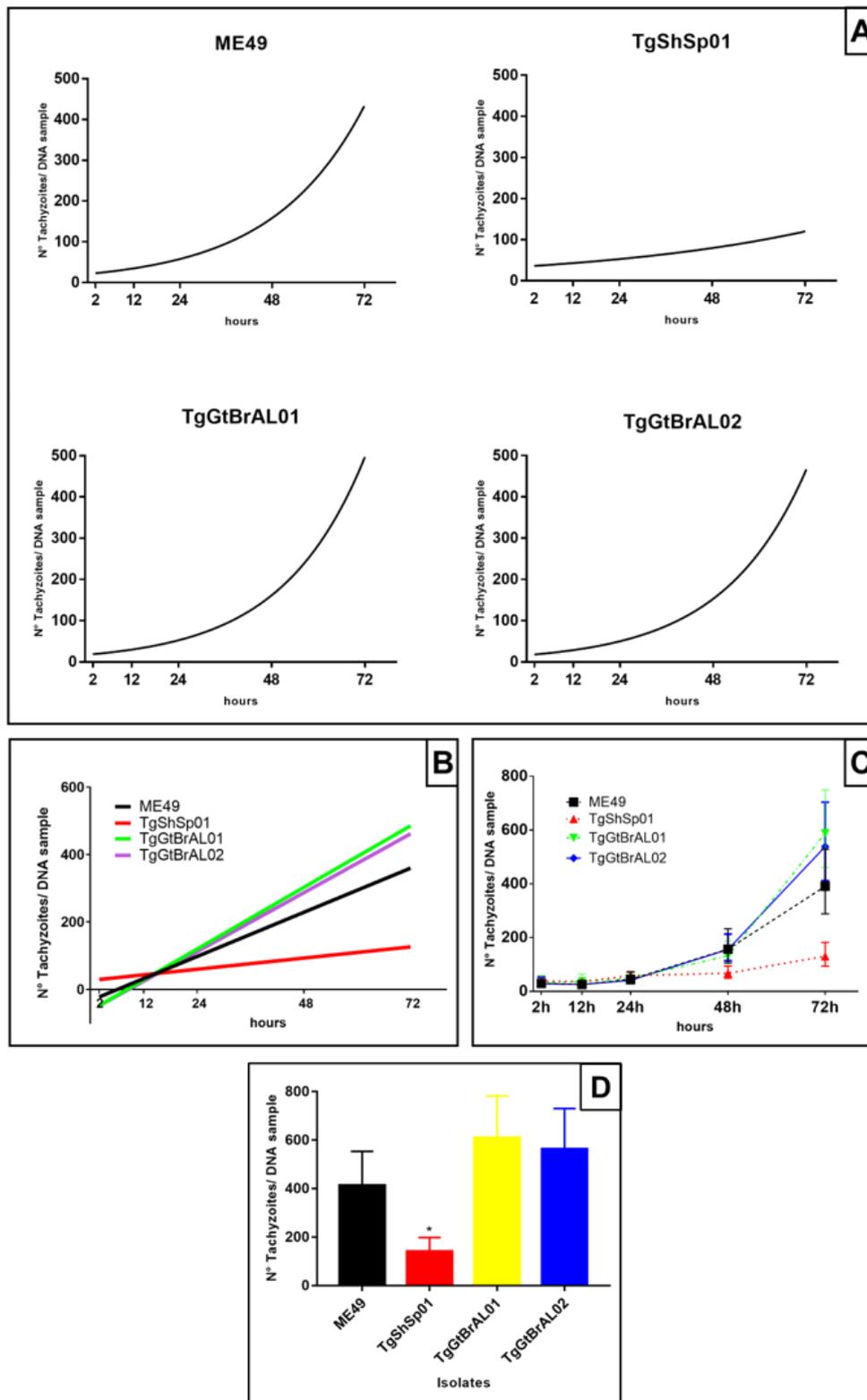
\* Diferenças significativas entre isolados ( $p < 0,05$ ).

### 3.2. Ensaio de proliferação intracelular

A observação das curvas de crescimento exponencial e da função logarítmica demonstraram eficácia e similaridade na proliferação dos isolados ME49, TgGtBrAL02 e TgGtBrAL01 e um padrão fenotípico diferente deste isolados em relação a TgShSp1, que apresentou a menor taxa de multiplicação *in vitro* ( $p < 0,05$ ) (Figura 3A e Figura 3B).

A cinética de multiplicação mostrou não haver diferença no crescimento das cepas estudadas na fase lag do ciclo de crescimento celular ( $p > 0,05$ ) (Figura 3C). Durante a fase log, a cepa TgShSp1 teve menor média de crescimento as 72hpi que os isolados do tipo II clássico, que não exibiram diferença entre si (Figura 3D) ( $p < 0,05$ ).

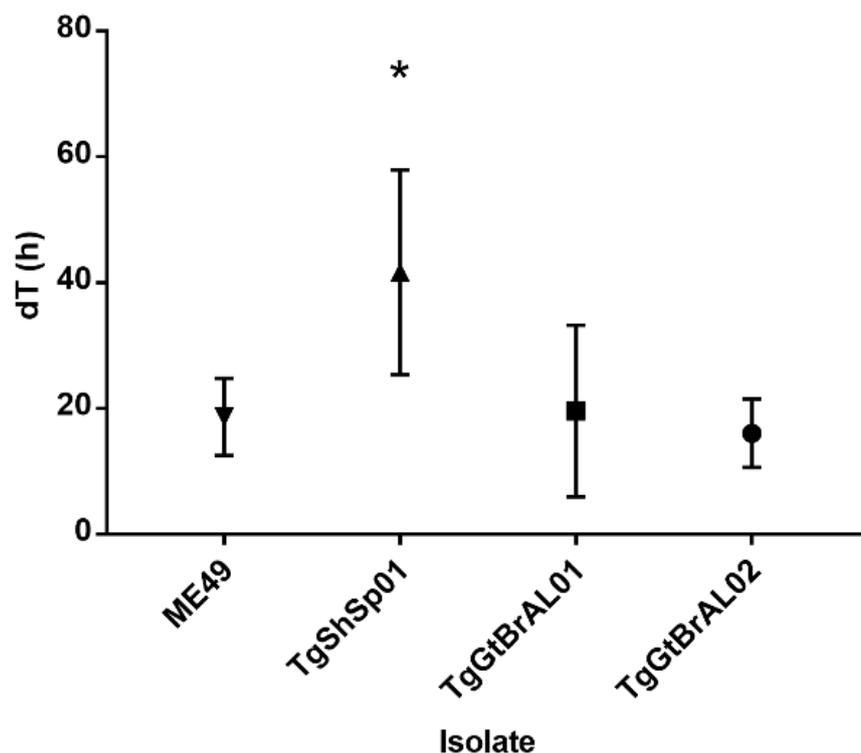
**Figura 3** - Curvas de crescimento exponencial (A), curva da função logarítmica (B), cinética de proliferação (C) e comparação das médias de crescimento populacional as 72 hpi das cepas de *Toxoplasma gondii* tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha.



\* Diferenças significativas entre isolados ( $p < 0,05$ ).

O isolado TgShSp1 também manifestou maior *doubling time* (dT=41,97) em relação a ME49 (dT= 18,65), TgGtBrAL01 (dT= 19,62) e TgGtBrAL02 (dT= 16,08) (Figura 4).

**Figura 4** - Médias dos valores de *doubling time* (dT) determinado na proliferação *in vitro* das cepas de *Toxoplasma gondii* tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha.



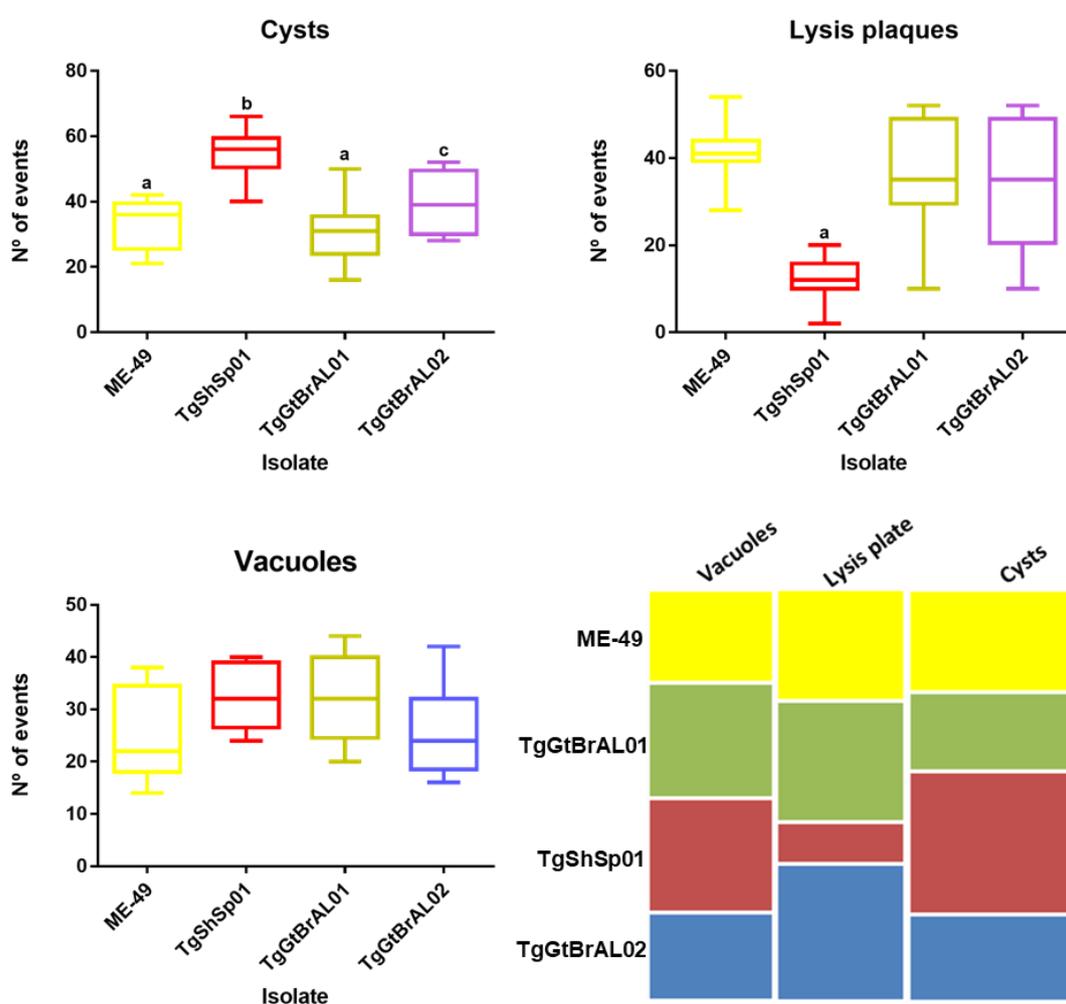
\* Diferenças significativas entre isolados ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Ensaio de conversão taquizoíto/bradizoíto

Todas as cepas apresentaram resposta positiva ao estresse exógeno gerado pelo pH alcalino do meio. A cepa TgShSp1 apresentou maiores ConvT (55,2%) e ConvR (42,3%) ( $p < 0,05$ ) quando comparada com as cepas ME49 (ConvT: 33,4%; ConvR: 30,9%), TgGtBrAL01 (30,5%; 27,5%) e TgGtBrAL02 (39,7%; 35,7%).

Ao comparar cada evento gerado durante a indução ao estresse (Figura 6), verificaram-se variações significativas entre os isolados. TgGtBrAL01 e TgGtBrAL02 diferiram no quantitativo de cistos formados ( $p < 0,05$ ), enquanto que TgShSp1 encistou-se em maior quantidade e gerou menor quantitativo de placas de lise ( $p < 0,05$ ).

**Figura 5** - Quantificação dos diferentes eventos (cistos, vacúolo parasitóforo e placas de lises) e *mosaic plot* das proporções destes eventos por isolados, resultantes da indução da cistogênese das cepas de *Toxoplasma gondii* tipo II (#1 e #3; ToxoDB) isolados de de abortos de pequenos ruminantes no Brasil e na Espanha.



Diferenças entre letras indicam diferenças significativas entre isolados ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

A toxoplasmose em caprinos e ovinos resulta em alterações reprodutivas e conseqüentemente em perdas econômicas [28,29]. O parasito tem sido isolado com frequência de fetos abortados e caracterizado geneticamente e, em alguns casos, a virulência em modelo murino é determinada [16,17, 30,31].

Sibley e Ajioka [32] ao estudarem a estrutura populacional de cepas clonais de *T. gondii* determinaram uma marcada variação fenotípica na virulência e infectividade, apesar da baixa variabilidade genética. Considerando que o processo de invasão, de adaptação ao ambiente intracelular, proliferação e egressão constituem etapas do ciclo lítico de *T. gondii* e influenciam a virulência do agente [18,19], a compreensão de cada etapa desse ciclo permite entender as diferenças no curso da infecção determinada por diferentes cepas.

Nessa investigação, avaliou-se as características fenotípicas associadas à infectividade (invasão e proliferação) e encistamento de cepas tipo II isolados de tecidos de fetos de caprinos e ovinos, em quadros de surto da toxoplasmose. Para realização dos ensaios, limitou-se o número de passagens das cepas visto que há evidências que longo período de manutenção em sistemas de cultivo celular ou bioensaio provoca alterações no comportamento biológico de *T. gondii*, podendo afetar a sua infectividade [7,33,34] e caracterizando um importante viés nas análises comparativas. Devido a cepa ME49 ser amplamente difundida e rotineiramente utilizada por laboratório que estudam *T. gondii*, o efeito adaptativo à cultura celular não foi notado nesse estudo uma vez que a análise do comportamento biológico dela foi similar às cepas de campo do tipo II clássico (TgGtBrAL01 e TgGtBrAL02).

Isolados de *T. gondii* pertencentes ao haplogrupo II são considerados clássicos (#1; ToxoDB) quando apresentam padrão tipo II nos alelos examinados na RFLP-PCR, enquanto que as cepas variantes (#3; ToxoDB) apresentam uma modificação em um específico, o Apico que apresenta-se como alelo do genótipo I [35, 36]. O haplogrupo II variante é altamente frequente na Europa, África e América do Norte [37] e, apesar de diversas investigações se dedicarem a avaliar cepas tipo II (clássicas e variantes), as possíveis conseqüências dessa variação alélica não é um consenso [38-40].

As taxas de invasão determinadas nesse estudo demonstram que as quatro cepas de *T. gondii* apresentam penetração celular no intervalo de 0 a 2 hpi, porém a entrada expressiva dos parasitos nas células hospedeiras ocorreu entre os tempos de lvnP2h e lvnP6h para todos isolados. A invasão de células hospedeiras por taquizoítos de *T. gondii* envolve uma sequência encadeada de passos, sendo controlada exclusivamente pelo parasito de forma ativa e não por mecanismos fagocíticos do hospedeiro, o que pode justificar o fato de qualquer célula nucleada ser uma potencial célula hospedeira [7,18,19]. Estima-se que a penetração de *T. gondii* na membrana da célula hospedeira leva cerca de 15 segundos para ocorrer [41], porém, dentro de uma população de parasitos a invasão pode ser assíncrona [42], e, numa condição *in vitro*, os parasitos necessitam de tempo de adaptação às condições fornecidas [43] para executar as etapas do ciclo lítico.

