Talita Caroline Coelho dos Santos

Reinfecção experimental de camundongos Balb/c por cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

São Paulo

2018

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Santos, Talita Caroline Coelho dos

Reinfecção experimental de camundongos Balb/c por cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii* / Talita Caroline Coelho dos Santos. – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Descritores: 1. TOXOPLASMOSE. 2. TOXOPLASMA GONDII. 3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL ANIMAL. 4. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE. 5. TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM. 6. TÉCNICAS IMUNOENZIMÁTICAS.

USP/IMTSP/BIB-25/2017.

Dedico essa dissertação à Dra. Luciana Regina Meireles pelo reconhecimento e oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; meu respeito e admiração pela sua serenidade. Companheira de caminhada ao longo dessa jornada. Eu posso dizer que a minha formação não teria sido a mesma sem a sua ajuda.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman, cujo apoio tem me permitido realizar meus ideais de profissão e vida, dedico minha amizade, admiração e respeito. Minha eterna gratidão pela finalização deste trabalho, sem ela, não seria possível.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior pela disposição do Laboratório de Protozoologia e importantes ensinamentos.

Ao meu marido, Julio Cesar que tem me apoiado nesses últimos anos com muita paciência, apoio e dedicação.

À minha mãe, Lucileia por dar a sua vida pelo meu crescimento e, desta forma, permitir que finalizasse essa nova fase em minha vida.

À minha família, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos importantes.

À minha querida companheira de jornada, Elizama Carneiro Machado Bezerra que me permitiu, além de colega de bancada, ganhar uma grande amiga, companheira para todas as horas.

A todos do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pelos ensinamentos dentro do laboratório.

*“Uma paixão forte por qualquer objeto assegurará o sucesso,
porque o desejo pelo objetivo mostrará os meios.”*

William Hazlitt

RESUMO

Santos TCC. Reinfecção experimental de camundongos Balb/c por cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

A infecção por *Toxoplasma gondii*, em hospedeiros imunocompetentes, resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos e resposta imune celular que, frequentemente, induzem imunidade protetora e duradoura, prevenindo reinfecção. Entretanto, casos de toxoplasmose congênita em mulheres imunocompetentes em fase crônica de infecção indicam a possibilidade de reinfecção em humanos. Em modelos experimentais, reinfecção por *T.gondii* já foi descrita em casos de infecção por cepa de genótipo distinto ao da infecção primária e por cepas recombinantes, porém os estudos envolvendo genótipos clonais, em modelo murino, restringem-se à utilização de cepas do genótipo II na infecção primária, com desafio subsequente por cepas do mesmo genótipo, ou dos genótipos I e III, com ausência de informações sobre as cepas do tipo III, que correspondem ao genótipo de maior frequência e distribuição mundial. Procuramos explorar vários modelos de infecção sequencial com cepas clonais dos tipos I, II e III, buscando dados mais consistentes para compreensão dos seguintes questionamentos: (i) A infecção primária por um genótipo de *T.gondii* é capaz de proteger o hospedeiro da reinfecção por genótipo distinto? (ii) A imunidade induzida pela infecção primária pode prevenir a progressão da infecção causada pela cepa secundária, impedindo doença aguda e mortalidade dos animais? (iii) A imunidade da infecção primária previne a colonização do cérebro por cistos teciduais da cepa secundária? Nossos dados mostram que a imunidade induzida pela infecção primária por cepas clonais de *T.gondii* não protege o hospedeiro da reinfecção por cepa de genótipo distinto, já que foram detectados anticorpos contra as cepas das infecções primária e secundária em todos os modelos propostos. Somente a imunidade induzida pela infecção primária por cepa do tipo III foi capaz de prevenir a progressão da infecção secundária causada pelas cepas do tipo I e do tipo II, impedindo a mortalidade e colonização do cérebro dos animais por cistos teciduais da cepa secundária. Esses achados são extremamente importantes para auxiliar estudos vacinais e terapêuticos da toxoplasmose.

Descritores: Toxoplasmose. *Toxoplasma gondii*. Infecção experimental animal. Técnicas imunoenzimáticas. Técnicas de genotipagem. Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Santos TCC. Experimental reinfection of Balb / c mice by genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

Toxoplasma gondii infection in immunocompetent hosts results in the development of specific antibodies and cellular immune responses that often induce protective and lifelong immunity, preventing reinfection. However, cases of congenital toxoplasmosis in immunocompetent women at a chronic phase of infection indicate the possibility of reinfection in humans. In experimental models, reinfection by *T.gondii* has been described in cases of infection by genotype distinct from that of primary infection and by recombinant strains, but studies involving clonal genotypes in the murine model are restricted to the use of type II genotype in primary infection, with subsequent challenge by strains of the same genotype, or genotypes I and III, without information about type III strains, which correspond to the genotype with the highest frequency and worldwide distribution. We explore several models of sequential infection with clonal strains of types I, II and III, looking for more consistent data to understand the following questions: (i) Primary infection by a *T.gondii* genotype is able to protect the host from reinfection by different genotype? (ii) Does the immunity induced by the primary infection prevent the progression of infection caused by the secondary strain, preventing acute disease and animal mortality? (iii) Does the immunity of primary infection prevent colonization of the brain by tissue cysts of the secondary strain? Our data show that the immunity induced by primary infection by *T.gondii* clonal strains does not protect the host from reinfection by a distinct genotype strain, since antibodies against the strains of primary and secondary infections were detected in all proposed models. Only the immunity induced by the primary infection by type III strain was able to prevent the progression of the secondary infection caused by type I and type II strains, preventing the mortality and colonization of the brains of the animals by tissue cysts of the secondary strain. These findings are extremely important to support vaccine and therapeutic studies of toxoplasmosis.

Descriptors: Toxoplasmosis. *Toxoplasma gondii*. Experimental infection of animal. Immunoenzymatic techniques. Genotyping techniques. Polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do taquizoito de <i>T. gondii</i> . Fonte: Esquema adaptado de Ajioka ⁽¹⁾	14
Figura 2	Ciclo de vida do <i>T. gondii</i> . Imagem modificada a partir de Robert Gangnax e Dardé ⁽²⁾	16
Figura 3	Ciclo de transmissão do <i>T. gondii</i> . Imagem modificada a partir de Robert-Gangnax e Dardé ⁽²⁾	17
Figura 4	Resultados do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em modelos de infecção experimental pelas cepas ME49 e VEG. A: ELISA com antígeno proteico solúvel de <i>T.gondii</i> . B: ELISA com peptídeos sintéticos para detecção de anticorpos específicos para cepa ME49. C: ELISA com peptídeos sintéticos para detecção de anticorpos específicos para cepa VEG. *** $p<0,0001$ e ** $p<0,001$	84
Figura 5	Determinação da carga parasitária por PCR em tempo real em amostras de tecido cerebral provenientes de modelos experimentais de infecção por cepas geneticamente distintas de <i>T.gondii</i> . *** $p<0,0001$, ** $p<0,001$ e * $p<0,05$	86
Figura 6	Resultados do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i> em modelos de infecção sequencial por cepas geneticamente distintas de <i>T.gondii</i> . *** $p<0,0001$, ** $p<0,001$ e * $p<0,05$	88
Figura 7	Resultados da porcentagem de animais sobreviventes para os diferentes grupos experimentais. *** $p<0,0001$	90
Figura 8	Resultados do perfil dos fragmentos de restrição obtidos por <i>nested</i> PCR - RFLP para os marcadores SAG3 (A); L358 (B) e PK1 (C).....	92
Figura 9	Resultados do perfil dos fragmentos de restrição obtidos por <i>nested</i> PCR - RFLP para os marcadores GRA6 (A); C29 (B) e C22 (C).....	93
Figura 10	Resultados do perfil dos fragmentos de restrição obtidos por <i>nested</i> PCR - RFLP para os marcadores APICO (A); BTUB (B) e Novo SAG2 (C).....	94
Figura 11	Resultados do perfil dos fragmentos de restrição obtidos por <i>nested</i> PCR - RFLP para os marcadores 3'SAG2 (A); 5' SAG2 (B) e SAG1 (C).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Delineamento experimental.....	71
----------	--------------------------------	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Relação dos marcadores moleculares e enzimas de restrição do PCR e <i>nested</i> - PCR (3-5).....	74
Quadro 2	Ciclos empregados nas reações de PCR e <i>nested</i> - PCR (4-6)...	75
Quadro 3	Marcadores genéticos e parâmetros das reações de RFLP.....	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Histórico.....	13
1.2	Taxonomia e ciclo de vida.....	13
1.3	Transmissão e aspectos epidemiológicos.....	17
1.4	Resposta Imunológica e Formas Clínicas.....	20
1.5	Diagnóstico Laboratorial.....	23
1.5.1	Genotipagem de <i>T. gondii</i> por Polimorfismo dos Comprimentos de Fragmentos de Restrição (RFLP).....	26
1.5.2	Sorotipagem de <i>T. gondii</i>	27
1.6	Epidemiologia Molecular e Estrutura Populacional de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
1.6.1	Diversidade genética e estrutura populacional de <i>T. gondii</i>	30
1.6.2	Padrões geográficos da diversidade genética de <i>T. gondii</i>	36
1.6.3	Genótipo de <i>Toxoplasma</i> e características biológicas.....	45
1.6.4	Genótipo de <i>T. gondii</i> e doença humana.....	47
1.6.4.1	Toxoplasmose Congênita.....	48
1.6.4.2	Toxoplasmose ocular.....	50
1.6.4.3	Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos.....	54
1.7	Prevenção e Tratamento.....	55
2	JUSTIFICATIVA.....	58
3	OBJETIVOS.....	68
3.1	Geral.....	68
3.2	Específicos.....	68
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	69

4.1	Animais.....	69
4.2	Parasitas.....	69
4.2.1	Cepa RH.....	69
4.2.2	Cepas ME 49 e VEG.....	70
4.3	Preparação e quantificação de inóculos.....	70
4.4	Delineamento experimental.....	71
4.5	Extração e purificação do DNA para PCR.....	72
4.6	Determinação do limite de detecção da PCR em tempo real (qPCR)	72
4.7	Quantificação por PCR em tempo real da carga parasitária em tecido cerebral.....	73
4.8	Caracterização genotípica das cepas presentes no tecido cerebral de camundongos BALB/c após infecção sequencial com diferentes linhagens de <i>T.gondii</i>	73
4.8.1	Caracterização por <i>nested</i> PCR RFLP.....	73
4.9	Avaliação da resposta imune humoral por ELISA.....	77
4.9.1	Preparação e quantificação do antígeno proteico solúvel de <i>T.gondii</i> (antígeno salino).....	77
4.9.2	Peptídeos sintéticos cepa-específicos.....	78
4.9.3	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	78
4.9.3.1	Detecção de anticorpos IgG totais anti - <i>T.gondii</i>	78
4.9.3.2	Detecção de anticorpos IgG cepa - específicos.....	79
4.10	Análise estatística.....	80
5	RESULTADOS.....	82
6	DISCUSSÃO.....	96
7	CONCLUSÃO.....	106
7.1	Geral.....	106
7.2	Específicas.....	106

REFERÊNCIAS.....	107
ANEXOS.....	128

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Nicolle e Manceaux ¹ identificaram, em 1908, no Instituto Pasteur da Tunísia, o protozoário no roedor *Ctenodactylus gundi*, que foi denominado de *Toxoplasma gondii*. No mesmo ano, no Brasil, Splendore identificou *T. gondii* em coelhos ².

A partir de 1923, começaram a ser descritos inúmeros casos de toxoplasmose em humanos. Janku em 1923 observou cistos de *T. gondii* na retina de uma criança de aproximadamente 1 ano que apresentava hidrocefalia e cegueira ³. Wolf e Cowen ⁴ descreveram a infecção congênita. Um ano depois, Pinkerton e Weinman ³ relataram a primeira infecção adquirida, em um paciente que faleceu com toxoplasmose disseminada.

Sabin ⁵ demonstrou que o parasita isolado em animais era idêntico ao *T. gondii* de origem humana, concluindo-se, assim, que se tratava de uma única espécie infectando diferentes animais.

Hutchison ⁶ estabeleceu o papel do gato no ciclo evolutivo do parasita, mostrando que os mesmos podiam eliminá-lo pelas fezes. Frenkel *et al.* ⁷ mostrou que o protozoário é um coccídio e que seu hospedeiro definitivo é o gato, o qual apresenta o ciclo enteroepitelial, sendo que os demais hospedeiros (hospedeiros intermediários) apresentam apenas o ciclo extra – intestinal.

1.2 Taxonomia e ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eimeriorina, Família Toxoplasmatidae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie

*gondii*⁸. O termo *Toxoplasma* é derivado da sua forma de lua crescente (do grego, *toxon* = arco, *plasma* = forma)⁹.

A estrutura do parasita é caracterizada pela presença do complexo apical composto pelo anel polar, roptrias, conóide e micronemas. Estas estruturas são responsáveis pela invasão e formação do vacúolo parasitóforo na célula hospedeira⁸.

Figura 1 – Estrutura do Taquizoito de *T. gondii*. Fonte: Esquema adaptado de Ajioka¹⁰

O ciclo de vida do *T. gondii* envolve múltiplos hospedeiros e compreende uma fase assexuada, que pode ocorrer tanto nos tecidos dos felinos como de outros hospedeiros, denominados hospedeiros intermediários, como aves e mamíferos, incluindo o homem, e uma fase sexuada, que ocorre exclusivamente no tecido enteroepitelial de felinos¹¹.

T. gondii apresenta três formas infectantes representadas pelos taquizoítos, bradizoítos (em cistos teciduais) e os esporozoítos (em oocistos)¹².

O taquizoíto tem forma de lua crescente, sendo sua extremidade posterior arredondada e a extremidade anterior afilada. Possui complexo apical com diversas organelas que auxiliam na penetração da célula do hospedeiro. Após a penetração do taquizoíto na célula hospedeira, forma-se um vacúolo parasitóforo, que protege o parasita do sistema de defesa do hospedeiro. Neste local, o parasita sofre diversas divisões assexuadas por endodiogenia, resultando no rompimento da célula hospedeira (pseudocisto) e liberação de taquizoítos que invadirão novas células ¹³.

Após algumas divisões, *T. gondii* forma cistos, nos quais se encontram os bradizoítos, que se diferem dos taquizoítos, sobretudo, por apresentarem maior resistência à destruição por enzimas proteolíticas. Os cistos podem se desenvolver em órgãos como pulmões, fígado e rins, mas são frequentemente encontrados em músculos esqueléticos e cardíacos, tecido neural, incluindo o cérebro e os olhos. Apesar de estarem presentes em diversos órgãos, os cistos, geralmente, não causam complicações ao hospedeiro ¹³.

Quando os felinos ingerem o cisto tecidual, o mesmo é digerido por enzimas proteolíticas no estômago e intestino delgado, liberando os bradizoítos que penetram as células epiteliais do intestino, iniciando vários ciclos assexuados e sexuados do parasita ¹⁴.

O ciclo enteroepitelial é responsável pela formação de esquizontes ou merontes pelo processo de esquizogonia. Assim, quando se forma um grupo de merozoítos dentro do vacúolo parasitóforo da célula, este é chamado meronte ou esquizonte maduro. A célula se rompe liberando os merozoítos que penetram em novas células epiteliais, transformando-se em gametócitos masculinos e femininos. O macrogameta fica alojado dentro da célula epitelial, e os microgametas móveis migram para fecundar o macrogameta, formando assim o zigoto. Este dará origem aos oocistos imaturos que são

liberados para a luz intestinal pela ruptura das células epiteliais¹³. No meio ambiente, o oocisto imaturo, dentro de 1 a 5 dias, dependendo das condições climáticas, sofre esporogonia, tornando-se infectante. Esta estrutura possui dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada¹³.

O gato pode eliminar oocistos ingerindo qualquer uma das três formas infectantes do *T. gondii*¹⁴⁻¹⁷. Após a infecção inicial, o tempo médio para liberação de oocistos no meio ambiente varia de acordo com a forma infectante, sendo que após a ingestão de cistos teciduais a eliminação de oocistos ocorre entre 3 a 10 dias, já para ingestão de taquizoítos ou oocistos a excreção ocorre após 19 dias ou mais¹⁴⁻¹⁷.

Figura 2 - Ciclo de vida do *T. gondii*. Imagem modificada a partir de Robert Gangnax e Dardé¹⁸.

1.3 Transmissão e aspectos epidemiológicos

A infecção por *T. gondii* pode ser congênita ou adquirida após o nascimento. A infecção congênita ocorre quando a mulher se infecta durante a gravidez e o feto é infectado por via transplacentária, já que os taquizoítos livres no líquido amniótico podem atingir o feto. A infecção pós-natal pode ser adquirida pela ingestão de cistos teciduais presentes na carne crua ou mal cozida, ou pela ingestão de oocistos presente no solo, alimentos crus, como frutas e verduras mal higienizadas, e na água⁹. Outras formas menos frequentes de infecção são transfusão sanguínea, transplante de órgãos e os acidentes laboratoriais¹⁹.

Figura 3 - Ciclo de transmissão do *T. gondii*. Imagem modificada a partir de Robert-Gangnux e Dardé¹⁸

As maiores taxas de infecção por *T. gondii* ocorrem em áreas tropicais devido a condições favoráveis de temperatura e umidade, que permitem a maturação e sobrevivência dos oocistos no solo. Outro fator importante é a presença de várias espécies de felinos (hospedeiros definitivos) nessas áreas, o que favorece a contaminação do ambiente por oocistos e, conseqüentemente, um risco maior de infecção humana por *T. gondii*²⁰.

Cerca de um terço da população mundial humana já foi infectado pelo *T. gondii*, sendo que as taxas de infecção podem variar de 15% a 85% na população adulta. Cabe ressaltar que, a prevalência da infecção por *T. gondii* varia de acordo com o nível sócio econômico, hábitos culturais e idade da população, além disso, pode sofrer influência, também, de fatores ambientais e climáticos^{21,22}

Alguns trabalhos mostram que a toxoplasmose afeta cerca de dois bilhões de pessoas no mundo e apresenta, na maioria dos casos, evolução benigna e assintomática em 80 a 90% dos pacientes imunocompetentes^{22,23}.

As taxas de infecção humana são elevadas em vários países latino-americanos (51-72%), no oeste africano (54%-77%) e na França (85%), porém na Ásia, China e Coréia foram relatadas prevalências baixas em mulheres em idade fértil (4-39%). Em zonas de clima frio, como os países escandinavos as taxas de infecção na população também são mais baixas (11-28%)¹⁸⁻²².

Como mencionado anteriormente, a prevalência da infecção por *T. gondii* pode variar de acordo com hábitos culturais. Assim, nos EUA, a grande parte das infecções nos seres humanos é resultado da ingestão de cistos contidos em carne mal cozida. Na

França, o hábito da ingestão de carne crua ou mal cozida é responsável pela alta taxa de infecção humana, com 84% das gestantes apresentando anticorpos contra *T. gondii*⁸.

A toxoplasmose é uma importante zoonose de distribuição mundial. Um estudo epidemiológico realizado na Inglaterra entre 2008 e 2012 relatou 1109 casos clínicos de indivíduos imunocompetentes com infecção por *T. gondii*¹⁰.

No Brasil, existe uma alta taxa de infecção por *T. gondii* em seres humanos, com relatos de 50% em crianças do ensino fundamental e 50-80% em mulheres em idade fértil²⁴.

A carne é uma das principais causas de infecção pelo *T. gondii* em humanos. Na Europa, três grandes estudos apontam a carne crua como o fator de risco mais importante para mulheres grávida²⁴⁻²⁷.

Cook²⁶ estimaram que o consumo de carne mal cozida foi a causa de infecção em 30-60% das gestantes com toxoplasmose aguda. Na Coreia, EUA, França, Guiana Francesa e Nova Zelândia, pequenos surtos de toxoplasmose têm sido associados com o consumo de carne²⁸⁻³¹. Nos EUA, a toxoplasmose é a segunda infecção de origem alimentar mais importante para os seres humanos, após salmonelose³².

Por outro lado, o oocisto, também, tem sido associado como fonte de infecção em diversos surtos de doença humana, já que pode contaminar o solo, a água e alimentos crus³³. Os gatos domésticos são os principais responsáveis pela contaminação ambiental por oocistos, já que liberam milhões de parasitas por grama de fezes após ingestão de carne contendo cisto tecidual de *T.gondii*³⁴.

O maior surto de toxoplasmose humana ocorreu no Brasil, no município de Santa Isabel do Ivaí, Paraná, devido à disseminação de oocistos de *T. gondii* em uma estação de tratamento de água³⁵. A condição de alguns vegetarianos restritos serem infectados por *T. gondii*, também, reforça o papel dos oocistos como fonte de infecção para a população humana^{36,37}. Da mesma forma, alguns estudos com mamíferos aquáticos demonstraram que estes animais são frequentemente infectados por *T. gondii*, indicando que a água contaminada por oocistos é uma importante fonte de infecção para estes hospedeiros^{38,39}.

Uma questão interessante, neste contexto, é se há influência da forma infectante de *T. gondii* nas características clínicas e epidemiológicas da doença humana. Recentemente, uma revisão sistemática, incluindo 38 artigos, selecionados a partir de 437 relatos de surtos da doença, demonstrou que o número de casos confirmados nos surtos é maior quando a transmissão ocorre por oocistos. Em relação aos achados clínicos, a infecção por cistos parece induzir um período de incubação menor ($11,4 \pm 6,7$ dias), com distribuição temporal nítida de casos, já nos surtos transmitidos por oocistos na água, o período de incubação é mais prolongado (20 ± 7 dias, $p < 0.001$). Não houve relação da forma infectante de *T. gondii* com a distribuição geográfica dos surtos e outras características como gênero e faixa etária dos indivíduos infectados. Essas informações podem ser úteis no desenvolvimento e implantação de estratégias de controle³³.

1.4 Resposta Imunológica e Formas Clínicas

A maior parte dos casos de infecção por *T. gondii* ocorre por via oral, tanto pela ingestão de oocistos presentes em alimentos ou água contaminada, como pela ingestão de cistos presentes em carne crua. Uma vez ingerido com o alimento, o parasita invade o

epitélio intestinal do hospedeiro, disseminando-se para outros tipos celulares, incluindo células dendríticas e macrófagos ⁴⁰.

No início da infecção, os taquizoítos se multiplicam no interior dos macrófagos. Essas células produzem interleucinas (IL12) que ativam as células Natural Killer (NK) e células T, que por sua vez, passam a produzir interferon- γ (IFN γ). O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF α) e o IFN γ agem ao mesmo tempo para inativação dos taquizoítos pelos macrófagos, que produzem uma grande quantidade de óxido nítrico (NO), responsável pela destruição do parasita ⁴¹⁻⁴³.

Contudo, a atividade de *T. gondii* depende da resposta imune do hospedeiro. No início da infecção, ocorre o processo de reconhecimento do antígeno e ativação do sistema imune. Nesta fase, a resposta imune do hospedeiro inibe a replicação de *T. gondii*, mas não é capaz de destruí-lo e o protozoário assume a forma de cistos latentes em tecidos do hospedeiro ⁴⁴.

A resposta imune humoral contra *T. gondii*, proporciona a produção de diversas classes de imunoglobulinas (IgA, IgE, IgM e IgG), sendo esses anticorpos essenciais no diagnóstico da doença. Os anticorpos IgA são os primeiros a serem produzidos, sendo encontrados na mucosa e soro. A IgM também é produzida no início da infecção, caracterizando a fase aguda da doença. A IgG pode ser detectada de 8 a 12 dias após a infecção, sendo a única imunoglobulina capaz de atravessar a barreira placentária ⁴².

A maioria dos casos de infecção pelo *T. gondii* em seres humanos imunocompetentes é assintomática, benigna e autolimitada. Em casos raros pode se observar alguns sintomas como a linfadenopatia, pneumonite, meningoencefalite, coriorretinite, miocardite e hepatite ^{9,12,45}.

A infecção congênita ocorre quando a mãe se infecta, pela primeira vez, durante a gestação e o parasita acomete o feto pela via transplacentária. Como o feto, ainda, não apresenta sistema imunológico eficaz e a resposta imune da mãe não consegue atravessar de forma eficiente a barreira placentária, a infecção progride sem controle ^{12,46}.