Os isolados TgGtBrAL01 e TgGtBrAL02 (#1; ToxoDB) são de uma mesma cepa circulante obtida de dois fetos caprinos distintos em uma mesma propriedade na região nordeste do Brasil [17]. As duas cepas, curiosamente, diferiram significativamente apenas na formação de cistos no ensaio de conversão taquizoíto/bradizoíto, onde TgGtBrAL01 apresentou menor número de cistos em relação a TgGtBrAL02. Apesar de isoladas sob as mesmas condições, com iguais número de passagens durante o bioensaio em camundongos e isolamento *in vitro*, durante a rotina de manutenção de TgGtBrAL02 foi realizada dupla passagem em modelo murino e reisolamento em cultivo celular. A passagem de culturas de *T. gondii* em camundongos é a técnica recomendada para eliminar contaminações por *Mycoplasma*, quando não é possível a eliminação completa desta cultura [44]. No entanto, taquizoítos inoculados *in vivo* tornam-se mais virulentos, como foi verificado por Frenkel e Ambroise-Thomas [45]. Trinta e um isolados de *T. gondii*, originais da Costa Rica, foram inoculados em camundongos, destes, 28 estabeleceram uma infecção assintomática e 3 isolados se mostraram hipervirulentos. Porém, após algumas passagens, 7 dos 31 isolados manifestavam fenótipo de alta virulência, matando os animais. Diferentes taxas de formação de cistos entre isolados do tipo II, também foi descrito por Brenier-Pinchart et al. [46] ao estudarem o fenótipo de cepas isoladas de infecção em humano.

O isolado TgShSp1 (#3; ToxoDB) foi obtido de um surto de aborto ovino em um rebanho na província de Palencia, noroeste da Espanha [16]. Esta cepa comportou-se de forma distinta em todos os ensaios fenotípicos realizados em comparação às cepas brasileiras e a cepa de referência. TgShSp1 apresentou as menores taxas de invasão nos tempos 2 hpi e 6 hpi e, após 48 hpi, exibiu maior quantidade de vacúolos e reduzida formação de placas de lise, de forma que seu ciclo lítico durou um tempo maior que os demais. A formação de placas de lise é resultado da egressão, que consiste na saída dos taquizoítos de um vacúolo maduro para invadir novas células, iniciando um novo ciclo [47]. Se não há saída da célula, os vacúolos maduros tendem ao encistamento como resposta às condições do microambiente [48], situação encontrada no ensaio de conversão taquizoíto-bradizoíto, que mesmo em condições normais de cultivo (pH 7,2), TgShSp1 foi a cepa que apresentou o maior percentual de encistamento. Em condição estressante (pH 8,0), a cistogênese do isolado espanhol apresentou-se elevada (55,4%) [16]. No ensaio de proliferação, esse isolado destacou-se pela baixa multiplicação e pelo elevado dT (41,97 horas), o que indica uma capacidade lenta na multiplicação do taquizoíto intracelular em relação aos outros isolados estudados.

Essas características denotam que TgShSp1 apresenta baixa infectividade *in vitro*, achado que corrobora com a virulência no modelo murino no experimento conduzido por Sánchez- Sánchez et al. [16], já que o isolado não provocou a morte de nenhum dos camundongos infectados com diferentes dosagens ( $10^5$  a  $10^1$  taquizoítos/mL), considerado avirulento. Em contrapartida, ainda nesse mesmo estudo, a inoculação oral de ovelhas e camundongas com oocistos dessa cepa mostrou uma alta frequência de abortamento em ovelhas em relação aos roedores, o que sugere a influência do hospedeiro na patogênese de *T. gondii*. Esses achados reforçam a ideia de que não apenas as propriedades dos patógenos estão envolvidas na virulência, mas que há forte relação com a interação parasito-hospedeiro, e nesse sentido, é difícil extrapolar a ação virulenta de cepas de *T. gondii* de modelos controlados para diferentes hospedeiros, caracterizando um limitante no emprego dessa técnica.

Conclui-se, que no modelo *in vitro* de caracterização de infectividade e indução à latência, a cepa tipo II variante (TgSpSh01) apresentou um padrão fenotípico diferente das cepas tipo II clássica (ME49, TgGtBrAL01 e

TgGtBrAL02), sendo necessário identificar as relações genéticas ou epigenéticas de tais variações para melhor elucidação do comportamento heterogêneo entre as cepas do tipo II.

## REFERÊNCIAS

- [1] A.M. Tenter, A.R. Heckeroth, L.M. Weiss, *Toxoplasma gondii*: from animals to humans, *Int. J. Parasitol.* 30 (2000) 1217–1258. doi:10.1016/S0020-7519(00)00124-7.
- [2] D. Buxton, S.W. Maley, S.E. Wright, S. Rodger, P. Bartley, E. A. Innes, *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story, *Vet. Parasitol.* 149 (2007) 25–28. doi:10.1016/j.vetpar.2007.07.003.
- [3] J.P. Dubey, *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2a ed, CRC Press, Florida, 2010. doi:10.1017/S0031182000078914.
- [4] D. Buxton, Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: Recent advances, *Vet. Res.* 29 (1998) 289–310. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689743>.
- [5] J. Benavides, M. Fernández, P. Castaño, M.C. Ferreras, L. Ortega-Mora, V. Pérez, Ovine Toxoplasmosis: A New Look at its Pathogenesis, *J. Comp. Pathol.* 157 (2017) 34–38. doi:10.1016/j.jcpa.2017.04.003.
- [6] J.P.J. Saeij, J.P. Boyle, J.C. Boothroyd, Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host., *Trends Parasitol.* 21 (2005) 476–481. doi:10.1016/j.pt.2005.08.001.
- [7] P. Saraf, E.K. Shwab, J.P. Dubey, C. Su, On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice, *Exp. Parasitol.* 174 (2017) 25–30. doi:10.1016/j.exppara.2017.01.009.
- [8] H.. E. Kaufman, J.S. Remington, L. Jacobs, Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage, *Am. J. Ophthalmol.* 46 (1958) 255–261.
- [9] L.D. Sibley, J.C. Boothroyd, Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage, *Nature.* 359 (1992) 82–85. doi:10.1038/359082a0.
- [10] A.M.A. Ragozo, H.F.J. Pena, L.E.O. Yai, C. Su, S.M. Gennari, Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed, *Vet. Parasitol.* 170 (2010) 307–312.

- doi:10.1016/j.vetpar.2010.02.024.
- [11] H.F.J. Pena, S.M. Gennari, J.P. Dubey, C. Su, Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil, *Int. J. Parasitol.* 38 (2008) 561–569. doi:10.1016/j.ijpara.2007.09.004.
- [12] D.K. Howe, L.D. Sibley, *Toxoplasma gondii* Comprises of Parasite Three Clonal Lineages : Correlation with Human Disease Genotype, *J. Infect. Dis.* 172 (1995) 1561–6.
- [13] J.P. Dubey, D.E. Hill, D.W. Rozeboom, C. Rajendran, S. Choudhary, L.R. Ferreira, O.C.H.H. Kwok, C. Su, High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA, *Vet. Parasitol.* 188 (2012) 14–18. doi:10.1016/j.vetpar.2012.03.008.
- [14] M.R. Owen, A.J. Trees, Genotyping of *Toxoplasma gondii* Associated with Abortion in Sheep, *J. Parasitol.* 85 (1999) 382. doi:10.2307/3285654.
- [15] G. Chessa, V. Chisu, R. Porcu, G. Masala, Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* Type II in sheep abortion in Sardinia, Italy., *Parasite.* 21 (2014) 6. doi:10.1051/parasite/2014007.
- [16] Sánchez-Sánchez, R., Ferre, I., Regidor-Cerrillo, J., Gutiérrez-Expósito, D., Ferrer, L. M., Arteche-Villasol, N., et al. (2019). Virulence in Mice of a *Toxoplasma gondii* Type II Isolate Does Not Correlate With the Outcome of Experimental Infection in Pregnant Sheep. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 436. doi:10.3389/fcimb.2018.00436.
- [17] J.M.B. de Oliveira, J.C. de Almeida, R.P.B. de Melo, L.D. de Barros, J.L. Garcia, M.R. Andrade, W.J.N. Porto, J. Regidor-Cerrillo, L.M. Ortega-Mora, A.A. da F. Oliveira, R.A. Mota, First description of clonal lineage type II (genotype #1) of *Toxoplasma gondii* in abortion outbreak in goats, *Exp. Parasitol.* 188 (2018) 21–25. doi:10.1016/j.exppara.2018.03.008.
- [18] M.W. Black, J.C. Boothroyd, Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000) 607–623. doi:10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000.
- [19] I.J. Blader, B.I. Coleman, C.-T. Chen, M.-J. Gubbels, Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later., *Annu. Rev. Microbiol.* 69 (2015) 463–85. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104100.
- [20] A. Dellarupe, J. Regidor-Cerrillo, E. Jiménez-Ruiz, G. Schares, J.M. Unzaga, M.C. Venturini, L.M. Ortega-Mora, Comparison of host cell

- invasion and proliferation among *Neospora caninum* isolates obtained from oocysts and from clinical cases of naturally infected dogs, *Exp. Parasitol.* 145 (2014) 22–28. doi:10.1016/j.exppara.2014.07.003.
- [21] P.J. Appleford, J.E. Smith, *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains., *Acta Trop.* 65 (1997) 97–104. doi:10.1016/S0001-706X(97)00656-6.
- [22] S. Skariah, M.K. McIntyre, D.G. Mordue, *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion., *Parasitol. Res.* 107 (2010) 253–260. doi:10.1007/s00436-010-1899-6.
- [23] J. Regidor-Cerrillo, M. Gómez-Bautista, I. Sodupe, G. Aduriz, G. Álvarez-García, I. Del Pozo, L.M. Ortega-Mora, *In vitro* invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*, *Vet Res.* 42 (2011) 41. doi:10.1186/1297-9716-42-41.
- [24] C.F. Frey, J. Regidor-Cerrillo, N. Marreros, P. García-Lunar, D. Gutiérrez-Expósito, G. Schares, J.P. Dubey, A. Gentile, P. Jacquiet, V. Shkap, H. Cortes, L.M. Ortega-Mora, G. Álvarez-García, *Besnoitia besnoiti* lytic cycle *in vitro* and differences in invasion and intracellular proliferation among isolates, *Parasit. Vectors.* 9 (2016) 1–14. doi:10.1186/s13071-016-1405-9.
- [25] L. Jiménez-Pelayo, M. García-Sánchez, J. Regidor-Cerrillo, P. Horcajo, E. Collantes-Fernández, M. Gómez-Bautista, N. Hambruch, C. Pfarrer, L.M. Ortega-Mora, Differential susceptibility of bovine caruncular and trophoblast cell lines to infection with high and low virulence isolates of *Neospora caninum*, *Parasit. Vectors.* 10 (2017) 463. doi:10.1186/s13071-017-2409-9.
- [26] B. Edvinsson, M. Lappalainen, B. Evengård, W. Buffalano, D. Ferguson, E. Guy, P. Jenum, D. Nowakowska, B. Pelloux, B. Stray-Pedersen, Z. Szénási, Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis, *Clin. Microbiol. Infect.* (2006). doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01332.x.
- [27] J. Gutierrez, J. O'Donovan, A. Proctor, C. Brady, P.X. Marques, S. Worrall, J.E. Nally, M. McElroy, H. Bassett, J. Fagan, S. Maley, D. Buxton, D. Sammin, B.K. Markey, Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of toxoplasmosis and enzootic abortion of

- ewes, *J. Vet. Diagn. Invest.* 24 (2012) 846–854. doi:10.1177/1040638712452730.
- [28] D.S. Lindsay, N.S. Rippey, T.A. Powe, E.A. Sartin, J.P. Dubey, B.L. Blagburn, Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*, *Am J Vet Res.* 56 (1995) 1176–1180.
- [29] J.P. Dubey, Toxoplasmosis in sheep-The last 20 years, *Vet. Parasitol.* 163 (2009) 1–14. doi:10.1016/j.vetpar.2009.02.026.
- [30] A.M.A. Ragozo, L.E.O. Yai, L.N. Oliveira, R.A. Dias, H.C. Gonçalves, S.S. Azevedo, J.P. Dubey, S.M. Gennari, Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from Brazil, *J. Parasitol.* 95 (2009) 323–326. doi:10.1645/GE-1854.1.
- [31] E.Z. Gebremedhin, M. Abdurahaman, T.S. Tessema, G. Tilahun, E. Cox, B. Goddeeris, P. Dorny, S. De Craeye, M.-L. Darde, D. Ajzenberg, Isolation and genotyping of viable *Toxoplasma gondii* from sheep and goats in Ethiopia destined for human consumption., *Parasit. Vectors.* 7 (2014) 425. doi:10.1186/1756-3305-7-425.
- [32] L.D. Sibley, J.W. Ajioka, Population Structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal Expansion Driven by Infrequent Recombination and Selective Sweeps, *Annu. Rev. Microbiol.* (2008). doi:10.1146/annurev.micro. 62.081307.162925.
- [33] D.K. Howe, L. David Sibley, *Toxoplasma gondii*: Analysis of different laboratory stocks of the RH strain reveals genetic heterogeneity, *Exp. Parasitol.* (1994). doi:10.1006/expr.1994.1024.
- [34] A. Khan, M.S. Behnke, I.R. Dunay, M.W. White, L.D. Sibley, Phenotypic and gene expression changes among clonal type I strains of *Toxoplasma gondii*, *Eukaryot. Cell.* 8 (2009) 1828–1836. doi:10.1128/EC.00150-09
- [35] E.K. Shwab, X.-Q.Q. Zhu, D. Majumdar, H.F.J.J. Pena, S.M. Gennari, J.P. Dubey, C. Su, Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping, *Parasitology.* 141 (2014) 453–461. doi:10.1017/S0031182013001844.
- [36] C. Su, A. Khan, P. Zhou, D. Majumdar, D. Ajzenberg, M.-L.M.-L. Darde, X.-Q.X.-Q. Zhu, J.W. Ajioka, B.M. Rosenthal, J.P. Dubey, L.D. Sibley, Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- 109 (2012) 5844–5849. doi:10.1073/pnas.1203190109.
- [37] M. L. Dardé, Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*, *Ann. Ist. Super. Sanita.* 40 (2004) 57–63.
- [38] C. Doliwa, D. Xia, S. Escotte-Binet, E.L. Newsham, S. Sanya J, D. Aubert, N. Randle, J.M. Wastling, I. Villena, Identification of differentially expressed proteins in sulfadiazine resistant and sensitive strains of *Toxoplasma gondii* using difference-gel electrophoresis (DIGE)., *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 3 (2013) 35–44. doi:10.1016/j.ijpddr.2012.12.002.
- [39] G. Kannan, K. Moldovan, J.C. Xiao, R.H. Yolken, L. Jones-Brando, M. V. Pletnikov, *Toxoplasma gondii* strain-dependent effects on mouse behaviour, *Folia Parasitol.* (2010). doi:10.14411/fp.2010.019.;
- [40] F.G. Araujo, F.G. Araujo, T. Slifer, T. Slifer, Different Strains of *Toxoplasma gondii* Induce Different Cytokine Responses in CBA/Ca Mice, *Infect. Immun.* 71 (2003) 4171–4174. doi:10.1128/IAI.71.7.4171.
- [41] L.H. Kasper, J.R. Mineo, Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*, *Parasitol. Today.* (1994). doi:10.1016/0169-4758(94)90026-4.
- [42] B.F.C. Kafsack, C. Beckers, V.B. Carruthers, Synchronous invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 136 (2004) 309–311. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.04.004.
- [43] J.M.W. Chatterton, R. Evans, D. Ashburn, A.W.L. Joss, D.O. Ho-Yen, *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation, *J. Microbiol. Methods.* 51 (2002) 331–335. doi:10.1016/S0167-7012(02)00101-X.
- [44] A. Khan, M.E. Grigg, *Toxoplasma gondii*: Laboratory maintenance and growth, *Curr Protoc Microbiol.* 44 (2018) 1–20. doi:10.1016/j.cogdev.2010.08.003.Personal.
- [45] J.K. Frenkel, P. Ambroise-Thomas, Genomic drift of *Toxoplasma gondii*, *Parasitol. Res.* 83 (1997) 1–5. doi:10.1007/s004360050197.
- [46] M.P. Brenier-Pinchart, R.L. Bertini, D. Maubon, H. Pelloux, In vitro differential phenotypic characteristics among Type-II *Toxoplasma gondii* strains from congenital toxoplasmosis in humans, *J. Parasitol.* 96 (2010) 798–799. doi:10.1645/GE-2405.1.
- [47] K.P. Eidell, T. Burke, M.-J. Gubbels, Development of a screen to dissect *Toxoplasma gondii* egress., *Mol. Biochem. Parasitol.* 171 (2010) 97–103.

- doi:10.1016/j.molbiopara.2010.03.004.
- [48] W.J.J. Sullivan, V. Jeffers, Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency., *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (2012) 717–733. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x.

## 6 ARTIGO 2

**Diferenças entre e intragenótipos na cistogênese induzida de cepas recombinantes de *Toxoplasma gondii* isoladas de galinhas e suínos**

**Artigo a ser submetidos a Veterinary Parasitology**

## Diferenças entre e intragenótipos na cistogênese induzida de cepas recombinantes de *Toxoplasma gondii* isoladas de galinhas e suínos

### RESUMO

Investigou-se a habilidade de dois isolados de galinhas (#114 e #277; ToxoDB) e três isolados de suínos (#114; ToxoDB) de genótipos recombinantes (I/II/III e I/III) de *Toxoplasma gondii* e cepas de referência da linhagem clonal (RH e ME49) de diferenciar do estágio proliferativo (taquizoítos) para o estágio latente (bradizoítos). Os isolados foram submetidos ao cultivo celular sob duas condições independentes: meio de cultivo com pH 7,0 (neutro, sem indução ao estresse) e pH 8,0 (alcalino, indutor de estresse). Após quatro dias, os cultivos foram fixados e os eventos resultantes da infecção e indução foram marcados. Os cistos de *T. gondii* foram marcados por uma lectina de *Dolichos biflorus*-FITC, ligante específico para parede de cistos, enquanto os taquizoítos livres ou em vacúolos foram marcados por um anticorpo policlonal anti-*T. gondii* seguido de anticorpo secundário conjugado ao Alexa 594. Foram demonstradas diferenças nas respostas de formação de cistos dos isolados de genótipos recombinantes em comparação aos genótipos típicos na resposta estressante exógena *in vitro*. A diferença entre isolados de genótipo I/III (#114) em relação à taxa de conversão e no padrão na produção de placas de lise indica que a extrapolação de características fenotípicas *in vitro* em parasitos de um mesmo genótipo deve ser cautelosa.

**PALAVRAS-CHAVES:** encistamento, fenótipo, toxoplasmose

### 1. INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii*, coccídio intracelular obrigatório atua como um dos agentes parasitários de maior êxito na infecção, manutenção e transmissão entre seus hospedeiros (Kim and Weiss, 2004; Tenter et al., 2000). A patogenicidade desse protozoário sustenta-se na capacidade de diferenciar entre estágios proliferativos e latentes durante o curso da infecção (Skariah et al., 2010). Quadros agudos ocorrem devido à rápida e expressiva multiplicação dos taquizoítos que resulta em lesão tecidual e o aparecimento de sinais clínicos da

toxoplasmose, enfermidade severa em indivíduos com sistema imunológico debilitado ou imaturo (Dubey, 2010; Edvinsson et al., 2009). Indivíduos imunocompetentes controlam a infecção por *T. gondii*, principalmente, por meio de uma resposta eficiente com ação de citocinas como INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Channon and Kasper, 1996), limitando a replicação do parasito e conduzindo a infecção para uma condição de cronicidade (Suzuki et al., 1989).

Em quadros crônicos, os taquizoítos presentes nos vacúolos parasitóforos no meio intracelular sofrem mudanças estruturais, metabólicas e antigênicas diferenciando-se em estágios latentes e de replicação lenta denominados bradizoítos (Dubey et al., 1998). Nesse processo de encistamento, os bradizoítos secretam quitina e glicoproteínas que convertem a parede do vacúolo parasitóforo em um cisto de parede fina, elástica, resistente e relativamente não-imunogênico (Sullivan and Jeffers, 2012).

Bradizoítos encistados podem permanecer por um longo período no tecido dos hospedeiros, com a habilidade de se reverter a taquizoítos quando o hospedeiro apresenta redução do *status* imunitário, por exemplo. Desse modo, a interconversão taquizoíto-bradizoíto além de beneficiar a dispersão do parasito entre hospedeiros por meio do carnivorismo, é importante para o estabelecimento da infecção crônica ou da recrudescência com aparecimento de um processo patológico agudo (Dubey, 2010; Lyons et al., 2002). A estratégia apresentada por Apicomplexa de permanência latente nos hospedeiros, é um paradoxo evolutivo, pois apesar do encistamento comprometer a virulência, esse processo beneficia a transmissão do agente entre hospedeiros (Sullivan Jr et al., 2009).

É possível analisar a conversão taquizoíto/bradizoíto de *T. gondii* por testes *in vitro* (Skariah et al., 2010) e diversos protocolos já foram descritos como eficientes para gerar estímulos estressantes para a cistogênese *in vitro*, como o uso do óxido nítrico exógeno (NO) (Bohne et al., 1994), arsenito de sódio, choque térmico, pH alcalino (Soete et al., 1994), privação de arginina (Fox et al., 2004) entre outros (Bohne and Roos, 1997; Nagamune et al., 2008b, 2008a; Narasimhan et al., 2008).

*T. gondii* apresenta uma complexa estrutura populacional (Shwab et al., 2014). Além das linhagens clássicas ou clonais (I, II, III), genótipos resultantes da recombinação entre essas linhagens têm sido reportados, principalmente no

Brasil (Ferreira et al., 2006; Khan et al. 2006; Pena et al., 2008). Cepas recombinantes foram descritas como responsáveis por quadros de toxoplasmose congênita (Ajzenberg et al., 2002), encefalite grave em imunossuprimidos (Carme et al., 2002; Genot et al., 2007) e por toxoplasmose ocular em humanos, com quadro clínico mais severo do que os provocados por linhagens clonais (Grigg et al. 2001). Entretanto, a compreensão de como essas recombinações afetam o fenótipo de cepas do parasito e, por consequência, a patogênese da toxoplasmose, tem sido pouco estudado, baseando-se, quase que exclusivamente, na virulência em modelo murino (Saraf et al., 2017).

Objetivou-se nesse estudo avaliar a capacidade de cinco cepas recombinantes #114 (I/III) e uma cepa do genótipo #277 (I/II/III) de *Toxoplasma gondii* em converter-se de taquizoítos a bradizoítos por indução *in vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Caracterização dos isolados de *T. gondii*

Foram avaliados cinco isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas e suínos criados em sistema de subsistência, no estado de Alagoas, Brasil (dados não publicados). Adicionalmente, foram incluídos no estudo dois isolados de referência: a cepa RH (genótipo tipo I) e a cepa ME49 (genótipo tipo II). Todos os isolados foram submetidos a duas passagens em camundongos antes do experimento. Na tabela 1 encontra-se dados referentes a identificação e números de passagem em cultura celular dos isolados estudados.

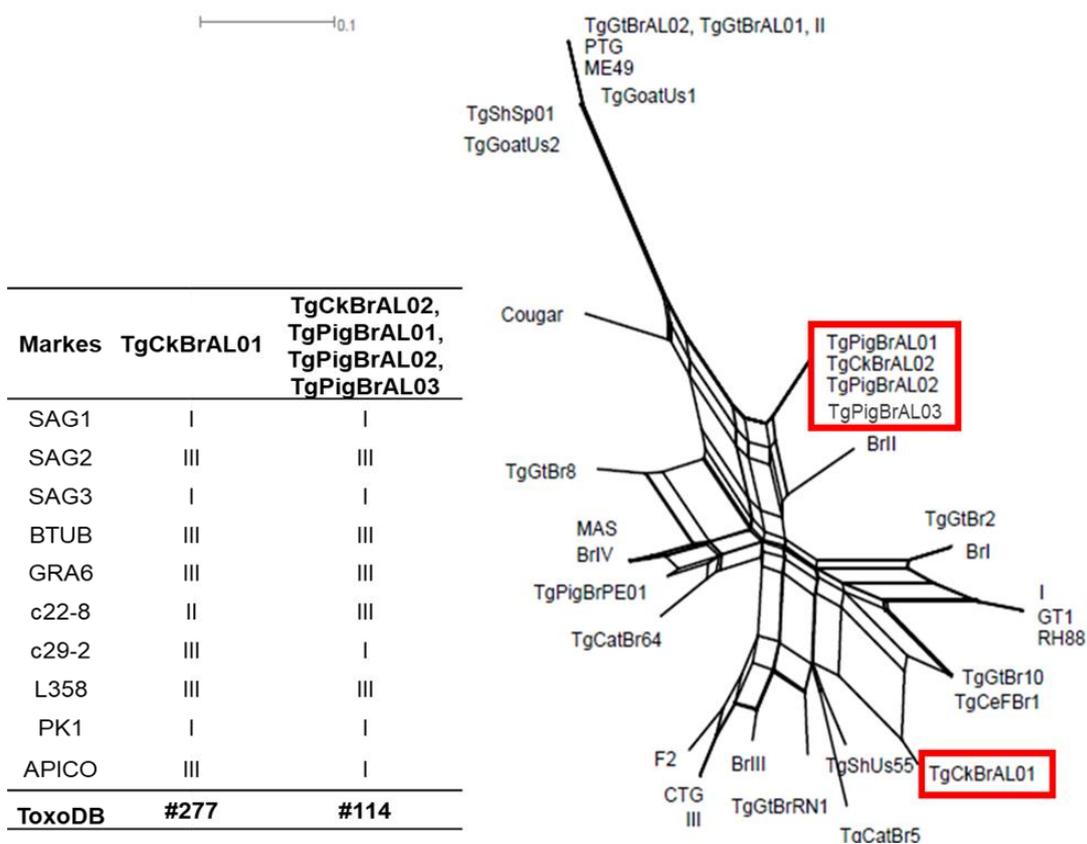
**Tabela 1** - Informações sobre os isolados de *Toxoplasma gondii* utilizados no estudo: cepas recombinantes e típicas.

Isolados	Espécie animal	Passagem <i>in vitro</i> <sup>a</sup>
TgCkBrAL01	Galinha	9-17
TgCkBrAL02	Galinha	7-15
TgPigBrAL01	Suíno	7-18
TgPigBrAL02	Suíno	8-18
TgPigBrAL03	Suíno	7-19
RH	Humano	9-16 <sup>a</sup>
ME49	Ovino	7-14 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Número de passagens após descongelamento e reinoculação em camundongo.

A caracterização genotípica (dados não publicados) revelou que o isolado TgCkBrAL01 trata-se do genótipo recombinante (I/II/III) #277 (ToxoDB) e os isolados TgCkBrAL02, TgPigBrAL01, TgPigBrAL02, TgPigBrAL03 são genótipos (I/III) #114 (ToxoDB), cujas informações são apresentadas na figura 1.

**Figura 1** - Genotipagem por RFLP-PCR e análise filogenética das cepas típicas e recombinantes (#114 e #277) de *Toxoplasma gondii* (quadrados).



## 2.1 Cultivo celular

Os taquizoítos dos diferentes isolados foram mantidos em monocamadas de células epiteliais de rim de macaco verde africano da linhagem MARC-145. As células foram cultivadas em meio DMEM alta glicose com glutamina 2 mM e vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) suplementado com 10% de soro equino (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), HEPES 5 mM (pH 7,2), além de uma mescla de penicilina

(100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) e anfotericina B (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), técnica previamente descrita por Regidor-Cerrillo et al. (2011). A cultura de células foi realizada em frascos de cultura de 75 ou 25 cm<sup>2</sup> incubadas a 37°C com saturação de 5% de CO<sub>2</sub>. O Soro equino utilizado foi previamente inativado por calor (57°C por 30 minutos), esterilizado por filtração e submetido a reação de imunofluorescência indireta comprovando ausência de IgG anti- *T. gondii* e *N. caninum*. Controle do cultivo celular contra contaminação por *Mycoplasma* spp. era realizado rotineiramente pelo teste de DAPI e, na suspeita de contaminação, submetia o cultivo à PCR com metodologia descrita por Van Kuppeveld et al. (1992). Todas as culturas foram negativas para *Mycoplasma* spp.

### 2.3 Ensaio de conversão taquizoíto-bradizoíto

Células da linhagem MARC-145 foram semeadas na concentração de 5x10<sup>4</sup> células/poço, em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas a 37°C com saturação de 5% de CO<sub>2</sub>, para obtenção de confluência do tapete celular.

Os taquizoítos foram purificados dos cultivos, três dias após a infecção quando apresentavam >80% de vacúolos parasitóforos preservados. As células infectadas foram raspadas e a suspensão foi passada repetidas vezes em agulha de 25G e purificados em coluna PD-10 (GE Healthcare, Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A concentração e a viabilidade dos taquizoítos foram determinadas pelo teste de exclusão de azul de Trypan por contagem em câmara de Neubauer. Todo procedimento de purificação foi realizado a 4°C e a inoculação das monocamadas de célula MARC-145 para os experimentos foram realizadas em até 1 hora do início da purificação.

As culturas foram infectadas com 2x10<sup>3</sup> taquizoítos purificados de cada isolado estudado e 8 horas pós-inoculação (hpi) foram lavadas três vezes com PBS 1X para retirada dos taquizoítos extracelulares. Foram recultivados com meio DMEM com pH ajustado para 8,0. As placas foram incubadas em estufa 37°C na ausência de CO<sub>2</sub> e o meio foi trocado a cada 24h para garantir a manutenção do pH alcalino, gerando o estresse dos taquizoítos e induzindo a conversão a bradizoítos.

Quatro dias pós-infecção, os ensaios foram fixados com metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos e marcados por imunofluorescência para contagem dos eventos resultantes da infecção. Cada condição foi avaliada em quadruplicata e os experimentos foram realizados em dois ensaios independentes. Para controle negativo, cada isolado foi incubado em placas preparadas nas mesmas condições descritas, mas mantendo DMEM em pH 7,2 a  $37^{\circ}\text{C}$  em 5% de  $\text{CO}_2$ , após as lavagens.

### 2.3 Marcação por imunofluorescência

Após a fixação, as células foram lavadas por três vezes com PBS e permeabilizadas utilizando uma solução de 0,25% de Triton 100X em PBS a 0,3% de BSA e incubadas por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Seguiu-se com o bloqueio com PBS a 3% de BSA em condições de incubação similares às descritas para evitar a autofluorescência ou ligações protéicas inespecíficas.

Posteriormente foi realizada uma dupla marcação: para confirmar a formação de cistos (bradizoítos) utilizou-se lectina aglutinina de *Dolichos biflorus*-biotinilada (DBA) (Vector Laboratories, EUA) e para os vacúolos parasitóforos ou placas de lise (taquizoítos) realizou-se incubação com anticorpos de camundongo anti-*T. gondii* (diluição 1:500; 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ ), seguida da adição de IgG de cabra anti-IgG de camundongo (H+L) conjugado com Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 (diluição de 1: 250; 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ ; Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O DBA quando excitado revela fluorescência verde e Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 demonstra fluorescência na cor vermelha, permitindo diferenciar os distintos eventos. Na sequência foi realizada nova lavagem (três vezes com PBS 1X), acompanhada de uma última marcação com DAPI (1:10.000) que se intercala com o DNA e revela os núcleos celulares. Por fim, as placas foram lavadas e mantidas com água destilada e armazenadas sob refrigeração.

A leitura dos resultados de indução da conversão taquizoíto-bradizoíto foi feita em microscópio invertido de fluorescência onde se realizou a contagem total de 100 eventos por poço: formação de vacúolo parasitóforo, placas de lise ou cisto tecidual.