A transmissão transplacentária de *T. gondii* pode levar a graves anormalidades neurológicas ou lesões oculares graves. As principais manifestações da toxoplasmose congênita são hidrocefalia, retinocoroidite, calcificações intracranianas e retardamento mental ¹². Além disso, alguns estudos revelam que a associação entre transtornos esquizofrênicos tenha ligação à exposição materna a *T. gondii* ^{47,48}.

A toxoplasmose em pacientes imunodeficientes possui como principal característica clínica a encefalite que ocorre, geralmente, pela reativação de cistos latentes, entretanto, a reinfeção por cepas geneticamente distintas não pode ser descartada ⁴⁹⁻⁵¹.

As principais lesões por *T. gondii* em pacientes imunodeficientes são decorrentes da necrose do tecido cerebral, principalmente do tálamo ⁵². Os sintomas mais comuns, nestes casos, são dor de cabeça, disfunções motoras e febre, que se não tratados, podem evoluir para convulsões e coma ⁴⁹⁻⁵¹. Pneumonia disseminada, doença sistêmica ou retinocoroidite também são manifestações importantes que podem ser encontrados em alguns casos ⁵³⁻⁵⁵.

Dentre os pacientes sintomáticos infectados por *T. gondii*, 2 a 3% desenvolvem um quadro de retinocoroidite ^{56,57}. A doença ocular pode ocorrer em infecção adquirida após nascimento, ou como parte das manifestações da doença congênita ⁵⁸. As lesões oculares podem ser precoces ou tardias, podendo ocorrer até anos depois da infecção sistêmica ^{59,60}.

A toxoplasmose ocular é consequência do tropismo de *T. gondii* pela retina. A lesão pode ser bilateral em 60-80% dos casos, levando a alterações oculares com diferentes graus de degeneração, como estrabismo, microftalmia, nistagmo, neurite óptica, edema de retina e lesões vasculares da coróide ⁶¹⁻⁶⁴. O processo inflamatório agudo na infecção ocular dura aproximadamente seis semanas e após esse período, a lesão começa a regredir com desaparecimento da pigmentação e formação de uma cicatriz ocular ⁶⁵.

No Reino Unido, 50% das crianças com retinocoroidite adquirem a infecção após o nascimento ⁶⁶. No Brasil, casos de infecção por toxoplasmose com lesões oculares, também são por consequência da infecção aguda adquirida ⁶¹⁻⁶⁴.

No Brasil, a frequência da toxoplasmose ocular corresponde a 7% em São Paulo e Belo Horizonte, 12% no Espírito Santo (67) e 17,7% em Erechim no RS ^{61,68}.

1.5 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose pode ser realizado através de métodos parasitológicos, histológicos, sorológicos ou moleculares que são de vital importância para a detecção da infecção, já que os sinais clínicos não são específicos e suficientes para a caracterização do diagnóstico definitivo da doença ⁶⁹.

A técnica de Sabin-Feldman, conhecida como teste do corante, foi utilizada por muito tempo em inquéritos soropidemiológicos como padrão ouro para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose, porém a aplicação de parasitas vivos e o factível risco de infecção do executante fizeram com que este teste fosse substituído por técnicas mais seguras e de fácil aplicabilidade ^{23,70}.

Dentre os métodos laboratoriais citados, anteriormente, merece destaque os testes sorológicos, já que grande parte das infecções são subclínicas. A detecção de anticorpos contra *T. gondii* em doentes pode auxiliar no diagnóstico, já que existem diversos testes sorológicos disponíveis ⁶⁹. A presença dos anticorpos anti-*T. gondii* no curso da doença disponibiliza a análise de perfis sorológicos em qualquer momento da infecção, seja na fase aguda, ou crônica ⁷¹.

Convencionalmente, os estudos sorológicos se baseiam na detecção de imunoglobulinas específicas como IgM e IgG, sendo IgM marcador de fase aguda e IgG de fase crônica, quando associada à IgG de alta avidéz ⁷²⁻⁷⁵. Anticorpos IgG surgem de 1 a 2 semanas após a infecção e apresentam altos níveis cerca de 1 ou 2 meses e, em seguida, caem variavelmente, podendo persistir por toda vida do hospedeiro ¹².

Os métodos sorológicos podem ser imunoenzimáticos, aglutinantes ou fluorimétricos. A reação de hemaglutinação baseia-se na formação de agregados visíveis como consequência da interação entre anticorpos específicos e a membrana dos eritrócitos sensibilizados com antígenos de *T. gondii*, sendo considerado um ensaio sensível e específico de fácil execução e baixo custo. Outras reações com o mesmo princípio têm sido propostas, com o emprego de parasitas tratados com formaldeído, cetona e partículas de látex ⁷⁶. A técnica de Aglutinação Direta Modificada (MAT) é amplamente utilizada em muitas espécies de animais para evidenciar aglutininas anti- *T. gondii*, através da interação entre anticorpos presentes no soro e taquizoitos inativados pela formalina, mostrando-se muito sensível, específica e de fácil realização. Dentre os testes de aglutinação, a reação de hemaglutinação indireta (HAI) tem sido amplamente aplicada. Esta técnica utiliza hemácias de aves recobertas com antígenos íntegros do parasita que são aglutinados por

anticorpos IgM e IgG, assegurando uma alta sensibilidade. É um teste prático de baixo custo, não exigindo equipamentos sofisticados para sua execução ⁷⁷.

A Imunofluorescência Indireta (IFI) baseia-se na capacidade de ligação do anticorpo a fluorocromos. A técnica utiliza taquizoítos íntegros e formolizados como antígeno, sendo que o anticorpo marcado deve ser purificado para aumentar a eficiência da coloração e evitar reações inespecíficas. A IFI é frequentemente utilizada para a detecção de IgM e IgG, porém a sensibilidade do teste é limitada ao nível de fluorescência detectável pelo olho humano ⁷⁸⁻⁷⁹. Apresenta a vantagem de utilizar *Toxoplasma gondii* preservado e fixado na lâmina de microscopia, sendo prático e seguro para uso em rotina laboratorial ⁸⁰.

Atualmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA) representa o principal método de detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, já que apresenta alta sensibilidade e permite automação com custo reduzido. Trata-se de um método quantitativo, no qual a reação Ag-Ac é monitorada pela medida da atividade enzimática. Essa técnica é utilizada, sobretudo para detecção de anticorpos IgM e IgG, porém é possível a ocorrência de resultados falsos-positivos para IgM, em portadores de fator reumatóide ⁸¹.

Em 1981, Desmonts e colaboradores desenvolveram o teste de ELISA para captura de IgM ou ELISA duplo sanduíche (DS-ELISA), que permite a detecção de IgM específica para *T. gondii* nos pacientes com toxoplasmose recém adquirida ⁸¹⁻⁸³.

Os testes moleculares para pesquisa de DNA de *T. gondii* são de grande utilidade no diagnóstico da toxoplasmose, principalmente em pacientes imunodeficientes, já que nestes indivíduos os títulos de anticorpos podem estar baixos ou ausentes. Dentre os testes moleculares empregados no diagnóstico da toxoplasmose, destaca-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR) que apresenta alta sensibilidade e especificidade, permitindo

a detecção de DNA de *T.gondii* em diversos materiais biológicos como soro, lavado bronco-pulmonar, líquido amniótico, urina e tecido ^{76, 84-88}.

Atualmente, a PCR tem sido utilizada para diagnóstico da toxoplasmose congênita no período pré-natal, possibilitando a detecção do agente em amostras de líquido amniótico e/ou sangue fetal ⁸⁹. Essa metodologia também pode ser utilizada em pacientes com gamaglobulinopatias, nos quais os títulos de anticorpos para *T. gondii* são muito altos, mas os indivíduos não apresentam as características clínicas clássicas. Além disso, a PCR pode ser empregada no diagnóstico da doença ocular ^{76, 85-88}. O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose ocular pode ser feito por PCR para detecção do parasita no humor aquoso, ou pela pesquisa de anticorpos específicos no soro ⁹⁰.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido frequentemente utilizada para diagnóstico da toxoplasmose, substituindo a PCR convencional, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, além de permitir a quantificação de parasitas ⁹¹⁻⁹³. Atualmente, a qPCR se tornou uma ferramenta poderosa no diagnóstico de toxoplasmose em pacientes imunodeficientes, gestantes, fetos ou recém-nascidos, pois além de diagnosticar a infecção, permite a quantificação de *T.gondii*, sendo útil para monitoramento da terapia anti - *T. gondii* ⁹¹⁻⁹³.

1.5.1 Genotipagem de *T. gondii* por Polimorfismo dos Comprimentos de Fragmentos de Restrição (RFLP)

Atualmente, existem diversas técnicas moleculares que são utilizadas no estudo da diversidade genética de *T. gondii*. Dentre estas técnicas, destaca-se o polimorfismo dos comprimentos de fragmento de restrição (RFLP), que consiste no resultado da quebra do DNA por enzimas de restrição. Este método baseia-se no fato de que cada enzima de

restrição reconhece uma sequência específica de quatro a oito bases. Assim, a análise de diferentes moléculas de DNA de organismos relacionados, como as linhagens de *T. gondii* com a mesma enzima de restrição, resulta em tamanhos de comprimentos diferentes, já que existem diferenças nos sítios de restrição de cada linhagem quando separados por eletroforese, resultando em bandas de diferentes pesos moleculares. A análise do perfil das bandas possibilita a determinação do genótipo da cepa de *T. gondii*⁹⁴.

A metodologia de RFLP também vem sendo utilizada para diversos estudos moleculares de diferentes protozoários como *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Naegleria* e *Acanthamoeba* e alguns helmintos como *Schistosoma* e *Taenia*⁹⁴.

A técnica de RFLP é utilizada em conjunto com o PCR, *Nested* PCR (*n*PCR), que é a amplificação do DNA por dois iniciadores. O primeiro par amplifica o DNA como um PCR convencional, já segundo par de iniciadores, amplifica o produto do primeiro PCR, produzindo um segundo produto de PCR, que será menor do que a primeiro, garantindo uma maior especificidade e sensibilidade ao método. Outra técnica que pode ser usada com o RFLP é o PCR multiplex, que consiste em uma reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas sequências-alvo numa mesma amostra^{95,96}.

1.5.2 Sorotipagem de *T. gondii*

Os métodos de caracterização genética de *T. gondii* sem dúvida trouxeram informações importantes que vêm auxiliando o entendimento da biologia, ecologia, epidemiologia e clínica da toxoplasmose. Contudo, a necessidade do isolamento do parasita em animais ou cultivo celular, bem como as dificuldades na obtenção de amostras de casos clínicos, vem despertando o interesse por abordagens mais simples e de fácil execução para o estudo da diversidade do parasito.

Neste contexto, uma metodologia alternativa aos estudos moleculares seria a sorotipagem que consiste em um teste sorológico com peptídeos sintéticos derivados de sítios polimórficos dos genes que codificam os antígenos de *T. gondii*, incluindo GRA6 e GRA7⁹⁷. A sorotipagem é um método de tipagem simples que consiste em um ensaio imunoenzimático (ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA) utilizando péptidos polimórficos sintéticos derivados de antígenos de *T. gondii*. Esta abordagem permite a detecção de anticorpos específicos contra cepas de *T. gondii* presentes em uma pequena quantidade da amostra, além de ser um método sensível⁹⁸⁻¹⁰⁰. A detecção de anticorpos contra estes peptídeos permite a identificação do parasita sem necessidade de isolamento de cepas ou extração de DNA.

Os peptídeos sintéticos são produzidos pelo método de fase-sólida com um sintetizador automático de peptídeos e a pureza é avaliada por espectroscopia de massa. Um resíduo de cisteína é adicionado na região C ou N terminal de cada peptídeo para facilitar o acoplamento à proteína carreadora⁹⁷.

Esta metodologia foi proposta, inicialmente, por Kong *et al.*⁹⁷ que desenvolveram um ensaio de imunoabsorção para detecção de anticorpos contra peptídeos polimórficos derivados dos antígenos SAG2A, GRA3, GRA6 e GRA7 de *T.gondii*. Estudo piloto com camundongos infectados estabeleceu a validade da abordagem, que foi testada, em seguida, com soro humano. Dos 8 pacientes que possuíam títulos > 64 pela reação de Sabin - Feldman e para os quais o tipo da cepa infectante era conhecido, os peptídeos distinguiram corretamente o tipo II de infecções não tipo II. A análise da reação de ELISA de um segundo grupo de 10 gestantes infectadas, das quais a cepa do parasita não tinha sido isolada, mostrou clara previsão do tipo de cepa envolvida na infecção, validando a metodologia.

Estudos posteriores, conduzidos por Sousa *et al.*,⁹⁹, desenvolveram um novo ELISA baseado em peptídeos polimórficos de GRA6, utilizando amostras de soro humano provenientes de 41 infecções por cepas clonais (tipo I, II ou III) e 18 infecções por cepas não clonais. Para as infecções causadas por cepas clonais, houve uma clara correlação entre o genótipo dos microsátélites e a sorotipagem por GRA6, porém as infecções por cepas não clonais foram classificadas erroneamente. Os peptídeos C-terminais GRA6, destas cepas, foram analisados e um segundo grupo de 455 pacientes com toxoplasmose aguda e crônica devido a genótipos desconhecidos de diferentes países europeus, africanos e latino-americanos foram incluídos no estudo e o tipo da cepa infectante foi promissora, embora existam limitações para cepas africanas e sul-americanas devido ao maior polimorfismo de peptídeos, sugerindo que peptídeos de diferentes marcadores sejam incluídos no ensaio para melhor discriminação destas cepa.

Visando a construção de novos peptídeos para sorotipagem de cepas não clonais, Sousa *et al.*⁹⁸ avaliaram regiões codificantes de GRA6 e GRA7 de 49 cepas não clonais que foram sequenciadas e comparadas com as sequências de cepas de referência dos tipos I, II e III. Dezoito sequências de aminoácidos diferentes foram encontradas para GRA6 e dez para GRA7. Dois peptídeos específicos para linhagens clonais I e III (peptídeos GRA7I e GRA7III, respectivamente) foram selecionados a partir do *locus* GRA7 e três peptídeos específicos para algumas cepas atípicas (peptídeos Am6, Af6 e Am7) foram selecionados a partir dos *locus* GRA6 e GRA7. Amostras de soro de indivíduos infectados com cepas de *Toxoplasma* de genótipos conhecidos foram sorotipadas com os peptídeos selecionados, mostrando que o peptídeo GRA7III é um bom marcador para sorotipagem de infecções causadas por cepas de tipo III, já o peptídeo GRA7I teve uma sensibilidade inferior e os peptídeos Am6 e Af6 apresentaram baixa especificidade,

reagindo com amostras de soro de pacientes infectados com cepas clonais. O peptídeo Am7, embora específico, apresentou baixa sensibilidade.

Uma vez estabelecida as melhores sequências para síntese de peptídeos sintéticos cepa - específicos para sorotipagem de amostras humanas, Sousa *et al.*¹⁰⁰ avaliaram a aplicabilidade destes peptídeos em amostras provenientes de animais produtores de carne naturalmente infectados por *T.gondii*. Foi utilizado um teste ELISA baseado em peptídeos polimórficos da região C - terminal de GRA6 e GRA7. O peptídeo GRA6II possui polimorfismos específicos para cepas clonais tipo II, GRA6I / III para cepas tipo I e III, GRA7I para cepas do tipo I e GRA7III para cepas do tipo III. Como material de referência e para validação da sorotipagem, foram selecionadas amostras de soro de onze galinhas e quinze suínos utilizados em estudos de isolamento de cepas de *Toxoplasma*. Três amostras de soro de galinhas e duas de suínos tiveram os resultados de sorotipagem compatíveis com a genotipagem. Trinta e cinco amostras de soro de galinhas, vinte e nove de suínos e cinquenta de ovelhas, soropositivas para *T. gondii*, das quais nenhum isolado foi obtido, também foram sorotipadas. O sorotipo III foi significativamente mais freqüente entre as ovelhas e os resultados do estudo demonstraram que a sorotipagem também é uma ferramenta valiosa para tipagem de cepas de *Toxoplasma* de origem animal.

1.6 Epidemiologia Molecular e Estrutura Populacional de *T. gondii*

1.6.1 Diversidade genética e estrutura populacional

A diversidade genética e a estrutura populacional estão fortemente relacionadas com a intensidade da atividade de recombinação genética e seleção evolutiva de recombinantes. Reprodução sem recombinação genética leva a uma população clonal com genótipos idênticos em grandes áreas geográficas e em intervalos prolongados de tempo.

Se um pequeno nível de recombinação genética é acoplado à expansão clonal de alguns genótipos, uma estrutura populacional epidêmica é esperada. Nesse cenário, um número incomum de genótipos multilocus coexistem com a representação de alguns genótipos principais. Para *T.gondii*, os dados atuais existentes sugerem uma estrutura populacional clonal na Europa, África, Ásia e América do Norte, e uma estrutura epidêmica na América Central e do Sul ¹⁰¹⁻¹⁰³.

O artigo histórico no domínio da genotipagem das cepas de *Toxoplasma gondii* foi publicado em 1995 por Howe e Sibley, que relataram pela primeira vez a famosa classificação de *T. gondii* nos tipos I, II e III, propondo uma estrutura de população clonal na Europa e na América do Norte ¹⁰⁴. Embora, este modelo, ainda, seja evidenciado em grande parte do hemisfério norte, sabe-se, agora, que a estrutura populacional de *T.gondii* não está limitada a três linhagens clonais, mas sim a um modelo mais complexo com pelo menos 15 haplogrupos em todo o mundo ¹⁰¹.

Lehmann *et al.* ¹⁰⁵ estudaram 275 isolados mundiais, provenientes de frangos, usando cinco microssatélites, um minissatélite e marcadores SAG2 para RFLP, revelando quatro grandes populações de *T. gondii*. Uma população (relacionada ao tipo 2) foi encontrada em todos os continentes, exceto na América do Sul; uma população (relacionada ao tipo 3) foi encontrada mundialmente e duas populações estão largamente confinadas na América do Sul. Além disso, as populações do sul apresentaram maior diversidade, sugerindo que as populações da América do Sul e Eurásia evoluíram separadamente nas últimas centenas de anos, quando o comércio transatlântico transmigrou algumas linhagens que se expandiram rapidamente no norte. Conclui-se, ainda, que devido a maior diversidade genética observada na América do Sul, as populações de *T. gondii* foram originárias dessa região.

Ao analisarem a estrutura de 46 isolados de *T. gondii* por seqüenciamento de multilocus, Khan *et al.* ¹⁰⁶concluíram que as populações atuais de *T. gondii* são derivadas de recombinações genéticas de quatro linhagens ancestrais ¹⁰⁷. A primeira linhagem ancestral foi previamente denominada como linhagem α que cruzou com uma cepa ancestral tipo 2 (Tipo II₁ teórico) dando origem à cepa moderna tipo 1 ¹⁰⁸. Esta linhagem α ancestral é mais parecida com as cepas modernas GPHT, BOF, FOU e TgCatBr2, que são também conhecidas como tipo BrI ou África 1 ^{109,110}. A segunda linhagem ancestral (Tipo II₂ teórico) é mais estreitamente relacionada com as cepas modernas PTG, DEG e PIH, que também são conhecidas como linhagem tipo 2. A terceira linhagem ancestral foi previamente denominada como linhagem β que cruzou com uma cepa ancestral tipo 2 (Tipo II₃ teórico) dando origem à cepa moderna do tipo 3 ¹⁰⁸. Esta terceira linhagem ancestral está intimamente relacionada com as cepas modernas P89 e TgCatBr3, que também são conhecidas como tipo BrIII ¹¹⁰. A quarta linhagem ancestral se assemelha mais às cepas modernas MAS, TgCatBr18 e TgCatBr25, que são também conhecidas como tipo BrIV ¹¹⁰.

A análise de uma grande coleção de 956 isolados mundiais de *T. gondii* contribuiu significativamente para a compreensão sobre a estrutura populacional e diversidade genética global do parasita ¹⁰¹. Este estudo integrou informações geradas por três conjuntos independentes de marcadores de DNA polimórfico, amostrando 30 *loci* distribuídos em todos os 14 cromossomos nucleares, bem como o genoma do apicoplasto. Dos 956 isolados, foram identificados 138 genótipos distribuídos em 15 halogrupos que, por sua vez, foram reunidos em seis clados principais (A a F). Os tipos convencionais 1, 2 e 3 foram agrupados em clados A, D e C, respectivamente, indicando que a população global consiste de agrupamentos altamente abundantes, representados por genótipos

clonais, juntamente com grupos que podem ser derivados de cruzamentos genéticos. A distribuição de genótipos mostrou uma forte separação geográfica, com clonalidade de genótipos no hemisfério norte e genótipos altamente diversificados na América do Sul. A análise da estrutura populacional desses genótipos sugere que um pequeno número de linhagens ancestrais tenha dado origem à diversidade existente por um processo de recombinação limitada ¹⁰¹. Um dado interessante deste estudo é que dos 138 genótipos analisados, 107 foram originários da América Latina, indicando claramente que esta área apresenta grande diversidade de *T. gondii*. Howe e Sibley tinham 106 cepas, mas apenas cinco da América Latina estão disponíveis naquela época ^{104,111}. Como resultado, a amostra de cepas foi predominantemente da América do Norte (cerca de 2/3 das cepas) e da Europa (1/3 das cepas). Além disso, estas diferenças não se resumem apenas às cepas, os marcadores genéticos também são importantes para diversidade genética. Os 15 haplogrupos foram descritos graças a 11 marcadores para RFLP, 15 marcadores microssatélites e quatro marcadores para sequenciamento. Todos estes marcadores obviamente detectam muito mais polimorfismos do que os seis marcadores de RFLP usados por Howe e Sibley ¹⁰⁴. De fato, as cepas pertencentes a haplogrupos 4, 6, 7, 9 e 12 já estavam presentes no estudo de Howe e Sibley e os seis marcadores de RFLP utilizados na ocasião detectaram algum polimorfismo nestas cepas, mas não foram suficientes para quebrar a forte estrutura de três grupos da árvore filogenética.

Neste contexto, cabe ressaltar, ainda, que a análise da estrutura populacional genética de *T. gondii* deve considerar as oportunidades de transmissão do agente entre hospedeiros em diferentes ambientes. Assim, fatores importantes a serem considerados são a população de felídeos (densidade, diversidade, áreas de caça e ingestão dietética), a riqueza das espécies de presas e a possibilidade de circulação dessas espécies. As

variações na dinâmica de transmissão de *T. gondii* em ambientes urbano, rural e não - antropizado em locais de clima temperado e tropicais foram recentemente revisadas por Gilot-Fromont *et al.* ¹¹², mostraram que estas variações têm consequências importantes na estrutura populacional genética de *T. gondii*.

Em áreas domésticas, somente um número limitado de espécies hospedeiras como os gatos, alguns animais de produção, aves e mamíferos peridomiciliares estão envolvidos no ciclo domésticos de *T. gondii*. Entre os vários genótipos existentes de *T.gondii*, as três linhagens clonais parecem ser as mais bem sucedidas e adaptadas nesses hospedeiros domésticos ¹¹³. Estas linhagens teriam divergido cerca de 10.000 anos atrás coincidindo com a domesticação de animais de companhia e de produção. Na Europa, ou na América do Norte, a criação intensiva de uma variedade de animais domésticos produtores de carne, juntamente com a domesticação de gatos ofereceu um nicho para essas linhagens. Nas zonas rurais, que abrigam tanto gatos como pequenos hospedeiros intermediários (pequenos roedores e aves peridomiciliares), estes animais são considerados reservatórios de infecção, dos quais a transmissão de tipos clonais pode irradiar para o ambiente selvagem circundante ¹¹³, levando a um empobrecimento da diversidade genética na vida selvagem. Nesse contexto, cepas encontradas na fauna vizinha, geralmente são semelhantes às cepas encontradas nos animais domésticos ¹¹⁴⁻¹¹⁶. As atividades humanas levam a um empobrecimento da diversidade por limitarem a recombinação e assim o fluxo genético de *T. gondii*. Áreas tropicais remotas, como a floresta tropical, são habitats ricos em espécies que abrigam muitos mamíferos e aves. Isso poderia sustentar a maior diversidade de genótipos do parasita a fim de colonizar o máximo de ecossistemas ^{117,118}. O comportamento diferente dos felinos selvagens comparado com o dos gatos domésticos (maiores áreas de caça e ingestão alimentar) e o número de possíveis presas influenciam

os padrões de hibridização e fluxo de genes do parasita, e assim, a estrutura genética de suas populações. Hospedeiros definitivos são mais freqüentemente infectados por múltiplos genótipos de *T. gondii*, que então se cruzam e recombinaem antes da transmissão para um novo hospedeiro intermediário ¹¹². A possibilidade de reinfecção por diferentes cepas pode ser outra fonte de crescente diversidade ¹¹⁹. Todos estes fatores ecológicos conduzem à diversidade genética. Na floresta tropical da Guiana Francesa, um dos mais importantes “hotspots” de diversidade com pelo menos 183 espécies de mamíferos, incluindo oito das 39 espécies de felídeos selvagens conhecidos e 718 espécies de aves, cepas selvagens exibiram uma diversidade genética notavelmente maior do que as cepas do ambiente antropizado adjacente ¹¹⁸. Além disso, as cepas do ambiente antropizado foram agrupadas em algumas linhagens generalizadas, enquanto que a população de cepas selvagens não apresentou estrutura de agrupamento genético claro, ou qualquer desequilíbrio de ligação, apoiando a hipótese de uma diversidade genética importante neste ecossistema natural não alterado pela colonização humana.