## 2.4 Análise estatística

Foram empregados o teste paramétrico one-way ANOVA, seguido do teste de comparações de Turkey para avaliar a influência da indução da conversão no aparecimento do cisto, placas de lise ou vacúolos de cada isolado. O teste two-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni foram empregados para avaliar a taxa de conversão entre isolados. Significância estatística foi estabelecida como  $p < 0,05$ . O software GraphPad Prism 7 v.7.00 foi utilizado para realizar todas as análises estatísticas e ilustrações gráficas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinco isolados de *T. gondii* obtidos de animais destinados ao consumo humano foram avaliados quanto à aptidão de responder a estímulos estressantes, assumindo uma condição de latência em cultura celular da linhagem MARC-145. Anteriormente, essa linhagem celular foi empregada para revelar características *in vitro* de isolados de *Neospora caninum* (Dellarupe et al., 2014; Regidor-Cerrillo et al., 2011) e *Besnoitia besnoiti* (Frey et al., 2016), demonstrando que a cultura *in vitro* representa um modelo adequado para o estudo de características fenotípicas de apicomplexas.

Já está estabelecido que ocorrem mudanças nas características biológicas de cepas de *T. gondii* mantidas prolongadamente em cultura celular ou em modelo murino (Khan et al., 2009; Lindsay et al., 1991; Villard et al., 1997), de maneira que qualquer comparação de fenótipos entre os isolados de *T. gondii* deve ser realizada usando os estoques originais ou de baixa passagem (Saraf et al., 2017), ou realizar a reinoculação do isolado em um hospedeiro animal e realizar o reisolamento *in vitro* como sugerido por Dellarupe et al. (2014). Dessa forma, optou-se por realizar dupla passagem das cepas utilizadas nesse estudo em camundongos para diminuir o viés da adaptação dos isolados em cultivo celular.

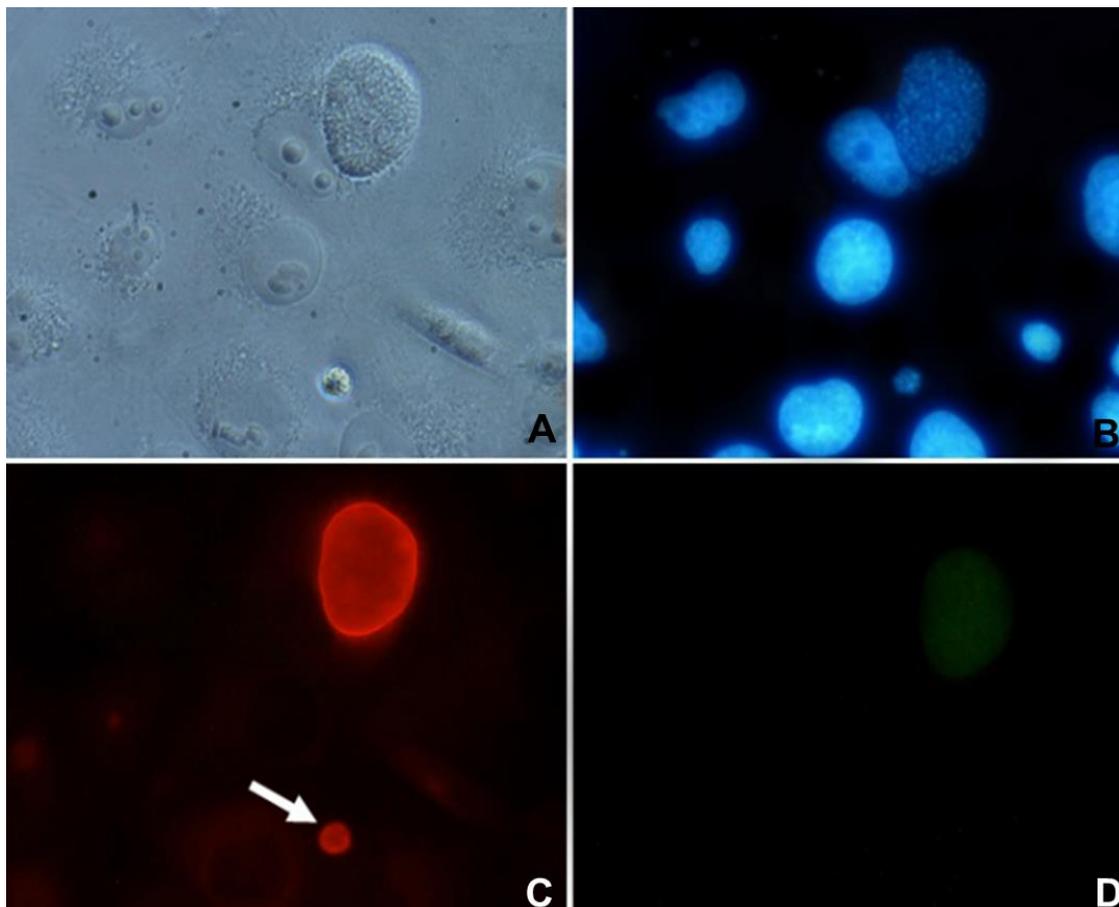
Empregou-se nesse estudo as cepas RH e ME49 como referências para auxiliar na comparação com isolados recombinantes. A cepa RH apresenta rápida proliferação em cultivo celular e é hipervirulenta no modelo murino (Sibley

and Boothroyd, 1992), enquanto que a cepa ME49 apresenta menor taxa de replicação, sendo considerada cistogênica *in vivo* e hipovirulenta no modelo murino (Saeij et al., 2005). Para enriquecer a análise foi incluída uma cepa referência do tipo III, uma vez que os isolados recombinantes expressam a maioria dos alelos analisados por RFPL do tipo III em combinação com tipo I (#144) ou com tipo I e II (#277).

As galinhas são consideradas excelentes indicadores de contaminação ambiental para oocistos de *T. gondii* devido ao hábito de se alimentarem próximo ao solo e serem suscetíveis à infecção pelo parasito (Dubey et al., 2002). Em suínos, a toxoplasmose está relacionada com alterações reprodutivas e configura como um importante problema para a Saúde Pública (Dubey et al., 2012; Miranda et al., 2015), uma vez que o consumo de embutidos, carnes *in natura*, preparações com cocção inadequada configuram vias que beneficiam a veiculação do parasito (Dias et al., 2005; Dubey, 2009). A manutenção do agente nos tecidos animais se dá pelo encistamento acompanhado de alteração da forma evolutiva de taquizoítos para bradizoítos (Dubey et al., 1998). Logo, a interconversão entre estágios proliferativos e estágios latentes de *T. gondii* é um evento crucial para a latência do parasito no hospedeiro sem gerar danos a este, podendo até ser transmitido ou produzir alterações patológicas (Lyons et al., 2002; Tenter et al., 2000; Weiss and Kim, 2000).

O estabelecimento de um modelo *in vitro* padronizado, proposto para esse estudo, permitiu comparar e diferenciar biologicamente isolados. A diferenciação de taquizoítos em bradizoítos a partir de estímulo estressante com meio de pH alcalino (8,0) dos isolados estudados foi obtido com êxito conforme demonstrado na Figura 2.

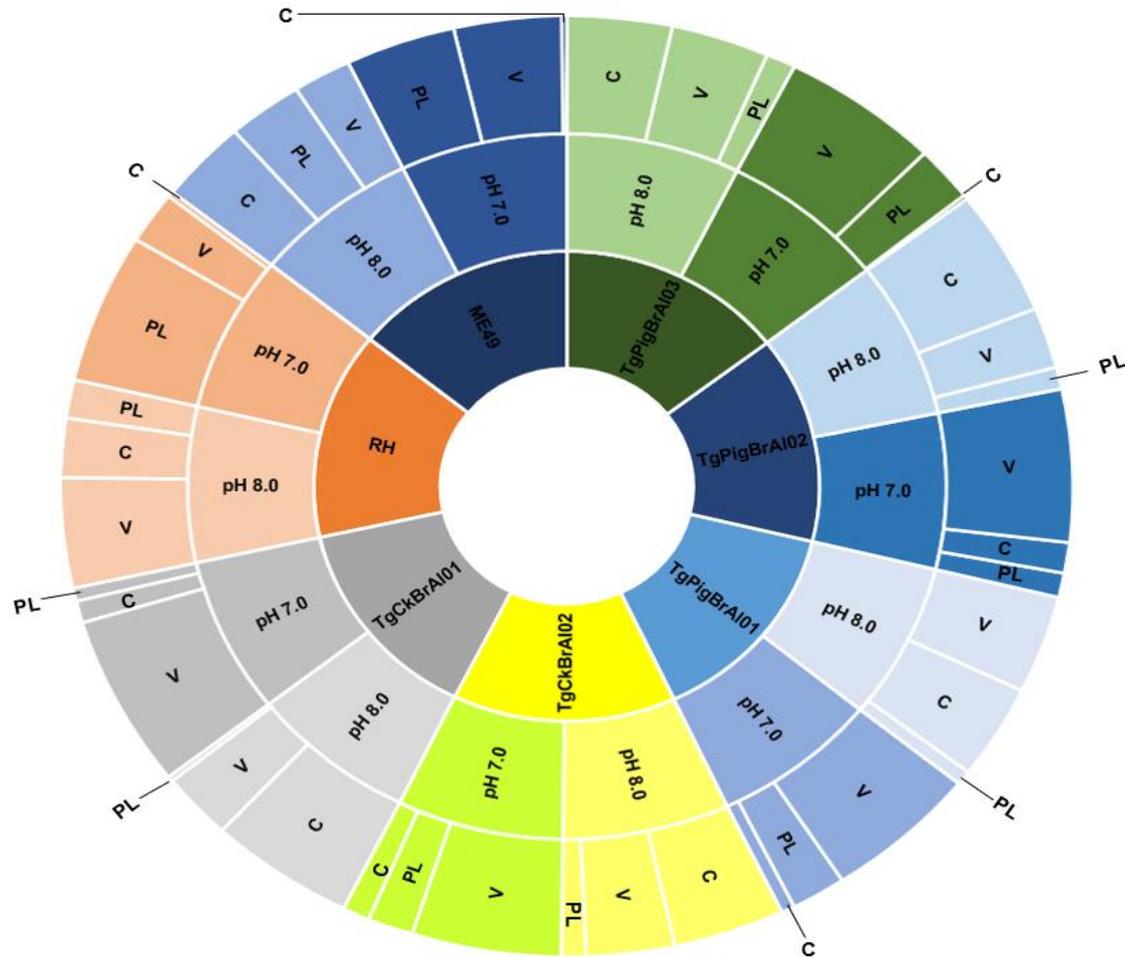
**Figura 2** - Cisto de *Toxoplasma gondii in vitro* induzido por pH alcalino em cultura celular da linhagem MARC-145.



Cultivo da cepa TgCkBrAL01 após indução do encistamento por meio alcalino. (A) Contraste de fase; (B) 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi utilizado para marcar moléculas de DNA; (C) Marcação com anticorpo primário (IgG de camundongo anti- *T. gondii*) e anticorpo secundário (IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor® 594, vermelho), seta representa um vacúolo parasitóforo (VP). (D) Marcação por lectina de *Dolichos biflorus* conjugada com FITC, confirma a conversão *in vitro* do agente por marcação de glicoproteínas de cisto, não há marcação do VP.

As proporções da formação de vacúolos parasitóforos, placas de lise e cistos para os diferentes isolados estão demonstradas na figura 3. Todos os isolados formaram de cistos nas culturas no meio com pH 7,0 (sem estresse) em baixo número, mostrando aumento significativo quando cultivados em meio com pH 8,0. Já é bem documentada que a indução por estresse exógeno altera o ciclo celular do parasito, conduzindo a uma condição de diferenciação de taquizoítos a bradizoítos (Skariah et al., 2010) e o uso de meio com pH alcalino (pH 8,0-8,2) tem sido um método altamente empregado para este fim (Lei et al., 2005; Ricard et al., 1999; Soete et al., 1994, 1993).

**Figura 3** - *Sunburst chart* das proporções de vacúolos, placas de lises e cistos para cada cepa de *Toxoplasma gondii* com indução (meio com pH 8,0) e sem indução (meio com pH 7,0) do encistamento *in vitro*.



V – vacúolos parasitóforos; PL – placa de lise; C - cisto

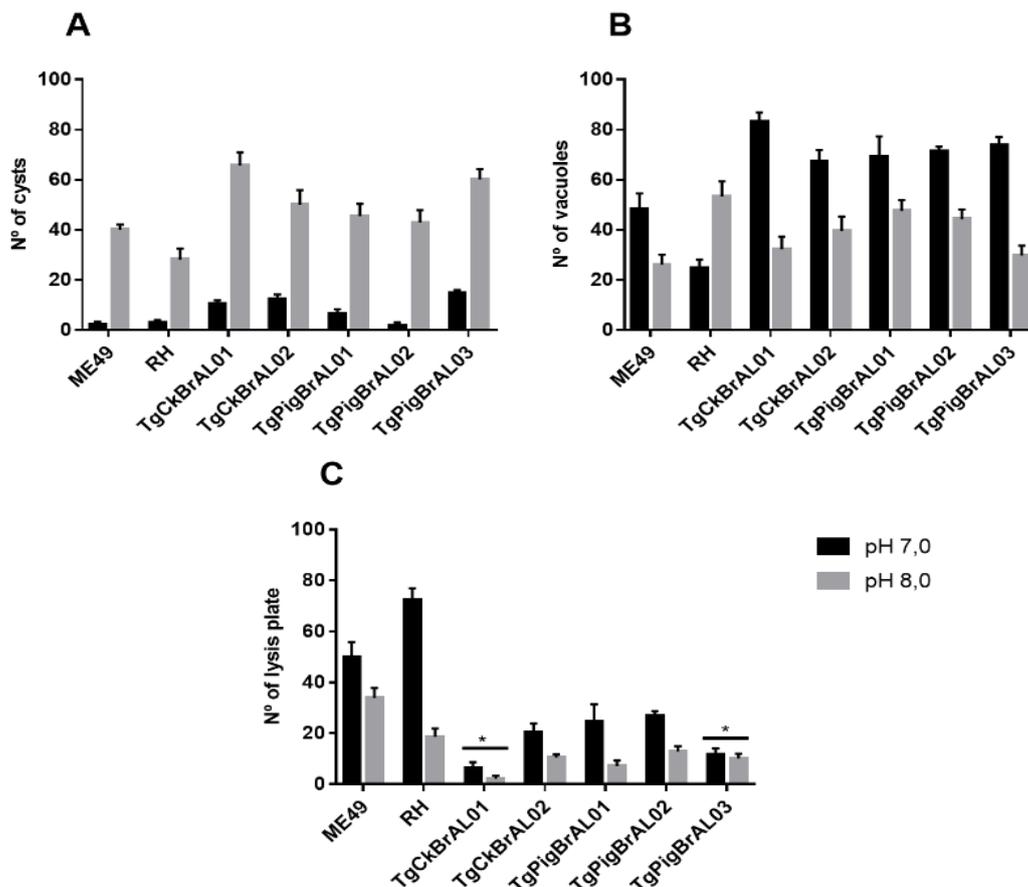
Ressalta-se que o pH alcalino não representa uma condição de estresse fisiológico, mas mimetiza o desencadeamento da conversão de estágio *in vivo* (Ferreira da Silva et al., 2009, 2008). Contudo, a conversão a bradizoíto encistado pode ser guiada por fatores fisiológicos que não sejam estresses exógenos, uma vez que os taquizoítos podem se converter espontaneamente em bradizoítos, como na baixa multiplicidade de infecção (MOI) e no recultivo sequencial de taquizoítos presente no sobrenadante de culturas infectadas também levam à formação de cistos (McHugh et al., 1993; Sullivan and Jeffers, 2012). Outro fator que pode explicar o encistamento em culturas sem estresse exógeno é o uso de linhagens celulares com um número elevado de passagens na manutenção dos parasitos (Dubey et al., 1998). Nesse experimento, utilizamos a linhagem MARC-145 entre a 31<sup>a</sup> e 36<sup>a</sup> passagem.

Comparando os diferentes eventos gerados entre os tratamentos (meio pH 7,0 e pH 8,0) (Figura 4), observa-se que a presença de vacúolos parasitóforos sofreu redução significativa, com exceção da cepa de referência RH, que demonstrou maior formação de vacúolos quando exposta ao meio de pH alcalino. As placas de lise foram reduzidas nos cultivos de meio de pH 8,0 de quase todos isolados, exceto para TgCkBrAL01 e TgPigBrAL03, não havendo diferença estatística.

Observa-se uma relação indireta quanto aos resultados obtidos na indução à latência entre o aumento da formação de cistos com a formação de vacúolos (exceção da cepa RH) e o aparecimento de placas de lise. Soete et al. (1993) relataram que a interconversão não é um evento sincrônico no cultivo celular, apesar dos parasitos *in vitro* formarem uma população homogênea. Alia-se o fato da transição entre taquizoítos e bradizoítos estar, assim como o ciclo lítico de *T. gondii*, acompanhado temporariamente por transcrição de genes dispersos no cromossomo do parasito (Radke et al., 2005), de modo que há uma desaceleração do ciclo celular provocado pela entrada no processo de conversão a bradizoítos (Gubbels et al., 2008; Radke et al., 2003). Essa redução do ciclo celular, possivelmente, contribui para a diminuição da proliferação, e também na formação de placas de lise, expressão da egressão que é a etapa final do ciclo lítico do parasito. Esse fenômeno foi reportado por Shimada, O'Connor, Yoneda (1974) ao avaliarem a relação entre destruição da monocamada de célula hospedeira e encistamento da cepa RH com 14 dias de

tratamento onde houve aumento da formação de cistos e diminuição drástica da lise celular.

**Figura 4** - Quantitativo dos eventos (cistos, vacúolos e placas de lises) entre o cultivo sem indução (pH 7,0) e com indução (pH 8,0) da conversão taquizoíto-bradizoíto das cepas típicas e recombinantes (#114 e #277) de *Toxoplasma gondii*.

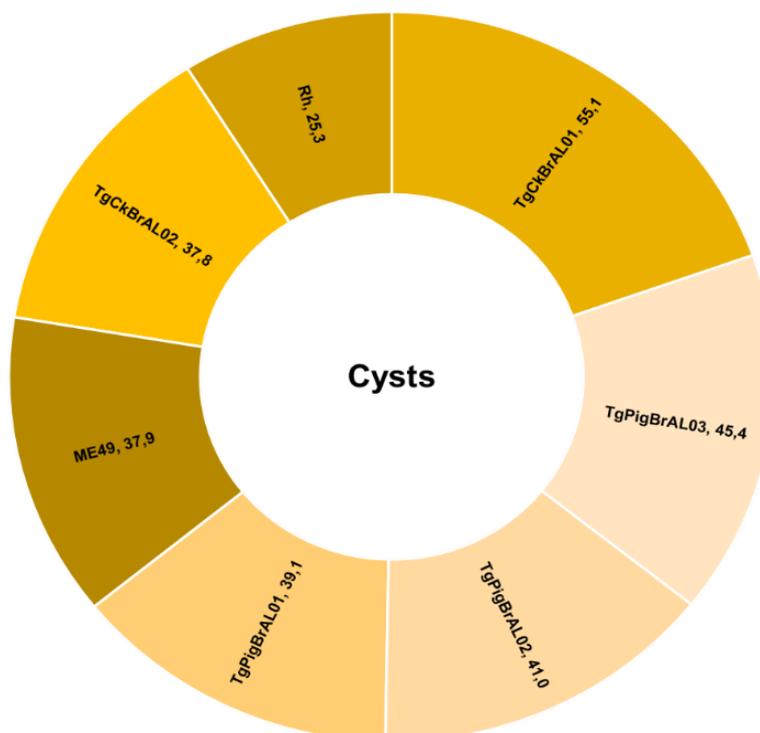


A – contagem de cistos; B – contagem de vacúolos; C – contagem de placas de lises. A diferença dos eventos entre tratamentos foi significativa para todos os isolados entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), exceto nos que apresentam asterisco (\*).

As taxas relativas de conversão (Figura 5) mostram que a cepa TgCkBrAL01 (55,1%) apresentou um maior percentual de encistamento, com diferença significativa em relação as outras cepas. O perfil fenotípico de alto encistamento demonstrado por esse isolado garante a manutenção de formas viáveis do agente uma vez que fornece resistência à digestão, não inativação pela resposta imune do hospedeiro, ação medicamentosa, além disso facilita a

dispersão ambiental, aumentando assim a transmissão do parasito se o hospedeiro for consumido por um predador (Sullivan Jr. et al., 2009).

**Figura 5** - Taxa relativa de conversão taquizoíto-bradizoíto entre cepas típicas e recombinantes (#114 e #277) de *Toxoplasma gondii*, em porcentagem.



As cepas de referências exibiram baixas taxas de conversão em relação aos isolados recombinantes com 25,3% para a cepa RH (menor entre todos os isolados) e 37,9% para a cepa ME49. Soete, Camus e Dubrametz (1994) relataram que a linhagem RH pode sofrer desenvolvimento parcial de bradizoíto *in vitro* sob condições similares aqui descritas, no entanto, geralmente acredita-se que as cepas do tipo I sejam menos capazes de realizar a conversão do que as cepas do tipo II (Weiss and Kim, 2000) ou do tipo III (Behnke et al., 2008). A cepa RH de *T. gondii* foi primeiramente isolada em 1939 de tecido humano (Sabin, 1941) e desde então passou por modelos *in vivo* e *in vitro* em diversos laboratórios do mundo (Hughes, Hudson, Fleck, 1986). Devido à passagem prolongada, esta cepa perdeu seu potencial de produção de oocistos (Frenkel; Dubey; Hoff, 1976), bem como de formar cistos teciduais em ratos (Dubey, et al., 1999). De modo divergente, foi verificado que em ratos infectados com taquizoítos da cepa RH, estes foram capazes de converterem-se em bradizoítos

quando tratados com atovaquone associado à pirrolidina ditiocarbamato de amônio (Djurkovic-Djakovic et al., 2005).

O isolado TgPigBrAL03 de genótipo I/II/III (#114; ToxoDB) comportou-se de forma diferente em comparação aos outros três isolados de mesmo genótipo, revelando maior produção de cistos, desenvolvimento de placas de lise e não diferente estatisticamente entre tratamento estressante e não-estressante. Há uma tendência de compreensão que um genótipo determinado expressará uma característica fenotípica também determinada. Todavia, comparações genômicas e transcriptômicas revelaram que variações fenotípicas entre isolados do tipo I (RH e GT-1) são resultados de diferenças na expressão de genes do parasito, além de identificar diferentes vias de modulação da célula hospedeira pelos isolados (Yang et al., 2013). Há carência de informações sobre a contribuição genética nas diferenças fenotípicas entre cepas recombinantes de mesmo genótipo.

A associação dos conhecimentos genéticos tão bem aceitos e empregados na caracterização de isolados de *T. gondii* pode e deve ser aliado às manifestações fenotípicas para melhor caracterizar um isolado. É necessário ressaltar que os estudos epigenéticos podem contribuir imensamente para compreender os mecanismos de encistamento. Em particular, a acetilação de histonas tem sido relacionada com a expressão de genes estágio-específicos de taquizoítos e bradizoítos. A acetilação de histona contribui para a reestruturação da cromatina, favorecendo um ambiente que leva à expressão de um determinado gene (Behnke et al., 2008; Dixon et al., 2010; Jamieson et al., 2009; Sullivan Jr et al., 2009).

Foram demonstradas diferenças na resposta entre cepas recombinantes tipo I/III e I/II/III em comparação às cepas típicas quando induzida a uma resposta estressante exógena *in vitro*. Uma cepa (TgPigBrAL03) de genótipo I/III (#114) manifestou taxas de conversão e padrão na formação de placa de lise distintas das outras cepas de mesmo genótipo, o que sugere que a extrapolação de dados fenotípicos intragenótipos deve ser cautelosa.

## REFERÊNCIAS

- Ajzenberg, D., Cogné, N., Paris, L., Bessières, M.-H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., Dardé, M.-L., 2002. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J. Infect. Dis.* 186, 684–689. <https://doi.org/10.1086/342663>
- Behnke, M.S., Radke, J.B., Smith, A.T., Sullivan, W.J.J., White, M.W., 2008. The transcription of bradyzoite genes in *Toxoplasma gondii* is controlled by autonomous promoter elements. *Mol. Microbiol.* 68, 1502–1518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06249.x>
- Bezerra, R.A., Carvalho, F.S., Guimaraes, L.A., Rocha, D.S., Maciel, B.M., Wenceslau, A.A., Lopes, C.W.G., Albuquerque, G.R., 2012. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. *Vet. Parasitol.* 189, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.036>
- Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U., 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect. Immun.* 62, 1761–7.
- Bohne, W., Roos, D.S., 1997. Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 88, 115–126. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00087-X)
- Carme, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Demar, M., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, A.M., Peneau, C., Neron, P., Dardé, M.L., 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4037–44. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4037-4044.2002>
- Channon, J.Y., Kasper, L.H., 1996. *Toxoplasma gondii*-induced immune suppression by human peripheral blood monocytes: role of gamma

interferon. *Infect. Immun.* 64, 1181–9.

Clementino Andrade, M.M., Pinheiro, B. V., Cunha, M.M., Carneiro, A.C.A. V., Andrade Neto, V.F., Vitor, R.W.A., 2013. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. *Res. Vet. Sci.* 94, 587–589. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.006>

de Melo Ferreira, A., Vitor, R.W.A., Gazzinelli, R.T., Melo, M.N., 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR–RFLP. *Infect. Genet. Evol.* 6, 22–31. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2004.12.004>

Dellarupe, A., Regidor-Cerrillo, J., Jiménez-Ruiz, E., Schares, G., Unzaga, J.M., Venturini, M.C., Ortega-Mora, L.M., 2014. Comparison of host cell invasion and proliferation among *Neospora caninum* isolates obtained from oocysts and from clinical cases of naturally infected dogs. *Exp. Parasitol.* 145, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.003>

Dias, R.A.F., Navarro, I.T., Ruffolo, B.B., Bugni, F.M., De Castro, M.V., Freire, R.L., 2005. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* <https://doi.org/10.1590/S0036-46652005000400002>

Dixon, S.E., Stilger, K.L., Elias, E. V, Naguleswaran, A., Sullivan, W.J.J., 2010. A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 173, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.05.001>

Djurković-Djaković, O., Nikolić, A., Bobić, B., Klun, I., Aleksić, A., 2005. Stage conversion of *Toxoplasma gondii* RH parasites in mice by treatment with atovaquone and pyrrolidine dithiocarbamate. *Microbes Infect.* 1, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.09.016>

Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis in pigs—The last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164, 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.018>

Dubey, J.P., 2010. Toxoplasmosis of animals and humans. *The Lancet.* <https://doi.org/10.1017/S0031182000078914>

- Dubey, J.P., Graham, D.H., Blackston, C.R., Lehmann, T., Gennari, S.M., Ragozo, A.M.A., Nishi, S.M., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., Hill, D.E., Thulliez, P., 2002. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: Unexpected findings. *Int. J. Parasitol.* 32, 99–105. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00364-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00364-2)
- Dubey, J.P., Hill, D.E., Rozeboom, D.W., Rajendran, C., Choudhary, S., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H.H., Su, C., 2012. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Vet. Parasitol.* 188, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.008>
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev* 11, 267–299. <https://doi.org/PMC106833>
- Dubey, J.P., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., Frenkel, J.K., 1999. Infection and Immunity with the RH Strain of *Toxoplasma gondii* in Rats and Mice. *J. Parasitol.* 85, 657–662. <https://doi.org/10.2307/3285739>
- Dubey, J.P.P., Velmurugan, G.V. V., Chockalingam, A., Pena, H.F.J.F.J., de Oliveira, L.N., Leifer, C.A.A., Gennari, S.M.M., Bahia Oliveira, L.M.G.M.G., Su, C., 2008. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet. Parasitol.* 157, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.036>
- Edvinsson, B., Lappalainen, M., Anttila, V.-J., Paetau, A., Evengard, B., 2009. Toxoplasmosis in immunocompromized patients. *Scand. J. Infect. Dis.* 41, 368–371. <https://doi.org/10.1080/00365540902783319>
- Feitosa, T.F., Vilela, V.L.R., de Almeida-neto, J.L., de Melo, L.R.B., de Morais, D.F., Alves, B.F., Nakashima, F., Gennari, S.M., Athayde, A.C.R., de Jesus Pena, H.F., 2017. First report of typical Brazilian *Toxoplasma gondii* genotypes from isolates of free-range chickens (*Gallus gallus domesticus*) circulating in the state of Paraíba, Northeast Brazil. *Parasitol. Res.* 116, 2265–2270. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5531-x>

- Ferreira da Silva, M. da F., Barbosa, H.S., Gross, U., Luder, C.G.K., 2008. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biosyst.* 4, 824–834. <https://doi.org/10.1039/b800520f>
- Ferreira da Silva, M. da F., Takacs, A.C., Barbosa, H.S., Gross, U., Luder, C.G.K., 2009. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.10.002>
- Fox, B.A., Gigley, J.P., Bzik, D.J., 2004. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int. J. Parasitol.* 34, 323–331. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2003.12.001>
- Frey, C.F., Regidor-Cerrillo, J., Marreros, N., García-Lunar, P., Gutiérrez-Expósito, D., Schares, G., Dubey, J.P., Gentile, A., Jacquiet, P., Shkap, V., Cortes, H., Ortega-Mora, L.M., Álvarez-García, G., 2016. *Besnoitia besnoiti* lytic cycle *in vitro* and differences in invasion and intracellular proliferation among isolates. *Parasit. Vectors* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1405-9>
- Genot, S., Franck, J., Forel, J.-M., Rebaudet, S., Ajzenberg, D., de Paula, A.M., Dardé, M.-L., Stein, A., Ranque, S., 2007. Severe *Toxoplasma gondii* I/III recombinant-genotype encephalitis in a human immunodeficiency virus patient. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3138–40. <https://doi.org/10.1128/JCM.00021-07>
- Grigg, M.E., Ganatra, J., Boothroyd, J.C., Margolis, T.P., 2001. Unusual Abundance of Atypical Strains Associated with Human Ocular Toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 184, 633–639. <https://doi.org/10.1086/322800>
- Gubbels, M.-J., White, M., Szatanek, T., 2008. The cell cycle and *Toxoplasma gondii* cell division: tightly knit or loosely stitched? *Int. J. Parasitol.* 38, 1343–1358. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.004>
- Jamieson, S.E., Cordell, H., Petersen, E., McLeod, R., Gilbert, R.E., Blackwell,

- J.M., 2009. Host genetic and epigenetic factors in toxoplasmosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 162–169.
- Jones, J.L., Dubey, J.P., 2012. Foodborne toxoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* 55, 845–851. <https://doi.org/10.1093/cid/cis508>
- Kaneto, C.N., Costa, A.J., Paulillo, A.C., Moraes, F.R., Murakami, T.O., Meireles, M.V., 1997. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet. Parasitol.* 69, 203–210. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01126-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01126-0)
- Khan, A., Behnke, M.S., Dunay, I.R., White, M.W., Sibley, L.D., 2009. Phenotypic and gene expression changes among clonal type I strains of *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell* 8, 1828–1836. <https://doi.org/10.1128/EC.00150-09>
- Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A.L., Rizzo, L. V, Belfort, R., Vitor, R.W.A., Silveira, C., Sibley, L.D., Sibley, L.D., 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 942–9. <https://doi.org/10.3201/EID1206.060025>
- Lei, Y., Davey, M., Ellis, J.T., 2005. Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines *in vitro*. *Parasitology* 131, 583–590. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008310>
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Blagburn, B.L., Toivio-Kinnucan, M., 1991. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J. Parasitol.* 77, 126–132. <https://doi.org/10.2307/3282569>
- Lyons, R.E., McLeod, R., Roberts, C.W., 2002. *Toxoplasma gondii* tachyzoite–bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol.* 18, 198–201. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02248-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02248-1)
- McHugh, T.D., Gbewonyo, A., Johnson, J.D., Holliman, R.E., Butcher, P.D., 1993. Development of an *in vitro* model of *Toxoplasma gondii* cyst formation 114, 325–332.
- Miranda, F.J.B., Souza, D.B. de, Frazao-Teixeira, E., Oliveira, F.C. de, Melo, J.C.