Uma situação intermédia pode estar presente em países como os EUA, ou o Canadá, onde grandes territórios, ainda, não são antropizados. Uma diversidade genotípica de *T. gondii* está presente na natureza, coexistindo com linhagens clonais em áreas antropizadas ^{34, 120, 121}. Na confluência entre os dois ambientes, os animais selvagens podem penetrar em áreas antropizadas e os animais domésticos entrarem em contato com o ambiente selvagem por meio da caça, solo ou água corrente. As consequências desta interpenetração em termos de genótipos de *T. gondii* são diversas: (1) detecção de cepas de *T. gondii* com genótipos híbridos entre as populações selvagem e antropizada, refletindo trocas genéticas, (2) cepas de ambiente selvagem encontradas em animais domésticos, (3) ou o oposto, cepas de ambiente antropizado encontradas em animais selvagens. Isso foi

demonstrado no contexto da Guiana Francesa ¹¹⁸, mas também é possível detectar a influência de cepas selvagens na América do Norte pela presença de diversos genótipos em animais domésticos ^{34, 120}.

As atividades humanas, como a urbanização, fragmentação da paisagem, áreas desmatadas, agricultura, domesticação de gatos e outros animais, modificam a ecologia de *T. gondii* por agrupamento da população do parasita. Contudo, o transporte dessas cepas para grandes distâncias devido ao intercâmbio comercial humano e transporte de animais levou, ocasionalmente, à expansão de linhagens clonais. Este mecanismo foi sugerido como explicação para a grande distribuição de mesmas linhagens entre países ou continentes ^{105,118}.

1.6.2 Padrões geográficos da diversidade genética de *T. gondii*

Os dados mais recentes de genotipagem de *T.gondii* foram relatados em um artigo de revisão conduzido por Shwab et al. ¹⁰², que utilizaram 1457 amostras provenientes de todos os continentes, exceto da Antártica, compondo o quadro mais abrangente e coeso da estrutura populacional global de *T. gondii* já descrito na literatura. Essa extensa coleção de isolados foi analisada por PCR-RFLP com 10 marcadores distintos, revelando a existência de 189 genótipos diferentes de *T.gondii* no mundo. Os dados foram baseados nos resultados publicados até o final de 2012 e a grande maioria dos isolados foi obtida de animais domésticos e selvagens com infecção crônica, sendo que para estas amostras, a infecção por *T. gondii* foi determinada pela presença de anticorpos anti-*Toxoplasma* no soro, seguida de bioensaio de tecidos animais soropositivos (cérebro e / ou músculo) em camundongos ou gatos. Na ausência de uma nomenclatura padrão para os diferentes genótipos de *T.gondii*, dado que a designação convencional define apenas as linhagens

clonais como Tipo I, II e III e agrupa todas as demais como genótipos “atípicos” ou “exóticos”^{104,122,123}, os autores propuseram um esquema de nomenclatura em que cada isolado foi designado pelo genótipo obtido por PCR-RFLP da base de dados ToxoDB, seguido por um número diferencial específico.

A partir dos dados desta revisão é possível identificar que apenas alguns genótipos dominam no hemisfério norte, o que contrasta profundamente com o hemisfério sul, onde centenas de genótipos coexistem e nenhum deles é dominante, sugerindo uma estrutura de população clonal no norte e uma estrutura de população epidêmica no sul. Esses achados corroboram fortemente com a conclusão de um estudo realizado com uma amostragem menor de isolados^{103,124}. Os genótipos de PCR-RFLP # 1 (Clonal de Tipo II), # 2 (Tipo III), # 3 (Variante de Tipo II) e # 10 (Tipo I) são identificados globalmente. Os genótipos # 2 e # 3 dominam na África, os genótipos # 9 (chinês 1) e # 10 são prevalentes na Ásia, os genótipos # 1, # 2 e # 3 são prevalentes na Europa, os genótipos # 1, # 2, # 3, 4 e # 5 dominam na América do Norte (# 4 e # 5 são conhecidos coletivamente como Tipo 12). Na América Central e do Sul, não há dominância clara de qualquer genótipo, embora alguns tenham frequências relativamente mais altas. De acordo com a análise estatística realizada por Shwab *et al.*¹²⁴ há diferenças significativas entre as populações da África, Ásia, Europa, América do Norte e América Central e do Sul, com apenas a Europa e América do Norte exibindo similar diversidade. Coletivamente, os resultados revelam estruturas populacionais distintas e padrões geográficos de diversidade de *T. gondii*¹⁰².

Os 10 genótipos mais frequentemente identificados mundialmente são os genótipos # 2, # 3, # 1, # 5, # 4, # 9, # 6, # 7, # 8 e # 10, representando 13,8, 12,6, 12,2, 5,0, 4,5 3,8, 3,3, 2,6, 2,3 e 2,1% das amostras, respectivamente. Os genótipos # 1 e # 3, que diferem apenas no *locus* Apico, compõem a linhagem convencional Tipo II e representam 24,6%

(362/1457) da população. O genótipo # 1 é referido como de Tipo II clonal, enquanto que o # 3 como Tipo II variante. Conforme observado, o genótipo # 2, também conhecido como Tipo III, respondeu por 13,8% (201/1457) das amostras. Os genótipos # 4 e # 5, que diferem apenas no *locus* SAG1 são coletivamente conhecidos como Tipo 12, representaram 9,5% (139/1457) da população. Os resultados mostraram que os genótipos # 1, # 2 e # 3 (Tipo II clonal, Tipo III e Tipo II variante) são identificados em todo o mundo. Estes três genótipos são altamente prevalentes na Europa. Os genótipos # 1, # 2, # 3, # 4 e # 5 dominam na América do Norte. Os genótipos # 2 e # 3 (dos Tipos III e II variante) dominam na África, e os genótipos # 9 e # 10 (Chinês 1 e Tipo I) são prevalentes no Leste Asiático ¹⁰².

Na América do Norte, incluindo os EUA e o Canadá, um total de 501 isolados foram genotipados exibindo 40 genótipos distintos ¹⁰². A maioria das amostras (86,4%, 433/501) compreendem os genótipos # 1, # 2, # 3, # 4 e # 5. Os genótipos # 1 (29,7%, 149/501) e # 3 (14,2%, 71/501), que são a linhagem convencional de Tipo II, representaram 43,9% (220/501) da população. O genótipo # 2 (tipo III) representou 18,2% (91/501) das amostras. Os genótipos # 4 (10,0%, 50/501) e # 5 (14,4%, 72/501) (juntos como Tipo 12) representaram 24,4% (122/501) da população. O Tipo 12 é agora reconhecido como a quarta linhagem clonal na América do Norte ¹²⁵. Foi demonstrado que o Tipo 12 é uma linhagem dominante na vida selvagem na América do Norte ¹²⁰. As cepas de *Toxoplasma gondii* pertencentes a esta linhagem, também designadas como Tipo X, foram associadas à alta mortalidade em lontras marinhas ao longo da costa da Califórnia ¹²⁶. O genótipo # 10 (Tipo I), considerado anteriormente como um dos vários tipos dominantes na América do Norte, representou apenas 0,8% (4/501) da população ¹⁰², mostrando que este genótipo,

atualmente, é muito raro. Alguns estudos chegam a questionar se este genótipo de fato, ainda, existe na América do Norte e Europa ^{111,127}.

Das 64 amostras obtidas de países europeus, foram identificados 9 genótipos ¹⁰². Quase três quartos (64,1%, 41/64) pertencem aos genótipos # 1 (25,0%, 16/64) e # 3 (39,1%, 25/64), que são reconhecidos como linhagem Tipo II. O genótipo # 2 (tipo III) constitui 12,5% (8/64) das amostras. Os genótipos # 10 (Tipo I) e genótipo # 6 (também conhecidos como Tipo BrI, África 1) têm freqüências relativamente altas, representando 9,4% (6/64) e 4,7% (3/64), respectivamente. Essa uniformidade genética confere à Europa a maior semelhança com o modelo de três linhagens proposto por Howe e Sibley ¹⁰⁴. A prevalência dos genótipos # 4 e # 5 (também designados colectivamente como Tipo 12) na América do Norte proporciona contraste com a Europa, onde o genótipo # 4 não foi encontrado e o genótipo # 5 constitui apenas uma pequena parte da população. É necessária uma maior amostragem com maior diversidade de hospedeiros dos países europeus para melhor compreensão da estrutura populacional de *T. gondii* na região ^{102, 104}.

Na Ásia, também parece haver um alto grau de uniformidade genética. Das 102 amostras, foram identificados 10 genótipos ¹⁰². O genótipo # 9 (chinês 1) é de longe o mais comumente encontrado, representando 48,0% ^{49,102} das amostras. Está presente na China, Vietnã e Sri Lanka, indicando uma distribuição generalizada na Ásia Oriental. O genótipo # 10 também é comum na China, ao contrário da maioria dos outros países (13,7%, 14/102 na Ásia). Os genótipos # 4, # 18 e # 20 têm freqüências relativamente altas entre as amostras na Ásia. O genótipo # 20 foi identificado em uma ampla gama de áreas, desde o Sri Lanka no sul da Ásia até o Egito no norte da África ¹⁰². Até agora, a maior parte da amostragem da Ásia foi proveniente das regiões mais populosas do leste, sendo

necessária uma maior amostragem das áreas ocidentais, onde o clima e a geografia, bem como a distribuição das populações humanas, são marcadamente diferentes.

Na África, um total de 141 amostras foram genotipadas e 13 genótipos identificados¹⁰², sendo que a maioria das amostras (118/141) na era proveniente do Egito. Em geral, os genótipos # 3 (45,4%, 64/141) e # 2 (39,0%, 55/141) são os dois tipos dominantes, representando 84,4% das amostras. O genótipo # 6 foi identificado para várias amostras. Os dados limitados disponíveis na amostragem na África Ocidental parecem sugerir um elevado nível de diversidade, com uma frequência relativamente baixa de genótipos comuns¹⁰². Entretanto, é necessária maior amostragem na África antes de se tirar conclusões fortes sobre a composição da população de *T. gondii* desse continente. Seria de especial interesse obter maiores informações sobre *T. gondii* nas regiões tropicais da África.

Na América Central e do Sul, um total de 646 amostras foram genotipadas e 156 genótipos identificados¹⁰². Ao contrário dos países do hemisfério norte, *T. gondii*, no hemisfério sul, exibe uma estrutura populacional altamente diversa, na qual nenhum genótipo parece ser claramente dominante. Os 10 principais genótipos são # 2, # 6, # 7, # 8, # 11, # 3, # 65, # 13, # 19 e # 146, com frequências de 6,8, 6,2, 3,7, 3,3, 3,1, 3,1, 2,5, 2, 5 e 2,3%, respectivamente¹⁰². Os genótipos # 1, # 2, # 3 e # 10 estão em baixas frequências e não tomaram conta da paisagem genética como no norte. Destes genótipos, o # 2 (Tipo III) é o mais freqüente (6,8%, 44/646) e é encontrado em muitos dos países desta região, mesmo aqueles para os quais o tamanho da amostra foi pequeno, como Panamá, Peru e Grenada. Mesmo nestas regiões, no entanto, o genótipo # 2 é geralmente menos freqüente do que muitos outros genótipos. Uma exceção a essa tendência é encontrada no Chile, onde se verifica uma composição genética mais semelhante à

encontrada na América do Norte e na Europa, onde predominam os genótipos # 1, # 2 e # 3. O Chile está localizado no lado oeste da Cordilheira dos Andes, que a separa da maioria dos países da América do Sul. Em seu lado oeste, está o Oceano Pacífico, que fornece portos para o transporte marítimo para outros continentes. O comércio com países de diferentes continentes pode ter sido responsável pela introdução dos genótipos # 1, # 2 e # 3 no Chile, permitindo que os mesmos se tornassem dominantes nesta região¹²⁸.

De acordo com Shwab et al.¹⁰², entre as cinco principais regiões, incluindo a África, Ásia, Europa, América do Norte e América Central e do Sul, os índices de diversidade de genótipos são 0,6433, 0,7280, 0,7679, 0,8285 e 0,9792, respectivamente, indicando alta diversidade na América Central / América do Sul, seguida pela América do Norte. A comparação por pares revelou que existem diferenças significativas entre as populações da África, Ásia, Europa, América do Norte e América Central / Sul, com apenas as populações da Europa e da América do Norte exibindo uma composição genética semelhante entre si. Além disso, a diferença entre a América Central / América do Sul e outras áreas é mais proeminente. A análise de genótipos compartilhados revelou a distribuição de genótipos comuns, sendo que os genótipos # 1, # 2 e # 3 existem em todos os cinco continentes. O genótipo # 6 (Brl, África 1) foi identificado em todos os continentes, exceto na América do Norte, o genótipo # 10 (Tipo I) foi identificado em todos os continentes, exceto na África e o genótipo # 15 identificado em todos, exceto na Ásia. As Américas do Norte, Central e Sul compartilharam 17 genótipos, o mais alto entre todas as populações comparadas.

Compreender a estrutura populacional de *T. gondii* é de grande interesse, pois pode fornecer informações essenciais sobre a transmissão e a evolução deste parasita zoonótico de distribuição mundial. De acordo com Shwab et al.¹⁰², vários fatores importantes podem

estar envolvidos na modelagem da estrutura moderna da população de *T. Gondii* ¹⁰². Em primeiro lugar, a ascensão da agricultura humana há cerca de 11 mil anos na Mesopotâmia e sua expansão para o Novo Mundo nas últimas centenas de anos pode ter transformado significativamente o ambiente biológico e reduzido a diversidade genética de parasitas animais ¹²⁹. Na América do Norte, Europa e Leste Asiático, a agricultura em larga escala e a construção de cidades transformaram em grande parte a paisagem dessas regiões, assim como muitas das espécies ancestrais de animais selvagens foram substituídas por animais domésticos geneticamente uniformes. Tal transformação da geografia e redução da diversidade animal pode ter levado à expansão de alguns genótipos de *T. gondii* que se adaptaram ao novo ambiente. Os dados limitados dão suporte à idéia de que as linhagens clonais de *T. gondii* podem ter se tornado dominantes de uma maneira concomitante com os primórdios da agricultura humana na região da Mesopotâmia, ocasião em que essas linhagens se espalharam ao longo do fluxo de migração humana. No entanto, são necessários mais dados do Oriente Médio e de outras regiões antes de se obter conclusões mais definitivas sobre esta questão. Além disso, é possível esperar que a alta diversidade genética, ainda, possa ser mantida na vida selvagem de regiões geográficas remotas que não foram perturbadas pela colonização humana na Europa e no sudoeste da Ásia. Estudos semelhantes também são necessários na África tropical, na floresta amazônica, no sul da Ásia e na Austrália para entender melhor o efeito das sociedades humanas na diversidade genética de *T. gondii*, já que a disponibilidade desses dados permitirá compreender os padrões globais de transmissão de *T. gondii*.

Em segundo lugar, a baixa diversidade genética de *T. gondii* observada no hemisfério norte pode ser resultado do efeito da origem do *Toxoplasma* nas Américas. A alta diversidade genética observada na América do Sul e Central sugere que *T. gondii* se

originou nessa região ¹⁰⁵. É possível que um pequeno número de cepas ancestrais tenha sido introduzido da América do Sul para outros continentes por meio de comércio marítimo de mercadorias, transporte de animais de estimação, como gatos, ou transporte acidental de roedores infectados nos últimos cinco séculos ¹⁰⁵. Estas populações ancestrais teriam então se expandido ao longo das respectivas regiões geográficas com pouca competição ou recombinação entre as cepas, conduzindo às estruturas de população clonal observadas na América do Norte e Europa.

Outra possível explicação para a alta diversidade genética encontrada na América do Sul e Central, em contraste com a baixa diversidade do hemisfério norte, é que as zonas tropicais e subtropicais da região sul apoiam uma maior diversidade e número de hospedeiros animais, cada um dos quais poderia favorecer a seleção de diferentes genótipos de *T. gondii*, permitindo a proliferação de uma maior variedade de linhagens. Além disso, o clima mais quente pode permitir a sobrevivência de um maior número de oocistos na natureza por um longo período de tempo, resultando em um número maior de hospedeiros infectados, bem como diminuição da pressão seletiva em comparação com o hemisfério norte. Até agora, a amostragem em regiões tropicais diferentes das da América do Sul e Central tem sido escassa e, portanto, a compreensão das estruturas populacionais de *T. gondii*, nestas áreas, permanece limitada.

Uma questão que merece destaque é a potencial transmissão a longa distância de *T. gondii* por mamíferos marinhos e aves migratórias. Já foi demonstrado que golfinhos, assim como uma variedade de pinípedes antárticos são soropositivos para *T. gondii* ¹³⁰. Os golfinhos podem migrar em distâncias relativamente grandes e, portanto, podem ser vetores importantes para a propagação de *T. gondii* a longa distância. Vários estudos têm focado na prevalência de *T. gondii* em mamíferos marinhos, como lontras marinhas ao

longo das costas da Califórnia, Washington e Alasca. Um genótipo designado como 'Tipo X' (genótipo # 5) é dominante nestas lontras marinhas ¹³¹. O mesmo genótipo parece ser a principal causa de alta mortalidade em lontras na Califórnia ¹³¹. Embora as lontras marinhas não sejam migratórias, elas podem ser sentinelas de uma rota pela qual *T. gondii* pode ser introduzido no ecossistema marinho, ou pelo menos um indicador dos tipos de cepas presentes nesses ecossistemas, já que parece provável a ocorrência de transmissão intercontinental de *T. gondii*. As aves migratórias também podem ser um importante contribuinte para a transmissão de *T. gondii* entre continentes, entretanto, poucos estudos têm sido realizados visando essas espécies. Um estudo recente relatou a genotipagem de um único isolado de um pombo selvagem no México ¹³². Outros estudos encontraram casos esporádicos de infecção por *T. gondii* em espécies de aves selvagens ¹²⁰. Dado o papel potencial da migração de mamíferos marinhos e aves na transmissão a longa distância de *T. gondii*, são necessários mais estudos sobre estes animais para melhor compreensão da sua contribuição na evolução de *T. gondii* em escala global.

Um achado importante e discutido na revisão de Shwab et al., ¹⁰² é a questão da virulência das cepas de *T. gondii*, já que este estudo verificou que o genótipo # 10 (Tipo I), linhagem altamente virulenta em camundongos, parece ser mais prevalente em infecções humanas do que é visto em outros hospedeiros. Assim, uma amostragem maior é necessária para determinar o significado desta característica, e os pacientes de toxoplasmose humana deveriam ser amostrados de uma maior variedade de regiões geográficas, a fim de determinar se este é um fenômeno global. Seria também de interesse determinar a virulência no camundongo das cepas atípicas encontradas em hospedeiros humanos, a fim de investigar a possibilidade de que tal virulência murina também possa provocar uma maior capacidade de doença humana.

1.6.3 Genótipo de *Toxoplasma* e características biológicas

A virulência no modelo murino é o fenótipo mais reconhecido e tem sido bem descrito para as linhagens clonais clássicas, tipos 1, 2 e 3. Cepas do tipo 1 ocasionam ampla disseminação de parasitas e morte de camundongos em menos de 10 dias após a inoculação de menos de 10 taquizoítos. Por outro lado, camundongos sobrevivem a infecções com cepas dos tipos 2 e 3 (LD50 variando de 10^2 a 10^5) e a disseminação de taquizoítos é muito menos extensa. As cepas do tipo 3 são, geralmente, consideradas como não virulentas em camundongos, embora deterioração progressiva e morte de camundongos, notavelmente com sintomas neurológicos, pode ocorrer algumas semanas ou meses após a inoculação ¹³³. As diferenças genéticas entre estas três cepas provocam uma modulação diferente nas células hospedeiras, induzindo diferentes respostas imunitárias no hospedeiro que poderiam explicar, em parte, as diferenças nos padrões de virulência ^{103, 134-140}.

A maior virulência de cepas do tipo 1 em camundongos comparada com as cepas dos tipos 2 e 3 foi correlacionada com propriedades biológicas *in vitro*. As cepas do tipo 1 mostram migração aumentada em placas de agarose, bem como transmigração aumentada através do epitélio polarizado, ou através da matriz extracelular. Essas cepas também mostram uma maior taxa de penetração *ex vivo* da lâmina própria e da ^{141,142}. Esta capacidade de atravessar rapidamente as barreiras epiteliais e alcançar a corrente sanguínea horas após a infecção pode ser um determinante importante da disseminação parasitária *in vivo* em espécies hospedeiras suscetíveis. Na cultura celular, o tipo 1 cresce mais rapidamente que os tipos 2 e 3 e tem uma menor taxa de interconversão de taquizoíto para bradizoíto do que as cepas do tipo 2 ¹⁴³. A maior taxa de crescimento dos parasitas do tipo 1 devido a uma maior taxa de invasão, ou a um tempo de duplicação menor pode

também explicar a maior carga tecidual observada em camundongos infectados com cepas virulentas ¹⁴⁴.

Os genótipos não clonais são geralmente mais virulentos em camundongos do que os genótipos clonais dos tipos 2 e 3, variando de altamente virulento a intermediário, ou com fenótipo não virulento de acordo com as diferenças na combinação precisa de seus alelos. Cruzamentos experimentais entre as cepas dos tipos 1, 2 ou 3 revelaram-se úteis na identificação de genes que determinam a virulência em camundongos ¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. Esses estudos demonstraram que a mortalidade do camundongo causada pelos clones das progênes desses cruzamentos variou de níveis baixos a 100%, consistente com um traço multilocus. Achados semelhantes foram observados também em amostras de cepas recombinantes naturalmente. Entre os cinco genótipos recombinantes identificados em uma amostra de oocistos, dois foram de baixa virulência em camundongos, um mostrou uma virulência intermediária (DL_{50} maior ou igual a 10^2 mas menor que 10^4 taquizoítos) e dois foram altamente virulentos em camundongos (DL_{50} menor que 10^2 taquizoítos) ¹⁴⁹.

Apesar dos estudos *in vitro* demonstrarem diferentes propriedades intrínsecas das cepas, a expressão da virulência em uma dada espécie hospedeira é uma questão mais complexa que depende de várias características do hospedeiro. A definição de virulência de *T. gondii* em relação à infecção em camundongos levou a muita ambiguidade ao definir os fatores de virulência, já que outros hospedeiros e, especialmente, o homem podem se comportar de maneira bastante diferente dos camundongos ¹³⁵.