- de, Mariano, C.M.A., Albernaz, A.P., Carvalho, E.C.Q. de, Oliveira, F.C.R. de, Souza, W. de, DaMatta, R.A., 2015. Experimental infection with the *Toxoplasma gondii* ME-49 strain in the Brazilian BR-1 mini pig is a suitable animal model for human toxoplasmosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 95–100. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140318>
- Nagamune, K., Hicks, L.M., Fux, B., Brossier, F., Chini, E.N., Sibley, L.D., 2008a. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature* 451, 207–210. <https://doi.org/10.1038/nature06478>
- Nagamune, K., Moreno, S.N., Chini, E.N., Sibley, L.D., 2008b. Calcium regulation and signaling in apicomplexan parasites. *Subcell. Biochem.* 47, 70–81.
- Narasimhan, J., Joyce, B.R., Naguleswaran, A., Smith, A.T., Livingston, M.R., Dixon, S.E., Coppens, I., Wek, R.C., Sullivan, W.J.J., Jr., 2008. Translation regulation by eukaryotic initiation factor-2 kinases in the development of latent cysts in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 283, 16591–16601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800681200>
- Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38, 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>
- Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38, 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>
- Radke, J.R., Behnke, M.S., Mackey, A.J., Radke, J.B., Roos, D.S., White, M.W., 2005. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol.* 3, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-26>
- Radke, J.R., Guerini, M.N., Jerome, M., White, M.W., 2003. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00198-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00198-1)

- Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Sodupe, I., Aduriz, G., Álvarez-García, G., Del Pozo, I., Ortega-Mora, L.M., 2011. *In vitro* invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. *Vet Res* 42, 41. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-41>
- Ricard, J., Pelloux, H., Gross, U., Meunier, A., Ambroise-Thomas, P., 1999. Induction of *Toxoplasma gondii* cystogenesis and multiplication arrest by treatments with a phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor. *J Parasitol*. <https://doi.org/10.2307/3285804>
- Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., Boothroyd, J.C., 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.001>
- Saraf, P., Shwab, E.K., Dubey, J.P., Su, C., 2017. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Exp. Parasitol*. 174, 25–30. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2017.01.009>
- Shimada, K., O'Connor, R., Yoneda, C., 1974. Cyst Formation by *Toxoplasma gondii* (RH Strain) *in vitro*. *Arch. Ophthalmol*. 92, 496. <https://doi.org/10.1001/archopht.1974.01010010510010>
- Shwab, E.K., Zhu, X.-Q., Majumdar, D., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>
- Sibley, L.D., Boothroyd, J.C., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82–85. <https://doi.org/10.1038/359082a0>
- Skariah, S., McIntyre, M.K., Mordue, D.G., 2010. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol. Res.* 107, 253–260. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>
- Soete, M., Fortier, B., Camus, D., Dubremetz, J.F., 1993. *Toxoplasma gondii*:

- Kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp. Parasitol.* <https://doi.org/10.1006/expr.1993.1031>
- Soete, M., Camus, D., Dubrametz, J.F., 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 78, 361–370. <https://doi.org/10.1006/EXPR.1994.1039>
- Sullivan Jr, W.J., Smith, A.T., Joyce, B.R., 2009. Understanding mechanisms and the role of differentiation in pathogenesis of *Toxoplasma gondii*: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 155–161.
- Sullivan, W.J.J., Jeffers, V., 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 717–733. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x>
- Suzuki, Y., Conley, F.K., Remington, J.S., 1989. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J. Immunol.* 143, 2045–50. <https://doi.org/0022-1767/89/1436-2045802.00/0>
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
- Van Kuppeveld, F.J.M., Van Der Logt, J.T.M., Angulo, A.F., Zoest, M.J.V., Quint, W.G.V., Niesters, H.G.M., Galama, J.M.D., Melchers, W.J.G., 1992. Genus and species specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2606-2615.
- Villard, O., Candolfi, E., Ferguson, D.J.P., Marcellin, L., Kien, T., 1997. Loss of oral infectivity of tissue cysts of *Toxoplasma gondii* RH strain to outbred Swiss Webster mice. *Int. J. Parasitol.* [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00144-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00144-6)
- Weiss, L.M., Kim, K., 2000. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front. Biosci.* 5, D391–D405. <https://doi.org/10.2741/Weiss>

Yang, N., Farrell, A., Niedelman, W., Melo, M., Lu, D., Julien, L., Marth, G.T., Gubbels, M.-J., Saeij, J.P.J., 2013. Genetic basis for phenotypic differences between different *Toxoplasma gondii* type I strains. *BMC Genomics* 14, 467. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-467>

## 7 ARTIGO 3

**Características da infectividade *in vitro* foram compatíveis com o perfil dos genes ROP18 e ROP5 de isolados recombinantes de *Toxoplasma gondii*, obtidos de suíno e galinha.**

**Artigo a ser submetidos a Experimental Parasitology**

## **Características da infectividade *in vitro* foram compatíveis com o perfil dos genes ROP18 e ROP5 de isolados recombinantes de *Toxoplasma gondii* obtidos de suíno e galinha.**

### **Resumo**

O comportamento biológico de diferentes isolados de *T. gondii* durante o ciclo lítico contribui para um maior ou menor fenótipo de virulência determinada no modelo murino. Devido à dificuldade de extrapolação de dados da virulência *in vivo*, marcadores moleculares vêm sendo identificados e relacionados com a patogenia em camundongos, a exemplo dos genes das proteínas de róprias (ROPs). Objetivou-se caracterizar a habilidade de invasão celular e proliferação de cinco isolados recombinantes de *T. gondii* obtidos de tecido de suíno e galinha no Brasil e estabelecer a relação entre a infectividade e os alelos dos genes ROP5 e ROP18. As características fenotípicas da infectividade *in vitro* dos isolados recombinantes caracterizaram-se por baixa taxa de invasão e proliferação intracelular e estão relacionados com o padrão dos marcadores moleculares de virulência ROP5/ROP18 (1/3) considerados avirulentos ou não-letais.

**Palavras-chaves:** Virulência; fenótipo; genótipo

### **1. Introdução**

*Toxoplasma gondii* é um coccídio intracelular obrigatório, cosmopolita e com habilidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros como seres humanos, animais selvagens e domesticados (Dubey, 2010). É o agente etiológico da toxoplasmose, uma enfermidade que em infecções agudas pode provocar severas lesões oftalmológicas, neurológicas e problemas reprodutivos (Tenter et al., 2000; Weiss and Dubey, 2009). Entretanto, as infecções geralmente cursam de forma assintomática e crônicas, com o encistamento do parasito nos tecidos dos hospedeiros (Sullivan and Jeffers, 2012).

A patogenia da toxoplasmose ocorre em consequência da lesão tecidual, provocada pelo ciclo lítico do parasito associada à resposta inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro frente à agressão (Bhopale, 2003; Black and Boothroyd, 2000). O ciclo lítico de *T. gondii* resulta do processo de adesão dos

taquizoítos na superfície da célula hospedeira, invasão com formação do vacúolo parasitóforo, proliferação intracelular e saída celular, ocasionando a liberação de taquizoítos no ambiente extracelular para infecção de novas células (Black and Boothroyd, 2000; Saeij et al., 2005). O comportamento biológico de diferentes isolados de *T. gondii* durante o ciclo lítico contribui para um maior ou menor fenótipo de virulência e isso depende das estratégias de evasão imunológica apresentada por cada isolado, chamados fatores de virulência (Appleford and Smith, 1997; Dupont et al., 2012; Melo et al., 2011).

A virulência de *T. gondii* é determinada pela mortalidade apresentada por camundongos infectados com diferentes doses do parasito (Saraf et al., 2017). Através dessa análise, verificou-se que cepas clonais, encontradas frequentemente na Europa e nos Estados Unidos (Shwab et al., 2014) apresentam fenótipo hipervirulento (tipo I), hipo ou avirulento (tipos II e III) (Howe and Sibley, 1995; Sibley and Boothroyd, 1992). Na América do Sul (com destaque para o Brasil), a presença de cepas clonais é incomum, em geral a estrutura populacional de *T. gondii* nessa região é formada por isolados com elevadas combinações alélicas, denominados de genótipos recombinantes (Ajzenberg et al., 2004; de Melo Ferreira et al., 2006; Pena et al., 2008). Cepas recombinantes foram isoladas de humanos com graves quadros de neurotoxaplosmose e toxoplasmose ocular, apresentando maior virulência que cepas clássicas, sugerindo que a recombinação sexual de linhas clonais distintas e concorrentes, seja o caminho natural na evolução da virulência em *T. gondii* (Carme et al., 2002; Cavalcante et al., 2007; Grigg et al., 2001a, 2001b; Khan et al., 2009). Apesar de amplamente empregado e ser a metodologia padrão recomendada, a virulência de *T. gondii* em modelo murino não pode ser extrapolada para outras espécies animais, caracterizando um limitante da técnica (Dubremetz and Lebrun, 2012; Saraf et al., 2017).

Na busca por marcadores genéticos da virulência, identificou-se que o perfil alélico das proteínas de róprias (ROPs) apresentavam uma associação com a virulência em camundongos (El Hajj et al., 2007; Weilhammer and Rasley, 2011; Zhao et al., 2009). As ROPs são quinases envolvidas ativamente com o processo de invasão celular e manutenção da infecção (Dubremetz and Lebrun, 2012; Schwab et al., 2016). Atualmente, um dos fatores de virulência mais importantes de *T. gondii* é a ROP18, que tem sua ação potencializada pela

ROP5, de forma que a combinação de alelos dessas proteínas é considerada um importante preditivo da virulência de cepas de *T. gondii* (Behnke et al., 2015; Fox et al., 2016; Rêgo et al., 2017)

Objetivou-se caracterizar a habilidade de invasão celular e proliferação de cinco isolados recombinantes de *T. gondii* obtidos de tecido de suíno e galinha, além de estabelecer a relação entre o fenótipo da infectividade *in vitro* e o padrão dos genes ROP5 e ROP18 para dois isolados (genótipos #114 e #277).

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Caracterização dos isolados de *T. gondii*

Foram avaliados cinco isolados de *T. gondii* de genótipos recombinantes obtidos de tecido nervoso de suínos (TgPigBrAL01, TgPigBrAL02, TgPigBrAL03) e galinhas (TgCkBrAL01 e TgCkBrAL02) criados em sistema de subsistência na zona rural da cidade do município de Viçosa, estado de Alagoas, Brasil (dados não publicados). A caracterização molecular prévia dos isolados revelou o padrão genotípico apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1** - Genotipagem por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP-PCR) dos isolados de *Toxoplasma gondii* de genótipo recombinante, obtidos de tecidos de suínos e galinhas.

Isolates	SAG1	SAG 2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	APICO	ToxoDB
TgPigBrAL01, TgPigBrAL02, TgPigBrAL03 TgCkBrAL02	I	III	I	III	III	III	I	III	I	I	#114
TgCkBrAL01	I	III	I	III	III	II	III	III	I	III	#277

Foram incluídas nesse estudo as cepas de referência RH (genótipo tipo I) e ME49 (genótipo tipo II). Todos os isolados foram submetidos a duas passagens em camundongos antes da execução dos experimentos. O intervalo de passagens em cultivo celular dos isolados durante os experimentos está apresentado na tabela 2.

A manutenção rotineira dos isolados ocorreu em monocamada de células da linhagem MARC-145 e para os ensaios de invasão e proliferação utilizou-se a linhagem HFF. O protocolo de manutenção dos isolados e das células

hospedeiras em cultivo, bem como a purificação dos taquizoítos para os ensaios foram realizadas de acordo com Regidor-Cerrillo et al. (2011).

**Tabela 2** - Número de passagens *in vitro* das cepas típicas e recombinantes (#114 e #277) de *Toxoplasma gondii* utilizadas no estudo.

Isolados	Espécie animal	Passagem <i>in vitro</i> <sup>a</sup>
TgCkBrAL01	Galinha	9-17
TgCkBrAL02	Galinha	7-15
TgPigBrAL01	Suíno	7-18
TgPigBrAL02	Suíno	8-18
TgPigBrAL03	Suíno	7-19
RH	Humano	9-16 <sup>a</sup>
ME49	Ovino	7-14 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Número de passagens após descongelamento e reinoculação em camundongo.

## 2.2 Ensaio de invasão parasitária

Para o ensaio de invasão parasitária seguiu-se o protocolo previamente descrito por Dellarupe (2014) com algumas modificações. Foi realizado plaqueamento (placas de 24 poços) de  $2,5 \times 10^4$  células da linhagem HFF para obtenção de monocamada celular confluyente em 24 horas de incubação a 37°C, com saturação de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente foi inoculado  $2,5 \times 10^2$  taquizoítos dos isolados estudados nos poços das placas, em quadruplicata. Diferentes placas foram lavadas por três vezes com PBS para a retirada dos taquizoítos que não realizaram a invasão em dois tempos distintos: as 2 horas pós-infecção (hpi) e as 6 hpi. Uma outra placa foi mantida sem lavagem até 48hpi (final do experimento). As taxas de invasão parasitária às 2 horas (InvP2h) e as 6 horas (InvP6h) foram determinadas pelo número de eventos (vacúolos parasitóforos e das placas de lise) e a taxa total de invasão (InvPT) foi determinado pelo número de eventos por poço na placa que não foi lavada (48 hpi). Ao final de 48 hpi, as placas foram fixadas com metanol a -20°C por 20 minutos e procedeu-se a imunomarcção pela metodologia descrita Jiménez-Pelayo (2017). Os poços de placas foram examinados em microscópio invertido com fonte de luz UV com aumento de 200x para contagem dos vacúolos parasitóforos e das placas de lise imunomarcadas (eventos) por poço após o crescimento do parasito. Os ensaios foram realizados em dois ensaios independentes.

### 2.3 Ensaio de proliferação intracelular

A proliferação dos taquizoítos *in vitro* foi determinada pela quantificação do número de taquizoítos em diferentes tempos de crescimento (2; 12; 24; 48; 72 hpi) por PCR quantitativa (qPCR). Foram determinadas curvas de proliferação, cinética de crescimento (fase lag e log do ciclo celular do parasito) e comparação das médias da proliferação às 72hpi.

A metodologia utilizada nesse ensaio foi similar ao procedimento proposto por Frey et al. [24], com modificações. O plaqueamento de células da linhagem HFF foi realizada na concentração  $2,5 \times 10^5$  células/poço e utilizou-se um inóculo de  $2 \times 10^3$  taquizoítos/poço dos isolados estudados à monocamada celular. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas em dois ensaios independentes.

O número de taquizoítos de *T. gondii* foi determinado pela interpolação do valor Ct sobre as curvas padrões do parasito ( $10^4$  a  $10^{-1}$  taquizoítos) e do gene endógeno  $\beta$ -actina (320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 ng de DNA). Os *primers* e o perfil térmico usado para o parasito foram os descritos por Edvinsson et al. (2006) e para o gene endógeno por Gutierrez et al. (2012). Os resultados foram expressos pela relação entre a quantidade de DNA do parasito e DNA da célula ( $R^2 \geq 0.99$ ; valores *slope* variaram entre -3.39 e -3.26).

### 2.4 Estudo da virulência molecular

A genotipagem de *locus* associados à virulência (ROP5 e ROP18) foi realizada para os isolados TgCkBrAL01 e TgPigBrAL01, que apresentam, respectivamente, os genótipos recombinantes #277 e #114. Utilizou-se a metodologia de RFLP-PCR, descrito anteriormente por Shwab (2016).

### 2.5 Análise estatística

Foram empregados o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn para investigar a diferença na taxa de infecção nas InvP2h, InvP6h e InvPT. O teste ANOVA two-way, seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni foram empregados para estudar a influência a indução da conversão entre isolados e a diferenças na frequência de detecção de DNA do parasito pelo qPCR as 72 hpi. Significância estatística foi estabelecida com  $p < 0,05$  e o software GraphPad Prism 7 v.7.00 foi utilizado para realizar todas as análises estatísticas e ilustrações gráficas.

### 3 Resultados

#### 3.1 Ensaio de invasão parasitária

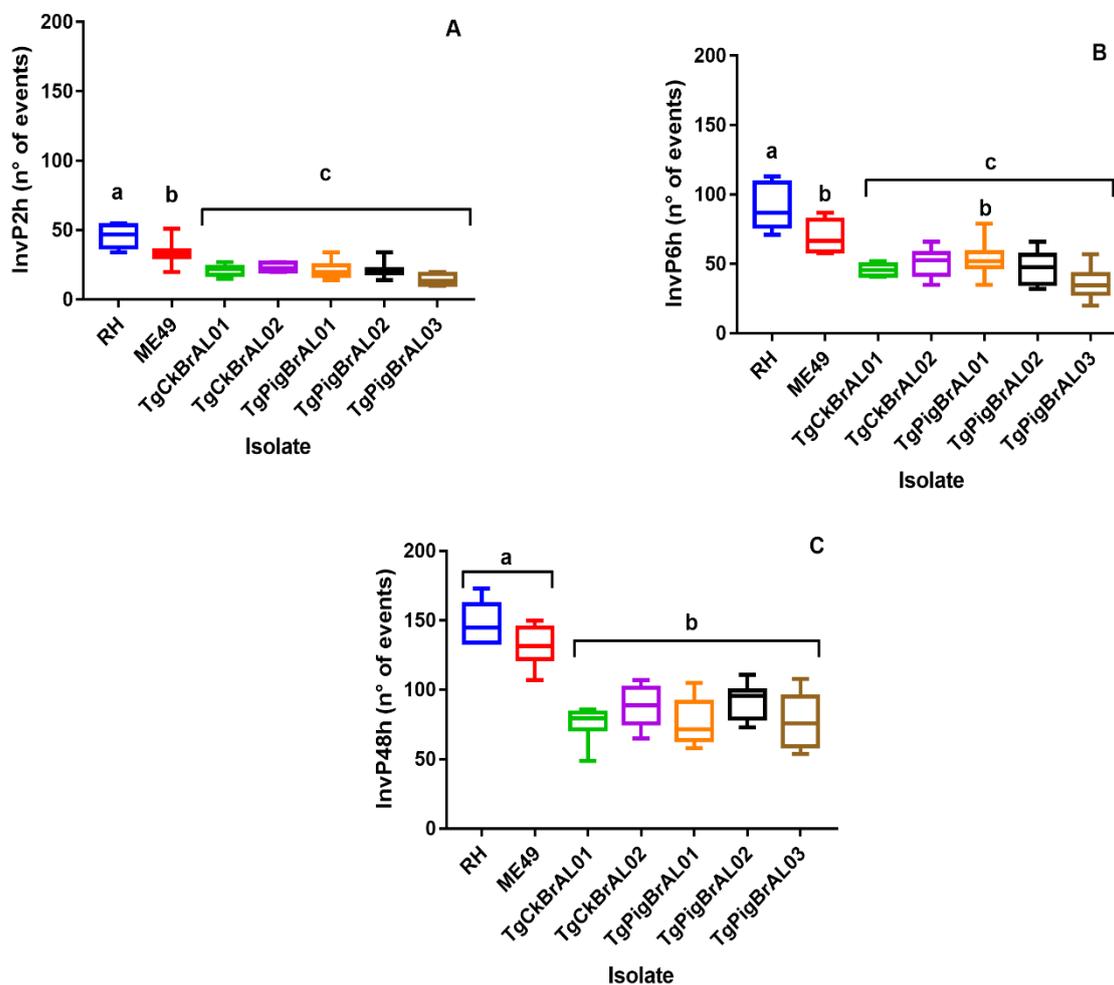
A taxa de invasão celular foi similar entre os isolados recombinantes com destaque para o isolado TgPigBrAL03 que teve as menores taxas às InvP2h (5,8%) e às InvP6h (14,4%), porém essa diferença não foi significativa. As taxas de invasão entre da cepa típica RH foi a maior entre todos os isolados. A entrada em InvP6h (entre 2h e 6hpi) foi mais efetiva que em InvP2h (0h as 2hpi) entre os isolados estudados (Tabela 3).

**Tabela 3** - Taxas de invasão parasitária às 2hpi (InvP2h), 6hpi (InvP6h) e 48hpi (InvP48h) dos isolados recombinantes de *Toxoplasma gondii* (#114 e #277; ToxoDB) isolados de suínos e galinhas.

Isolates	Inv2h(%)	Inv6h(%)	Inv48h(%)
RH	18,4	36,4	59,2
ME49	13,4	28,0	52,6
TgCkBrAL01	8,4	18,4	30,2
TgCkBrAL02	9,2	20,5	35,2
TgPigBrAL01	8,5	21,4	30,7
TgPigBrAL02	8,5	18,9	36,8
TgPigBrAL03	5,8	14,4	31,1

Verificou-se que os isolados recombinantes de ambos os genótipos (#114 e #277) se comportaram de forma similar quanto à invasão das células, não havendo diferença significativa em InvP2h, InvP6h ou InvPT. Entre as cepas clonais, a RH apresentou maior número de eventos resultantes da invasão nos tempos avaliados, seguido por ME49 (Figura 1).

**Figura 1** - Eventos de invasão parasitária para InvP2h (A), as InvP6h (B), InvPT (B) dos isolados recombinantes de *Toxoplasma gondii* (#114 e #277; ToxoDB) isolados de suínos e galinhas.

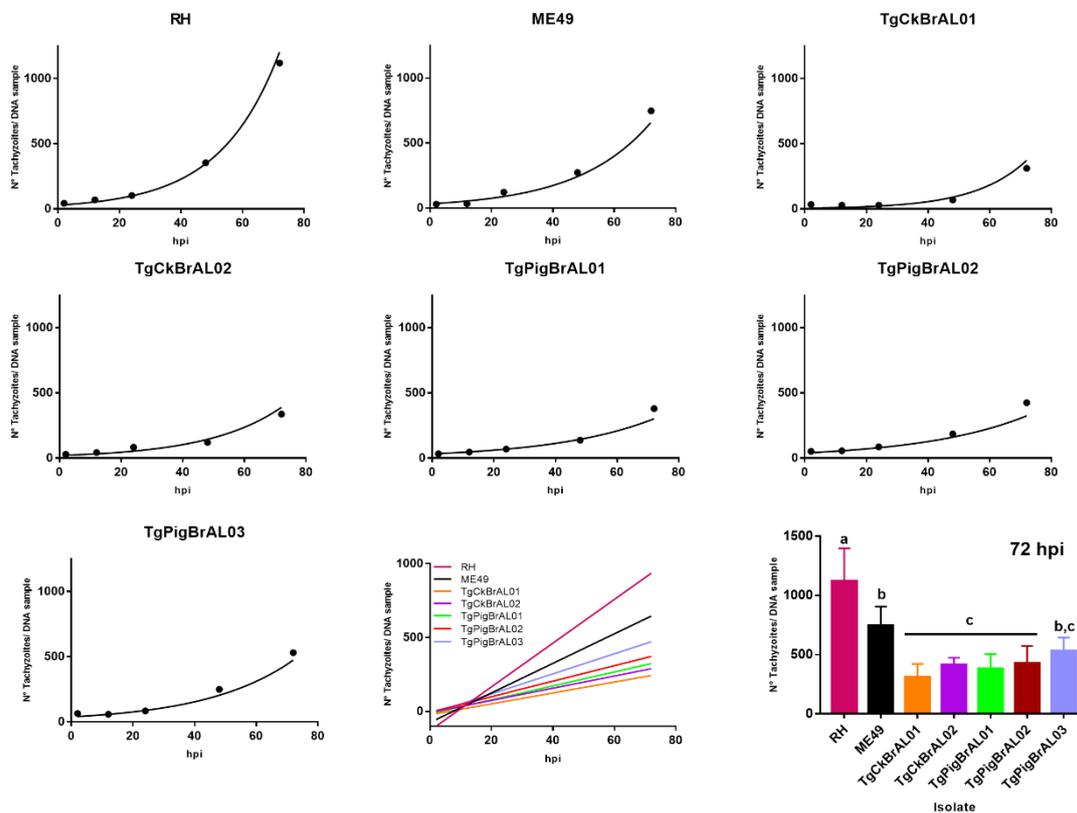


Diferentes letras indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,005$ )

### 3.2 Ensaio de proliferação intracelular

As curvas de crescimento exponencial, da função logarítmica e crescimento populacional às 72 hpi revelaram que a cepa RH multiplicou de maneira mais eficiente que os demais isolados. Entre os isolados de genótipo #114 e #277, a proliferação foi estatisticamente igual, no entanto o isolado TgCkBrAL01 (#277) teve menor número de taquizoítos/ng de DNA que os demais, entanto TgPigBrAL03 (#114) foi o isolado com eficiência na proliferação entre os recombinantes, não mostrando diferença significativa em relação à cepa ME49.

**Figura 2** - Curvas de crescimento exponencial, da função logarítmica e comparação das médias de crescimento populacional as 72 hpi dos isolados recombinantes de *Toxoplasma gondii* (#114 e #277; ToxoDB) isolados de suínos e galinhas.



Diferentes letras demonstram diferenças estatísticas.

### 3.3 Estudo da virulência molecular

A caracterização dos alelos dos genes das proteínas de róprias ROP5 e ROP18 dos isolados TgTgCkBrAL01 (#277) e TgPigBrAL01 (#114) apontou o perfil 1/3 (ROP5/ROP18) para ambos os isolados. Em comparação aos dados publicados previamente por Shwab et al. (2016), a combinação desses alelos está associada a um fenótipo não virulento no modelo murino. Os genes ROP16 e ROP17 exibiram os alelos 3 e 4 para o isolado de galinha e 1 e 4 para o isolado suíno (Tabela 4).

**Tabela 4** - Caracterização dos alelos dos genes ROP5, ROP18, ROP16 e ROP17 dos isolados TgTgCkBrAL01 (#277) e TgPigBrAL01 (#114) obtidos de galinha e suíno e cepas de referência RH e ME49.

Isolate	Genotype	Virulence protein				Virulence <i>in vivo</i> by
		ROP5	ROP18	ROP16	ROP17	Shwab et al. (2016)
RH	Tipo I (#10)	1	1	1	1	Lethal
ME49	Tipo II (#1)	2	2	2	2	Lethal
TgCkBrAL01	#277	1	3	3	4	No-lethal
TgPigBrAL01	#144	1	3	1	4	No-lethal

### 3 Discussão

No presente estudo foram qualificados os aspectos fenotípicos da infectividade *in vitro* (invasão e proliferação) de isolados recombinantes de *T. gondii* e o perfil genético dos fatores de virulência ROP5 e ROP18. A infectividade de um agente infeccioso é compreendida como a capacidade de invasão e colonização dos tecidos (Dubremetz and Lebrun, 2012; Putt, 1987). Esse comportamento biológico em Toxoplasmatíneos pode ser determinado por avaliações *in vitro* (Appleford and Smith, 2000, 1997; Dellarupe et al., 2014; Frey et al., 2016; Regidor-Cerrillo et al., 2011), contudo, a relação entre achados fenotípicos da infectividade *in vitro* com os fatores de virulência não está estabelecido. Para nosso conhecimento essa é a primeira investigação que estuda a etapas do ciclo lítico de genótipos recombinantes e verifica a relação entre os achados *in vitro* e os marcadores moleculares de virulência.

Os isolados avaliados foram obtidos de animais de produção da zona rural do interior do Estado de Alagoas, nordeste brasileiro (dados não publicados). Esses animais eram criados para a subsistência e consumidos pela população humana, o que configura um sério problema sanitário, uma vez que carne proveniente de produções com precário manejo sanitário apresenta um maior risco de infecção para os humanos do que animais criados em sistemas tecnificados (Garcia-Bocanegra et al., 2010; Hill et al., 2005; Jones and Dubey, 2012). Adiciona-se a isso o fato de ser cultural nessa região do Brasil o consumo de vísceras de suínos, como o coração, tecido que já teve *T. gondii* isolado de animais de criação de subsistência no sul do Brasil (Oliveira et al., 2014). Assim,

deve-se alertar a população sobre os riscos da ingestão de tecidos crus ou com cocção inadequada (Dubey, 2010).

Antes da realização dos ensaios fenotípicos, as cepas foram inoculadas em camundongos para reduzir os efeitos da cultura *in vitro* que podem alterar algumas das características fenotípicas do parasito (Khan and Michael, 2018). Os cinco isolados (um genótipo #277 e quatro genótipos #114) exibiram igualdade na análise estatística no fenótipo de infectividade de invasão parasitária e proliferação *in vitro*. Todavia, o isolado TgPigBrAL03 (#114) apresentou um comportamento distinto dos demais, e apesar de exibir menor taxa de invasão, esse isolado curiosamente teve a maior proliferação entre os isolados recombinantes, ou seja, apesar da baixa habilidade de penetrar as células foram eficientes em multiplicar-se no curso do ciclo lítico, ainda que sem significância estatística. Comparando as características apresentadas dos isolados recombinantes com as cepas clonais, verificamos que os cinco isolados apresentaram baixa infectividade.

De modo esperado, a cepa de referência RH (tipo I) foi a mais eficiente tanto na invasão quanto na proliferação, seguida da cepa ME49 (tipo II). Dado que confirma as descrições feitas por Radke e White (1999) que já haviam demonstrado que a taxa de crescimento *in vitro* difere significativamente entre genótipos típicos, com a cepa do tipo I, crescendo substancialmente mais rápido do que as cepas dos tipos II e III. A cepa RH não só tem uma taxa de crescimento *in vitro* mais elevada, mas também pode sobreviver muito mais tempo no ambiente extracelular do que qualquer outra linhagem conhecida de *T. gondii* (Khan et al., 2009).

Isolados recombinantes e atípicos são encontrados em alta frequência no Brasil em animais (Pena et al., 2008) e em humanos, estando associados com toxoplasmose ocular congênita na frequência de cinco vezes maior do que em casos europeus (Gilbert et al., 2008). Desta maneira, o estudo de caracterização biológica ou genética de novos isolados são importantes para compreender a complexidade do parasito. Na busca por métodos que facilitem o acesso a virulência deste coccídio, diferentes marcadores moleculares têm sido descritos.