1.6.4 Genótipo de *T. gondii* e doença humana

Howe e Sibley¹⁰⁴ relataram uma possível associação do genótipo de *T. gondii* com a doença em humanos e animais, demonstrando uma maior predominância de cepas do tipo

II na toxoplasmose humana, quando comparada a animal, com ocorrência significativamente maior deste genótipo em pacientes com AIDS. Além disso, os autores identificaram uma maior frequência de cepas do tipo I em casos de toxoplasmose congênita humana e este genótipo também foi mais prevalente em humanos do que em animais. Por outro lado, a frequência do genótipo III foi significativamente mais elevada na toxoplasmose animal. Contudo, cabe ressaltar que a amostragem parcial das cepas no estudo de Howe e Sibley levaram a conclusões errôneas sobre a correlação entre o genótipo da cepa e a toxoplasmose em humanos e animais, já que as amostras analisadas restringiram-se aos isolados provenientes da Europa e América do Norte, com ausência de cepas representativas de outras regiões do mundo. Atualmente, está bem estabelecido que as cepas do tipo I são raras^{111, 127}. Cepas do tipo I podem ser ocasionalmente amostradas em seres humanos ou animais na Colômbia, Brasil e China, entretanto, pode-se perguntar se esse genótipo ainda existe na América do Norte e Europa, já que raramente são descritas^{102,111}. Com base em uma amostragem de cepas da França, não é correto afirmar que a frequência das cepas do tipo III é maior em animais do que em seres humanos^{116,150,151}. Além disso, a predominância de cepas de tipo II em toxoplasmose humana é verdadeira apenas em áreas, onde este genótipo é predominante no meio ambiente, como na Europa. Na França, as cepas do tipo II correspondem a 90% das cepas isoladas em animais e em todas as formas de toxoplasmose humana, mas não é verdade que a ocorrência de cepas de tipo II é mais elevada em humanos do que em animais^{111,116,151}. A porcentagem de cepas do tipo II em seres humanos nos EUA deve ser provavelmente, muito menor do que na Europa, já que há um número significativo de outros genótipos que também infectam os animais neste país^{102, 111}. Embora, algumas cepas do tipo II tenham sido isoladas no Brasil, é esperado que estas cepas raramente causem infecção humana devido sua raridade no meio ambiente. Para ser infectado por uma cepa do tipo II, um

brasileiro terá de comer carne mal cozida ou hortaliças de cidades brasileiras próximas às fronteiras da Argentina ou Uruguai, onde este genótipo é mais comum ^{152, 153}, viajar para a ilha de Fernando de Noronha, onde o tipo II é surpreendentemente endêmico ¹⁵⁴, comer alimentos importados, ou viajar para áreas onde tipo II é predominante, como a Europa e a EUA ¹¹¹.

1.6.4.1 Toxoplasmose Congênita

Os casos de toxoplasmose congênita constituem a principal fonte de isolamento de *T.gondii* em humanos a partir de amostras de líquido amniótico, placenta, sangue do cordão umbilical e tecidos de fetos abortados. Líquido amniótico, ou mesmo placenta, estão disponíveis principalmente em países como a França, onde é feita uma triagem pré-natal sistemática de toxoplasmose ¹⁵⁰. Nesse caso, quase todos os isolados responsáveis pela toxoplasmose, incluindo a maioria das casos assintomáticos ao nascimento, podem ser submetidos à genotipagem, porém o isolamento de cepas ocorre principalmente nos casos mais graves de toxoplasmose congênita sintomática introduzindo um viés clínico. A maior série de casos congênitos com os dados de genotipagem foram conduzidos em um estudo multicêntrico na França ¹⁵⁰. A tipificação realizada em todas as cepas isoladas de casos congênitos em laboratórios franceses revelou que quase todas as cepas pertenciam ao Tipo 2. Isolados tipo 2 foram encontrados em todos os diferentes aspectos da doença congênita, desde infecção letal e envolvimento neuro-ocular grave em infecções maternas precoces, até isolados de retinocoroidite, ou toxoplasmose latente em infecções maternas tardias. Embora, as cepas do tipo 2 possam algumas vezes serem altamente patogênicas para feto humano ¹⁵⁵, a gravidade da infecção fetal causada por estas cepas está diretamente relacionada ao período da gestação em que a mãe é infectada, com uma diminuição de risco de doença clínica quando o período gestacional aumenta. A questão,

neste caso, é saber se as cepas que não são do tipo 2 são mais virulentas para o feto do que as cepas do tipo 2. De acordo com os dados disponíveis, as cepas do tipo 3 parecem ter o mesmo comportamento que as cepas do tipo 2 nos casos de toxoplasmose congênita e as cepas do tipo 1 são raramente isoladas ¹²⁷. Contudo, existem evidências crescentes para relacionar uma carga mais elevada de cepas atípicas à toxoplasmose congênita ^{119, 156, 157}. A maior patogenicidade das cepas atípicas tem sido sugerida para explicar a doença ocular mais grave em crianças infectadas congenitamente no Brasil quando comparadas às crianças infectadas na Europa ¹⁵⁸.

Agora, está claro que a Europa e o Brasil apresentam estruturas populacionais de *T. gondii* totalmente diferentes. Se a diversidade é baixa na Europa com grande predominância de cepas do tipo 2, não é o caso no Brasil, onde inúmeros genótipos atípicos têm sido caracterizados em animais. Pode-se supor que esta diversidade de cepas também é verdadeira em seres humanos e poderia explicar a carga mais elevada da doença em crianças infectadas congenitamente por alguma cepa virulenta de *T. gondii* no Brasil, mas como a coleção de cepas de casos humanos brasileiros é deficiente não é possível apoiar plenamente a hipótese ¹⁵⁹. De fato, relatos de cepas atípicas em toxoplasmose congênita são escassos, mas a maioria destes casos foram graves mesmo após infecção materna tardia durante a gravidez ^{119, 150, 156, 157}. Além disso, o fato de que cepas atípicas são capazes de reinfectar mulheres com infecção pregressa por *T. gondii* é outra questão que sugere que as cepas com fundo genético diferente ocasione uma resposta imunológica inapropriada no hospedeiro aumentando o risco de danos para o feto ^{103, 119}. Uma vez que o isolamento de cepas é uma tarefa difícil a partir de amostras clínicas, uma resposta parcial à questão da maior patogenicidade de cepas não - tipo 2 versus cepas tipo 2 pode vir da sorotipagem em vez de genotipagem, embora os ensaios de

sorotipagem tenham limitações ¹⁶⁰. Um estudo de sorotipagem realizado com crianças congenitamente infectadas nos EUA mostrou que a doença grave ao nascimento foi mais frequente em indivíduos infectados com sorotipos não - tipo 2 do que com sorotipos tipo 2 ¹⁶⁰. Os sorotipos não tipo 2 pertencem ao haplogrupo 12 que também foi denominado quarta linhagem clonal na América do Norte ¹²⁵. As cepas pertencentes ao haplogrupo 12 são abundantes e endêmicas nos EUA e parecem mais patogênicas em casos de toxoplasmose congênita do que as cepas do tipo 2, comumente encontradas na Europa ¹⁶⁰. Embora, a gravidade da doença seja influenciada pelo trimestre em que a infecção é adquirida pela mãe e, provavelmente, pelo histórico genético das cepas, outros fatores incluindo a predisposição genética do hospedeiro podem contribuir com a gravidade da doença. Estudos sugerem que polimorfismos nos genes que afetam a resposta imune, incluindo HLA ¹⁶¹, ou em genes relacionados ao desenvolvimento de processos como ABCA4 e COL2A1, poderiam influenciar o resultado clínico da toxoplasmose congênita ¹⁶².

1.6.4.2 Toxoplasmose ocular

A influência do genótipo de *T. gondii* na toxoplasmose ocular (TO) tem sido pouco estudada devido à escassez de amostras de fluido ocular para análise de genotipagem. Essas amostras apresentam baixo volume, geralmente menos de 200 µL, e exigem procedimentos invasivos de diagnóstico e além disso, a maioria do volume coletado é dedicado ao diagnóstico da TO. Assim, o isolamento de cepas em camundongos, ou cultura celular, quase nunca é realizado devido às limitações do volume da amostra coletada. Quando os ensaios de PCR são realizados para detecção de *T. gondii*, o DNA extraído pode ser utilizado para análises de genotipagem direta, mas a quantidade de DNA do parasita é, na maioria das vezes, muito baixa para permitir a amplificação por marcadores genéticos de cópia única, conduzindo a resultados de tipificação mal

sucedidos ou incompletos. Além disso, análises de genotipagem realizadas diretamente em amostras de humor aquoso ou vítreo podem levar a um viés, já que as amostras de líquido ocular são normalmente coletadas quando a apresentação clínica é grave e / ou atípica ^{103,}

¹⁶³.

A toxoplasmose ocular é causa mais comum de uveíte posterior em muitas partes do mundo, mas a carga de TO pós-natal varia significativamente entre as áreas geográficas. Foi estimado que 0,6% da população total do Alabama e Maryland nos EUA tiveram cicatrizes consistentes de retinocoroidite pela infecção pelo *T. gondii*. Números maiores de prevalência de cicatrizes retinianas toxoplasmáticas têm sido relatados em estudos populacionais na América do Sul, variando de 6% na Colômbia ¹⁶⁴, para 21% em Erechim, sul do Brasil (61). Entre as diferentes hipóteses para explicar esta variação na prevalência de TO entre as partes norte e sul das Américas, a conhecida divergência genética entre as cepas de ambas as áreas tem sido considerada como mais plausível ^{103,}

¹⁶³.

Os dados de genotipagem multilocus disponíveis para TO no Brasil foram coletados principalmente nos estados do sul do país, onde a prevalência da doença é conhecida por ser extremamente alta. Genótipos de *T. gondii* foram recuperados diretamente das amostras de pacientes na cidade de Erechim, Estado do Rio Grande do Sul ¹⁶⁵ (165) e em diversas cidades do Estado de São Paulo ¹⁵⁹, enquanto que uma cepa foi recuperada indiretamente de amostras ambientais implicadas como fonte de infecção de um grande surto de toxoplasmose ocorrido por transmissão hídrica que causou alta prevalência de envolvimento ocular em Santa Isabel do Ivaí, Paraná ^{35, 166}. É difícil traçar uma conclusão definitiva desses estudos porque o número de casos é muito limitado e são necessários estudos adicionais, mas alguns achados não esperados merecem atenção. A diversidade

genética de cepas de *T. gondii* em TO parece limitada quando comparada com os dados genéticos de cepas coletadas em animais no Brasil. No Estado de São Paulo, por exemplo, é impressionante ver que apenas um genótipo (ToxoDB genótipo # 65) foi presente em sete pacientes com TO ¹⁵⁹, considerando que, no mesmo estado de São Paulo, foram coletados 20 genótipos diferentes de 46 gatos ¹¹⁰. O genótipo #65 ToxoDB parece ser comum no Brasil, uma vez que também foi descrito em pacientes imunossuprimidos com toxoplasmose cerebral ¹⁵⁹, e em animais de outros locais do país ¹¹⁰. Da mesma forma, a maioria dos 11 pacientes de Erechim foram infectados por apenas um genótipo e a cepa envolvida no surto de Santa Isabel do Ivaí foi caracterizada como pertencente ao genótipo Brl, que é considerado como uma linhagem clonal no Brasil por ter sido amostrado em vários animais de diferentes áreas ³⁵. Todos estes dados sugerem que, entre os vários genótipos que circulam no Brasil, apenas alguns são responsáveis pela alta carga de TO no país e são comuns no ambiente ⁴⁷. Um grande argumento para a alta virulência das cepas coletadas em pacientes de Erechim e São Paulo é o fato de que as mesmas não foram caracterizadas em amostras de fluido ocular, mas sim de sangue periférico ^{159,165}. A parasitemia prolongada na doença ocular no Brasil tem sido confirmada pela observação microscópica de taquizoítos em amostras de sangue ¹⁶⁷. Estudos realizados nos EUA e na Europa tiveram resultados contraditórios. Na França e em vários países europeus, TO envolve predominantemente cepas do tipo 2 ¹⁶⁸. Este resultado não é surpreendente uma vez que as cepas do tipo 2 são as cepas mais comuns no ambiente europeu. De acordo com um inquérito que investigou o perfil genético das cepas responsáveis por lesões atípicas e / ou graves de TO nos EUA, a maioria dos casos em pacientes imunocompetentes não eram devidos às cepas comuns do Tipo 2 ou haplogrupo 12, mas envolviam genótipos atípicos ¹²². Como falta informação epidemiológica, não foi possível saber se essas cepas atípicas foram coletadas em pacientes provenientes da América do

Sul, onde tais genótipos atípicos são comuns. Dada a estrutura populacional pouco clara na América do Norte, é possível que esses genótipos atípicos circulem nos EUA e possam ser mais virulentos do que as cepas do tipo 2. Notavelmente, no Canadá, o maior surto de toxoplasmose relatado foi associado a uma cepa atípica eliminada por um puma em um dos dois principais reservatórios de água potável na província de British Columbia ^{169, 170}.

Cepas atípicas com genótipos altamente divergentes têm sido envolvidas nos casos raros de toxoplasmose disseminada observados em indivíduos saudáveis. A doença é caracterizada por febre alta e prolongada associada com envolvimento pulmonar que pode ser fatal. O DNA de *T.gondii* é geralmente genotipado a partir de sangue periférico ou fluido do lavado broncoalveolar. A maioria destes casos foi descrita na Guiana Francesa ^{28, 156, 171, 172}, mas também há relatos de casos semelhantes na Europa ^{173, 174}. Na Guiana Francesa, toxoplasmose grave disseminada foi adquirida após a ingestão da carne de caça de animais selvagens, ou consumo de água não filtrada, proveniente de áreas florestais que ocupam grande parte do seu território. Na Europa, estes casos foram adquiridos após o consumo de carne importada, especialmente carne de cavalo, proveniente da América do Sul.

Os determinantes das diferenças cepas - específicas na virulência da infecção humana permanecem desconhecidos. Os *loci* ROP18, ROP5, ROP16 e GRA15 de *T. gondii* têm sido associados com virulência em camundongos, mas não se pode presumir que estes quatro *loci* de virulência em camundongos afetam igualmente a sobrevivência de células humanas. Um surto de toxoplasmose no Suriname mostrou que a mesma cepa atípica pode levar a um espectro de manifestações clínicas, desde doença leve até doença potencialmente fatal ¹⁵⁶.

1.6.4.3 Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos

Em pacientes com AIDS, a manifestação clínica mais frequente da toxoplasmose é encefalite. O material para isolamento e genotipagem das cepas raramente está disponível nestes pacientes, uma vez que biópsias cerebrais quase nunca são realizadas e os ensaios de PCR geralmente resultam em negativos nas amostras de sangue. Em pacientes com toxoplasmose grave, cuja imunossupressão não é causada por infecção pelo HIV, tais como aqueles que se submetem a transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas, *T. gondii* é frequentemente detectado no sangue e lavado broncoalveolar e, portanto, poderia ser genotipado, mas a prevalência desta infecção oportunista nesses pacientes é muito menor do que em pacientes com AIDS ¹⁰³.

Os pacientes imunossuprimidos usualmente reativam a cepa adquirida por infecção assintomática anos antes quando eram imunocompetentes. Para estes pacientes, espera-se que o perfil genético das cepas seja equivalente ao encontrado na população em geral. Assim, um paciente imunocomprometido com imunidade pregressa para *T. gondii* e que sempre viveu na França terá uma alta probabilidade de reativar uma cepa tipo 2, já que as cepas do tipo 2 respondem por 95% das cepas isoladas no país.

A maior coleção de genótipos de *T. gondii* com características epidemiológicas, clínicas e dados de desfecho da doença em pacientes imunocomprometidos foi obtida a partir de um estudo multicêntrico francês ¹⁵¹. O genótipo das cepas de *T. gondii* estava fortemente ligado à presumível origem geográfica da infecção. As cepas de tipo 2 foram predominantes em doentes que adquiriram a infecção na Europa, enquanto que as cepas não - tipo 2 foram mais comumente recuperadas de doentes com infecções adquiridas fora da Europa. Dois principais genótipos atípicos foram recuperados de pacientes que

adquiriram a infecção em vários países da África subsaariana (genótipo África 1) e na região da Índia Francesa (genótipo Caribe 1), sugerindo que esses genótipos atípicos são comuns nestas áreas. A distribuição de genótipos de *T. gondii* (tipo 2 versus não - tipo 2) não foi significativamente diferente entre pacientes infectados pelo HIV e em pacientes sem HIV, nem foi significativamente diferente para diferentes locais e desfecho da infecção. Estes dados sugerem que o genótipo da cepa não desempenha um papel importante na fisiopatologia e gravidade da toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos^{103, 151}.

Em síntese, existe uma forte correlação entre a diversidade genética da cepa de *T. gondii* com origem, mas não com a especificidade do hospedeiro, ou resultado da doença. Marcadores genéticos utilizados para a genotipagem das cepas de *T. gondii* são muito bons para revelar a associação dos genótipos com localização geográfica, mas não há nenhum alelo ou combinação alélica que pode prever o curso e a gravidade das cepas na toxoplasmose humana.

1.7 Prevenção e Tratamento

Em relação às medidas de prevenção da toxoplasmose humana transmitida pela ingestão da carne e produtos cárneos contaminados pelo agente, é necessária a aplicação de medidas que inativem os parasitas presentes nos cistos contidos na carne. Esses cistos podem ser inativados imediatamente por aquecimento a 67°C, (21). A utilização do forno microondas não garante a destruição completa dos cistos devido ao aquecimento desigual da carne¹⁷⁵. Assim, é imprescindível que toda a carne destinada ao consumo esteja devidamente cozida, devendo-se evitar a ingestão de produtos cárneos crus ou mal cozidos, bem como provar a carne crua antes de prepará-la²¹.

Cistos teciduais são relativamente resistentes às mudanças de temperatura e permanecem infectantes em carcaças refrigeradas (1 - 4°C), ou carne moída por até 3 semanas^{176,177}. Cistos de *T. gondii* também podem permanecer viáveis por até 22 dias em temperaturas entre - 1°C a - 3,9°C e por 11 dias a - 6,7°C, indicando que a importação de carnes parcialmente congeladas não garante a inativação do parasita. Para a inativação completa dos cistos, é necessário que a temperatura no interior do corte da carne esteja a - 12°C²¹.

Geralmente, o congelamento pode inativar os cistos, diminuindo o risco de infecção por *T. gondii*, porém é necessário respeitar o tempo e temperatura adequados para alcançar 100% de eficiência. Contudo, detalhes de um procedimento adequado, ainda, precisam ser validados, já que vários trabalhos indicam tempos e temperaturas diferentes e, além disso, a maioria destes trabalhos utiliza carne proveniente de animais experimentalmente infectados²¹.

Outra forma importante de transmissão a ser prevenida é a ingestão de oocistos presentes em água, alimentos crus e solo. Assim, faz-se necessário o consumo de água filtrada ou fervida, além da higienização adequada de frutas, verduras e legumes. Os gatos domésticos devem ser alimentados preferencialmente com alimentos secos, enlatados ou devidamente cozidos, e as fezes da caixa de areia devem ser removidas diariamente, já que o oocisto leva pelo menos um dia para se tornar infectante⁸.

O tratamento da toxoplasmose consiste em fármacos com eficiência contra taquizoitos, sendo pouco eficaz contra cisto, ou seja, só podem ser utilizados na fase aguda da doença⁸⁹.

Caso a infecção por *T. gondii* seja adquirida durante a gestação a medicação recomendada é espiramicina, e caso a doença seja confirmada, pode ser associada à sulfadiazina e pirimetamina^{89, 178}.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos experimentais em modelo murino demonstraram que a imunidade induzida pela infecção primária por *T. gondii* confere resistência à reinfecção pelo agente ¹⁷⁹⁻¹⁸², porém pesquisas recentes mostraram que essa proteção é parcial, possibilitando a reinfecção do hospedeiro, já que um genótipo de *T. gondii* pode evadir a resposta imune induzida pela infecção primária por outro genótipo do parasita ¹⁸³⁻¹⁸⁸.

Araújo, Slifer e Kim ¹⁸³ demonstraram o efeito da reinfecção em hospedeiros previamente infectados, utilizando duas cepas de *T.gondii* (ME49 e C56) com diferentes capacidades de indução da doença e lesões cerebrais em camundongos. Apesar da resposta imune mediada por células e anticorpos marcados, camundongos infectados cronicamente desenvolveram doença e morreram de toxoplasmose aguda quando reinfetados com uma cepa diferente daquela que causou a infecção primária. Além disso, a resposta imune não preveniu a invasão do cérebro dos animais e formação de cistos teciduais pela cepa reinfetante.

Dao *et al.*, ¹⁸⁶ relataram resultados semelhantes, mostrando que as diferenças genéticas entre as cepas de duas infecções sucessivas por *T.gondii* têm um efeito importante na toxoplasmose. A distinção entre os cistos teciduais da infecção primária e secundária foi realizada por meio de um procedimento indireto, utilizando uma cepa de *T.gondii* transfectada com β galactosidase (Pru β gal), já que a atividade enzimática da galactosidase permite uma diferenciação precisa entre cepas transfectadas e não transfectadas. A partir desta abordagem foi demonstrado que a infecção primária por uma cepa do tipo II (cepa Pru β gal) não protegeu o hospedeiro da reinfecção e colonização do cérebro por cistos da cepa secundária de genótipo III (cepa Ned).

Brandão *et al.*,¹⁸⁵ avaliaram a reinfecção de camundongos Balb/c com diferentes cepas recombinantes de *T. gondii*. Neste estudo, camundongos Balb/c foram infectados, inicialmente, com a cepa D8 não virulenta e desafiados com as cepas virulentas recombinantes (EGS e CH3). A PCR - RFLP demonstrou que houve reinfecção dos animais com a cepa EGS tanto no 45º dia como no 180º dia após a infecção primária. Por outro lado, a reinfecção pela cepa CH3 ocorreu apenas no 180º dia após infecção, demonstrando que a ocorrência de reinfecção está relacionada não apenas com o genótipo da cepa infectante, mas, também, com a resposta imune do hospedeiro, dependendo diretamente do tempo de infecção. De acordo com os autores, a quantidade significativamente maior de IL10 produzida no 180º dpi, provavelmente, está associada à maior suscetibilidade à reinfecção, já que esta citocina desempenha um papel importante no equilíbrio entre a imunidade protetora e o desenvolvimento da patologia imune na toxoplasmose.

Além das diferenças genéticas entre as cepas do parasita, uma questão importante que deve ser considerada em estudos de reinfecção é a suscetibilidade do hospedeiro à infecção por *T.gondii*. Brandão *et al.*¹⁸⁵ avaliaram a suscetibilidade de duas linhagens distintas de camundongos à reinfecção por cepas recombinantes de *T.gondii*. Camundongos Balb/c e C57Bl/6 foram infectados, inicialmente, com a cepa D8 não virulenta e desafiados com as cepas virulentas recombinantes EGS e CH3. Os resultados demonstraram que camundongos Balb/c foram reinfetados somente pela cepa EGS, enquanto que os camundongos C57Bl/6 foram reinfetados por ambas as cepas (EGS e CH3). Além disso, os níveis de IL10 e IFN γ , após a infecção primária pela cepa D8, foram menores nos camundongos C57Bl/6 em relação aos resultados obtidos para os camundongos Balb/c, demonstrando que a reinfecção depende do genótipo do parasita

utilizado no desafio e, também, de características intrínsecas da resposta imune do hospedeiro ¹⁸⁴.

Silva *et al.*, ¹⁸⁹ verificaram o efeito da imunossupressão com ciclofosfamida (CY) em camundongos BALB/c com infecção primária pela cepa D8 (recombinante I/III) ou ME49 (tipo II) e infecção secundária pelas cepas CH3 ou EGS (cepas virulentas I/III). Os resultados mostraram que a infecção primária com a cepa D8 conferiu maior proteção contra o desafio com as cepas CH3 e EGS, quando comparada com a infecção primária pela ME49. O tratamento com CY causou leucopenia significativa nos camundongos, o que, provavelmente, favoreceu a reinfecção após o desafio.

A possibilidade de transmissão vertical de *T.gondii* é outro fator extremamente importante que deve ser avaliado na toxoplasmose. Franco *et al.*, ¹⁸⁸ avaliaram a suscetibilidade de fêmeas de *Calomys callosus* cronicamente infectadas pela cepa ME49 (tipo II) à reinfecção por cepas brasileiras recombinantes durante a gestação. Para avaliar as curvas de sobrevivência, fêmeas não gestantes foram cronicamente infectadas com a cepa ME49 e reinfectadas com as cepas TgChBrUD1 ou TgChBrUD2 e a transmissão vertical foi analisada após a reinfecção de fêmeas gestantes com essas mesmas cepas. Todas as fêmeas não gestantes sobreviveram após à reinfecção e não foram observadas alterações no peso corporal e no escore de morbidade. Nas fêmeas gestantes, foram detectados parasitas nas placentas, tanto dos animais cronicamente infectados pela cepa ME49, como dos animais reinfectados pelas cepas recombinantes, porém o parasita foi detectado somente nos fetos de fêmeas reinfectadas. As fêmeas reinfectadas com a cepa TgChBrUD2 apresentaram maior taxa de perda fetal, com níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias e anticorpos de subclasse IgG2a. Estes resultados demonstram que durante a gravidez, a proteção prévia contra *T. gondii* pode ser rompida pela

reinfeção do hospedeiro com cepa geneticamente distinta da cepa primária, particularmente, quando as cepas não clonais estão envolvidas. Além disso, este estudo demonstrou que a reinfeção de fêmeas gestantes por cepas brasileiras recombinantes pode ocasionar transmissão congênita do parasita e infecção fetal, ressaltando a importância do cuidado e monitoramento para *T.gondii* em gestantes, já que o conceito de imunização materna prévia, parece não descartar a possibilidade de reinfeção na gestação e transmissão congênita da toxoplasmose em modelos experimentais ¹⁸⁸.