O perfil dos genes ROP5/ROP18 apresentado pelas cepas TgCkBrAL01 (#277) e TgPigBrAL01 (#114) foram descritos como de isolados não letais ou avirulentos em um amplo estudo realizado por Shwab et al. (2016) com isolados

de diversas regiões geográficas. Esses dados corroboram com os nossos achados de infectividade *in vitro*. A quinase ROP18 atua fosforilando enzimas hidrolíticas (IRGs; família das GTPases) que danificam o vacúolo parasitóforo inviabilizando a sobrevivência do parasito (El Hajj et al., 2007; Steinfeldt et al., 2010). A ROP5, uma pseuquinase, potencializa a ação de ROP18 na inativação das IRGs e mesmo na ausência de ROP18 alelos específicos de ROP5 podem reduzir a produção de IFN- $\gamma$  induzida pelas IRGs (Niedelman et al., 2012), ao passo que, a inativação das IRGs por ROP18 é dependente da expressão de alelos virulentos de ROP5 (Behnke et al., 2015). As ROP18 e ROP5 também têm se mostrado importantes alvos vacinais devido à atividade imunogênica, com proteção parcial contra cepas virulentas e avirulentas (Zheng et al., 2013, Grzybowski et al., 2015).

O genótipo #114 já foi isolado anteriormente em galinhas por de Oliveira et al. (2009) no Estado de Pernambuco. Na caracterização fenotípica *in vivo* esse isolado não provocou a morte de nenhum animal inoculado, sendo classificado como avirulento, e exibiu na avaliação de marcadores moleculares de virulência os alelos 1/3/1/4 (ROP5, ROP18, ROP16, ROP17, respectivamente) (Shwab et al., 2016), igualmente aos apresentados pelo isolado do presente estudo. O genótipo #277 foi primeiramente descrito também em galinhas, no Estado da Paraíba, porém como não há descrição prévia da virulência *in vivo* ou molecular, comparou-se a associação do perfil alélico do isolado TgCkBrAL01 (Tabela 3) com um isolado que apresenta mesmo perfil alélico de ROPs, o isolado TgCkGy18 (#68) (Dubey et al., 2007), obtido de galinhas na Guiana Francesa. O isolado franco-guianês foi considerado avirulento em camungondo, assim a combinação dos alelos de TgCkBrAL01 também está relacionada com um isolado avirulento.

Apesar de terem sido propostas como fatores de virulência, as proteínas ROP16 e ROP17, essas não apresentaram relação com a virulência em camundongo nas descrições comparativas de Schwab et al. (2016). Funcionalmente, a quinase ROP17, atua de forma sinérgica ROP18 (Etheridge et al., 2014) e a ROP16 manipula a transcrição das vias STAT3/6, reduzindo a resposta Th1 (Butcher et al., 2011). Aqui, optou-se por incluir esse marcadores para verificar a relação com o modelo *in vitro*. No entanto, o perfil de alelos 1 ou 3 (ROP16) e 4 (ROP17), por exemplo, são descritos tanto para isolados

virulentos, quanto avirulentos, sem um padrão evidente ou correlação com a virulência em camundongo (Shwab et al., 2016). Logo, não é possível traçar uma relação entre o perfil desses genes como o fenótipo de baixa infectividade aqui descrito dos isolados de genótipo recombinante.

Conclui-se que os genótipos #114 e #277 de *T. gondii* de suíno e galinha do Brasil apresentam o mesmo comportamento de invasão e proliferação *in vitro*, caracterizando um fenótipo de baixa infectividade e este fenótipo possui relação com os marcadores moleculares de virulência ROP5 e ROP18.

## Referências

- Ajzenberg, D., Bañuls, A.L.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., Dardé, M.L.L., 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34, 1185–1196. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.06.007>
- Appleford, P.J., Smith, J.E., 1997. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. *Acta Trop.* 65, 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00656-6](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00656-6)
- Appleford, P.J., Smith, J.E., 2000. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. *Int. J. Parasitol.* 30, 1187–1191. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00109-0)
- Behnke, M.S., Khan, A., Lauron, E.J., Jimah, J.R., Wang, Q., Tolia, N.H., Sibley, L.D., 2015. Rhoptry Proteins ROP5 and ROP18 Are Major Murine Virulence Factors in Genetically Divergent South American Strains of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Genet.* 11, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005434>
- Bhopale, G.M., 2003. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 213–222. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(02\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(02)00058-9)
- Black, M.W., Boothroyd, J.C., 2000. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 607–623. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>
- Butcher, B.A., Fox, B.A., Rommereim, L.M., Kim, S.G., Maurer, K.J., Yarovinsky, F., Herbert, D.R., Bzik, D.J., Denkers, E.Y., 2011. *Toxoplasma gondii* rhoptry

kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6 resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. *PLoS Pathog.* 7, e1002236. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002236>

Carme, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Demar, M., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, A.M., Peneau, C., Neron, P., Dardé, M.L., 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4037–44. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4037-4044.2002>

Cavalcante, A.C.R., Ferreira, A.M., Melo, M.N., Fux, B., Brandão, G.P., Vitor, R.W.A., 2007. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. *Small Rumin. Res.* 69, 79–82. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.12.023>

de Melo Ferreira, A., Vitor, R.W.A., Gazzinelli, R.T., Melo, M.N., 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR–RFLP. *Infect. Genet. Evol.* 6, 22–31. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2004.12.004>

de Oliveira, L.N., Costa Junior, L.M., de Melo, C.F., Ramos Silva, J.C., Bevilaqua, C.M., Azevedo, S.S., Muradian, V., Araújo, D.A., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2009. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the northeast region of Brazil. *J Parasitol*, 95, 235 - 237. <https://doi.org/10.1645/GE-1730.1>

Dellarupe, A., Regidor-Cerrillo, J., Jiménez-Ruiz, E., Schares, G., Unzaga, J.M., Venturini, M.C., Ortega-Mora, L.M., 2014. Comparison of host cell invasion and proliferation among *Neospora caninum* isolates obtained from oocysts and from clinical cases of naturally infected dogs. *Exp. Parasitol.* 145, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.003>

Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans.*, 2a ed. ed, The Lancet. CRC Press, Florida. <https://doi.org/10.1017/S0031182000078914>

Dubey, J.P., Applewhaite, L., Sundar, N., Velmurugan, G.V., Bandini, L.A., Kwok, O.C., Hill, R., Su, C., 2007. Molecular and biological characterization of

*Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. *Parasitology* 134, 1559 - 1565.

Dubremetz, J.F.F., Lebrun, M., 2012. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 14, 1403–1410. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.005>

Dupont, C.D., Christian, D.A., Hunter, C.A., 2012. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin. Immunopathol.* 34, 793–813. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3>

Edvinsson, B., Lappalainen, M., Evengård, B., Buffalano, W., Ferguson, D., Guy, E., Jenum, P., Nowakowska, D., Pelloux, B., Stray-Pedersen, B., Szénási, Z., 2006. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Infect.* <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01332.x>

El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S.T., Vial, H., Labesse, G., Dubremetz, J.F., 2007. ROP18 Is a Rhopty Kinase Controlling the Intracellular Proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 3, e14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030014>

Etheridge, R.D., Alaganan, A., Tang, K., Lou, H.J., Turk, B.E., Sibley, D., 2014. The *Toxoplasma* Pseudokinase ROP5 Forms Complexes with ROP18 and ROP17 Kinases that Synergize to Control Acute Virulence in Mice. *Cell Host Microbe* 15, 537–550.

Evans R, Chatterton JM, Ashburn D, Joss AW, Ho-Yen DO. Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*1999;18:879–84.

Feitosa, T.F., Vilela, V.L.R., de Almeida-neto, J.L., de Melo, L.R.B., de Morais, D.F., Alves, B.F., Nakashima, F., Gennari, S.M., Athayde, A.C.R., de Jesus Pena, H.F., 2017. First report of typical Brazilian *Toxoplasma gondii* genotypes from isolates of free-range chickens (*Gallus gallus domesticus*)

circulating in the state of Paraíba, Northeast Brazil. *Parasitol Res* <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5531-x>

- Fox, B.A., Rommereim, L.M., Guevara, R.B., Falla, A., Triana, M.A.H., Sun, Y., Bzik, D.J., 2016. The *Toxoplasma gondii* rhoptry kinome is essential for chronic infection. *MBio* 7, e00193-16. <https://doi.org/10.1128/MBIO.00193-16>
- Frey, C.F., Regidor-Cerrillo, J., Marreros, N., García-Lunar, P., Gutiérrez-Expósito, D., Schares, G., Dubey, J.P., Gentile, A., Jacquiet, P., Shkap, V., Cortes, H., Ortega-Mora, L.M., Álvarez-García, G., 2016. *Besnoitia besnoiti* lytic cycle in vitro and differences in invasion and intracellular proliferation among isolates. *Parasit Vect* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1405-9>
- Garcia-Bocanegra, I., Dubey, J.P., Simon-Grife, M., Cabezon, O., Casal, J., Allepuz, A., Napp, S., Almeria, S., 2010. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pig farms from Catalonia, north-eastern Spain. *Res. Vet. Sci.* 89, 85–87. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.01.017>
- Grigg, M.E., Bonnefoy, S., Hehl, A.B., Suzuki, Y., Boothroyd, J.C., 2001a. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 294, 161–5. <https://doi.org/10.1126/science.1061888>
- Grigg, M.E., Ganatra, J., Boothroyd, J.C., Margolis, T.P., 2001b. Unusual Abundance of Atypical Strains Associated with Human Ocular Toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 184, 633–639. <https://doi.org/10.1086/322800>
- Grzybowski, M.M., Dziadek, B., Gatkowska, J.M., Dzitko, K., Długońska, H., 2015. Towards vaccine against toxoplasmosis: evaluation of the immunogenic and protective activity of recombinant ROP5 and ROP18 *Toxoplasma gondii* proteins. *Parasitol. Res.* 114, 4553–4563
- Gutierrez, J., O'Donovan, J., Proctor, A., Brady, C., Marques, P.X., Worrall, S., Nally, J.E., McElroy, M., Bassett, H., Fagan, J., Maley, S., Buxton, D.,

- Sammin, D., Markey, B.K., 2012. Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of toxoplasmosis and enzootic abortion of ewes. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 846–854. <https://doi.org/10.1177/1040638712452730>
- Hill, D.E., Chirukandoth, S., Dubey, J.P., 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim. Heal. Res. Rev.* 6, 41–61. <https://doi.org/10.1079/AHR2005100>
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* Comprises of Parasite Three Clonal Lineages : Correlation with Human Disease Genotype. *J. Infect. Dis.* 172, 1561–6.
- Jiménez-Pelayo, L., García-Sánchez, M., Regidor-Cerrillo, J., Horcajo, P., Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., Hambruch, N., Pfarrer, C., Ortega-Mora, L.M., 2017. Differential susceptibility of bovine caruncular and trophoblast cell lines to infection with high and low virulence isolates of *Neospora caninum*. *Parasit. Vectors* 10, 463. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2409-9>
- Jones, J.L., Dubey, J.P., 2012. Foodborne toxoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* 55, 845–851. <https://doi.org/10.1093/cid/cis508>
- Khan A, Behnke MS, Dunay IR, White MW, Sibley LD., 2009. Phenotypic and gene expression changes among clonal type I strains of *Toxoplasma gondii*. *Euk Cell* 8, 1828–36.
- Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A.L., Rizzo, L. V, Belfort, R., Vitor, R.W.A., Silveira, C., Sibley, L.D., Sibley, L.D., 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 942–9. <https://doi.org/10.3201/EID1206.060025>
- Melo, M.B., Jensen, K.D.C., Saeij, J.P.J., 2011. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol.* 27, 487–95. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.08.001>

- Oliveira, P.A. de, Oliveira, F.C. de, Faria, L.M.J. de, Cademartori, B.G., Marcolongo-Pereira, C., Coelho, A.C.B., Pappen, F.G., Farias, N.A., 2014. Patogenicidade e virulência de *Toxoplasma gondii* isolado de suínos de criação artesanal no sul do Brasil. *Pesqui. Veterinária Bras.* 34, 1186–1190. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001200007>
- Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38, 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>
- Putt, S.N.H., 1987. *Veterinary epidemiology and economics in Africa : a manual for use in the design and appraisal of livestock health policy*. Veterinary Epidemiology and Economics Research Unit, Dept. of Agriculture, University of Reading.
- Radke JR, White MW, 1999. Expression of herpes simplex virus thymidine kinase in *Toxoplasma gondii* attenuates tachyzoite virulence in mice. *Infect Immun.* 67, 292–7.
- Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Sodupe, I., Aduriz, G., Álvarez-García, G., Del Pozo, I., Ortega-Mora, L.M., 2011. *In vitro* invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. *Vet Res* 42, 41. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-41>
- Rêgo, W.M.F., Costa, J.G.L., Baraviera, R.C.A., Pinto, L.V., Bessa, G.L., Lopes, R.E.N., Vitor, R.W.A., 2017. Association of ROP18 and ROP5 was efficient as a marker of virulence in atypical isolates of *Toxoplasma gondii* obtained from pigs and goats in Piauí, Brazil. *Vet. Parasitol.* 247, 19–25. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2017.09.015>
- Saeij, J.P.J., Boyle, J.P., Boothroyd, J.C., 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol.* <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.001>
- Saraf, P., Shwab, E.K., Dubey, J.P., Su, C., 2017. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Exp. Parasitol.* 174, 25–30.

<https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2017.01.009>

- Shwab, E.K., Jiang, T., Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2016. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 46, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.10.005>
- Shwab, E.K., Zhu, X.-Q.Q., Majumdar, D., Pena, H.F.J.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453–461. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>
- Sibley, L.D., Boothroyd, J.C., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82–85. <https://doi.org/10.1038/359082a0>
- Steinfeldt, T., Konen-Waisman, S., Tong, L., Pawlowski, N., Lamkemeyer, T., Sibley, L.D., Hunn, J.P., Howard, J.C., 2010. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biol.* 8, e1000576. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000576>
- Sullivan, W.J.J., Jeffers, V., 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 717–733. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x>
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30, 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
- Weilhammer, D.R., Rasley, A., 2011. Genetic approaches for understanding virulence in *Toxoplasma gondii*. *Brief. Funct. Genomics* 10, 365–373. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elr028>
- Weiss, L.M., Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* 39, 895–901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>

Zhao, Y., Ferguson, D.J.P., Wilson, D.C., Howard, J.C., Sibley, L.D., Yap, G.S., 2009. Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. *J. Immunol.* 182, 3775–3781. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804190>

Zheng, B., Lu, S., Tong, Q., Kong, Q., Lou, D., 2013. The virulence-related rhoptry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 31, 4578–4584. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.058>

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Cepa de *Toxoplasma gondii* de genótipo tipo II variante apresenta padrão fenotípico de infectividade distinto nos ensaios na invasão parasitária, proliferação intracelular e cistogênese induzida em relação a cepas de genótipo tipo II clássico.
- A caracterização da habilidade de resposta ao estresse para cistogênese demonstrou que isolados recombinantes I/III diferem de isolados do genótipo recombinante I/II/III e entre isolados de mesmo genótipo. É necessário estabelecer melhor relação da virulência em modelo murino, caracterização genética e comportamento fenotípico para cepas recombinantes de *T. gondii*.
- As características fenotípicas da infectividade *in vitro* (baixa taxa de invasão e baixa de proliferação intracelular) de dois isolados recombinantes de *T. gondii* corroboram com o padrão dos marcadores moleculares de virulência ROP5/ROP18 (1/3), considerados avirulentos ou não-letais.
- Variações fenotípicas entre e intragenótipos devem ser exploradas por ferramentas genéticas, epigenéticas e ou transcricionais para compreender os mecanismos desenvolvidos por *T. gondii* envolvidos no comportamento biológico.
- Técnicas de caracterização *in vitro* mostram-se aptas para revelarem características da infectividade que estão diretamente relacionadas à virulência. Estudos futuros devem se dedicar a correlacionar achados *in vitro*, *in vivo* e moleculares a fim de tentar validar um teste de virulência que não necessite o uso de camundongos.