Casos de toxoplasmose congênita foram relatados em mulheres imunocompetentes em fase crônica de infecção, indicando a possibilidade de reinfeção em humanos ^{119, 190-}

¹⁹⁵.

Descrição de aborto espontâneo devido reinfeção por *T.gondii* durante a gestação foi relato por Fortier, Pinto-Sousa e Ajana ¹⁹⁰ em uma mulher imunocompetente de 25 anos de idade apresentando sorologia compatível com imunidade adquirida por infecção prévia na 6ª e 8ª semanas de gestação, sendo que nenhum anticorpo IgM e IgA específico foi identificado. Na 11ª semana, foi observado retardo no crescimento do feto pela imagem de ultrassom e investigações laboratoriais revelaram um aumento de IgG específico associado com altos níveis de IgA específicos, mas nenhuma imunoglobulina IgM ou IgE específica. A paciente foi admitida no hospital por aborto espontâneo na 12ª semana apresentando altos níveis de IgA e IgG. O exame histológico do material do aborto revelou um cisto típico de *T.gondii*, mas não foi realizado o isolamento do parasita. A mulher não tinha linfopenia nem alterações nos subtipos de linfócitos e não houve evidências de infecções virais, bacterianas e parasitológicas a não ser toxoplasmose. A paciente relatou que foi presenteada pelo irmão com um gato no início da gestação, sendo este fato responsável pela reinfeção ¹⁹⁰.

Hennequim ¹⁹² relatou um caso de toxoplasmose congênita sintomática em uma criança, cuja mãe tinha resultados sorológicos consistentes com infecção crônica. A mãe de 34 anos de idade era nativa de São Domingos e vivia há 7 anos na Guiana Francesa, quando engravidou pela terceira vez, sendo que seus dois filhos anteriores eram saudáveis. Os testes sorológicos para detecção de anticorpos contra *Toxoplasma* realizados na 4ª e 10ª semanas de gestação foram consistentes com infecção passada, revelando títulos de IgG moderados e estáveis, com ausência de IgM e IgA. O nascimento ocorreu no tempo previsto, porém o recém-nascido apresentou um quadro de retinocoroidite recente no olho direito, além de altos títulos de IgG anti-*T.gondii* associados com anticorpos IgM e IgA específicos. Na ocasião, um novo teste sorológico da mãe revelou um aumento dos títulos de IgG e IgA anti-*T.gondii* específicos, mas não de IgM. A mãe estava saudável e apresentou teste para HIV negativo e, além disso, ela não recebeu terapia com corticosteroides. Os sinais clínicos da criança e a presença de IgM e IgA confirmaram o diagnóstico de toxoplasmose congênita como consequência de um episódio de parasitemia materna por reinfeção ¹⁹².

Gavinet *et al.*,¹⁹¹ relataram um caso de retinocoroidite devido à infecção congênita por *T.gondii* em uma criança semelhante ao quadro descrito anteriormente, no qual a mãe também apresentava imunidade adquirida por infecção prévia à gestação de acordo com os resultados sorológicos realizados na 11ª semana de gestação (títulos moderados de IgG, com ausência de IgM). O nascimento ocorreu com 38,5 semanas e o exame clínico do recém-nascido foi normal, porém nove meses mais tarde, a criança desenvolveu estrabismo e o exame oftalmológico revelou uma cicatriz macular de retinocoroidite, com perda da visão do lado direito. Amostras de soro da mãe e da criança, obtidas nove meses após o nascimento, revelaram o surgimento de anticorpos IgM e IgA e aumento acentuado

dos títulos de IgG (10 vezes) na mãe e detecção de anticorpos IgM no soro da criança. Além disso, as amostras de soro da mãe e da criança foram analisadas comparativamente por immunoblotting, demonstrando a ocorrência de reinfecção materna durante a gestação. Os padrões do immunoblotting materno e da criança apresentaram frações antigênicas comuns correspondendo à IgG transferida da mãe para o filho, entretanto, o padrão da criança revelou quatro bandas adicionais de 42, 55, 63 e 86 KDa, correspondentes a anticorpos recém-sintetizados. A reinfecção materna, provavelmente, ocorreu pela ingestão acidental de oocistos, já que a mãe referiu contato com gatos durante a gestação e a presença de uma doença semelhante à gripe cerca de uma semana após o contato.

Kodjikian *et al.*,¹⁹³ relataram a transmissão vertical da toxoplasmose de uma mãe imunocompetente cronicamente infectada para seu filho. A mãe tinha 33 anos e era brasileira, mas vivia na Suíça há 6 anos, quando engravidou pela terceira vez. Seus dois primeiros filhos, com idades entre 4 e 12 anos, eram saudáveis e ela sabia, desde sua segunda gravidez, que era soropositiva para *T.gondii*. Além disso, a sorologia realizada na 7ª semana da terceira gravidez confirmou imunidade prévia para *T.gondii*, sem evidência de atividade de doença recente (título de IgG moderado e estável e ausência de anticorpos IgA e IgM). A mãe não apresentou sinais clínicos de reativação da toxoplasmose durante a gestação e relatou que passou o 5º mês de gestação no Brasil, onde teve contato com gatos. Na 35ª semana de gestação, deu à luz a uma criança prematura, do sexo feminino, clinicamente saudável. Por outras razões, uma amostra de sangue da mãe foi retirada juntamente com punção da veia umbilical do recém-nascido e a análise sorológica materna revelou aumento dos títulos de IgG anti-*T.gondii* e surgimento de anticorpos específicos IgA, mas ausência de IgM. A análise comparativa do soro materno e do sangue umbilical do recém-nascido por immunoblotting revelou um padrão de bandas da criança

substancialmente diferente do da mãe, indicando que os anticorpos foram recentemente sintetizados. A ultrassonografia craniana aos 14 dias, seis semanas e 24 semanas não revelou anormalidades, porém o exame de fundo de olho realizado com três semanas de idade revelou retinocoroidite macular bilateral. Neste caso, a infecção por *T.gondii* foi transmitida congenitamente à criança pela mãe reinfectada durante a gestação, já que o diagnóstico foi realizado no momento do nascimento. A possibilidade de transmissão congênita pela reativação da infecção crônica materna foi descartada pelo fato da gestante ser imunocompetente.

Lebas *et al.*,¹⁹⁴ descreveram um quadro de toxoplasmose fetal, potencialmente grave, transmitida por mãe imunocompetente e previamente infectada por *T.gondii*. Este caso ocorreu em uma mulher angolana de 28 de idade, que vivia na França há dois anos. A dosagem de anticorpos maternos contra *T.gondii*, realizada na gravidez anterior, já havia revelado que a mulher apresentava infecção crônica pelo agente. A mãe não recebeu qualquer terapia imunossupressora durante a gravidez e não apresentou indícios de imunodeficiência conhecida, além disso, a sorologia para HIV foi negativa. A presença de danos fetais foi evidenciada por ultrassonografia, realizada na 37ª de gestação, que mostrou a presença de polidrâmnio, derrame pericárdico e dilatação do coração direito do feto. A criança, do sexo masculino, nasceu por cesariana de emergência na 37ª semana de gestação devido à frequência cardíaca fetal anormal. O ecocardiograma realizado logo após o nascimento revelou hipertrofia ventricular bilateral com grande dilatação da artéria pulmonar do átrio direito e veia cava inferior. O exame neurológico mostrou hipotonia axial e periférica com reflexos tendinosos presentes e hiporreatividade. A sorologia do recém-nascido detectou anticorpos IgG e IgM anti-*T.gondii*, revelado toxoplasmose fetal. Sorologia para toxoplasmose foi realizada em todos os soros retirados retrospectivamente da mãe

durante a gravidez, mostrando aumento significativo dos níveis de IgG específicos no 8º mês de gestação. O exame de fundo de olho da criança revelou lesões fortemente sugestivas de retinocoroidite por *Toxoplasma*. O diagnóstico da toxoplasmose congênita grave foi confirmado no 14º dia de vida e o tratamento com sulfadiazina e pirimetamina foi iniciado e o quadro teve uma melhora progressiva.

O caso mais recente de toxoplasmose congênita devido à reinfecção materna por *T.gondii* durante a gestação foi descrito por Elbez-Rubinstein *et al.*¹¹⁹. Este estudo relatou um quadro de toxoplasmose congênita disseminada em um recém – nascido, cuja mãe apresentava imunidade prévia contra *T.gondii*. A mãe foi, provavelmente, reinfetada durante a gravidez pela ingestão de carne de cavalo importada. Um dado interessante deste estudo foi o isolamento da cepa infectante de *T.gondii* no sangue periférico do recém – nascido, sendo que a genotipagem da cepa por marcadores de microssatélites revelou um genótipo atípico, incomum na Europa, mas descrito na América do Sul. Outro dado importante do estudo foi a demonstração experimental da reinfecção materna e transmissão vertical de *T.gondii* em gestante com imunidade prévia. Para testar a hipótese de reinfecção por genótipo diferente daquele da infecção primária, os autores demonstraram em modelo experimental murino que a imunidade adquirida pela infecção primária com cepas europeias não protege o hospedeiro contra a reinfecção por cepas atípicas, comprovando a possibilidade de transmissão congênita de *T.gondii* mesmo em gestantes previamente infectadas.

Além dos relatos de reinfecção em gestantes, há descrição na literatura da ocorrência de reinfecção em três pacientes de uma mesma família, previamente infectados pelo *T. gondii*. Estes indivíduos apresentaram aumento simultâneo dos níveis de IgG e linfadenopatia. Uma reativação concomitante da enfermidade foi considerada pouco

provável porque a toxoplasmose aguda ocorreu em dois outros integrantes da mesma família na mesma época ¹⁹⁶.

O estabelecimento de uma imunidade efetiva ou proteção na toxoplasmose depende da determinação do tipo de imunidade obtida em modelos de reinfecção. Em áreas de alta transmissão, como o Brasil, este fenômeno pode ocorrer com frequência e justificar achados menos comuns da toxoplasmose, como o comprometimento ocular e a reativação ou reinfecção em pacientes com AIDS. A abordagem de infecção experimental sequencial permite reproduzir modelos e identificar mais claramente os passos e eventos que resultam em risco de reinfecção, permitindo uma melhor compreensão de eventuais abordagens terapêuticas ou vacinais na toxoplasmose.

Propomos, no presente estudo, estabelecer modelos de infecção sequencial com cepas de *T.gondii* de diferentes genótipos e virulências para avaliar a resposta protetora induzida pela diversidade genotípica do agente. Optamos por modelos de infecção com cepas pertencentes aos três genótipos clonais de *T.gondii*, identificados globalmente, já que os estudos descritos na literatura estão restritos a modelos de reinfecção com cepas recombinantes, ou com apenas um dos tipos clonais, gerando dados limitados a um determinado genótipo, sobretudo do tipo I ou II, com escassez de informações sobre as cepas do tipo III. Além disso, os estudos relatados, até o momento, restringem-se à utilização de cepas do genótipo II na infecção primária dos animais, com desafio subsequente com cepas do mesmo genótipo, ou dos genótipos I e III, com ausência de informações sobre a imunidade induzida pela infecção primária por cepas do tipo III, que correspondem ao genótipo de maior frequência e distribuição mundial. Assim, procuramos explorar todos os modelos de infecção sequencial com cepas clonais dos tipos I, II e III, buscando dados mais consistentes e abrangentes para compreensão dos seguintes

questionamentos: (i) A infecção primária por um genótipo de *T.gondii* é capaz de proteger o hospedeiro da reinfecção por genótipo distinto? (ii) A imunidade induzida pela infecção primária pode prevenir a progressão da infecção causada pela cepa secundária, impedindo doença aguda e mortalidade dos animais? (iii) A imunidade da infecção primária previne a colonização do cérebro por cistos teciduais da cepa secundária?

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a reinfecção de camundongos Balb/c com cepas clonais de *T. gondii* de diferentes genótipos e virulências a partir de modelos experimentais de infecção sequencial com as cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III).

3.2 Específicos

- a) Avaliar se a imunidade induzida pela infecção primária por *T.gondii* é capaz de proteger o hospedeiro da reinfecção por cepa de genótipo distinto a partir da detecção de anticorpos IgG cepa – específicos por ELISA utilizando peptídeos sintéticos;
- b) Avaliar se a imunidade induzida pela infecção primária pode prevenir a progressão da infecção causada pela cepa secundária, impedindo doença aguda e mortalidade dos animais;
- c) Avaliar se a imunidade da infecção primária previne a colonização do cérebro dos animais por cistos teciduais da cepa secundária a partir da determinação da cepa prevalente no cérebro de camundongos Balb/c pela reação de *nested* PCR para detecção de alelos variantes dos genes SAG1, 5' 3' SAG2, alt.SAG2, c22-8, c29-2, L358, PK1, BTUB, GRA6, SAG3 e Apico e pela quantificação da carga parasitária pela reação de PCR em tempo Real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para desenvolvimento de modelos experimentais de infecção sequencial por cepas geneticamente distintas de *T.gondii* foram utilizados camundongos Balb/c isogênicos, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina - USP. De acordo com Suzuki²⁰⁵, esta linhagem de camundongo é ideal para estudos de infecção crônica por *T.gondii*, já que estes animais são geneticamente resistentes ao *Toxoplasma*, estabelecendo uma infecção crônica latente semelhante à infecção humana em indivíduos imunocompetentes. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas, com ar estéril e ventilação forçada, recebendo água e ração comercial *ad libitum*, sendo alojados em gaiolas de plástico contendo maravalha de pinho autoclavada. A manipulação dos animais foi conduzida de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (protocolo CPE-IMT/181).

4.2 Parasitas

4.2.1 Cepa RH

A cepa RH, tipo I (virulenta), foi mantida no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por meio de sucessivas passagens com intervalos de 3 a 4 dias, em camundongos Balb/c isogênicos, pesando em torno de 20 g, e com idade variando entre 30 e 60 dias. Os animais previamente infectados foram submetidos à eutanásia por narcose com CO₂ e o peritônio lavado com 5 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2 (PBS) estéril. A suspensão parasitária foi

filtrada em membrana de policarbonato de 3µm (Milipore®) e, em seguida, os taquizoítos foram quantificados em câmara de Neubauer e diluídos apropriadamente em PBS para que cada animal recebesse 10^2 taquizoítos por inóculo intraperitoneal de acordo com o protocolo descrito por Djurkovic-Djakovic *et al.*¹⁹⁷.

4.2.2 Cepas ME 49 e VEG

As cepas ME 49, genótipo II (não virulenta) e VEG, genótipo III (virulência intermediária), foram mantidas no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, através de sucessivas passagens com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos Balb/c isogênicos. Os animais infectados foram submetidos à eutanásia por narcose com CO₂ e os cérebros macerados em PBS. Uma alíquota da suspensão cerebral de cada cepa foi examinada para quantificação do número de cistos em microscopia óptica convencional e diluída adequadamente em PBS para que cada animal recebesse 10 cistos por via oral da respectiva cepa.

4.3 Preparação e quantificação de inóculos

Para infecção ou desafio dos animais foram utilizados cistos de *T. gondii* obtidos de cérebros de camundongos Balb/c cronicamente infectados com a cepa ME49 ou VEG de acordo com o protocolo descrito no item anterior, sendo que cada animal recebeu 10 cistos por via oral. Para a cepa RH de *T. gondii*, foram utilizados taquizoítos obtidos do líquido peritoneal de camundongos Balb/c previamente infectados como descrito no item 4.2.1, sendo que cada animal recebeu 10^2 taquizoitos por via intraperitoneal.

4.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi baseado na quantificação e identificação de parasitas no cérebro de camundongos Balb/c após 30 e 60 dias de infecção. Grupos de 10 camundongos foram, inicialmente, infectados por via oral com 10 cistos de *T.gondii*, provenientes de animais em infecção crônica com uma das linhagens (ME49 e VEG), ou 10^2 taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) por via intraperitoneal. Este número experimental permitiu que cada grupo fosse finalizado com pelo menos sete animais, estatisticamente significativo para o tipo de estudo, considerando a longa duração do experimento e eventuais mortalidades induzidas pela infecção. Após 30 dias, os grupos experimentais foram desafiados com número equivalente de cistos ou taquizoitos de cepas heterólogas, sendo mantidos grupos com infecção isolada por cada cepa, totalizando nove grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1 – Delineamento experimental.

GRUPOS	CEPA DA INFECCÃO PRIMÁRIA	CEPA DO DESAFIO	ÉPOCA DO DESAFIO	ÉPOCA DA EUTANÁSIA
1	ME49	-	-	30 dias
2	ME49	-	-	60 dias
3	ME49	VEG	30 dias	60 dias
4	ME49	RH	30 dias	60 dias
5	RH	-	-	30 dias
6	VEG	-	-	30 dias
7	VEG	-	-	60 dias
8	VEG	ME49	30 dias	60 dias
9	VEG	RH	30 dias	60 dias

Foram coletadas amostras quinzenais de sangue da cauda dos camundongos para avaliação sorológica da infecção por ELISA. Após o período de estudo, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras de cérebro foram retiradas e mantidas congeladas à - 20 °C até o momento da extração e purificação do DNA para realização da PCR em tempo real e *nested* PCR.

4.5 Extração e purificação do DNA para PCR

O DNA das amostras de cérebro de camundongos infectados com as cepas ME 49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) e de amostras de lavado peritoneal de camundongos infectados com a cepa RH (Tipo I) foram extraídos com kit comercial de extração QIAamp DNA (Qiagen®) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O DNA de cada amostra foi suspenso em 100 uL de TE e armazenado a - 20 °C até a utilização na PCR em tempo real e *nested* PCR. A quantificação do DNA extraído foi realizada no equipamento NanoDrop (Thermo Fisher Scientific®).

4.6 Determinação do limite de detecção da PCR em tempo real (qPCR)

Para determinar o limite de detecção da reação de qPCR foi realizada uma curva padrão com diluições seriadas de DNA extraído de taquizoítos da cepa RH de *T.gondii*, provenientes do lavado peritoneal de camundongos Balb/c previamente infectados. Os pontos da curva variaram entre concentrações de 10^6 a 10^1 taquizoítos/mL. Os “*cycle threshold*” (CT) obtidos foram plotados em relação às diferentes concentrações de parasitas e o número de parasitas foi calculado pelo valor do CT, fornecido pela equação de regressão linear, $y = ax + b$, onde: $y = CT$; $a =$ inclinação da curva (*slope*); $x =$ número

de parasitas; b = intercepção do eixo y , obtendo-se, assim, a curva padrão. Deste modo, foi possível estimar o número de parasitas presentes em cada amostra.

4.7 Quantificação por PCR em tempo real da carga parasitária em tecido cerebral

A carga parasitária presente no cérebro dos animais infectados foi quantificada por PCR em tempo real (qPCR), utilizando-se o aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®). As reações foram realizadas com um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de SYBR Green Mix (Invitrogen®), 1 µL de cada primer (sense: GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG) e (anti-sense: TTCTCGCCTCATTTCTGGGTCTAC) específico para o gene B1 na concentração de 10 µM; 5 µL de DNA (100 ng) e 6,5 µL de água ultrapura estéril. As amplificações foram realizadas com 2 controles negativos (água ultrapura e DNA de tecido cerebral de camundongos negativos para *T.gondii*) e um controle positivo (DNA extraído da cepa RH de *T.gondii*). As amplificações foram realizadas com uma temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, 10 minutos a 95°C e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 60°C por 1 minuto. Todas as amostras foram testadas em triplicatas.

4.8 Caracterização genotípica das cepas presentes no tecido cerebral de camundongos BALB/c após infecção sequencial com diferentes linhagens de *T.gondii*

4.8.1 Caracterização por *nested* PCR RFLP

Para determinação dos genótipos de *T.gondii* foram utilizados 11 marcadores (SAG1, 5' 3' SAG2, alt.SAG2, c22-8, c29-2, L358, PK1, BTUB, GRA6, SAG3 e Apico)

capazes de distinguir as três linhagens clonais (Tipo I, II e III) após amplificação do DNA alvo e tratamento com enzimas de restrição^{110, 198, 199}.

As sequências de DNA alvo foram, primeiramente, amplificadas em dois multiplex PCR, utilizando *primers* externos para todos os marcadores (multiplex 1: SAG1, 5' 3' SAG2, SAG3, BTUB e GRA6 e multiplex 2: alt.SAG2, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico), seguido de *nested* PCR para cada marcador, individualmente, utilizando primers internos, conforme descrito previamente^(110, 198, 199). Os detalhes sobre os marcadores moleculares, *primers* (PCR e *nested* PCR) e enzimas de restrição que foram utilizadas estão presentes no Quadro 1

Quadro 1 - Relação dos marcadores moleculares e enzimas de restrição do PCR e *nested* – PCR^{110, 198, 199}.

Marcador	Primer (PCR)	Primer (nested PCR)	Enzimas de restrição
C22-8	c 22-8F:TGATGCATCCATGCGTTTAT c 22-8R:CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	C 22-8F:TCTCTCTACGTGGACGCC C 22-8R:AGGTGCTTGGATATTCGC	<i>BsmAI</i> <i>MbolI</i>
C29-2	c 29-2F:ACCCACTGAGCGAAAAGAAA c 29-2R:AGGGTCTCTTGCGCATACAT	C 29-2F:AGTTCTGCAGAGTGTGCG C 29-2R:TGTCTAGGAAAGAGGCGC	<i>HpyCH4IV</i> <i>RsaI</i>
L358	L358-F:TCTCTCGACTTCGCTCTTC L358-R:GCAATTTCTCGAAGACAGG	L358-F:AGGAGGCGTAGCGCAAGT L358-R:CCCTCTGGCTGCAGTGCT	<i>HaeIII</i> <i>NlaIII</i>
PK1	PK1-F:GAAAGCTGTCCACCTGAAA PK1-R:AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	PK1-F:CGCAAAGGGAGACAATCAGT PK1-R:TCATCGCTGAATCTCATTGC	<i>AvaI</i> <i>RsaI</i>
SAG1	SAG1-F:GTTCTAACCACGCACCCTGAG SAG1-R:AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	SAG1-F:CAATGTGCACCTGTAGGAAGC SAG1-R:GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	<i>HaeII</i> <i>Sau96I</i>
SAG2a	SAG2Fa:ACCCATCTGCGAAGAAAACG SAG2Ra:ATTCGACCAGCGGGAGCAC	SAG2Fa:ACCCATCTGCGAAGAAAACG SAG2Ra:ATTCGACCAGCGGGAGCAC	<i>HinfI</i> <i>TaqI</i>
BTUB	BTUB-F:TCCAAAATGAGAGAAATCGT BTUB-R:AAATTGAAATGACGGAAGAA	BTUB-F:GAGGTCATCTCGGACGAACA BTUB-R:TTGTAGGAACACCCGGACGC	<i>BsiEI</i> <i>TaqI</i>
GRA6	GRA6F:ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GRA6R:GCACCTTCGCTTGTTGTT	GRA6F:TTTCCGAGCAGGTGACCT GRA6R:TCGCCGAAGAGTTGACATAG	<i>MseI</i>
SAG3	SAG3F:TCTGTGCGGTGTTCACTCA SAG3R:CACAAGGAGACCGAGAAGGA	SAG3F:CAACTCTCACCATTCCACCC SAG3R:GCGCGTTGTTAGACAAGACA	<i>NciI</i>
Apico	TGG TTT TAA CCC TAG ATT GTG G AAA CGG AAT TAA TGA GAT TTG AA	ApicoF:TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT ApicoR:GGGATTGGAACCTTGATA	<i>AflII</i> <i>DdeI</i>
5'SAG2	SAG2.F4:GCTACCTCGAACAGGAACAC SAG2.R4:GCATCAACAGTCTTCGTTGC	SAG2.F:GAAATGTTTCAGGTTGCTGC SAG2.R2:GCAAGAGCGAACTTGAACAC	<i>Sau3AI</i>
3'SAG2	SAG2.F3:TCTGTTCTCCGAAGTACTCC SAG2.R3:TCAAAGCGTGCAATATCGC	SAG2.F2:ATTCTCATGCCTCCGCTTC SAG2.R:AACGTTTCACGAAGGCACAC	<i>HhaI</i>

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25 µL, contendo 17,6 µL de água ultrapura autoclavada, 2,5 µL de tampão de reação 10X (KCL 50Mm; Tris-HCl 10Mm; pH 9,0), 2,0 µL da mistura de dNTPs (2,5 mM), 0,15 µL da mistura de primers externos sense (16,7 µM), 0,15 µL da mistura de primers externos *anti-sense* (16,7 µM), 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,1µL de *Taq* DNA polimerase Platinum[®], Invitrogen[™] (5 U/µL) e 1,5 µL da amostra de DNA.

Para a *nested* PCR, o produto amplificado da PCR foi diluído 1:2 em água ultrapura autoclavada e, em seguida, foi utilizado o mesmo protocolo de reação descrito acima, substituindo-se os primers externos pelos primers internos (50 µM). Nesta segunda etapa, a PCR foi realizada, individualmente, para cada marcador e não como multiplex. Os ciclos que foram utilizados estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Ciclos empregados nas reações de PCR e *nested*PCR^{110, 198, 199}.

ETAPAS	PCR	<i>Nested</i> PCR
1.Desnaturação inicial	95°C por 4'	95°C por 4'
2.Desnaturação	94°C por 30''	94°C por 30''
3.Hibridização	55°C por 30''	60°C por 1'
4. Extensão	72°C por 1' e 30''	72°C por 2'
Ciclos (etapas 2 a 4)	25 ciclos	35 ciclos

Para investigar o padrão de RFLP de cada amostra, 3µL do produto da *nested* PCR foi adicionado a 17µL da solução de digestão, contendo tampão NE (1X),

0,1mg/mL de BSA e uma unidade de cada enzima de restrição. As amostras foram incubadas na temperatura indicada pelo fabricante como ideal para cada enzima ¹⁹⁹. Os parâmetros das reações de RFLP estão detalhados no Quadro 3.

Quadro 3 - Marcadores genéticos e parâmetros da reação de RFLP¹⁹⁹.

Marcadores Genéticos	Enzimas de Restrição	Temperatura	Tempo (minutos)	Concentração Gel (%)
SAG1	Sau96I HaeII	37°C	60	2,5%
SAG36	NciI	37°C	60	2,5%
3'-SAG2	HhaI	37°C	60	2,5%
5'-SAG2	MboI	37°C	60	2,5%
BTUB	BsiEI TaqI	60°C	60	2,5%
GRA6	MseI	37°C	60	2,5%
New SAG2	Hinfl TaqI	37°C 65°C	30 30	2,5%
C22	BsmAI MboII	37°C 55°C	30 30	2,5%
L358	HaeIII NlaIII	37°C	60	2,5%
C29	HpyCH4IV RsaI	37°C	60	2,0%
PK1	RsaI AvaI	37°C	60	2,5%
Apico	AflII DdeI	37°C	60	3,0%

Após incubação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2 a 3% corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As bandas foram identificadas sob transiluminação com luz ultravioleta e a documentação foi realizada em sistema de digitalização de imagens (AlphaImager®EC, Alpha Innotech Corporation).

4.9 Avaliação da resposta imune humoral por ELISA

A evolução da infecção nos modelos experimentais foi avaliada por ELISA visando: (i) detecção de anticorpos IgG totais anti-*T.gondii* frente ao antígeno proteico solúvel de *T.gondii* (antígeno salino) e (ii) detecção de anticorpos IgG cepa - específicos pelo emprego de peptídeos sintéticos.

4.9.1 Preparação e quantificação do antígeno proteico solúvel de *T.gondii* (antígeno salino)

O antígeno salino de taquizoítos foi obtido por aprimoramento da metodologia descrita na literatura (200). Para obtenção de antígeno proteico solúvel de *T. gondii* foram utilizados 3×10^8 taquizoítos da cepa RH. A suspensão parasitária obtida através do lavado peritoneal de animais infectados, como descrito no item 4.2.1, foi purificada por filtração em membrana de policarbonato 5 µm (Millipore®) e centrifugada a 700g por 10 minutos a 4°C. O precipitado suspenso em 5 mL de água destilada foi submetido à sonicação (0.40 MHz, 4 Vdc) por 4 períodos de 30 segundos, em banho de gelo via sonicador de ponta Thornton®. Após certificação microscópica da lise total dos taquizoítos, foi acrescentado 5 mL de solução de NaCl 0,3M e a suspensão foi centrifugada a 10.000g a 4°C por 30 minutos, em centrífuga refrigerada Eppendorf 5403. A concentração proteica do antígeno solúvel foi

determinada no sobrenadante pelo método de Bradford utilizando γ -globulina humana como padrão(201) e o mesmo foi separado em alíquotas e mantido à - 70 °C até o momento de seu uso. Todas as reações foram realizadas com uma mesma partida de antígeno.

4.9.2 Peptídeos sintéticos cepa-específicos

Foram utilizados três peptídeos sintéticos correspondentes a epítomos das proteínas de grânulos densos GRA6 e GRA7 de *T. gondii* previamente descritos por Kong ⁽⁹⁷⁾ e Sousa ^(98, 99). O peptídeo denominado GRA6II (LHPGSVNEFDF) apresenta polimorfismo específico para cepas tipo II. O peptídeo GRA7I (LEQEVPESGEDGEDARQ) apresenta polimorfismo específico para cepas tipo I e o peptídeo GRA7III (PEHEVPESGEDREDARQ) apresenta polimorfismo específico para cepas do tipo III. Todos os peptídeos foram sintetizados pela Invitrogen[®], apresentando grau de pureza de 70% ⁹⁷⁻⁹⁹.

4.9.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

4.9.3.1 Detecção de anticorpos IgG totais anti - *T.gondii*

O ensaio foi baseado na metodologia descrita na literatura Venkatesan e Walklin,²⁰². Brevemente, placas de poliestireno de 96 poços para microtitulação, certificadas para alta ligação de proteínas (Costar[®]), foram sensibilizadas com 100 μ L/poço (10 μ g/mL) de antígeno proteico solúvel de *T. gondii*, suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5, por 20hs a 4°C em câmara úmida. A seguir, foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada, com PBS 0,02M pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 3% de solução de leite desnatado (Molico[®]) em PBST durante 1 hora em estufa a 37°C. Após

bloqueio e 3 lavagens com PBST, as amostras de soros (100 µL/poço), diluídas 1:100 em PBST e testadas em duplicata, foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após três novas lavagens, cada poço recebeu 100 µL de conjugado imunoenzimático anti - IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma®) e as placas foram mantidas por 1 hora a 37°C. Após lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5,8 contendo OPD 0,4mg/ml e H₂O₂ 0,03%, por 30 minutos em câmara escura, seguida de estabilização pela adição de HCl 4N. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS) a 492 nm.

O *cut off* da reação foi determinado por curva ROC, utilizando-se o programa Graph Pad Prism 5.0. Para construção da curva ROC foram utilizados soros de camundongos experimentalmente infectados pelas cepas ME49 e VEG, e soros de camundongos com sorologia negativa para *T.gondii*.

Os resultados da reação de ELISA foram expressos por índice de reatividade (IR), dividindo-se a média das duplicatas das densidades ópticas da amostra pelo valor do *cut off* da reação. O soro foi considerado positivo quando $IR \geq 1$.

4.9.3.2 Detecção de anticorpos IgG cepa - específicos

A resposta imune humoral cepa específica foi determinada por ELISA utilizando peptídeos sintéticos cepa - específicos. O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia preconizada por Sousa *et al.*¹⁰⁰, com pequenas modificações. Brevemente, placas de 96 poços revestidas com ligantes de aminas primárias (Immobilizier amino plates, Nunc®) foram sensibilizadas com 10 µg/mL de cada peptídeo (100 µL/poço) suspensos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 por 20hs a 4°C em câmara úmida. Após adsorção, as placas foram lavadas três vezes, por 5

minutos cada, com PBS 0,02M pH 7,2 contendo 0,3% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com 3% de BSA em PBST durante 1 hora em estufa a 37 °C. Após bloqueio e lavagem das placas com PBST, as amostras de soros, diluídas 1:50 (100 µL/poço) e testadas em duplicatas, foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Após três novas lavagens, cada poço recebeu 100 µL de conjugado anti - IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma[®]) na diluição de 1:10.000 e as placas foram mantidas por 1 hora a 37 °C. Após lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de solução citrato de sódio 0,05M pH 5,8 contendo OPD 0,4mg/ml e H₂O₂ 0,03%, por 30 minutos em câmara escura, seguida de estabilização pela adição de HCl 4N. A absorbância de cada poço foi determinada em leitor automático de microplacas (Labsystems Multiskan MS) a 492 nm

O *cut off* da reação foi determinado por curva ROC, seguindo os mesmos critérios descritos no item anterior para a reação de ELISA com antígeno proteico solúvel de *T.gondii*.

Os resultados da reação de ELISA com peptídeos sintéticos também foram expressos por índice de reatividade (IR), dividindo-se a média das duplicatas das densidades ópticas da amostra pelo valor do *cut off* da reação. O soro foi considerado positivo quando $IR \geq 1$.

4.10 Análise estatística

A comparação de dados numéricos foi feita por ANOVA, após verificação da homogeneidade de variâncias. Na sua ausência, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal - Wallis. A comparação entre frequência de eventos foi realizada através do teste de χ^2 , utilizando-se ocasionalmente o teste de Fisher para tabelas 2x2. Amostras foram

consideradas com diferença significativa quando a probabilidade de igualdade entre elas foi menor que 5% em todos os testes estudados ($p < 0.05$). Todos os testes foram feitos utilizando-se o conjunto GraphPadPrism 5.0.

5 RESULTADOS

Para facilitar a descrição e análise dos eventos, optamos por apresentar os resultados de acordo com os objetivos propostos, a saber: (i) A infecção primária por um genótipo de *T.gondii* é capaz de proteger o hospedeiro da reinfecção por genótipo distinto? (ii) A imunidade induzida pela infecção primária pode prevenir a progressão da infecção causada pela cepa secundária, impedindo doença aguda e mortalidade dos animais? (iii) A imunidade da infecção primária previne a colonização do cérebro por cistos teciduais da cepa secundária?

A infecção primária por um genótipo de T.gondii é capaz de proteger o hospedeiro da reinfecção por genótipo distinto?

Para avaliação do efeito protetor de uma infecção prévia por *T.gondii* na reinfecção do hospedeiro por uma cepa distinta do parasita, foram realizados modelos de infecção experimental em camundongos Balb/c, utilizando cepas de *T.gondii* de diferentes genótipos e virulências, como a cepa RH do tipo I (virulenta), a cepa ME49 do tipo II (não virulenta) e a cepa VEG do tipo III (virulência intermediária) como descrito em métodos. O delineamento dos grupos experimentais foi baseado na presença de modelos de infecções sequenciais, utilizando cepas de genótipos e virulências distintas nas infecções primária e secundária. Concomitantemente, modelos de infecções isoladas com cada uma das cepas foram mantidos como controles. A evolução das infecções foi avaliada pela resposta imune humoral frente ao antígeno solúvel de *T.gondii* e peptídeos sintéticos cepa-específicos utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA). Além disso, foi realizada a quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real e a genotipagem por *nested* PCR-RFLP dos cistos presentes em amostras de tecido cerebral.

Como podemos observar na figura 4A, a avaliação da resposta imune humoral nos grupos de infecção isolada pelas cepas ME49 e VEG mostrou que a cepa VEG induziu maior resposta imune humoral, detectada pela presença de anticorpos IgG frente ao extrato proteico solúvel de *T.gondii*, quando comparada com a cepa ME49 ($p < 0,0001$), tanto no grupo com 30 dias de infecção como no grupo com 60 dias. Para ambas as cepas, a resposta imune humoral frente ao extrato proteico solúvel de *T.gondii* foi maior no grupo com 30 dias de infecção ($p < 0,0001$), mostrando uma ligeira queda nos níveis de anticorpos após 60 dias de infecção.

Figura 4 - Resultados do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em modelos de infecção experimental pelas cepas ME49 e VEG. A: ELISA com antígeno proteico solúvel de *T.gondii*. B: ELISA com peptídeos sintéticos para detecção de anticorpos específicos para cepa ME49. C: ELISA com peptídeos sintéticos para detecção de anticorpos específicos para cepa VEG. *** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,001$.

A imunidade humoral contra peptídeos sintéticos cepa-específicos para a cepa ME49 (Fig. 4B) apresentou maiores níveis de anticorpos contra o peptídeo GRA6II, específico para cepas do tipo II, em relação ao peptídeo GRA7III, tanto no 30º dpi ($p < 0,05$) como no 60º dpi ($p < 0,001$). Por outro lado, a infecção pela cepa VEG (Fig. 4C) apresentou maiores níveis de anticorpos contra o peptídeo GRA7III, específico para cepas do tipo III, em relação ao peptídeo GRA6II, tanto no 30º dpi ($p < 0,0001$) como no 60º dpi ($p < 0,001$). Cabe ressaltar que, a detecção dos anticorpos de cepa diferente foram inferiores ao *cut-off* da reação ($IR \leq 1$), demonstrando que a resposta imune humoral tem características cepa específicas, com resposta apenas para os epítomos específicos da cepa infectante, mesmo na presença de uma resposta humoral geral contra epítomos comuns do agente, demonstrada pelo ELISA com extrato proteico solúvel.

Não foram detectados anticorpos IgG anti-*T.gondii* nos camundongos Balb/c infectados com a cepa RH. Este resultado já era esperado, pois todos os animais morreram precocemente, nos primeiros cinco dias de infecção, devido à alta virulência da cepa, impossibilitando a detecção de anticorpos específicos.

Interessante notar que além de induzir uma maior resposta imune humoral, a infecção pela cepa VEG também foi responsável por maior carga parasitária no cérebro dos animais experimentais quando comparada à cepa ME49 ($p < 0,0001$) para o grupo com 60 dias de infecção (Figura 5). Na figura 5 podemos verificar, também, que a carga parasitária da infecção pela cepa VEG no grupo com 60 dias de infecção foi significativamente maior que a carga parasitária encontrada no grupo com 30 dias de infecção ($p < 0,001$).

Figura 5 - Determinação da carga parasitária por PCR em tempo real em amostras de tecido cerebral provenientes de modelos experimentais de infecção por cepas geneticamente distintas de *T.gondii*. ***p<0,0001, **p<0,001 e *p<0,05.

Com relação à mortalidade dos animais não foram detectadas diferenças significativas entre a infecção pela cepa VEG e a infecção pela cepa ME49 em nenhum dos grupos experimentais com infecção isolada por estas cepas, porém, como já era esperada, a mortalidade para o grupo infectado com a cepa RH foi significativamente maior que o observado para as cepas ME49 e VEG ($p<0,0001$) devido à alta virulência da cepa (Figura 7).

Uma vez estabelecida a evolução da infecção individual para cada uma das cepas avaliadas, procuramos determinar se a infecção primária por uma destas cepas seria capaz de proteger o hospedeiro da reinfecção por uma cepa secundária distinta. Para isso, utilizamos modelos experimentais de infecção sequencial, alternando as cepas da infecção

primária e do desafio. Assim, avaliamos modelos experimentais de infecção primária pela cepa ME49 do tipo II, seguida de desafio com a cepa VEG do tipo III (grupo ME49+VEG), ou desafio com a cepa RH do tipo I (grupo ME49+RH). Da mesma forma, avaliamos a infecção primária pela cepa VEG do tipo III, seguida de desafio com a cepa ME49 do tipo II (grupo VEG+ME49), ou desafio com a cepa RH do tipo I (grupo VEG+RH), conforme protocolo detalhado em métodos.

A figura 6 apresenta os resultados do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii* frente ao extrato proteico solúvel de *T.gondii* e peptídeos sintéticos cepa-específicos para os diferentes grupos de infecção sequencial propostos, sendo que os dados correspondem aos resultados obtidos no 60º dia pós-infecção (dpi). É interessante notar que os três modelos apresentados na figura, tiveram um padrão de resposta semelhante, ou seja, em todos os grupos foi possível verificar por meio de anticorpos IgG cepa-específicos que os animais apresentaram anticorpos tanto para a cepa da infecção primária, como para a cepa secundária, já que os valores foram maiores que o *cut - off* da reação ($IR \geq 1$) para todos os peptídeos analisados. Estes dados demonstram que a imunidade induzida pela infecção primária não foi capaz de proteger o hospedeiro da infecção por uma cepa secundária distinta, já que os animais produziram anticorpos contra ambas as cepas.

Figura 6 - Resultados do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em modelos de infecção sequencial por cepas geneticamente distintas de *T.gondii*. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$.

Contudo, vale ressaltar que os níveis de anticorpos contra a cepa da infecção primária foram significativamente maiores que os níveis de IgG contra a cepa da infecção secundária para todos os modelos analisados. No grupo ME49+VEG, os níveis de anticorpos para o peptídeo GRA6II foram maiores em relação aos níveis de anticorpos para o peptídeo GRA7III ($p < 0,05$). Por outro lado, no grupo VEG+ME49, os níveis de anticorpos contra o peptídeo GRA7III foram maiores que os níveis de anticorpos para o peptídeo GRA6II ($p < 0,001$). Já para o grupo para o grupo VEG+RH, os níveis de anticorpos para o peptídeo GRA7III foram maiores que os níveis de anticorpos para o peptídeo GRA7I ($p < 0,0001$). Estes resultados sugerem um padrão de resposta anamnésica, ou seja, a infecção secundária estimulou a resposta imune de memória, levando à produção de maiores níveis de anticorpos contra antígenos da cepa primária, já conhecidos pelo

sistema imune em decorrência da infecção prévia pelo agente, porém devido às diferenças antigênicas das cepas, uma parcela dos anticorpos produzidos foi específica para a cepa secundária. Não foi possível avaliar a evolução da resposta imune humoral para o grupo ME49+RH, já que todos os animais vieram a óbito antes do 30º dia de infecção.

A imunidade induzida pela infecção primária pode prevenir a progressão da infecção causada pela cepa secundária, impedindo doença aguda e mortalidade dos animais?

Como podemos observar na figura 7, não houve diferença estatística significativa pelo teste Log-rank (Mantel Cox) usando Kaplan-Meier com relação à progressão da doença e mortalidade dos animais entre os grupos ME49+VEG, VEG+ME49 e VEG+RH, porém houve diferença estatística significativa destes grupos em relação ao grupo ME49+RH, já que todos os animais deste grupo morreram com menos de 30 dias de infecção. Estes dados sugerem que a infecção primária pela cepa VEG (tipo III) induz uma resposta imune mais efetiva, prevenindo a progressão da infecção secundária e mortalidade dos animais, quando comparada com a imunidade induzida na infecção primária pela cepa ME49 (tipo II).

Figura 7 - Resultados da porcentagem de animais sobreviventes para os diferentes grupos experimentais. *** $p < 0,0001$.

A imunidade da infecção primária previne a colonização do cérebro por cistos teciduais da cepa secundária?

Após verificarmos o efeito da imunidade induzida pela cepa primária no controle da progressão da infecção e mortalidade de animais reinfetados por cepa secundária distinta, avaliamos o papel da imunidade primária na prevenção da colonização do cérebro dos animais com cistos teciduais da cepa secundária. Para isso, realizamos a quantificação por PCR em tempo real da carga parasitária em amostras de cérebros de animais com 60 dias de infecção sequencial por cepas distintas de *T.gondii*.

Como podemos observar na figura 5, obtivemos uma maior carga parasitária no cérebro dos animais do grupo ME+VEG em relação aos animais do grupo VEG+ME49 ($p<0,05$), sugerindo que a infecção primária pela cepa ME49 não protege o hospedeiro da colonização do cérebro por cistos da cepa VEG utilizada no desafio. Para confirmarmos estes dados, realizamos *nested* PCR - RFLP com 11 marcadores genéticos visando a genotipagem dos cistos presentes nos cérebros destes animais. A genotipagem, utilizando diferentes marcadores, mostrou que os cérebros dos animais do grupo ME49+VEG foram colonizados por cistos de ambas as cepas, apresentando cistos tanto da infecção primária como da infecção secundária (Figuras 8, 9,10 e 11). Por outro lado, os animais do grupo VEG+ME49 apresentaram apenas cistos da cepa primária, mostrando que a cepa VEG induz uma resposta imune capaz de proteger o hospedeiro da colonização do cérebro por cistos da cepa secundária (Figuras 8, 9,10 e 11). Para o grupo VEG+RH foram detectados somente parasitas da cepa VEG. Não foi possível realizar a genotipagem do grupo ME49+RH, já que todos os animais morreram antes do término do experimento. Estes dados sugerem que a progressão da infecção secundária bem como a colonização do tecido cerebral por cistos desta cepa estão na dependência do genótipo da cepa da infecção primária. Desta forma, quando o hospedeiro é infectado primariamente por uma cepa do tipo III, a resposta imune induzida por esta infecção é capaz de protegê-lo da doença aguda, mortalidade e colonização do cérebro quando reinfestado por cepas do tipo II e do tipo I.

Figura 8 - Resultados do perfil dos fragmentos de restrição obtidos por *nested* PCR - RFLP para os marcadores SAG3 (A); L358 (B) e PK1 (C). (1): grupo ME49 (30° dpi); (2): grupo 49 (60° dpi); (3) grupo ME49 + VEG (60° dpi); (4): grupo VEG (30° dpi); (5): grupo VEG (60° dpi); (6): grupo VEG + ME49 (60° dpi) e (7): grupo VEG + RH (60° dpi).

Figura 9 - Resultados do perfil dos fragmentos de restrição obtidos por *nested* PCR - RFLP para os marcadores GRA6 (A); C29 (B) e C22 (C). (1): grupo ME49 (30º dpi); (2): grupo 49 (60º dpi); (3) grupo ME49 + VEG (60º dpi); (4): grupo VEG (30º dpi); (5): grupo VEG (60º dpi); (6): grupo VEG + ME49 (60º dpi) e (7): grupo VEG + RH (60º dpi).

Figura 10 - Resultados do perfil dos fragmentos de restrição obtidos por *nested* PCR - RFLP para os marcadores APICO (A); BTUB (B) e Novo SAG2 (C). (1): grupo ME49 (30° dpi); (2): grupo 49 (60° dpi); (3) grupo ME49 + VEG (60° dpi); (4): grupo VEG (30° dpi); (5): grupo VEG (60° dpi); (6): grupo VEG + ME49 (60° dpi) e (7): grupo VEG + RH (60° dpi).

Figura 11 - Resultados do perfil dos fragmentos de restrição obtidos por *nested* PCR - RFLP para os marcadores 3'SAG2 (A); 5' SAG2 (B) e SAG1 (C). (1): grupo ME49 (30° dpi); (2): grupo 49 (60° dpi); (3) grupo ME49 + VEG (60° dpi); (4): grupo VEG (30° dpi); (5): grupo VEG (60° dpi); (6): grupo VEG + ME49 (60° dpi) e (7): grupo VEG + RH (60° dpi).

6 DISCUSSÃO

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção pelo *Toxoplasma gondii* é considerada como indutora de uma imunidade ^{12, 202}. Entretanto, casos de toxoplasmose congênita, relatados em mulheres imunocompetentes em fase crônica de infecção, indicam a possibilidade de reinfecção em humanos ^{119, 167, 190-194}. Em modelos experimentais, a reinfecção por *T.gondii* já foi descrita em casos de exposição dos animais à cepa de genótipo clonal distinto ao da cepa primária ^{183, 186, 187}, e também, em casos de exposição à cepas recombinantes ^{184, 185, 188, 189}, porém os estudos experimentais decritos, até o momento, envolvendo genótipos clonais, restringem-se à utilização de cepas do genótipo II na infecção primária dos animais com desafio subsequente com cepas do mesmo genótipo ou dos genótipos I e III. Em nosso estudo, descrevemos vários modelos de infecção em camundongos Balb/c procurando explorar ao máximo as formas de reinfecção que o hospedeiro está exposto no ambiente. Para isso, desenvolvemos vários protocolos de infecção sequencial com cepas clonais dos genótipos I, II e III de *T.gondii*, abrangendo todas as possibilidades de exposição e reinfecção por cepas clonais.

Nossa abordagem metodológica utilizando modelos de infecção sequencial com cepas geneticamente distintas de *T.gondii* permitiu a avaliação do efeito da reinfecção em hospedeiros imunocompetentes, previamente infectados por *T.gondii*. Estes achados foram obtidos a partir da quantificação da carga parasitária, identificação de cistos cerebrais da cepa infectante e detecção da imunidade humoral cepa - específica. Nossos dados mostram que mesmo na presença de uma resposta imune humoral com produção de anticorpos específicos, camundongos previamente infectados podem desenvolver doença e morrer de toxoplasmose aguda quando reinfetados com uma cepa geneticamente diferente da cepa da infecção primária, já que dependendo do genótipo da cepa primária, a

resposta imune humoral produzida pode não ser capaz de prevenir a invasão e formação de cistos cerebrais da cepa reinfetante. Além disso, nossos resultados demonstram que duas cepas clonais de *T.gondii* com diferentes genótipos e virulências podem coexistir no cérebro de indivíduos imunocompetentes. Estes dados corroboram os resultados obtidos por Araújo *et al.*¹⁸³ que mostraram que camundongos infectados cronicamente pela cepa ME49 morreram de toxoplasmose aguda quando reinfetados com a cepa C56, ou com uma variante desta cepa, denominada R-C56, ambas virulentas para camundongos. Para distinguir as duas cepas, os autores utilizaram um método indireto, baseado na resistência das mesmas ao tratamento por atovaquone, já que a cepa C56 é sensível à droga e a sua variante, a cepa R-C56, é resistente. Dao *et al.*¹⁸⁶ também relataram resultados semelhantes ao utilizarem modelos de infecção experimental com uma cepa transfectada de *T.gondii* (Prugnialud β galactosidase, denominada de Pru β gal) que expressa β -galactosidase de *Escherichia coli*, sendo que a detecção da atividade enzimática nos parasitas permite a detecção simultânea direta de cistos teciduais de tipo selvagem não corados e cistos teciduais de Pru β gal transfectados corados em azul. A partir deste modelo, os autores verificaram que a infecção primária de camundongos OF1 com a cepa 76 K clonal de genótipo II de *T. gondii* protege totalmente os camundongos contra a produção de cistos teciduais após a reinfecção com a cepa Pru β gal de *T. gondii*, também do genótipo II. Por outro lado, a infecção primária com a cepa Pru β gal de *T. gondii*, não impede a formação de cistos nos tecidos após a reinfecção com a cepa Ned, que pertence ao genótipo III de *T. gondii*, mostrando que as diferenças genéticas das cepas entre duas infecções sucessivas têm de fato um efeito importante sobre o destino da reinfecção¹⁸³.

Em nosso estudo, obtivemos resultados semelhantes com o modelo de infecção primária pela cepa ME49 (genótipo II) e infecção secundária pela cepa VEG (genótipo III), mostrando que a infecção prévia pelo genótipo II não foi capaz de proteger o hospedeiro da

colonização por cistos cerebrais da cepa secundária. Esses achados enfatizam a importância da suscetibilidade dos seres humanos aos vários genótipos de *T. gondii*, já que esta questão poderia influenciar diretamente a reinfecção e progressão da doença ¹⁸⁶. Este fato poderia explicar os relatos da literatura sobre reinfecção por *T. gondii*, principalmente em gestantes com risco de exposição durante a gestação, independentemente de apresentarem imunidade por infecção prévia por determinado genótipo ^{119, 190-195}.

Na literatura já foram descritos também estudos de infecção sequencial utilizando infecção primária por cepa de genótipo II e desafio com cepa virulenta do genótipo I, demonstrando dados semelhantes aos descritos anteriormente para modelos de infecção secundária com genótipo III. Dzitko *et al.*¹⁸⁷ demonstraram que a infecção primária pela cepa DX (genótipo II) induziu uma forte imunidade adaptativa que impediu a mortalidade de camundongos Balb/c após infecção secundária com dose letal da cepa BK (genótipo I), altamente virulenta. Contudo, a imunidade induzida pela cepa DX não impediu a reinfecção dos animais pela cepa secundária, levando à parasitemia e forte resposta imune sorológica com produção de anticorpos específicos para a cepa BK. Esses anticorpos foram detectados por imunoblotting a partir de bandas específicas para um isotipo novo dirigido contra a fração do antígeno de 64 KDa que nunca havia sido visualizada em animais infectados com a cepa DX utilizada na infecção primária. De acordo com esses achados, os autores sugerem que o ELISA combinado com o imunoblotting poderia permitir o reconhecimento de casos de reinfecção em indivíduos imunocompetentes.

Por outro lado, um estudo experimental de toxoplasmose congênita em *Calomys callosus*, utilizando infecções com cepas clonais, mostrou que fêmeas cronicamente infectadas pela cepa ME49 (tipo II) de baixa virulência, quando desafiadas durante a gestação com a cepa RH (tipo I), altamente virulenta, não apresentaram reinfecção pela

cepa secundária, mostrando que a infecção primária anterior à gestação ocasionou uma imunidade duradoura, prevenindo a reinfecção ¹⁷⁹.

Em nosso trabalho, também avaliamos a reinfecção dos animais pela pesquisa sorológica, porém utilizamos a detecção de anticorpos pelo emprego de peptídeos sintéticos cepa-específicos, que nos permitiu identificar com precisão a especificidade da resposta imune humoral dos animais. Em nossos modelos de infecção sequencial evidenciamos uma resposta imune humoral tanto para a cepa da infecção primária como para a cepa da infecção secundária, corroborando com os dados descritos por Dzitko *et al.*¹⁸⁷ que detectaram por ELISA a presença de anticorpos IgG específicos, denominados de isotipos antigos, dirigidos contra a cepa da infecção primária devido à reativação sorológica e um isotipo novo produzido especificamente contra a cepa secundária.

Cabe ressaltar que os dados de mortalidade referente à infecção primária pela cepa DX, seguida pela infecção secundária pela cepa BK, descritos por Dzitko *et al.*¹⁸⁷, diferem dos achados obtidos no nosso modelo de infecção sequencial com as cepas ME 49 (genótipo II) e RH (genótipo I) que são equivalentes ao modelo proposto por estes autores. Nossos dados mostram que a imunidade induzida pela infecção primária pela cepa ME49 não preveniu a reinfecção pela cepa RH e mortalidade dos animais. Esta divergência nos resultados pode ser atribuída à concentração de taquizoítos no inóculo da infecção secundária, já que em nosso trabalho utilizamos uma concentração 10 vezes maior de parasitas (10^2 taquizoítos).

Estudos de reinfecção experimental de camundongos Balb/c com diferentes cepas recombinantes do tipo I/III de *T.gondii* também demonstraram que a imunidade induzida pela infecção primária não foi capaz de proteger o hospedeiro contra a reinfecção por cepa de genótipo distinto. O trabalho pioneiro que demonstrou a possibilidade de reinfecção experimental com cepas recombinantes de *T.gondii* foi descrito por Brandão *et al.*¹⁸⁵ que

monstraram que camundongos Balb/c foram suscetíveis à reinfecção com diferentes cepas recombinantes e que a suscetibilidade estava correlacionada com o aumento da produção de IL10 de *T.gondii*. Neste trabalho, os autores demonstraram que a infecção primária de camundongos Balb/c pela cepa não virulenta D8 não protegeu o hospedeiro da reinfecção pelas cepas virulentas recombinantes EGS e CH3 isoladas no Brasil. Estes achados demonstram que a resposta imune induzida pela infecção primária pode não ser suficiente para prevenir doença e mortalidade após reinfecção, ressaltando a importância do genótipo do parasita na patogênese da toxoplasmose. Além disso, estes autores verificaram que a ocorrência de reinfecção variou em função da cepa utilizada no desafio e da resposta imune do hospedeiro. Quando o desafio foi realizado no 45º dpi, tanto para a cepa EGS, como para a cepa CH3, houve a formação de cistos da cepa secundária no tecido cerebral dos animais. Contudo, quando os animais foram desafiados tardiamente (180 dpi) foram observados cistos cerebrais somente da cepa EGS. Isto ocorreu porque a resposta imune foi menos exacerbada em camundongos desafiados após 180 dpi, favorecendo a reinfecção por *T.gondii*, quando comparado ao desafio realizado no 45º dpi. A quantidade significativamente maior de IL10 em camundongos Balb/c no 180º dpi pela cepa D8 foi um dos fatores que, provavelmente, favoreceram a maior mortalidade observada após o desafio com as cepas EGS e CH3. Isso ocorre porque a IL10 estaria agindo na inibição de eventos iniciais da inflamação que são cruciais para proteção do hospedeiro durante a infecção por *T.gondii*.

Além do genótipo da cepa infectante, outra questão importante que deve ser avaliada em estudos de reinfecção é o efeito da suscetibilidade do hospedeiro ao *T.gondii*. Estudo utilizando camundongos das linhagens Balb/c e C57Bl/6 demonstrou que a ocorrência de reinfecção experimental por *T. gondii* variou em função da cepa do parasita e da linhagem do camundongo. Essas observações sugerem que a reinfecção está

relacionada não apenas com o genótipo de *T.gondii*, mas também com a resposta imune do hospedeiro, que depende de fatores genéticos relacionados à linhagem do animal ¹⁸⁴. Neste estudo, a infecção primária pela cepa D8, não virulenta, não preveniu a reinfecção de camundongos C57Bl/6 pelas cepas recombinantes EGS e CH3 virulentas. Por outro lado, camundongos Balb/c, geneticamente mais resistentes, apresentaram reinfecção apenas pela cepa EGS. Este efeito pode ser atribuído aos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I (haplótipo H-2) que exercem influência considerável no resultado da toxoplasmose experimental em camundongos ^{169, 204}. Camundongos Balb/c exibem o alelo d, que confere resistência à encefalite causada pela infecção por *T. gondii*, já camundongos C57BL/ 6 têm o alelo b, que está associado à suscetibilidade ²⁰⁵.

Em relação à suscetibilidade do hospedeiro, foi demonstrado, também, que a imunossupressão com ciclofosfamida favorece reinfecção com cepas recombinantes virulentas de *T.gondii* ¹⁸⁹. Este estudo comprovou que a suscetibilidade de camundongos Balb/c à reinfecção por *T.gondii* está relacionada com as diferenças genéticas entre as cepas utilizadas nas infecções primária e secundária e que a alteração da integridade imune do hospedeiro por ciclofosfamida, droga utilizada no tratamento de vários tipos de câncer, doenças auto-imunes, imunopatias não-específicas e rejeição de transplantes, provavelmente, compromete a proteção estabelecida pela infecção primária. Neste estudo, os autores demonstraram que a infecção primária pela cepa D8, não virulenta, confere maior proteção contra a infecção secundária pelas cepas recombinantes virulentas CH3 e EGS, quando comparada com a infecção primária pela cepa ME49, tanto em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida como em camundongos imunocompetentes, corroborando com nossos achados, que demonstraram em modelos de infecção sequencial, que a infecção primária pela cepa ME49 de genótipo II, conferiu menor

proteção à reinfecção pelas cepas RH e VEG, quando comparada à infecção primária pela cepa VEG de genótipo III.

Cabe ressaltar, ainda, que o processo de reinfecção pode estar associado à virulência da cepa utilizada no desafio, já que taquizoítos de cepas virulentas têm uma maior capacidade de invadir as células do hospedeiro, atravessar barreiras biológicas e multiplicar-se no meio intracelular ¹⁴¹. Silva *et al.* ²⁰¹² demonstraram que a imunidade adquirida contra cepas européias pode não proteger o hospedeiro contra a reinfecção por cepas virulentas recombinantes, mostrando que a infecção secundária pela cepa EGS (dose letal 100% = 1 taquizoíto) foi responsável por maiores taxas de reinfecção e mortalidade de camundongos previamente infectados, em comparação com a cepa CH3 (dose letal ≥ 10 taquizoítos) ^{159, 189}.

Um estudo francês de toxoplasmose congênita disseminada em um recém-nascido, cuja mãe apresentava imunidade contra *T.gondii* antes da concepção, também demonstrou a possibilidade de reinfecção de hospedeiro imunocompetente por cepas altamente virulentas ¹¹⁹. Neste estudo, a cepa responsável pela reinfecção materna foi isolada do sangue periférico do recém-nascido e genotipada por marcadores de microssatélites, evidenciando um genótipo atípico, incomum na Europa, mas descrito com frequência na América do Sul. Uma questão interessante deste estudo é que a infecção experimental de camundongos com a cepa isolada do recém – nascido, comprovou que a imunidade adquirida contra as cepas européias de *Toxoplasma* pode não proteger o hospedeiro da reinfecção por cepas atípicas adquiridas fora da Europa como, por exemplo, em viagens à América do Sul, ou pela ingestão de carne importada de países sul americanos. A fonte provável de reinfecção materna pela cepa atípica, neste caso, foi a ingestão de carne mal passada de cavalo importada da América do Sul. Na França e, provavelmente, em outros

locais da Europa, toxoplasmose congênita após reinfecção materna durante a gravidez é excepcional, mas diante dos achados, os autores sugerem que gestantes europeias que foram imunizadas por infecção prévia com cepas do genótipo II de *T.gondii*, predominante em humanos e no ambiente na Europa ^{150, 206}, quando viajam para áreas tropicais, ou consomem carne importada durante a gestação, estão em risco de reinfecção por cepas atípicas. Por outro lado, mulheres nascidas na África, ou na América do Sul, provavelmente, imunizadas contra cepas atípicas de *Toxoplasma* antes da concepção, também estariam em risco de reinfecção por uma cepa do tipo II, sugerindo que a presença de anticorpos IgG residuais específicos não é sempre sinônimo de proteção contra uma nova infecção por *Toxoplasma*.

Cabe ressaltar que embora não existam provas para uma correlação entre cepas atípicas e toxoplasmose grave, casos disseminados em pacientes imunocompetentes na Guiana Francesa e Suriname ^{28, 156} e toxoplasmose congênita ¹⁵⁰ são mais frequentemente associados a genótipos atípicos de *T.gondii*.

E por fim, é preciso salientar a importância dos estudos de infecções por diferentes linhagens de *T.gondii* em um hospedeiro. Os estudos de reinfecção são extremamente importantes na toxoplasmose congênita devido à possibilidade de mulheres cronicamente infectadas e, teoricamente protegidas, transmitirem a doença ao feto quando reinfetadas durante a gestação ^{119, 190-195}. Outro aspecto importante é a toxoplasmose ocular em pacientes com imunidade preservada e lesão em local específico, como a retina, já que não podemos afastar a possibilidade de uma reinfecção nestes indivíduos que levaria a um maior comprometimento das lesões oculares. Inicialmente, acreditava-se que estas lesões eram somente congênitas com cistos adquiridos intra-útero ^{207, 208}, mas posteriormente, foi demonstrado que a doença ocorria também após a toxoplasmose adquirida ^{209, 210}. Outra

questão importante é a encefalite por *T.gondii* em imunossuprimidos, ou em portadores do vírus HIV. Nestes pacientes, a taxa de encefalite é semelhante à taxa de incidência da toxoplasmose. Geralmente, atribuída à reativação de cistos teciduais, sua incidência deveria ser muito maior que a encontrada, já que todos os infectados deveriam ter cistos cerebrais com reativação e não apenas o número reduzido descrito ²¹¹. Esta taxa menor poderia ser explicada na dependência de uma reinfecção em um paciente com imunidade incompleta. Isto também explicaria os casos de toxoplasmose como causa de febre desconhecida em pacientes portadores do vírus HIV, sem acometimento do SNC ²¹². Para os casos de doença humana, estes são os principais aspectos relevantes, mas do ponto de vista de uma zoonose, outras questões são importantes. A infecção de um hospedeiro intermediário por diferentes linhagens com prevalência de seus cistos nos tecidos é a única explicação para a diversidade de cepas híbridas descritas por diversos autores na América do Sul ^{110, 159}, já que no felino a excreção de oocistos ocorre num curto período até a formação de imunidade e a recombinação de cepas só poderia ocorrer, num mesmo momento, e a partir de infecção simultânea por cistos de cepas geneticamente distintas. Outro aspecto importante é a proteção dos animais de produção, cuja carne é destinada ao consumo humano, que seria inválida se fosse uma proteção cepa específica, pois o risco de infecção ambiental com múltiplas cepas é grande, resultando em animais portadores de cistos de diferentes genótipos.

As implicações vacinais dos estudos de reinfecção em *T.gondii* são essenciais para o desenvolvimento de vacinas, já que na realidade estamos sempre diante da possibilidade de reinfecções e, desta forma, o conhecimento sobre a proteção cruzada entre cepas geneticamente distintas seria essencial para a produção de uma vacina polivalente.

Como conclusão, acreditamos que as novas ferramentas advindas dos estudos genotípicos de linhagens isoladas de *T.gondii* são uma abordagem promissora para a compreensão dos fenômenos decorrentes de uma relação complexa entre o hospedeiro e um bem sucedido parasita, o *T.gondii*, demonstrados em nossos estudos de reinfecção de camundongos por diferentes linhagens.

7 CONCLUSÕES

7.1 Geral

Nossos dados demonstram que foi possível avaliar a reinfecção de camundongos Balb/c com cepas clonais de *T. gondii* de diferentes genótipos e virulências a partir de modelos experimentais de infecção sequencial com as cepas RH (tipo I), ME49 (tipo II) e VEG (tipo III), com resultados inéditos em relação à imunidade induzida por cepa do tipo III.

7.2 Específicas

- a) A imunidade induzida pela infecção primária por *T.gondii* não é capaz de proteger o hospedeiro da reinfecção por cepa de genótipo distinto, já que foi possível detectar anticorpos cepa – específicos, tanto da cepa da infecção primária, como da cepa da infecção secundária, em todos os modelos de infecção sequencial propostos;
- b) Somente a imunidade induzida pela infecção primária por cepa do tipo III (VEG) é capaz de prevenir a progressão da infecção secundária causada pelas cepas do tipo I (RH) e do tipo II (ME49), impedindo doença aguda e mortalidade dos animais;
- c) Somente a imunidade induzida pela infecção primária por cepa do tipo III (VEG) é capaz de prevenir a colonização do cérebro dos animais por cistos teciduais da cepa secundária do tipo II (ME 49). A infecção pela cepa VEG induziu maior carga parasitária no cérebro quando comparada à infecção pela cepa ME49.

Referências

1. Nicolle C, Manceaux LH. On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. 1908. *Int J Parasitol.* 2009;39(8):863-4.
2. Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(2):133-48.
3. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol.* 2009;39(8):895-901.
4. Wolf A, Cowen D, Paige B. Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. *Science.* 1939;89(2306):226-7.
5. Sabin AB. Biological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1939;41(1):75-80.
6. Hutchison WM. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 1965;206(987):961-2.
7. Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 1970;167(3919):893-6.
8. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev.* 2005;6(1):41-61.
9. Dubey JP, Beattie C. *Toxoplasmosis of animals and man*: CRC Press, Inc.; 1988.
10. Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med.* 2001;2001:1-19.
11. Dubey JP. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J Parasitol.* 1998;84(4):862-5.

12. Remington JS, McLeod R, Wilson CB, Desmonts G. Toxoplasmosis. In Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 7th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2011.
13. Hill DE, Sreekumar C, Gamble HR, Dubey JP. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *J Food Prot.* 2004;67(10):2230-3.
14. Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972;19(1):155-77.
15. Dubey JP. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J Parasitol.* 1996;82(6):957-61.
16. Dubey JP. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet Parasitol.* 2002;106(2):121-53.
17. Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool.* 1976;23(4):537-46.
18. Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):264-96.
19. Ryning FW, McLeod R, Maddox JC, Hunt S, Remington JS. Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation. *Ann Intern Med.* 1979;90(1):47-9.
20. Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2009;39(8):877-82.
21. Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol.* 2008;38(12):1359-70.
22. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1217-58.
23. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004;363(9425):1965-76.

24. Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012;139(11):1375-424.
25. Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B. Risk factors for Toxoplasma infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scand J Infect Dis*. 1999;31(3):305-9.
26. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*. 2000;321(7254):142-7.
27. Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J. Risk factors for Toxoplasma gondii infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol*. 1996;144(4):405-12.
28. Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol*. 2002;40(11):4037-44.
29. Choi WY, Nam HW, Kwak NH, Huh W, Kim YR, Kang MW, et al. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 1997;175(5):1280-2.
30. Ross RD, Stec LA, Werner JC, Blumenkranz MS, Glazer L, Williams GA. Presumed acquired ocular toxoplasmosis in deer hunters. *Retina*. 2001;21(3):226-9.
31. Lake R, Hudson A, Cressey P. Risk profile: Toxoplasma gondii in red meat and meat products. Institute of Environmental Science and Research Limited Christchurch Science centre. 2002.
32. Buzby JC, Roberts T. ERS updates US foodborne disease costs for seven pathogens. *Food Review: The Magazine of Food Economics*. 1996;19(3).
33. Meireles LR, Ekman CC, Andrade j RH, Luna EJ. Human Toxoplasmosis Outbreaks and the Agent Infecting Form. Findings from a Systematic Review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(5):369-76.
34. Dubey JP. The history of Toxoplasma gondii--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*. 2008;55(6):467-75.

35. de Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(2):326-9.
36. Hall SM, Pandit A, Golwilkar A, Williams TS. How do Jains get toxoplasma infection? *Lancet.* 1999;354(9177):486-7.
37. Roghmann MC, Faulkner CT, Lefkowitz A, Patton S, Zimmerman J, Morris JG, Jr. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(5):790-2.
38. Gibson AK, Raverty S, Lambourn DM, Huggins J, Magargal SL, Grigg ME. Polyparasitism is associated with increased disease severity in *Toxoplasma gondii*-infected marine sentinel species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(5):e1142.
39. Santos PS, Albuquerque GR, da Silva VM, Martin AR, Marvulo MF, Souza SL, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from central Amazon, Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;183(1-2):171-3.
40. Egan CE, Cohen SB, Denkers EY. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(7):668-75.
41. Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol.* 2012;34(6):793-813.
42. Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.* 2004;40(1):71-80.
43. Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1992;149(1):175-80.
44. Lang C, Algnier M, Beinert N, Gross U, Luder CG. Diverse mechanisms employed by *Toxoplasma gondii* to inhibit IFN-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene expression. *Microbes Infect.* 2006;8(8):1994-2005.

45. Brown RR, Ozaki Y, Datta SP, Borden EC, Sondel PM, Malone DG. Implications of interferon-induced tryptophan catabolism in cancer, autoimmune diseases and AIDS. In Kynurenine and Serotonin Pathways. Springer New York. 1991;425-435.
46. Andrade GM, Vasconcelos-Santos DV, Carellos EV, Romanelli R, Vitor RW, Carneiro AC, et al. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy an underestimated event? J Pediatr. 2010;86(1):85-8.
47. Mortensen PB, Norgaard-Pedersen B, Waltoft BL, Sorensen TL, Hougaard D, Yolken RH. Early infections of *Toxoplasma gondii* and the later development of schizophrenia. Schizophr Bull. 2007;33(3):741-4.
48. Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry Jr CP, Liu L, Babulas VP, Susser ES. Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. Am J Psychiatry. 2005;162(4):767-73.
49. Luft BJ, Conley F, Remington JS, Laverdiere M, Wagner KF, Levine JF, et al. Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in western Europe and North America. Lancet. 1983;1(8328):781-4.
50. Luft BJ, Kansas G, Engleman EG, Remington JS. Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis. J Infect Dis. 1984;150(5):761-7.
51. Wong B, Gold JW, Brown AE, Lange M, Fried R, Grieco M, et al. Central-nervous-system toxoplasmosis in homosexual men and parenteral drug abusers. Ann Intern Med. 1984;100(1):36-42.
52. Renold C, Sugar A, Chave JP, Perrin L, Delavelle J, Pizzolato G, et al. Toxoplasma encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Medicine (Baltimore). 1992;71(4):224-39.
53. Schaffner A. Pretransplant evaluation for infections in donors and recipients of solid organs. Clin Infect Dis. 2001;33 Suppl 1:S9-14.
54. Shulman IA, Appleman MD. Transmission of parasitic and bacterial infections through blood transfusion within the U.S. Crit Rev Clin Lab Sci. 1991;28(5-6):447-59.

55. Siegel SE, Lunde MN, Gelderman AH, Halterman RH, Brown JA, Levine AS, et al. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood*. 1971;37(4):388-94.
56. Holland GN, Muccioli C, Silveira C, Weisz JM, Belfort R, Jr., O'Connor GR. Intraocular inflammatory reactions without focal necrotizing retinochoroiditis in patients with acquired systemic toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol*. 1999;128(4):413-20.
57. McLeod R, Boyer K, Karrison T, Kasza K, Swisher C, Roizen N, et al. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Clin Infect Dis*. 2006;42(10):1383-94.
58. Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol*. 2002;5(4):438-42.
59. Gilbert RE, Stanford MR. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? *Br J Ophthalmol*. 2000;84(2):224-6.
60. Wilder HC. *Toxoplasma* chorioretinitis in adults; a preliminary study of forty-one cases diagnosed by microscopic examination. *AMA Arch Ophthalmol*. 1952;47(4):425.
61. Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Junior M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*. 1992;114(2):136-44.
62. McCannel CA, Holland GN, Helm CJ, Cornell PJ, Winston JV, Rimmer TG. Causes of uveitis in the general practice of ophthalmology. UCLA Community-Based Uveitis Study Group. *Am J Ophthalmol*. 1996;121(1):35-46.
63. Diniz EMA, Camargo ME, Vaz FA. Toxoplasmose congênita. In: Diniz EMA, Vaz FA. Infecções congênitas e perinatais. São Paulo: Atheneu, 1991.
64. Kompalic-Cristo A, Britto C, Fernandes O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(4):229-35.
65. Smith JR, Cunningham ET, Jr. Atypical presentations of ocular toxoplasmosis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2002;13(6):387-92.

66. Stanford MR, Tan HK, Gilbert RE. Toxoplasmic retinochoroiditis presenting in childhood: clinical findings in a UK survey. *Br J Ophthalmol*. 2006;90(12):1464-7.
67. Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol*. 2003;136(6):973-88.
68. Abreu M, Hirata P, Belfort Jr R, Domingues Neto S. Uveítes em São Paulo: estudo epidemiológico, clínico e terapêutico. *Arq Bras Oftalmol*. 1980;43(1):10-6.
69. Porto AM, Amorim MMR, Coelho ICN, Santos LC. Serologic profile of toxoplasmosis in pregnant women attended at a teaching-hospital in Recife. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(3):242-8.
70. Sabin AB, Feldman HA. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science*. 1948;108(2815):660-3.
71. Contreras MdC, Sandoval L, Salinas P, Muñoz P, Vargas S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y Elisa avidéz de IgG en toxoplasmosis reciente y crónica. *Rev Assoc Med Bras*. 2000;55(1-2):17-24.
72. Bessieres MH, Roques C, Berrebi A, Barre V, Cazaux M, Seguela JP. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Pathol*. 1992;45(7):605-8.
73. Dannemann BR, Vaughan WC, Thulliez P, Remington JS. Differential agglutination test for diagnosis of recently acquired infection with *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*. 1990;28(9):1928-33.
74. Decoster A, Slizewicz B, Simon J, Bazin C, Darcy F, Vittu G, et al. Platelia-Toxo IgA, a new kit for early diagnosis of congenital toxoplasmosis by detection of anti-P30 immunoglobulin A antibodies. *J Clin Microbiol*. 1991;29(10):2291-5.
75. Liesenfeld O, Press C, Flanders R, Ramirez R, Remington JS. Study of Abbott Toxo IMx system for detection of immunoglobulin G and immunoglobulin M toxoplasma antibodies: value of confirmatory testing for diagnosis of acute toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1996;34(10):2526-30.

76. Ferreira AW. Diagnóstico laboratorial. Avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas, parasitárias e auto-imunes. Correlação clínico-laboratorial. *Rev Inst Med Trop*. 1996;38(4):264-.
77. Camargo ME, Moura ME, Leser PG. Toxoplasmosis serology: an efficient hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1989;31(4):279-85.
78. Gross U, Holpert M, Goebel S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. *Ann Ist Super Sanita*. 2004;40(1):65-70.
79. Sakata FBLS, Bellato V, Sartor AA, Moura ABd, Souza APd, Farias JA. Toxoplasma gondii antibodies sheep in Lages, Santa Catarina, Brazil, and comparison using IFA and ELISA. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012;21(3):196-200.
80. Camargo ME, Leser PG, Rocca A. Rheumatoid factors as a cause for false positive IgM anti-toxoplasma fluorescent tests. A technique for specific results. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1972;14(5):310-3.
81. Camargo M, Leser P, Guarnieri D, Rocca A. Padronização de testes sorológicos para toxoplasmose, problema urgente da patologia clínica. *Rev Brás Patol Clin*. 1977;13:1-5.
82. Desmonts G, Naot Y, Remington JS. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired Toxoplasma infections. *J Clin Microbiol*. 1981;14(5):486-91.
83. Hafid J, Tran Manh Sung R, Raberin H, Akono ZY, Pozzetto B, Jana M. Detection of circulating antigens of Toxoplasma gondii in human infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;52(4):336-9.
84. Fachado A, Fonseca L, Fonte L, Alberti E, Cox R, Bandeira F. Toxoplasma gondii antigenuria in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92(5):589-93.
85. Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital Toxoplasma infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol*. 1990;28(10):2297-301.
86. Li S, Ding Z, Liang Y. [A preliminary study on the antenatal diagnosis and prevention of the fetus toxoplasmosis infection]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 1995;30(4):200-2.

87. Bretagne S, Costa J-M, Fleury-Feith J, Poron F, Dubreuil-Lemaire M-L, Vidaud M. Quantitative competitive PCR with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of toxoplasmosis in AIDS patients. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1662-4.
88. Cantos G, Prando M, Siqueira M, Teixeira R. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos antitoxoplasma gondii e diagnóstico. *Rev Assoc Med Bras.* 2000;46(4):335-41.
89. Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 2008;47(4):554-66.
90. Santoro F, Afchain D, Pierce R, Cesbron JY, Ovlaque G, Capron A. Serodiagnosis of toxoplasma infection using a purified parasite protein (P30). *Clin Exp Immunol.* 1985;62(2):262-9.
91. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):1897-900.
92. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):165-256.
93. Maubon D, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H. [Real-time PCR in the diagnosis of toxoplasmosis: the way to standardisation?]. *Pathol Biol (Paris).* 2007;55(6):304-11.
94. Cristina N, Oury B, Ambroise-Thomas P, Santoro F. Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitol Res.* 1991;77(3):266-8.
95. Ilovic V, Vujanic M, Zivkovic T, Klun I, Djurkovic-Djakovic O. Molecular detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* from clinical samples. In *Toxoplasmosis-Recent Advances* 2012.
96. Sadek O, Abdel-Hameed ZM, Kuraa HM. Molecular Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Raw Goat And Sheep Milk with Discussion of its Public Health Importance in assiut Governorate. *Assiut Vet. Med.* 2015.

97. Kong JT, Grigg ME, Uyetake L, Parmley S, Boothroyd JC. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *J Infect Dis.* 2003;187(9):1484-95.
98. Sousa S, Ajzenberg D, Marle M, Aubert D, Villena I, da Costa JC, et al. Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(8):1158-69.
99. Sousa S, Ajzenberg D, Vilanova M, Costa J, Darde ML. Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(9):1380-6.
100. Sousa S, Canada N, Correia da Costa JM, Darde ML. Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals. *Vet Parasitol.* 2010;169(1-2):24-8.
101. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Darde ML, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(15):5844-9.
102. Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology.* 2014;141(4):453-61.
103. Dardé ML, Ajzenberg D, Su C. Molecular epidemiology and population structure of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma Gondii*. 2 ed. Academic Press; 2014.
104. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 1995;172(6):1561-6.
105. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(30):11423-8.
106. Khan A, Fux B, Su C, Dubey J, Dardé M-L, Ajioka J, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(37):14872-7.

107. Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(37):14872-7.
108. Boyle JP, Rajasekar B, Saeij JP, Ajioka JW, Berriman M, Paulsen I, et al. Just one cross appears capable of dramatically altering the population biology of a eukaryotic pathogen like *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(27):10514-9.
109. Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Banuls AL, Durand P, et al. Additional haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: population structure and mouse-virulence of strains from Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e876.
110. Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol*. 2008;38(5):561-9.
111. Ajzenberg D. 1995-2015: it is time to celebrate 20 years of (intensive) genotyping of *Toxoplasma gondii* strains. *Future Microbiol*. 2015;10(5):689-91.
112. Gilot-Fromont E, Jego M, Bonenfant C, Gibert P, Rannou B, Klein F, et al. Immune phenotype and body condition in roe deer: individuals with high body condition have different, not stronger immunity. *PLoS One*. 2012;7(9):e45576.
113. Lehmann T, Graham DH, Dahl E, Sreekumar C, Launer F, Corn JL, et al. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infect Genet Evol*. 2003;3(2):135-41.
114. Aubert D, Ajzenberg D, Richomme C, Gilot-Fromont E, Terrier ME, de Gevigney C, et al. Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. *Vet Parasitol*. 2010;171(3-4):346-9.
115. De Craeye S, Speybroeck N, Ajzenberg D, Darde ML, Collinet F, Tavernier P, et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: common parasites in Belgian foxes and Cervidae? *Vet Parasitol*. 2011;178(1-2):64-9.
116. Halos L, Thebault A, Aubert D, Thomas M, Perret C, Geers R, et al. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. *Int J Parasitol*. 2010;40(2):193-200.

117. Ajzenberg D, Banuls AL, Su C, Dumetre A, Demar M, Carme B, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2004;34(10):1185-96.
118. Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, Demar MP, de Thoisy B, Bonnabau H, et al. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infect Genet Evol*. 2011;11(6):1378-87.
119. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Darde ML, Cohen R, Dumetre A, Yera H, et al. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis*. 2009;199(2):280-5.
120. Dubey JP, Velmurugan GV, Rajendran C, Yabsley MJ, Thomas NJ, Beckmen KB, et al. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int J Parasitol*. 2011;41(11):1139-47.
121. Wendte JM, Gibson AK, Grigg ME. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: new perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Vet Parasitol*. 2011;182(1):96-111.
122. Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J Infect Dis*. 2001;184(5):633-9.
123. Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*. 2003;299(5605):414-6.
124. Shwab EK, Zhu X-Q, Majumdar D, Pena HF, Gennari SM, Dubey JP, et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. 2014;141(4):453-61.
125. Khan A, Miller N, Roos DS, Dubey JP, Ajzenberg D, Darde ML, et al. A monomorphic haplotype of chromosome Ia is associated with widespread success in clonal and nonclonal populations of *Toxoplasma gondii*. *MBio*. 2011;2(6):e00228-11.
126. Miller MA, Miller WA, Conrad PA, James ER, Melli AC, Leutenegger CM, et al. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int J Parasitol*. 2008;38(11):1319-28.

127. Ajzenberg D. Is PCR testing on blood samples useful or not in the diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104(8):569-70.
128. Rajendran C, Su C, Dubey JP. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):359-68.
129. Rosenthal BM. How has agriculture influenced the geography and genetics of animal parasites? *Trends Parasitol.* 2009;25(2):67-70.
130. Rengifo-Herrera C, Ortega-Mora LM, Alvarez-Garcia G, Gomez-Bautista M, Garcia-Parraga D, Garcia-Pena FJ, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in Antarctic pinnipeds. *Vet Parasitol.* 2012;190(1-2):259-62.
131. Conrad PA, Miller MA, Kreuder C, James ER, Mazet J, Dabritz H, et al. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int J Parasitol.* 2005;35(11-12):1155-68.
132. Alvarado-Esquivel C, Garcia-Machado C, Vitela-Corrales J, Villena I, Dubey JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Durango State, Mexico. *Vet Parasitol.* 2011;183(1-2):43-6.
133. Darde ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;39(6):551-8.
134. Diana J, Persat F, Staquet MJ, Assossou O, Ferrandiz J, Gariazzo MJ, et al. Migration and maturation of human dendritic cells infected with *Toxoplasma gondii* depend on parasite strain type. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;42(3):321-31.
135. Dubremetz JF, Lebrun M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 2012;14(15):1403-10.
136. Fux B, Rodrigues CV, Portela RW, Silva NM, Su C, Sibley D, et al. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 2003;71(11):6392-401.

137. Gavrilescu LC, Denkers EY. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol.* 2001;167(2):902-9.
138. Nguyen TD, Bigaignon G, Markine-Goriaynoff D, Heremans H, Nguyen TN, Warnier G, et al. Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and gamma-interferon. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 10):869-76.
139. Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley LD. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J Immunol.* 2004;172(6):3686-94.
140. Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, Jensen KD, et al. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J Exp Med.* 2011;208(1):195-212.
141. Barragan A, Sibley LD. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *J Exp Med.* 2002;195(12):1625-33.
142. Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* 2003;11(9):426-30.
143. Soete M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. *Exp Parasitol.* 1993;76(3):259-64.
144. Saeij JP, Boyle JP, Grigg ME, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infect Immun.* 2005;73(2):695-702.
145. Behnke MS, Khan A, Wootton JC, Dubey JP, Tang K, Sibley LD. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(23):9631-6.
146. Reese ML, Zeiner GM, Saeij JP, Boothroyd JC, Boyle JP. Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(23):9625-30.

147. Saeij JP, Boyle JP, Collier S, Taylor S, Sibley LD, Brooke-Powell ET, et al. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science*. 2006;314(5806):1780-3.
148. Taylor S, Barragan A, Su C, Fux B, Fentress SJ, Tang K, et al. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science*. 2006;314(5806):1776-80.
149. Herrmann DC, Barwald A, Maksimov A, Pantchev N, Vrhovec MG, Conraths FJ, et al. *Toxoplasma gondii* sexual cross in a single naturally infected feline host: generation of highly mouse-virulent and avirulent clones, genotypically different from clonal types I, II and III. *Vet Res*. 2012;43:39.
150. Ajzenberg D, Cogne N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Filisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*. 2002;186(5):684-9.
151. Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, Menotti J, et al. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*. 2009;199(8):1155-67.
152. da Silva RC, Langoni H, Su C, da Silva AV. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. *Vet Parasitol*. 2011;175(1-2):173-7.
153. Pardini L, Carral LA, Bernstein M, Gos ML, Olejnik P, Unzaga JM, et al. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from a human placenta in Argentina. *Parasitol Int*. 2014;63(2):470-2.
154. Dubey JP, Felix TA, Kwok OC. Serological and parasitological prevalence of *Toxoplasma gondii* in wild birds from Colorado. *J Parasitol*. 2010;96(5):937-9.
155. Kieffer F, Rigourd V, Ikounga P, Bessieres B, Magny JF, Thulliez P. Disseminated congenital toxoplasma infection with a type II strain. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(9):813-5.
156. Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, et al. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clin Infect Dis*. 2007;45(7):e88-95.

157. Delhaes L, Ajzenberg D, Sicot B, Bourgeot P, Darde ML, Dei-Cas E, et al. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenat Diagn*. 2010;30(9):902-5.
158. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(8):e277.
159. Ferreira IM, Vidal JE, de Mattos Cde C, de Mattos LC, Qu D, Su C, et al. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp Parasitol*. 2011;129(2):190-5.
160. Ajzenberg D. High burden of congenital toxoplasmosis in the United States: the strain hypothesis? *Clin Infect Dis*. 2012;54(11):1606-7.
161. Mack DG, Johnson JJ, Roberts F, Roberts CW, Estes RG, David C, et al. HLA-class II genes modify outcome of *Toxoplasma gondii* infection. *Int J Parasitol*. 1999;29(9):1351-8.
162. Jamieson SE, de Roubaix LA, Cortina-Borja M, Tan HK, Mui EJ, Cordell HJ, et al. Genetic and epigenetic factors at COL2A1 and ABCA4 influence clinical outcome in congenital toxoplasmosis. *PLoS One*. 2008;3(6):e2285.
163. Subauste CS, Ajzenberg D, Kijlstra A. Review of the series "Disease of the year 2011: toxoplasmosis" pathophysiology of toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2011;19(5):297-306.
164. de-la-Torre A, Gonzalez G, Diaz-Ramirez J, Gomez-Marin JE. Screening by ophthalmoscopy for *Toxoplasma retinochoroiditis* in Colombia. *Am J Ophthalmol*. 2007;143(2):354-6.
165. Khan A, Bohme U, Kelly KA, Adlem E, Brooks K, Simmonds M, et al. Common inheritance of chromosome 1a associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. *Genome Res*. 2006;16(9):1119-25.
166. Vaudaux JD, Muccioli C, James ER, Silveira C, Magargal SL, Jung C, et al. Identification of an atypical strain of *toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *J Infect Dis*. 2010;202(8):1226-33.

167. Silveira C, Vallochi AL, Rodrigues da Silva U, Muccioli C, Holland GN, Nussenblatt RB, et al. Toxoplasma gondii in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. Br J Ophthalmol. 2011;95(3):396-400.
168. Morisset S, Peyron F, Lobry JR, Garweg J, Ferrandiz J, Musset K, et al. Serotyping of Toxoplasma gondii: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. Microbes Infect. 2008;10(7):742-7.
169. Bowie WR, King AS, Werker DH, Isaac-Renton JL, Bell A, Eng SB, et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. Lancet. 1997;350(9072):173-7.
170. Burnett AJ, Shortt SG, Isaac-Renton J, King A, Werker D, Bowie WR. Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. Ophthalmology. 1998;105(6):1032-7.
171. Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Darde ML. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of Toxoplasma gondii, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2009;15(4):656-8.
172. Demar M, Hommel D, Djossou F, Peneau C, Boukhari R, Louvel D, et al. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. Clin Microbiol Infect. 2012;18(7):E221-31.
173. De Salvador-Guillouet F, Ajzenberg D, Chaillou-Opitz S, Saint-Paul MC, Dunais B, Dellamonica P, et al. Severe pneumonia during primary infection with an atypical strain of Toxoplasma gondii in an immunocompetent young man. J Infect. 2006;53(2):e47-50.
174. Pomares C, Ajzenberg D, Bornard L, Bernardin G, Hasseine L, Darde ML, et al. Toxoplasmosis and horse meat, France. Emerg Infect Dis. 2011;17(7):1327-8.
175. Lunden A, Uggla A. Infectivity of Toxoplasma gondii in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. Int J Food Microbiol. 1992;15(3-4):357-63.
176. Dubey JP, Kirkbride CA. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. J Am Vet Med Assoc. 1989;195(12):1715-6.

177. Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Parasitol.* 1990;76(2):201-4.
178. Hotop A, Hlobil H, Gross U. Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 2012;54(11):1545-52.
179. Franco PS, Silva DA, Costa IN, Gomes AO, Silva AL, Pena JD, et al. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. *Placenta.* 2011;32(2):116-20.
180. Haque S, Franck J, Dumon H, Kasper LH, Haque A. Protection against lethal toxoplasmosis in mice by an avirulent strain of *Toxoplasma gondii*: stimulation of IFN-gamma and TNF-alpha response. *Exp Parasitol.* 1999;93(4):231-40.
181. Reikvam A, Lorentzen-Styr AM. Virulence of different strains of *Toxoplasma gondii* and host response in mice. *Nature.* 1976;261(5560):508-9.
182. Zenner L, Darcy F, Cesbron-Delauw MF, Capron A. Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chronic infection. *Infect Immun.* 1993;61(1):360-3.
183. Araujo F, Slifer T, Kim S. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not prevent acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. *J Parasitol.* 1997;83(3):521-2.
184. Brandao GP, Melo MN, Caetano BC, Carneiro CM, Silva LA, Vitor RW. Susceptibility to re-infection in C57BL/6 mice with recombinant strains of *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol.* 2011;128(4):433-7.
185. Brandao GP, Melo MN, Gazzinelli RT, Caetano BC, Ferreira AM, Silva LA, et al. Experimental reinfection of BALB/c mice with different recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: involvement of IFN-gamma and IL-10. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(2):241-5.
186. Dao A, Fortier B, Soete M, Plenat F, Dubremetz JF. Successful reinfection of chronically infected mice by a different *Toxoplasma gondii* genotype. *Int J Parasitol.* 2001;31(1):63-5.

187. Dzitko K, Staczek P, Gatkowska J, Dlugonska H. *Toxoplasma gondii*: Serological recognition of reinfection. *Exp Parasitol*. 2006;112(2):134-7.
188. Franco PS, da Silva NM, de Freitas Barbosa B, de Oliveira Gomes A, Ietta F, Shwab EK, et al. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. *Front Microbiol*. 2015;6:181.
189. Silva LA, Brandao GP, Pinheiro BV, Vitor RW. Immunosuppression with cyclophosphamide favors reinfection with recombinant *Toxoplasma gondii* strains. *Parasite*. 2012;19(3):249-57.
190. Fortier B, Pinto-Sousa MI, Ajana F. [*Toxoplasma gondii*: 2 cases of recontamination in immune patients]. *Presse Med*. 1991;20(41):2109.
191. Gavinet MF, Robert F, Firtion G, Delouvrier E, Hennequin C, Maurin JR, et al. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J Clin Microbiol*. 1997;35(5):1276-7.
192. Hennequin C. [Prevention of parasitic infections (excluding toxoplasmosis) in immunocompromised patients]. *Ann Med Interne (Paris)*. 1997;148(3):240-5.
193. Kodjikian L, Hoigne I, Adam O, Jacquier P, Aebi-Ochsner C, Aebi C, et al. Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(3):272-4.
194. Lebas F, Ducrocq S, Mucignat V, Paris L, Megier P, Baudon JJ, et al. [Congenital toxoplasmosis: a new case of infection during pregnancy in an previously immunized and immunocompetent woman]. *Arch Pediatr*. 2004;11(8):926-8.
195. Silveira C, Ferreira R, Muccioli C, Nussenblatt R, Belfort R, Jr. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. *Am J Ophthalmol*. 2003;136(2):370-1.
196. Coutinho SG, Lobo R, Dutra G. Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in a rural area in Brazil. *J Parasitol*. 1982;68(5):866-8.

197. Djurković-Djaković O, Nikolić A, Bobić B, Klun I, Aleksić A. Stage conversion of *Toxoplasma gondii* RH parasites in mice by treatment with atovaquone and pyrrolidine dithiocarbamate. *Microbes Infect.* 2005;7(1):49-54.

198. Dubey JP, Sundar N, Nolden CA, Samuel MD, Velmurugan GV, Bandini LA, et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), coyotes (*Canis latrans*), and striped skunks (*Mephitis mephitis*) in Wisconsin identified several atypical genotypes. *J Parasitol.* 2007;93(6):1524-7.

199. Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol.* 2006;36(7):841-8.

200. Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immun.* 1978;21(1):55-8.

201. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54.

202. Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. *Parasitology Today.* 1993;9(6):228-32.

203. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis.* 1994;18(6):853-61; quiz 62.

204. Blackwell JM, Roberts CW, Alexander J. Influence of genes within the MHC on mortality and brain cyst development in mice infected with *Toxoplasma gondii*: kinetics of immune regulation in BALB H-2 congenic mice. *Parasite Immunol.* 1993;15(6):317-24.

205. Suzuki Y, Yang Q, Conley FK, Abrams JS, Remington JS. Antibody against interleukin-6 reduces inflammation and numbers of cysts in brains of mice with toxoplasmic encephalitis. *Infect Immun.* 1994;62(7):2773-8.

206. Dumetre A, Ajzenberg D, Rozette L, Mercier A, Darde ML. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. *Vet Parasitol.* 2006;142(3-4):376-9.

207. Luft BJ, Castro KG. An overview of the problem of toxoplasmosis and pneumocystosis in AIDS in the USA: implication for future therapeutic trials. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1991;10(3):178-81.

208. Perkins E. Ocular toxoplasmosis. *The British journal of ophthalmology*. 1973;57(1):1.

209. Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 1996;23(2):277-82.

210. Silveira C, Belfort R, Jr., Muccioli C, Abreu MT, Martins MC, Victora C, et al. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*. 2001;131(3):351-4.

211. Passos LN, Araujo Filho OF, Andrade Junior HF. *Toxoplasma* encephalitis in AIDS patients in Sao Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42(3):141-5.

212. Kitkungvan D, Apisarnthanarak A, Plengpart P, Mundy LM. Fever of unknown origin in patients with HIV infection in Thailand: an observational study and review of the literature. *Int J STD AIDS*. 2008;19(4):232-5

ANEXO A – Carta de aprovação do projeto pela CEUA – IMT

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-8650/7193 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 13 de junho de 2013.

Ilmo (a)

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

(aos cuidados de Talita Caroline Coelho dos Santos)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/181** "Reinfecção experimental de camundongos BALB/c por cepas geneticamente distintas de *Toxoplasma gondii*", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Dr. Jorge Casseb
Presidente

Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP