

MARINA NEVES FERREIRA

Determinação da virulência de isolados brasileiros de *Toxoplasma gondii* em camundongos

São Paulo
2017

MARINA NEVES FERREIRA

Determinação da virulência de isolados brasileiros de *Toxoplasma gondii*
em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Solange Maria Gennari

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3598
FMVZ

Ferreira, Marina Neves
Determinação da virulência de isolados brasileiros de *Toxoplasma gondii* em camundongos / Marina Neves Ferreira. – 2017.
55 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. Toxoplasmose. 2. Virulência. 3. Brasil. 4. Camundongos. 5. Swiss Webster. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Padronização de metodologia para estudo de virulência em isolados de *Toxoplasma gondii*", protocolada sob o CEUA nº 7400080915, sob a responsabilidade de **Solange Maria Gennari** e equipe; Marina Neves Ferreira - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/04/2016.

We certify that the proposal "Methodology standardization for virulence study in *Toxoplasma gondii* isolates", utilizing 360 Heterogenic mice (360 females), protocol number CEUA 7400080915, under the responsibility of **Solange Maria Gennari** and team; Marina Neves Ferreira - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/14/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 01/2016 a 12/2016

Área: **Doenças Parasitárias**

Origem: **Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **8 a 10 semanas**

N: **360**

Linhagem: **Swiss/Balb**

Peso: **40 a 60 g**

Resumo: A toxoplasmose é uma zoonose de prevalência mundial, causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, que acomete aves e mamíferos, incluindo o homem. Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectada por *T. gondii*. A prevalência da infecção por *T. gondii* em humanos no Brasil é muito alta, atingindo mais de 80% em algumas regiões. A infecção pelo *T. gondii* atinge, outros animais mamíferos e as aves. No Brasil, os índices ultrapassam 50% em animais domésticos e de produção. Por se tomarem fonte de transmissão de *T. gondii*, estes animais constituem risco para a saúde pública. Estudos realizados com isolados de *T. gondii* de humanos e animais no Brasil, mostraram uma ampla diversidade genética, diferente da encontrada em outros continentes, com a presença de cepas atípicas. A avaliação da virulência das cepas de *T. gondii* é realizada por meio do bioensayo em camundongos. Dessa maneira, pode-se notar características fenotípicas nos camundongos decorrentes da infecção. As manifestações clínicas ajudam a determinar a patogenicidade das cepas inoculadas, com cepas que causam nenhuma sintomatologia nos animais até cepas que matam os camundongos em poucos dias. Os genes polimórficos ROP18 e ROP5 constituem fatores que determinam a virulência de *T. gondii*. No entanto, com a grande diversidade de cepas encontradas no Brasil, outros genes podem estar associados aos fatores de virulência.

Local do experimento: **Laboratório de Doenças Parasitárias VIII - VPS**

São Paulo, 30 de outubro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERREIRA, Marina Neves

Título: Determinação da virulência de isolados brasileiros de *Toxoplasma gondii* em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Solange Maria Gennari, pelo “sim” da orientação há dois anos. Pela confiança e oportunidade. Por ter sido uma pessoa fundamental em minha caminhada profissional. Minha sincera admiração e enorme gratidão!

À Dra Hilda por todos os ensinamentos e por todo o trabalho desenvolvido ao seu lado nesse tempo. Em cada trabalho, inúmeros aprendizados, os quais levarei por onde seguir. Pela paciência e ajuda.

Aos meus pais, José Luiz (*in memoriam*) e Elza, que nunca mediram esforços para garantir meus estudos e para que nada me faltasse. Por todo apoio em cada fase de minha vida. Por conquistarem comigo este momento.

À minha irmã, Júlia, meu exemplo e maior orgulho! Por acreditar e me ajudar a realizar meus sonhos.

Aos amigos, em especial, Ana Beatriz, Amanda, Maria Carolina, Ryan e Jairo. Pela presença em todos os momentos. Por cada conversa, conselho e ajuda. Vocês fizeram da rotina, dias melhores. Levarei histórias lindas vividas ao lado de vocês.

Aos colegas do laboratório de Doenças Parasitárias, por toda a colaboração, companheirismo e momentos bons e alegres vividos juntos. Em especial, à Brisa, por toda a disposição e prontidão em ajudar sempre.

Ao Prof. Dr. Marcos Amaku, pela prontidão, paciência e ajuda com as análises deste trabalho.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

*“Eu que já não sou assim
Muito de ganhar
Junto as mãos ao meu redor
Faço o melhor que sou capaz
Só pra viver em paz.”*

Marcelo Camelo

RESUMO

FERREIRA, M. N. **Determinação da virulência de isolados brasileiros de *Toxoplasma gondii* em camundongos.** 2017. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Os isolados de *Toxoplasma gondii* encontrados no Brasil apresentam grande variedade genética. No país, foram verificadas quatro linhagens clonais, denominadas tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV. Dentre elas, a virulência para camundongos varia, sendo BrI virulenta, BrIII não virulenta e, as linhagens BrII e BrIV são consideradas de virulência intermediária. A definição da virulência desses isolados é feita, na maioria dos estudos, a partir do isolamento por bioensaio, com a determinação da mortalidade de camundongos infectados. No entanto, a dose de *T. gondii* inoculada nesses animais é desconhecida e, assim, trata-se de um método impreciso para caracterização da virulência. Dessa maneira, este estudo tem por objetivo avaliar a virulência, em camundongos, de 22 isolados brasileiros de *T. gondii*, utilizando inóculos padronizados. Para o teste de virulência, utilizou-se taquizoítas de cada um dos isolados, em três concentrações (10^1 , 10^2 e 10^3). Cada dose foi inoculada via intraperitoneal em grupos formados por quatro camundongos heterogênicos fêmeas, de oito semanas de idade, da linhagem Swiss Webster. A mortalidade dos animais foi observada por 30 dias e, baseando-se nesses dados, além do tempo decorrido pós-inoculação até a morte dos animais, determinou-se a virulência dos isolados. Dos 22 isolados brasileiros incluídos nesse estudo, sete (32%) foram definidos como de virulência intermediária, pois houve sobrevivência de animais infectados e a mortalidade foi dose-dependente. Além disso, 15 (68%) foram considerados virulentos, uma vez que causaram a morte de todos os camundongos independente da dose analisada. Comparando as classificações definidas pelo bioensaio e pelo teste de virulência, 83% dos isolados virulentos analisados se mantiveram como virulentos, em contrapartida os isolados não virulentos e de virulência intermediária pelo bioensaio mostraram um fenótipo de maior virulência no teste. Devido à predominância de isolados virulentos no Brasil, o uso de uma metodologia padronizada para determinação da virulência em camundongos é de pouca utilidade epidemiológica.

Palavras-chave: Toxoplasmose. Virulência. Brasil. Camundongos. Swiss Webster.

ABSTRACT

FERREIRA, M. N. **Determination of the virulence of Brazilian isolates of *Toxoplasma gondii* in mice.** 2017. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The isolates of *Toxoplasma gondii* found in Brazil present a great genetic variety. In the country, four clonal lineages, denominated type BrI, BrII, BrIII and BrIV were verified. Among them, virulence for mice varies, with virulent BrI and non-virulent BrIII, and the BrII and BrIV strains are considered as intermediate virulence. The determination of the virulence of these isolates is made, in the majority of the studies, from the isolation by bioassay, with the determination of the mortality of infected mice. However, the dose of *T. gondii* inoculated in these animals is unknown and thus is an imprecise method for characterization of virulence. Thus, this study aims to evaluate the virulence of 22 Brazilian isolates of *T. gondii* in mice using standardized inocula. For the virulence test, tachyzoites from each of the isolates were used in three concentrations (10^1 , 10^2 and 10^3). Each dose was inoculated intraperitoneally into groups consisting of four 8-week-old female heterogenic mice of the Swiss Webster strain. The mortality of the animals was observed for 30 days and, based on these data, in addition to the time elapsed post-inoculation until the death of the animals, the virulence of the isolates was determined. Of the 22 Brazilian isolates included in this study, seven (32%) were defined as intermediate virulence, since there was survival of infected animals and mortality was dose-dependent. In addition, 15 (68%) were considered virulent, since they caused the death of all mice regardless of the dose analyzed. Comparing the classifications defined by the bioassay and the virulence test, 83% of the virulent isolates analyzed remained virulent. In contrast, the non virulent isolates and intermediate virulence by the bioassay showed a phenotype of greater virulence in the test. Due to the predominance of virulent isolates in Brazil, the use of a standardized methodology for the determination of virulence in mice is of little epidemiological utility.

Keywords: Toxoplasmosis. Virulence. Brazil. Mice. Swiss Webster.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do Brasil com indicação dos locais de obtenção dos isolados de *T. gondii*, de acordo com os hospedeiros.

Figura 2. Letalidade dos isolados brasileiros de *T. gondii* em relação ao dia-médio de morte dos camundongos, nas três doses de taquizoítas analisadas.

Figura 3 (a) – variação do peso corporal por dia de cada camundongo, infectados por cada isolado de *T. gondii*, nas três doses analisadas

Figura 3 (b)– variação média de peso corporal dos camundongos, para cada isolado de *T. gondii* analisado, em cada dose

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos isolados brasileiros de *T. gondii* selecionados para o estudo de virulência, classificados de acordo com a taxa de mortalidade dos camundongos em bioensaio; genótipo (ToxoDB), hospedeiro e Estado de obtenção da amostra.

Tabela 2. Taxa de mortalidade e dias de morte pós-inoculação dos camundongos Swiss para cada isolado e doses de *T. gondii*.

Tabela 3. Classificação de virulência dos 22 isolados brasileiros de *T. gondii*, considerando três doses de taquizoítas, inoculados via intraperitoneal, em camundongos da linhagem Swiss Webster.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DL – Dose Letal

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

Dpi – Dias pós-inoculação

GBPs – Proteínas de ligação ao guanilato (Guanylate binding proteins)

GRA – Proteína do grânulo denso

GTP – Guanosina trifosfato

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

INF- γ – Interferon-gama

IRGs – Enzimas GTP relacionadas à imunidade (Immunity-related GTPases)

MAT – Teste de aglutinação modificado (Modified Agglutination Test)

Meio RPMI – Meio para cultivo celular desenvolvido no Instituto Memorial Roswell Park (Roswell Park Memorial Institute Medium)

MIC - Proteína do micronema

NK – Células natural killer

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (Phosphate buffer solution)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)

p.i – pós-inoculação

RFLP – Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism)

ROP – Proteína das roptrias

SFB – Soro Fetal Bovino

STAT 3 – Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3

Th1 – Linfócitos T tipo 1

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α (Tumor necrosis factor)

ToxoDB – Toxo database

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivos Específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Comitê de Ética	23
4.2. Seleção dos Isolados	23
4.3. Reativação dos Isolados	26
4.4. Teste de Aglutinação Modificado (DUBEY, DESMONTS, 1987)	27
4.5. Modelo animal experimental para o teste de virulência	28
4.6. Quantificação do inóculo	28
4.7. Teste de Virulência	29
4.8. Análise dos Resultados	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Seleção e reativação dos isolados de <i>T. gondii</i>	31
5.2. Teste de Virulência	31
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, zoonose cosmopolita de grande importância médica e veterinária, é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. O coccídio pertence ao filo Apicomplexa e apresenta, em sua forma morfológica proliferativa e circulante, um complexo apical constituído, principalmente, pelas organelas micronemas e roptrias (DUBEY, 2010). Esse parasito foi descrito pela primeira vez por Nicole e Manceaux, na Tunísia, em 1908, no cérebro de um roedor selvagem e, no mesmo ano no Brasil, por Splendore, que o encontrou em coelhos de laboratório (HALONEN, WEISS, 2013). Trata-se da única espécie referente ao gênero *Toxoplasma*.

Toxoplasma gondii é um protozoário de ciclo heteroxênico facultativo e intracelular obrigatório e infecta uma grande diversidade de animais vertebrados, sendo os mamíferos e as aves os reservatórios naturais. No entanto, apenas os felídeos apresentam as formas de reprodução sexuada de *T. gondii* e são, portanto, os únicos hospedeiros definitivos (DUBEY, 2010). Por seu perfil zoonótico, infecta o homem levando a um quadro crônico assintomático na maioria dos casos. Por outro lado, traz risco à indivíduos imunocomprometidos, ao se apresentar como parasito oportunista, estabelecendo uma infecção sintomática, com desenvolvimento de doenças oculares e quadros de encefalia (PETERSEN, KIJLSTRA, STANFORD, 2012; OLIVEIRA, 2016). Além disso, pode prejudicar o desenvolvimento do feto ao ser transmitido verticalmente pela placenta (GILBERT et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2017).

Aproximadamente um terço da população mundial se encontra infectada cronicamente por *T. gondii* (AJIOKA, SOLDATI, 2007). No Brasil, a prevalência atinge percentual superior a 80% em algumas regiões (DUBEY et al. 2012a). Os índices de toxoplasmose congênita no país também são elevados (20 em cada 10.000 recém-nascidos vivos), resultando em graves consequências aos fetos e recém-nascidos, podendo inclusive levar a óbitos. A soroprevalência de *T. gondii* em crianças e gestantes brasileiras é considerada uma das mais altas no mundo, com valores superiores a 70% em algumas localidades (GILBERT et al., 2008; PAPPAS et al., 2009). As doenças oculares, decorrentes da infecção pelo parasito, afetam até 27,3% da população (FERREIRA et al., 2014).

Em seu ciclo de vida, *T. gondii* pode se apresentar em três formas biológicas infectantes: bradizoítas, taquizoítas e, esporozoítas. Os bradizoítas estão presentes em cistos que se localizam nos diversos tecidos dos hospedeiros. Caracterizam-se por serem de divisão lenta e se desenvolvem, predominantemente, na fase crônica da infecção. Os taquizoítas constituem a forma circulante e de replicação rápida. Dessa maneira, são responsáveis pela disseminação do parasito no organismo do hospedeiro. Ambas as formas podem ser encontradas tanto nos hospedeiros definitivos, quanto nos intermediários. Já os esporozoítas se encontram no interior de oocistos liberados pelos felídeos (HALONEN, WEISS, 2013).

O ser humano, dentre os hospedeiros intermediários, pode fazer parte do ciclo de desenvolvimento da toxoplasmose, ao adquirir a infecção por meio de três maneiras principais: consumo de carnes cruas ou mal cozidas contaminadas com cistos teciduais de *T. gondii*, ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente (os quais podem contaminar fontes de água ou alimentos) e pela transmissão transplacentária, na qual taquizoítas, oriundos da infecção na gestante, podem atingir o feto (MONTROYA, LIESENFELD, 2004). Além disso, é possível contrair o parasito pela realização de transplantes e transfusões sanguíneas (AMARAL, 2008; FOROUTAN-RAD et al., 2016). Independentemente da forma biológica contraída, *T. gondii* irá se desenvolver nesses hospedeiros por reprodução assexuada (DUBEY, 2010).

Espécies da família Felidae se infectam por meio das mesmas vias. No entanto, além do desenvolvimento do parasito pela reprodução assexuada, ocorrem as formas sexuadas de *T. gondii* no epitélio intestinal desses animais, com a formação de macro e microgametócitos, tornando-os hospedeiros definitivos do parasito. Essas formas ao fertilizarem originarão zigotos que, posteriormente, formarão oocistos não esporulados. Esses serão liberados nas fezes dos felídeos, sendo, dessa maneira, responsáveis pela contaminação ambiental. Sob condições ideais de umidade e temperatura, os oocistos irão esporular, tornando-se infectantes e resistirão no ambiente por meses (HALONEN, WEISS, 2013).

A estrutura populacional de *T. gondii* exhibe três linhagens clonais predominantes na América do Norte e na Europa, denominadas tipo I, II e III, indicados por RFLP (HOWE, SIBLEY, 1995). O tipo II é o mais encontrado tanto em

animais quanto em humanos nessas regiões (AJZENBERG et al., 2002; FEKKAR et al., 2011; VERMA et al., 2015; VILARES et al. 2017).

A virulência em camundongos está relacionada à esses tipos clonais, de maneira que cada um induz diferentes respostas no hospedeiros, resultando em patologias distintas. A linhagem tipo I é considerada virulenta, sendo letal mesmo com baixas doses do parasito. Os tipos II e III são menos virulentas, levando ao desenvolvimento de uma infecção crônica com produção de cistos teciduais e sobrevivência dos animais (SIBLEY, MORDUE E HOWE, 1999). Em relação à virulência em humanos, Xia et al. (2017), em um estudo de meta-análise, encontraram associação entre infecções pelo tipo III e o desenvolvimento de toxoplasmose pulmonar, além de um maior risco de toxoplasmose congênita nas infecções pelo tipo I.

Isolados de *T. gondii* encontrados na América do Sul apresentam alta diversidade genética e são, portanto, diferentes dos encontrados na América do Norte e Europa (SHWAB et al., 2014). Nos países desse continente, verifica-se a existência de linhagens atípicas e genótipos recombinantes, predominantemente virulentas para camundongos (SILVA et al. 2014).

No Brasil, essa grande variedade genética de isolados de *T. gondii* está amplamente distribuída pelo país e é proveniente de diferentes hospedeiros (DUBEY et al., 2012a). Pena et al. (2008) observaram uma estrutura populacional diversa, com a presença de quatro genótipos mais comuns, considerados linhagens clonais brasileiras. Esses foram denominados tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV. Em relação a virulência em camundongos, BrI se mostrou virulenta, BrIII não virulenta e as linhagens BrII e BrIV apresentaram virulência intermediária. Considerando infecção em humanos, ao contrário do que é observado no hemisfério norte, a maioria das cepas não arquétipos, chamadas por muitos de atípicas, são virulentas, e a infecção leva ao desenvolvimento de quadros clínicos, mesmo em pacientes imunocompetentes (ALEIXO et al., 2009; HIGA et al., 2014; SANDERS et al., 2017). Além disso, a maioria dos casos de toxoplasmose congênita estão associados à infecções por isolados atípicos virulentos (FERREIRA et al., 2011; CARNEIRO et al., 2013).

A invasão celular por *T. gondii* é um processo ativo que envolve a produção de diversas proteínas das roptrias, micronemas e grânulos densos (FOX et al., 2016; CLOUGH, FRICKEL, 2017; LIU et al., 2017). Ao atingir algum de seus hospedeiros, ocorre a transformação do parasito para a forma de taquizoítas. Esses irão infectar diferentes tipos celulares, replicando-se rapidamente no interior do vacúolo, e se disseminando pelo organismo até o desenvolvimento da resposta imune, que determina o início da fase crônica com a formação de cistos teciduais (BLADER, SAEIJ, 2009).

A interiorização do parasito ocorre, inicialmente, com a adesão do parasito à célula hospedeira. Em seguida há a liberação de proteínas do micronema (MICs) – responsáveis por ativar o complexo actomiosina -, e das roptrias (ROPs) – as quais formarão estruturas denominadas *moving junction*. Com o estabelecimento dessas condições, há a internalização do parasito na célula do hospedeiro por meio da formação simultânea do vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS, BOOTHROYD, 2007)

No interior desse vacúolo, os taquizoítas irão se replicar por endodiogenia, e serão liberados no interior da célula hospedeira. Dessa maneira, há indução da resposta imune no organismo hospedeiro, a fim de controlar a multiplicação de *T. gondii* e conter a infecção. No entanto, essa resposta imune inata apresenta perfil inflamatório e pode gerar danos aos tecidos infectados (BLADER, SAEIJ, 2009). Pinheiro et al. (2015) verificaram visíveis alterações histopatológicas em tecidos de camundongos experimentalmente infectados com linhagens atípicas de *T. gondii*. Os maiores danos decorrentes da infecção e da imunidade pró-inflamatória foram verificados no fígado, pulmão e íleo.

Células dendríticas e macrófagos são os primeiros tipos celulares que reconhecem o parasito. Essa identificação se dá por meio de receptores do tipo Toll, que reconhecem proteínas do *T. gondii* como a glicosilfosfatidilinositol (GPI) e a profilina (HUNTER, SIBLEY, 2012). Em resposta à detecção do agente, essas células do sistema imune produzem a citocina pró-inflamatória interleucina 12 (IL-12). Isso desencadeia a resposta de linfócitos do tipo Th1 – por estar relacionado a uma infecção por parasito intracelular – que ativa a produção de INF- γ pelas células T e NK (BLADER, SAEIJ, 2009). Além disso, há produção de TNF- α pelos macrófagos. Ambas citocinas (INF- γ e TNF- α) apresentam atividade antimicrobiana,

uma vez que alteram o metabolismo celular, induzindo a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos fagócitos, o que prejudica o desenvolvimento do patógeno. Dessa maneira, atuam no controle da proliferação do protozoário em questão (HUNTER, SIBLEY, 2012).

Na infecção por *T. gondii* em roedores, além da produção de citocinas, o INF- γ aumenta a expressão de duas proteínas de defesa da família das GTPases: as IRGs e as GBPs. Essas atuam por autofagia no vacúolo parasitóforo para eliminação do parasito (KIM et al., 2016).

A interação de *T. gondii* com o hospedeiro envolve a produção de proteínas imunomodulatórias pelo parasito, as quais constituem mecanismos de evasão da resposta imune (HUNTER, SIBLEY, 2012). Isso resulta na variação da virulência entre as diferentes cepas de *T. gondii*. Dentre as mais conhecidas, que apresentam modos de ação em sua maior parte elucidados em modelo murino, estão as proteínas polimórficas da família das roptrias ROP16, ROP18 e ROP 5 (SAEIJ et al., 2006; DUBREMETZ, LEBRUN, 2012; NIEDELMAN et al. 2012)

A quinase ROP 16 é secretada no citoplasma da célula hospedeira infectada e age no núcleo, interferindo em diversas vias de transcrição. Essa proteína é responsável por fosforilar as vias STAT3/6, resultando na diminuição de citocinas pró-inflamatória e, conseqüentemente, na supressão da resposta Th1 sobre o parasito (SAEIJ et al., 2006; BUTCHER et al., 2011; DUBREMETZ, LEBRUN, 2012). A serino-treonina quinase ROP18 também é secretada no interior da célula hospedeira e tem ação fundamental na patogenia de *T. gondii*, além de estar relacionada à virulência na fase aguda da infecção (TAYLOR et al., 2006). Localiza-se na superfície do vacúolo parasitóforo, e sua função principal é fosforilar as IRGs, preservando o parasito da ação do sistema imune. A pseudoquinase ROP5 é fortemente associada à ROP18, uma vez que aumenta a atividade de fosforilação dessa quinase, protegendo o vacúolo (BEHNKE et al., 2015). A combinação de alelos das proteínas ROP18 e ROP5 constitui um importante fator de virulência tanto para as cepas clonais encontradas na América do Norte e Europa (NIEDELMAN et al. 2012; DUBEY et al., 2014), quanto para os isolados da América do Sul, considerados virulentos em sua maioria (SHWAB et al., 2016; BEHNKE et al., 2015).

Um estudo utilizando cepas clonais de *T. gondii* identificou que a pseudoquinase ROP54 também está relacionada à virulência do parasito. Essa proteína é secretada no interior da célula hospedeira e responsável pela evasão da resposta imune mediada por INF- γ . Além disso, localiza-se na membrana do vacúolo parasitóforo e, assim, modula a resposta da outra classe de proteínas de defesa do hospedeiro, as GBPs (GBP2) (KIM et al., 2016).

Além das quinases e pseudoquinases secretadas pelas roptrias, há liberação de proteínas por outra organela presente nos taquizoítas de *T. gondii*, os grânulos densos. A GRA25, secretada no interior do vacúolo parasitóforo, modula a produção de citocinas por macrófagos infectados, constituindo assim, um outro fator de virulência (SHASTRI et al., 2014).

O marcador CS3, utilizado na genotipagem de *T. gondii*, está associado à virulência em camundongos. Esse locus está presente no cromossomo VIIa, o mesmo no qual se localiza a quinase ROP18. A variação alélica observada nesse marcador, pode indicar a virulência de isolados considerados atípicos (PENA et al., 2008; SILVA et al., 2014). No entanto, considerando-se a grande diversidade de cepas existente, outros genes podem estar associados à virulência de *T. gondii* (DUBEY et al, 2014).

Os estudos de virulência são conduzidos por meio de ensaios biológicos, utilizando camundongos para infecção experimental. Os dados são obtidos com a análise da mortalidade dos animais infectados (DUBEY et al., 2004). Isolados dos tipos clonais I, II e III apresentam virulência bem definida. Porém isolados recombinantes e atípicos possuem variação nesta característica, e não há uma metodologia estabelecida para determiná-la. Alguns fatores influenciam na virulência de isolados de *T. gondii*. São eles: forma biológica e cepa do parasito, dose, rota de inoculação e linhagem do camundongo (DUBEY et al., 2004; JOHNSON et al., 2002; PINHEIRO et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

O isolamento de *T. gondii* é realizado, principalmente, por meio de bioensaio em camundongos. Nesse procedimento, amostras de tecidos infectadas são inoculadas nesses animais, os quais são o modelo experimental mais utilizado devido à susceptibilidade ao parasito e à maior facilidade de manuseio. Se viáveis, *T. gondii* leva à infecção aguda em duas semanas, com desenvolvimento de pneumonia e/ou encefalite, ou se estabelece infecção crônica, após seis semanas, com sobrevivência dos animais (DUBEY, 2010).

Além do bioensaio em camundongos, pode-se isolar *T. gondii in vitro*, por meio de cultivo celular. Por se tratar de um protozoário bem adaptado, o que se verifica pela sua distribuição e diversidade de hospedeiros, é possível cultivá-lo em várias linhagens celulares de mamíferos (SZABO, FINNEY, 2017). São muito utilizadas as de origem endotelial e epitelial, como a VERO, derivada de rim do macaco africano *Chlorocebus* sp. (SAADATNIA et al., 2010). No entanto, de acordo com a linhagem utilizada, a susceptibilidade ao parasito é distinta e, além disso, a multiplicação de taquizoítas varia também de acordo com a cepa de *T. gondii*, indicando diferenças na virulência (BOOTHROYD, GRIGG, 2002).

A infecção experimental em camundongos mostra uma variação na patogenicidade causada pelo parasito nesses animais (DUBEY, 2010). Isso ocorre, pois, a virulência das cepas de *T. gondii* se diferencia de acordo com a forma biológica e cepa do parasito utilizados, dose, rota de inoculação e linhagem do camundongo (DUBEY et al., 2004; PINHEIRO et al., 2015). Devido a esses diferentes fatores, encontra-se uma dificuldade na determinação da virulência dos isolados, uma vez que cada estudo faz uso de condições pertinentes à cada realidade.

A realização do bioensaio, método mais comum utilizado para isolamento de *T. gondii*, não permite determinar a virulência da cepa obtida, pois não se conhece a quantidade de cistos inoculados, e de bradizoítas presentes nos cistos teciduais das amostras primárias a serem analisadas (DUBEY et al. 2012b). Dessa maneira, os resultados de virulência verificados com a utilização desse ensaio biológico são imprecisos e podem variar de acordo com a dosagem de *T. gondii* (PENA et al.,

2008). Além disso, não se considera o tempo após a inoculação do parasito até a morte dos camundongos. Este intervalo é uma variável importante ao se analisar virulência.

Para determinação da virulência de isolados de *T. gondii*, alguns estudos utilizam taquizoítas via inoculação intraperitoneal ou oocistos via oral, em camundongos de linhagens distintas (FERREIRA et al., 2001; DUBEY et al., 2012b). O oocisto, além de ser a forma de infecção natural no ciclo do parasito, é considerado mais virulento em relação aos taquizoítas e bradizoítas (DUBEY et al., 2004). Entretanto, em um estudo no qual foi verificada a virulência de isolados de *T. gondii* de animais silvestres, não se encontrou diferença nos resultados com o uso de taquizoítas e oocistos (DUBEY et al., 2014).

A fim de diminuir as diferenças no delineamento dos estudos de virulência de isolados de *T. gondii* em camundongos, Saraf *et al.* (2017) propuseram a padronização de uma metodologia, de maneira que os resultados obtidos possam ser comparados. Sugere-se a preparação de quatro dosagens de taquizoítas (10^4 a 10^1) por 500 μ L, obtidos de lavado peritoneal de camundongos ou cultivo celular, que devem ser inoculados via intraperitoneal em grupos de cinco camundongos (de uma das seguintes linhagens: CD-1, CF-1 ou Swiss-Webster).

A virulência dos isolados de *T. gondii* encontrados no Brasil foi verificada, em sua maioria, pela mortalidade de camundongos infectados no procedimento de bioensaio (PENA et al., 2008; VITALIANO et al., 2014; SILVA et al., 2017). No entanto, devido à inconsistência desse método para determinar tal fator, e diante da diversidade genética do parasito existente no país, e da grande variedade de hospedeiros os quais esse parasito infecta, torna-se necessário a avaliação da virulência de isolados brasileiros seguindo uma metodologia padrão.

3. OBJETIVOS

Avaliar a virulência de isolados brasileiros de *T. gondii* obtidos de diversas regiões do país e de diferentes hospedeiros, por meio do bioensaio em camundongos, com a utilização de inóculos padronizados.

3.1. Objetivos Específicos

Relacionar a virulência dos isolados analisados e a morbidade dos camundongos infectados, por meio da observação de sinais clínicos e variação de peso corporal para cada uma das doses de *T. gondii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Comitê de Ética

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), protocolo nº 7400080915.

4.2. Seleção dos Isolados

Inicialmente, selecionou-se 41 isolados brasileiros de *T. gondii* obtidos em estudos prévios, que são mantidos no Banco de Isolados do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP. Esses contemplam três regiões do Brasil (norte, nordeste e sudeste) e provém de oito estados (Figura 1). Os isolados se encontravam em amostras de pulmão ou cérebro de camundongos, nas formas de taquizoítas ou cistos contendo bradizoítas, respectivamente.

Os critérios para escolha dos isolados foram os dados de virulência (definidos por meio do bioensaio em camundongos), genótipo (*ToxoDataBase* –ToxoDB#) e regiões do país de origem das amostras primárias de diferentes hospedeiros. A tabela 1 mostra os isolados selecionados para este estudo, seguindo essas características.

Os isolados, em relação à virulência determinada pelo bioensaio, foram classificados como: virulentos (morte de 100% dos animais infectados), não virulentos (sobrevivência de 100% dos animais infectados) ou de virulência intermediária (padrão de mortalidade entre os extremos), conforme sugerido por Sibley & Howe (1995).



Figura 1. Mapa do Brasil com indicação dos locais de obtenção dos isolados de *T. gondii*, de acordo com os hospedeiros.

Tabela 1. Lista dos isolados brasileiros de *T. gondii* selecionados para o estudo de virulência, classificados de acordo com a taxa de mortalidade dos camundongos em bioensaio; genótipo (ToxoDB), hospedeiro e Estado de obtenção da amostra.

Não virulentos				
Isolados	ToxoDB #	Hospedeiro (espécie)	Estado	Referência isolamento
TgCatBr63	26	Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	SP	Pena et al., 2006
TgCatBr66	26	Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	SP	Pena et al., 2006
TgCatBr74 ^a	8	Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	SP	Pena et al., 2006
TgCpBr20	8	Capivara (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>)	SP	Yai et al., 2008
TgCpBr5*	4	Capivara (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>)	SP	Yai et al., 2008
TgCpBr7*	4	Capivara (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>)	SP	Yai et al., 2008
TgGtBr10 *	13	Caprino (<i>Capra hircus</i>)	RN	Ragozo et al., 2009
TgGtBr8*	135	Caprino (<i>Capra hircus</i>)	RN	Ragozo et al., 2009
TgRhHmBr1	13	Macaco (<i>Alouatta belzebul</i>)	PE	Pena et al., 2011
TgRatnoBrFN1 ^a	3 (II variante)	Brown rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	PE	Silva et al., 2017
TgRatnoBrFN2	146	Brown rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	PE	Silva et al., 2017
Virulência Intermediária				
Isolados	Toxo DB #	Hospedeiro (espécie)	Estado	Referência isolamento
TgCatBr39	11	Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	SP	Pena et al., 2006
TgCatBr67	121	Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	SP	Pena et al., 2006
TgCpBr11	11	Capivara (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>)	SP	Yai et al., 2008
TgCpBr13	34	Capivara (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>)	SP	Yai et al., 2008
TgCpBr15	34	Capivara (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>)	SP	Yai et al., 2008
Virulentos				
Isolados	Toxo DB #	Hospedeiro (espécie)	Estado	Referência isolamento
TgBatBr2	19	Morcego (<i>Desmodus rotundus</i>)	SP	Cabral et al., 2013
TgCantBr2*	234	Tamanduá (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	PA	Vitaliano et al., 2014
TgCantBr3*	236	Tamanduá (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	SP	Vitaliano et al., 2014
TgCatBr53	6	Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	SP	Pena et al., 2006
TgCatBr76	67	Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	SP	Pena et al., 2006
TgCkBr169	78	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	RN	Oliveira et al., 2009
TgCkBr177	109	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	CE	Oliveira et al., 2009
TgCkBr186	88	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	AL	Oliveira et al., 2009
TgCkBr282*	257	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	AM	Vitaliano et al., 2014
TgCkBr283*	258	Galinha (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	AM	Vitaliano et al., 2014
TgCpBr10*	19	Capivara (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>)	SP	Yai et al., 2008
TgCpBr25	175	Capivara (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>)	SP	Yai et al., 2008
TgCpBr34	33	Capivara (<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>)	SP	Yai et al., 2008

(Continuação da tabela 1).

Virulentos				
Isolados	Toxo DB #	Hospedeiro (espécie)	Estado	Referência isolamento
TgGtBr7	149	Caprino (<i>Capra hircus</i>)	SP	Ragozo et al., 2009
TgHoFBr1*	237	Raposa do Campo (<i>Pseudalopex vetulus</i>)	SP	Vitaliano et al., 2014
TgJagBr1	166	Jaguarundi (<i>Puma yagouaroundi</i>)	PE	Pena et al., 2011
TgLWpBr1*	175	Pica-pau (<i>Dryocopus lineatus</i>)	SP	Vitaliano et al., 2014
TgMWBr1*	11	Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	SP	Vitaliano et al., 2014
TgNbaBr3*	195	Tatu (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	PA	Vitaliano et al., 2014
TgSbaBr2*	6	Tatupeba (<i>Euphractus sexcinctus</i>)	MG	Vitaliano et al., 2014
TgShBr1	144	Ovino (<i>Ovis aries</i>)	SP	Ragozo et al., 2008
TgShBr3	150	Ovino (<i>Ovis aries</i>)	SP	Ragozo et al., 2008
TgSpPBr2*	240	Paca (<i>Cuniculus paca</i>)	PA	Vitaliano et al., 2014
TgWlpBr1*	232	Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	PA	Vitaliano et al., 2014
TgWlpBr3*	233	Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	PA	Vitaliano et al., 2014

* Isolados que não reativaram

^a Isolados em que não se obteve taquizoítas

4.3. Reativação dos Isolados

As amostras contendo os isolados de *T. gondii* se encontravam criopreservadas, por um período que variou de três a 14 anos. O procedimento de reativação consistiu, primeiramente, de um descongelamento rápido em banho-maria à 37°C e adição de soro fetal bovino (SFB), para neutralização do composto dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para criopreservação, seguido de centrifugação (1500g – 10 min). Ao pellet resultante foi adicionado solução de NaCl 0,85% (solução salina) e assim, inoculou-se aproximadamente 250 µL em camundongos, via intraperitoneal. Os camundongos utilizados nessa etapa do experimento eram da linhagem Swiss Webster, com seis a oito semanas de vida e de ambos os sexos, obtidos do biotério do VPS-FMVZ (USP).

A maioria dos isolados causou infecção aguda, resultando na morte dos camundongos em até 14 dias pós-inoculação. Nesses casos, confirmou-se a infecção pela presença de taquizoítas nos pulmões (*imprinting* de um fragmento do órgão, analisado em microscopia óptica). Amostras do tecido positivas foram

criopreservadas, para a manutenção dos isolados no Banco e sucessivas passagens foram feitas em novos camundongos (via intraperitoneal), para obtenção de maior quantidade do parasito em lavado peritoneal.

Após várias passagens (de três a 13), ao se iniciarem as manifestações clínicas nos camundongos em até 10 dias pós-inoculação, realizou-se a eutanásia para colheita de lavado peritoneal. Para isso, os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina (via intramuscular), seguindo-se de aprofundamento em uma câmara fechada, contendo algodão embebido em isoflurano. O lavado foi realizado com a injeção intraperitoneal de 10mL de solução-tampão salina de Hank (HBSS), imediatamente seguida de uma etapa de recolhimento do líquido. Esse material foi centrifugado a 1500g por 10 min e o pellet formado foi ressuspenso em solução para criopreservação (5% DMSO + 10% SFB + 85% meio RPMI 1640).

Os camundongos que sobreviveram por 30 dias, tiveram o sangue colhido por punção submandibular, para realização do exame sorológico MAT (*Modified Agglutination Test*), segundo Dubey & Desmonts (1987). O cérebro de todos os animais foi analisado, em microscopia óptica, a fim de confirmar o resultado obtido na sorologia. Aqueles com resultado da sorologia positivo e cérebro contendo cistos de *T. gondii* tiveram esse tecido macerado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 e inoculado, via intraperitoneal, em outros camundongos, na tentativa de gerar uma infecção aguda para obtenção de taquizoítas no lavado peritoneal.

4.4. Teste de Aglutinação Modificado (DUBEY, DESMONTS, 1987)

O diagnóstico sorológico para pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* dos camundongos que sobreviveram ao período de 30 dias pós-inoculação foi realizado por meio do Teste de Aglutinação Modificado (MAT, em inglês). Trata-se de um teste direto de aglutinação, de alta especificidade que detecta apenas anticorpos anti-*T. gondii* da classe IgG. Para sua realização não é necessário o uso de conjugados espécie-específicos, sendo muito utilizado para diagnóstico desse parasito em diferentes espécies de animais.

Nesse teste o soro foi diluído a 1:25 em solução de PBS 0,01 M. Em seguida, 25µL dessa solução é adicionada à mesma parte de uma mistura de antígeno de *T. gondii*, contendo 2-mercaptoethanol (o qual remove resíduos de anticorpos da classe IgM) e solução corante azul de Evans. A placa é incubada à 37°C *overnight*.

A reação ocorre com a ligação dos anticorpos IgG anti-*T. gondii* presentes no soro e o antígeno adicionado. Nesse caso, a amostra é considerada positiva e se observa o fundo da placa limpo. Quando não há interação antígeno-anticorpo devido à ausência de anticorpos, nota-se a formação de um ponto no fundo da placa, que corresponde ao antígeno precipitado, e a amostra é considerada negativa.

4.5. Modelo animal experimental para o teste de virulência

Foram utilizados camundongos fêmeas de 60 dias de idade (variação máxima de três dias em relação à data de nascimento), da linhagem de camundongos heterogênicos Swiss Webster obtidas no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da USP. Durante o experimento, os animais receberam ração comercial e água *ad libitum*.

4.6. Quantificação do inóculo

À medida em que os grupos de camundongos para realização do teste de virulência foram preparados, os lavados peritoneais de cada isolado, contendo taquizoítas provenientes da etapa de reativação, foram descongelados de acordo com os mesmos procedimentos empregados para as amostras de cérebro e pulmão, anteriormente descritos. Foram realizadas no mínimo duas passagens das amostras em camundongos, a fim de obter quantidade suficiente de taquizoítas viáveis para preparação das diferentes dosagens de inóculos. Posteriormente, o lavado peritoneal desses animais foi recuperado.

Nesse material, foi realizada a quantificação de taquizoítas com utilização da Câmara de Neubauer. Foram feitas quatro contagens de taquizoítas para cada isolado, excluiu-se os valores extremos e a quantidade final foi obtida por meio da

média dos valores intermediários. A partir disso, preparou-se as diluições seriadas para obtenção de 10^3 , 10^2 e 10^1 taquizoítas em 0,5 mL de solução de PBS pH 7,2.

4.7. Teste de Virulência

Foram inoculados quatro camundongos (via intraperitoneal) para cada uma das diluições dos isolados de *T. gondii*. Adicionalmente, um grupo controle negativo foi inoculado com 0,5 mL de solução de PBS pH 7,2. Além dos isolados brasileiros selecionados para o estudo, o teste de virulência foi realizado com amostras das cepas referências RH (tipo I – virulento) e VEG (tipo III – não virulento).

Os animais foram pesados a cada três dias, iniciando-se pelo dia 0, dia da inoculação, até o 30º dia pós-inoculação. Além disso, durante 30 dias, foram registrados dados de mortalidade e sinais clínicos nos camundongos, sendo eles: conjuntivite, dispneia, diarreia, ascite, pelos arrepiados, pelos aglutinados, relutância em se mover, desequilíbrio no andar e torso encurvado.

Dos animais que morreram, a infecção por *T. gondii* foi confirmada com a busca de taquizoítas na cavidade peritoneal. Além disso, foram colhidas amostras de cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rim, músculo esquelético, intestino (3 porções – duodeno, íleo e cólon descendente), olhos e linfonodos mesentéricos (quando visíveis) para futuras análises de imunohistoquímica e exame histopatológico.

Os camundongos que sobreviveram no período de 30 dias pós-inoculação tiveram o sangue coletado para realização do exame sorológico (MAT) e confirmação da infecção. Além disso, fragmento do cérebro desses animais foram analisados em microscopia óptica em busca de cistos teciduais.

4.8. Análise dos Resultados

Os critérios de avaliação da virulência dos isolados brasileiros de *T. gondii* foram a mortalidade dos camundongos infectados nas doses determinadas e tempo decorrido da inoculação até a morte dos animais. Considerando essas variáveis foi feito um gráfico de dispersão para avaliação desses dados. Para análise da variação de peso corporal dos camundongos, calculou-se a média da variação por dia e construiu-se um gráfico de variação de peso por animal, por dia para cada dose e isolado. Todas as análises foram realizadas com a utilização do *software* R.

5. RESULTADOS

5.1. Seleção e reativação dos isolados de *T. gondii*

Foram selecionados 41 isolados brasileiros de *T. gondii* para reativação, com a seguinte classificação de virulência resultante do bioensaio: 11 (26,8%) não virulentos, cinco (12,1%) de virulência intermediária e 25 (60,9%) virulentos. Esses possuem genótipos atípicos. Sete são dos tipos clonais brasileiros: TgCatBr53 e TgSpPBr2 (BrI); TgCatBr39, TgCpBr11 e TgMWBr1 (BrII); TgCatBr74 e TgCpBr20 (BrIII). Há uma predominância de isolados do estado de São Paulo, pois a maioria das amostras que foram armazenadas no Banco de Isolados pertencem a esse território.

Dos isolados selecionados, conseguiu-se reativar 24 (58,5%), com a obtenção de taquizoítas no pulmão dos camundongos e/ou cistos no cérebro. Foram feitas passagens sucessivas desses tecidos contendo *T. gondii* em outros camundongos, via intraperitoneal, para manutenção do isolado e aumento da quantidade do parasito, bem como para obtenção da forma de taquizoítas no caso de cistos cerebrais.

Mesmo após várias passagens, não se obteve taquizoítas do lavado peritoneal de dois isolados (TgCatBr74 e TgRatnoBrFN1). Esses desenvolveram sempre infecção crônica nos camundongos, com a presença de cistos no cérebro. Dessa maneira, não foi possível proceder com a metodologia proposta para análise de virulência nesses isolados.

5.2. Teste de Virulência

O teste de virulência foi realizado com 22 isolados brasileiros de *T. gondii*, além das cepas padrão RH e VEG. Desses, de acordo com a classificação de virulência determinada por bioensaio, efetuou-se o teste em cinco isolados não virulentos, cinco de virulência intermediária e 12 virulentos. Os dados de mortalidade obtidos para cada isolado, em cada uma das doses de taquizoítas, e os dias de morte após a inoculação dos camundongos, encontram-se na tabela 2. Para todos

os isolados foi feita a confirmação da infecção nos camundongos, por meio do MAT e exame do cérebro, no caso dos animais que sobreviveram ao período do experimento, ou pela busca de taquizoítas no líquido peritoneal daqueles que morreram durante o teste.

A cepa padrão RH, considerada altamente virulenta, matou todos os animais infectados dentre as três doses analisadas, entre sete e oito dias pós-inoculação. Em relação à cepa padrão VEG, caracterizada como não virulenta, todos os camundongos, pertencentes aos grupos das três doses de taquizoítas, se infectaram e sobreviveram os 30 dias do experimento. O soro desses animais testado no MAT foi positivo e, no exame do cérebro, verificou-se cistos de *T. gondii*. Os camundongos do grupo controle negativo, inoculados com PBS, sobreviveram ao período do teste, apresentando resultados negativos na sorologia e no exame em busca de cistos cerebrais.

Dos isolados brasileiros de *T. gondii* testados, 15 (68,2%) levaram à morte de todos os camundongos infectados, independente da dose inoculada, entre seis e 16 dias pós-inoculação. São eles: TgCatBr63, TgCpBr20, TgCatBr39, TgCatBr67, TgCpBr13, TgBatBr2, TgCatBr53, TgCatBr76, TgCkBr177, TgCkBr186, TgCpBr25, TgGtBr7, TgJagBr1, TgShBr1, TgShBr3. De acordo com esses resultados, tais isolados foram letais como a cepa padrão RH e são considerados virulentos. Os dados de letalidade dos isolados de *T. gondii*, considerando o dia médio de morte pós-inoculação em cada uma das doses analisadas, podem ser observados na figura 2.

Tabela 2. Taxa de mortalidade e dias de morte pós-inoculação dos camundongos Swiss para cada isolado e doses de *T. gondii*.

Virulência ^a	Isolados	Doses de <i>T. gondii</i> [*]									Taxa cumulativa de mortalidade (%)
		10 ³			10 ²			10 ¹			
		n ^o infectados	n ^o mortos	dias de morte (p.i.) ^b	n ^o infectados	n ^o mortos	dias de morte (p.i.)	n ^o infectados	n ^o mortos	dias de morte (p.i.)	
Não virulentos	TgCatBr63	4	4	8, 9, 9, 9	3	3	9, 9, 11	4	4	11, 11, 11, 12	100
	TgCatBr66	4	4	10, 10, 10, 11	4	4	9, 10, 10, 12	4	3	13, 13, 14	92
	TgCpBr20	4	4	11, 11, 11, 12	4	4	9, 10, 11, 11	4	4	10, 11, 12, 12	100
	TgRatnoBrFN2	4	2	11, 11	4	2	13, 15	4	1	13	42
	TgRhHmBr1	4	4	9, 11, 11, 11	4	4	10, 11, 11, 12	4	3	11, 12, 13	92
Virulência Intermediária	TgCatBr39	4	4	8, 8, 8, 9	4	4	8, 9, 9, 12	4	4	10, 10, 10, 11	100
	TgCatBr67	4	4	9, 9, 10, 11	4	4	10, 10, 11, 11	4	4	10, 10, 11, 12	100
	TgCpBr11	4	1	15	4	0	-	4	0	-	8
	TgCpBr13	4	4	9, 9, 9, 9	4	4	11, 11, 12, 13	4	4	10, 11, 11, 11	100
	TgCpBr15	4	3	14, 17, 18	4	0	-	4	0	-	25
Virulentos	TgBatBr2	3	3	7, 7, 7	4	4	7, 7, 7, 8	4	4	8, 8, 8, 8	100
	TgCatBr53	4	4	7, 7, 7, 7	4	4	8, 8, 8, 9	4	4	9, 9, 10, 10	100
	TgCatBr76	4	4	7, 7, 8, 8	4	4	8, 8, 8, 8	4	4	8, 8, 9, 9	100
	TgCkBr169	4	4	8, 9, 9, 10	4	4	9, 9, 9, 10	4	2	9, 10	80
	TgCkBr177	4	4	8, 8, 9, 11	4	4	9, 11, 11, 12	4	4	10, 10, 13, 16	100
	TgCkBr186	4	4	8, 8, 8, 9	4	4	9, 9, 9, 10	4	4	10, 10, 11, 12	100
	TgCpBr25	4	4	6, 7, 7, 9	4	4	7, 8, 8, 8	4	4	8, 8, 8, 8	100
	TgCpBr34	4	4	8, 8, 9, 9	4	4	8, 8, 9, 9	4	3	8, 9, 10	92
	TgGtBr7	4	4	6, 7, 7, 7	4	4	7, 7, 7, 8	4	4	7, 8, 8, 9	100
	TgJagBr1	4	4	6, 7, 7, 7	4	4	7, 7, 8, 8	4	4	7, 7, 9, 9	100
	TgShBr1	4	4	7, 7, 8, 8	4	4	8, 8, 8, 10	4	4	9, 9, 10, 10	100
	TgShBr3	4	4	8, 8, 8, 8	4	4	8, 8, 8, 9	4	4	9, 9, 9, 10	100
Cepas padrão	RH	4	4	7, 7, 7, 8	4	4	7, 8, 8, 8	1	1	8	100
	VEG	4	0	-	4	0	-	4	0	-	0

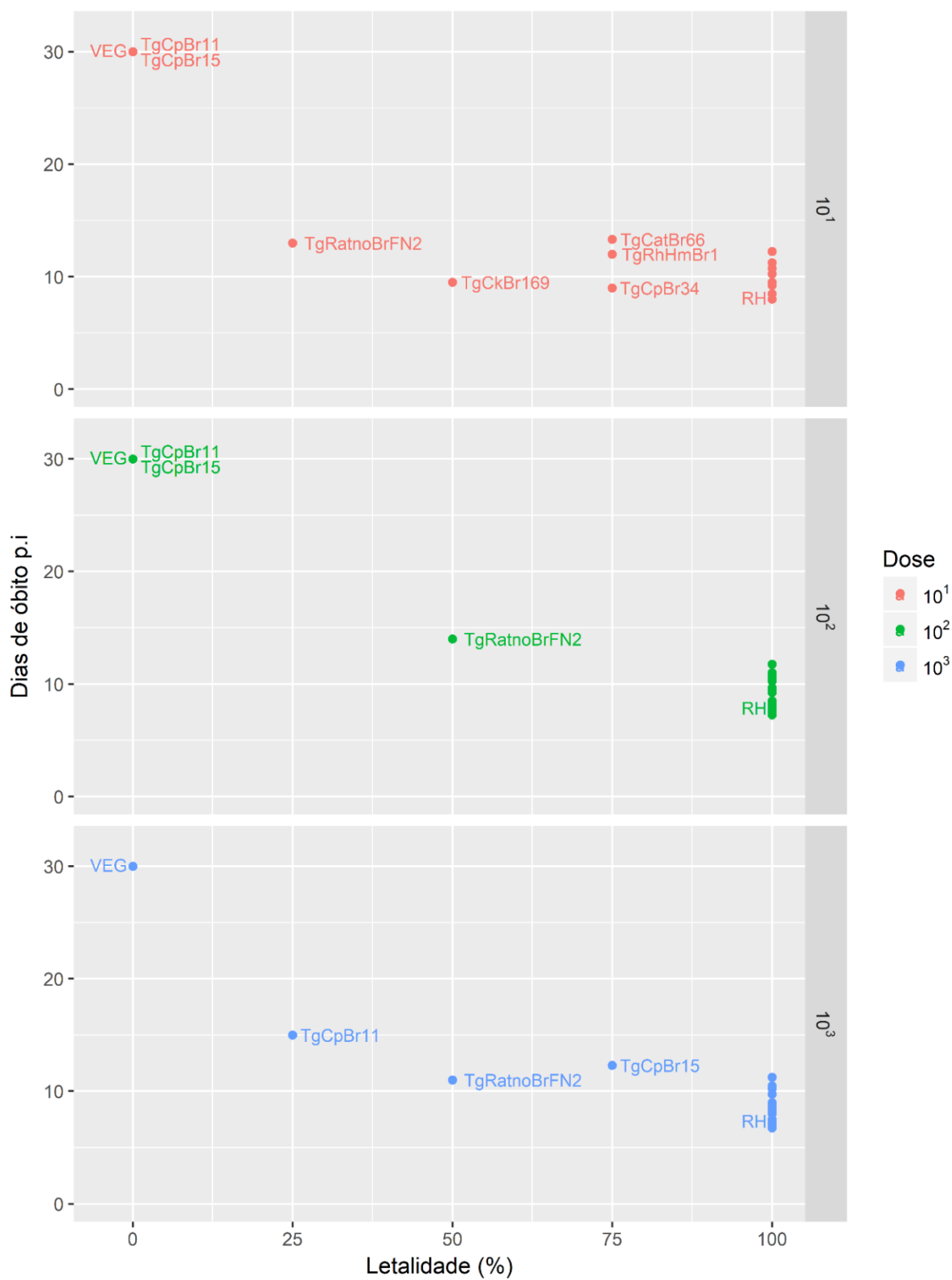


Figura 2. Letalidade dos isolados brasileiros de *T. gondii* em relação ao dia-médio de morte dos camundongos, nas três doses de taquizoítas analisadas.

Os isolados TgCpBr11, TgCpBr15 e TgRatnoBrFN2 apresentaram letalidade inferior à 100% nas três doses analisadas, mostrando-se um grupo de menor virulência em relação aos outros incluídos no estudo. Além disso, nas doses de 10^1 e 10^2 taquizoítas de TgCpBr11 e TgCpBr15, todos os camundongos infectados sobreviveram, igualmente ao que foi observado para cepa padrão não virulenta VEG. No entanto, para a maior dose analisada (10^3 taquizoítas), a letalidade de ambos os isolados aumentou (25 e 75%, respectivamente). Em relação a menor dose avaliada neste experimento (10^1 taquizoítas), letalidade dos isolados TgCatBr66, TgCpBr34, TgCkBr169 e TgRhHmBr1 foi inferior em relação às outras doses, nas quais esses foram 100% letais. A variação da letalidade observada nesses isolados de *T. gondii* indica que a virulência dos mesmos é dose-dependente e, ainda, a mortalidade dos camundongos foi mais tardia comparado aos altamente letais, variando de oito a 18 dias pós-inoculação.

De acordo com os dados de mortalidade dos camundongos inoculados com os 22 isolados brasileiros de *T. gondii* neste estudo, utilizando-se inóculos padronizados, sete isolados (32%) foram considerados de virulência intermediária e 15 (68%) foram virulentos. A nova classificação de virulência se encontra na tabela 3. Isolados que mataram 100% dos animais infectados independentemente da dose, foram considerados virulentos. Definiu-se como não virulentos, aqueles em que todos os camundongos infectados sobreviveram ao período do experimento, nas três doses analisadas. Os que tiveram padrão de mortalidade dos animais entre esses dois níveis foram considerados de virulência intermediária. Em relação aos fatores definidos para a realização do teste de virulência neste trabalho (três doses de taquizoítas inoculados, via intraperitoneal, em camundongos da linhagem Swiss), os isolados foram classificados em duas categorias (virulência intermediária e virulentos) e, não foram identificados isolados não virulentos.

Tabela 3. Classificação de virulência dos 22 isolados brasileiros de *T. gondii*, considerando três doses de taquizoítas, inoculados via intraperitoneal, em camundongos da linhagem Swiss Webster.

Virulência Intermediária		
Isolados	Toxo DB #	Classificação por bioensaio
TgCpBr11	11	Virulência intermediária
TgCpBr15	34	Virulência intermediária
TgCpBr34	33	Virulento
TgCatBr66	26	Não virulento
TgCkBr169	78	Virulento
TgRhHmBr1	13	Não virulento
TgRatnoBrFN2	146	Não virulento
Virulentos		
Isolados	Toxo DB #	Classificação por bioensaio
TgBatBr2	19	Virulento
TgCatBr39	11	Virulência intermediária
TgCatBr53	6	Virulento
TgCatBr63	26	Não virulento
TgCatBr67	121	Virulência intermediária
TgCatBr76	67	Virulento
TgCkBr177	109	Virulento
TgCkBr186	88	Virulento
TgCpBr13	34	Virulência intermediária
TgCpBr20	8	Não virulento
TgCpBr25	175	Virulento
TgGtBr7	149	Virulento
TgJagBr1	166	Virulento
TgShBr1	144	Virulento
TgShBr3	150	Virulento

Dos 22 isolados brasileiros analisados no teste de virulência, 10 (45,5%) foram classificados diferentemente em relação ao que foi determinado por bioensaio. Dessa maneira, obteve-se um total de sete isolados de virulência intermediária e 15 virulentos. O grupo definido pelo bioensaio como virulento, com 12 isolados, foi o que menos sofreu alterações e 83% deles se mantiveram na mesma classificação de virulência.

Seguindo esta classificação, foi possível observar que isolados que apresentam o mesmo genótipo foram separados em categorias diferentes. São eles: TgCpBr11 e TgCatBr39 (ToxoDB #11); TgCpBr15 e TgCpBr13 (ToxoDB #34); TgCatBr66 e TgCatBr63 (ToxoDB #26). Os primeiros de cada par foram definidos como de virulência intermediária, e os outros, classificados como virulentos. Em relação à classificação determinada pelo bioensaio, os isolados com genótipos ToxoDB #11 e #34 apresentam virulência intermediária e, os #26 se encontram definidos como isolados não virulentos.

Além disso, neste teste de virulência, quanto aos tipos clonais brasileiros, quatro isolados foram incluídos: TgCatBr53 (tipo BrI); TgCatBr39 e TgCpBr11 (tipo BrII); TgCpBr20 (tipo BrIII). Desses, seguindo a classificação de virulência aqui proposta, apenas TgCpBr11 foi definido como de virulência intermediária. Os outros foram considerados virulentos.

A morbidade resultante da infecção por *T. gondii* nos camundongos foi avaliada de acordo com a variação do peso corporal desses animais, e pela presença de sinais clínicos. A figura 3 (3a e 3b) mostra essa variação de peso dos animais inoculados com cada isolado analisado, em cada uma das doses. Dos 22 isolados somente o TgCkBr169 não foi considerado por problemas técnicos. Para a maioria dos isolados é possível observar uma variação, tanto de ganho quanto de perda de peso em relação ao peso inicial, no dia da inoculação dos animais (dia 0) e esse valor era comparado ao grupo controle negativo (inoculado com PBS) durante o mesmo período. Não se observou associação entre a variação de peso e a virulência dos isolados, ou as doses inoculadas.

Em relação aos sinais clínicos observados nos animais infectados, os mais comuns foram: pelos arrepiados, pelos aglutinados, torso encurvado, dispneia e ascite. Porém, também não houve um padrão no aparecimento de sinais clínicos, em relação à virulência dos isolados e doses inoculadas nos grupos.

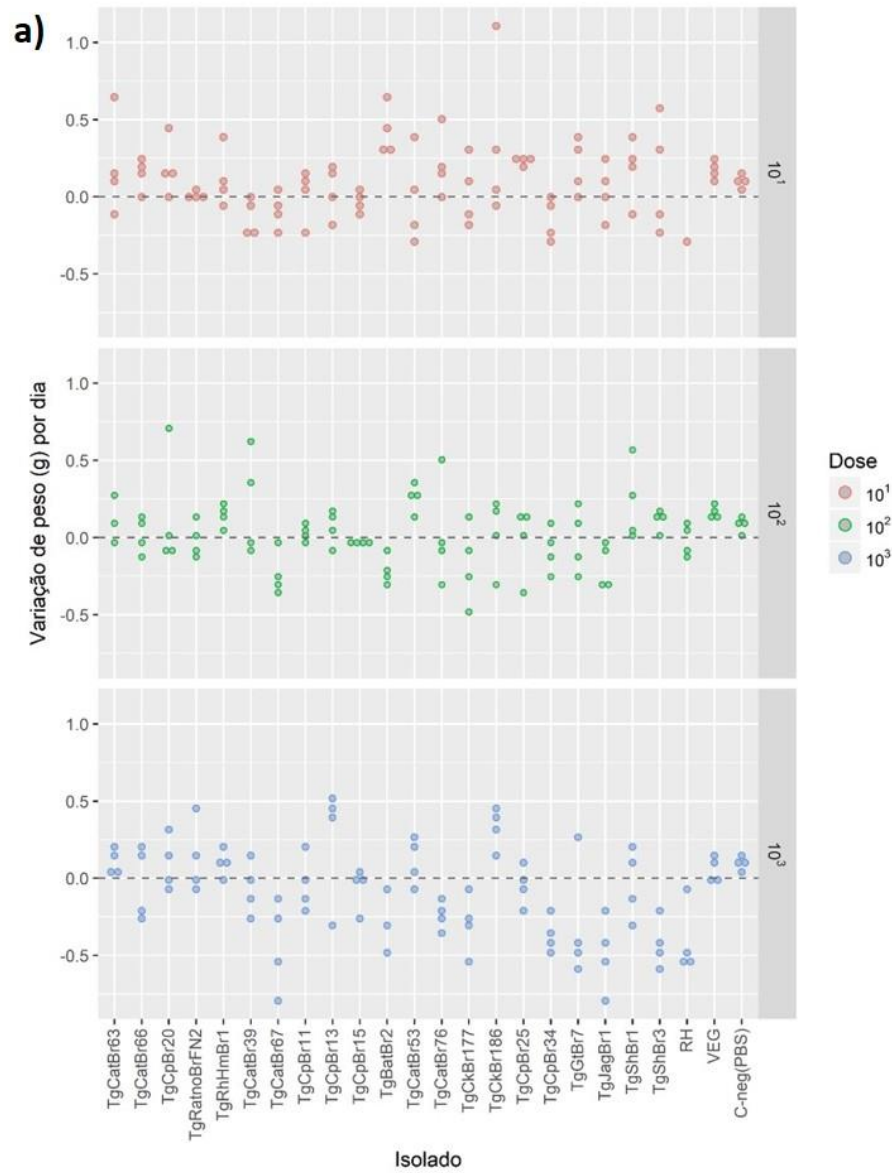


Figura 3 (a) – variação do peso corporal por dia de cada camundongo, infectados por cada isolado de *T. gondii*, nas três doses analisadas.

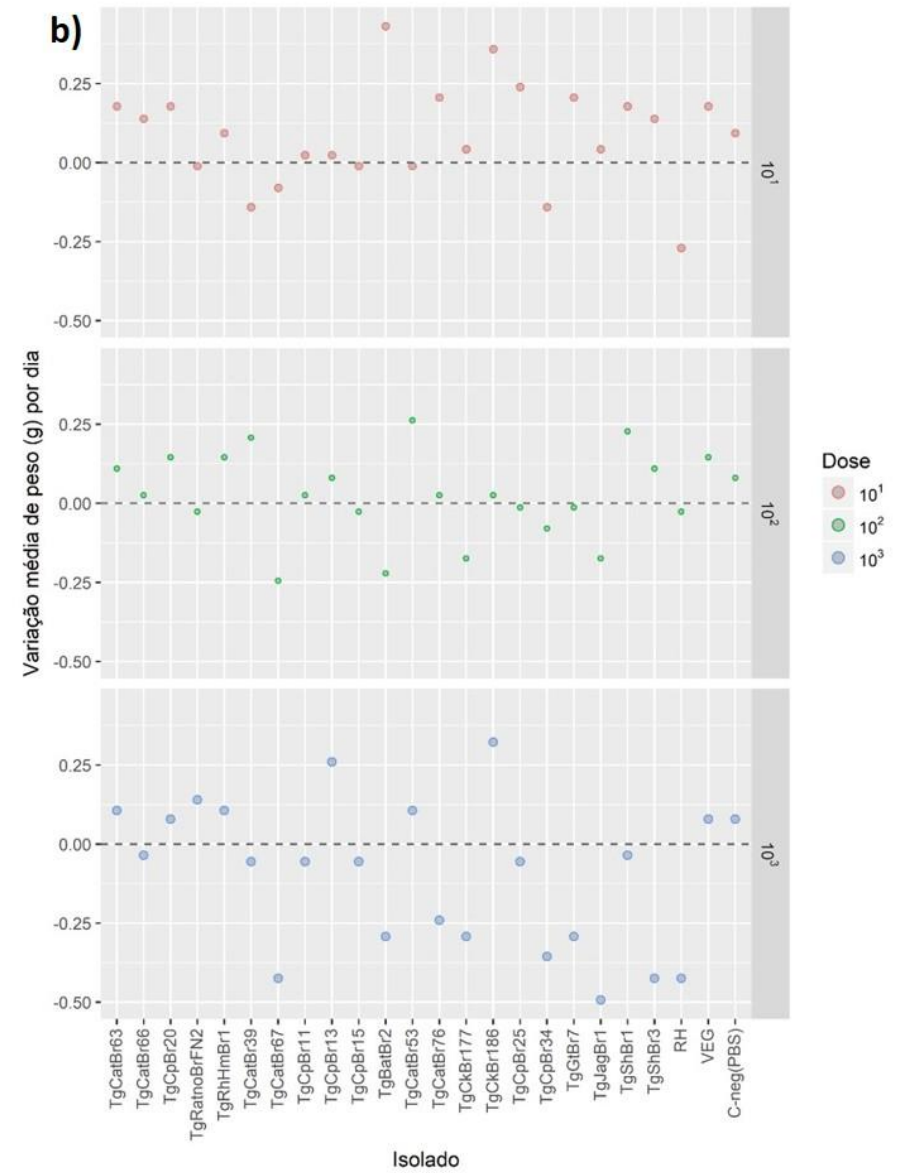


Figura (b)– variação média de peso corporal dos camundongos, para cada isolado de *T. gondii* analisado, em cada dose.

6. DISCUSSÃO

A maioria dos isolados brasileiros de *T. gondii* selecionados para este estudo foram considerados virulentos pelo bioensaio em camundongos. Apesar da imprecisão do método para definição de virulência, uma vez que a dose inoculada no modelo experimental é desconhecida, sabe-se que no Brasil há predominância de cepas virulentas e patogênicas (BRANDÃO et al., 2006; PENA et al., 2008; CARNEIRO et al., 2013; HIGA et al., 2014).

Depois da etapa de reativação, para obtenção da quantidade adequada de taquizoítas e realização do teste de virulência, foram feitas sucessivas passagens dos isolados em camundongos, via intraperitoneal. Passagens contínuas do parasito, tanto em camundongos como em cultivo celular, podem alterar suas características biológicas e de patogenicidade (DUBEY et al., 1999; KHAN et al., 2009). No entanto, alterações no fenótipo de isolados de *T. gondii* foram verificadas somente após 30 (LINDSAY et al., 1991) e 40 passagens (FRENKEL, DUBEY, HOFF, 1976), número bastante superior ao utilizado no presente estudo, de três a 13 passagens.

Mesmo com esse procedimento, os isolados TgCatBr74 (Tipo BrIII) e TgRatnoBrFN1 (Tipo II variante) não produziram quantidade suficiente de taquizoítas para ser colhido em lavado peritoneal, uma vez que causaram infecção crônica nos camundongos, com a formação de cistos cerebrais. Para obtenção de taquizoítas de *T. gondii* em isolados não virulentos, pode-se realizar a imunossupressão dos camundongos, com a utilização de corticosteroides, ou executar os ensaios em camundongos *knock-out* para o gene interferon gama (DUBEY, 2010). Diante do que foi observado, e considerando o genótipo desses isolados, observou-se que estes são isolados não virulentos. O mesmo resultado havia sido anteriormente obtido quando do isolamento pelo bioensaio em camundongos (PENA et al., 2006; SILVA et al., 2017). Chiebao et al. (2016) utilizaram oocistos do isolado TgCatBr74 para infectar camundongos e também observaram baixa virulência desse isolado quando comparado a outros do tipo BrI.

A virulência de *T. gondii* depende de diversos fatores, dentre eles: a forma biológica e a quantidade do parasito a que o hospedeiro é exposto; a via de infecção e a espécie de hospedeiro infectado, os quais apresentam variação na susceptibilidade ao parasito. Em ensaios biológicos, tratando-se da virulência desse coccídio, geralmente se utiliza camundongos (DUBEY et al., 2012b). Pinheiro et al. (2015), em um estudo de patogenicidade com isolados de humanos (provenientes de casos de toxoplasmose congênita no Brasil), em duas linhagens de camundongos, mostraram que a linhagem C57BL/6 é mais susceptível à infecção por *T. gondii* em relação à linhagem BALB/c.

Para a avaliação da virulência dos isolados de *T. gondii* selecionados neste estudo, foram utilizados camundongos heterogênicos da linhagem Swiss-Webster. Diversos trabalhos com objetivos semelhantes e considerando isolados brasileiros do parasito, também usaram camundongos dessa mesma linhagem (MITSUKA et al, 1998; SEVÁ et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2014; CHIEBAO et al., 2016).

A forma biológica do parasito está relacionada ao fator dose. Neste estudo, utilizou-se a forma de taquizoíta do coccídio. A quantificação de oocistos e taquizoítas traz maior precisão, porém os bradizoítas presentes no interior dos cistos não podem ter sua quantidade determinada. Devido à maior dificuldade para obtenção de oocistos de *T. gondii* quando se trabalha com muitos isolados, por serem necessários bioensaios em gatos para cada um, a maioria dos estudos utiliza taquizoítas, os quais são inoculados via intraperitoneal (MITSUKA et al, 1998; BRANDÃO et al., 2006, CARNEIRO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014). Apesar da infecção natural por *T. gondii* acontecer por oocistos e cistos teciduais, Dubey et al. (2014), ao analisar a virulência de isolados recombinantes de *T. gondii* por meio de infecção experimental com oocistos e com taquizoítas em camundongos da linhagem Swiss Webster, não encontraram diferenças na virulência e patogenicidade entre as duas formas biológicas do parasito.

A determinação da virulência é feita, na maioria das vezes, de acordo com o isolamento primário de *T. gondii* (bioensaio), ou então, conforme sugerido por Ferreira et al. (2001), com a utilização de inóculos graduados do parasito. No entanto, considerando os diversos fatores relacionados à virulência e as diferenças em que são realizados os ensaios experimentais, Saraf et al. (2017) propuseram a

padronização de uma metodologia para definir a virulência de isolados de *T. gondii*, a fim de unificar os resultados. Nesta, recomenda-se a realização de infecção experimental em grupos formados por cinco camundongos das linhagens CD-1, CF-1 ou Swiss Webster, com inoculação de quatro doses de taquizoítas, via intraperitoneal. O artigo de Saraf et al. (2017) é apenas descritivo, e não valida a metodologia proposta. O presente estudo já estava em execução quando da publicação da proposta de padronização para determinação de virulência, com a realização do mesmo ensaio sugerido, exceto pela utilização de três doses de taquizoítas, inoculados em grupos formados por quatro camundongos da linhagem Swiss-Webster. Além disso, pela primeira vez, aplica-se essa metodologia sugerida para determinação da virulência de 22 isolados brasileiros de *T. gondii*, comparando os dados obtidos com os resultados de virulência prévios, definidos pelo bioensaio em camundongos.

A cepa padrão RH é considerada altamente virulenta, uma vez que a dose letal para 100% (DL100) é igual a um taquizoíta (DUBEY et al., 1999). Neste estudo, todos os camundongos infectados com essa cepa, independente da dose, morreram entre sete e oito dias pós-inoculação. Apesar da susceptibilidade à infecção por *T. gondii* do modelo experimental utilizado, todos os animais infectados pela cepa não virulenta VEG, sobreviveram ao período do experimento. Dessa maneira, os resultados encontrados estão de acordo com os descritos na literatura para essas cepas, indicando serem excelentes cepas controle em estudos de virulência (DUBEY et al., 1999; KHAN et al., 2009).

Conforme as condições estabelecidas para a realização deste teste de virulência e, observando-se a taxa de mortalidade dos camundongos infectados com os 22 isolados analisados, bem como os dias de óbito pós-inoculação, foi possível a classificação desses em virulentos (matam todos os camundongos infectados, independente da dose) e de virulência intermediária (isolados que causam mortalidade apenas de parte dos animais infectados e muitos apresentam dose-dependência). O presente trabalho analisou três doses de taquizoítas: 10^1 , 10^2 e 10^3 . Para essas dosagens, 15 isolados foram letais (virulentos). Não foram observados isolados não virulentos, ou seja, que permitiram a sobrevivência de todos os camundongos, nas três doses.

Por outro lado, os isolados TgCpBr11 e TgCpBr15 tiveram comportamento fenotípico semelhante à cepa VEG nas doses mais baixas, nas quais todos os camundongos infectados sobreviveram ao período do teste de virulência e, foi observada mortalidade dos animais apenas nos grupos 10^3 (25 e 75%, respectivamente). Além disso, os isolados TgCatBr66, TgCpBr34, TgCkBr169 e TgRhHmBr1 mataram 100% dos animais inoculados com as doses de 10^2 e 10^3 taquizoítas, porém, a mortalidade foi menor no grupo da dose 10^1 . Na literatura, o critério para determinação de isolados virulentos é comum, definindo-os por apresentar $DL_{100} = 10^0$ taquizoíta. No entanto, a definição de isolados não virulentos varia entre os trabalhos, sendo esses considerados por possuir $DL_{50} > 10^3$ taquizoítas (DARDÉ, 2008; KHAN et al., 2009) ou $DL_{100} > 10^3$ (FERREIRA et al., 2001; CARNEIRO et al., 2013). Assim, para classificar com maior precisão esses isolados que apresentaram variação na mortalidade dos camundongos em alguma das doses analisadas, faz-se necessário a realização do teste de virulência com a utilização de mais inóculos como, por exemplo, de 10^0 a 10^4 taquizoítas.

Considerando a morbidade dos camundongos, resultante da infecção por isolados de *T. gondii* virulentos e de virulência intermediária, não se observou relação da variação de peso corporal dos animais e do aparecimento dos sinais clínicos com a virulência dos mesmos e doses de taquizoítas inoculadas. Camundongos infectados com cepas altamente letais morrem, muitas vezes, antes da manifestação clínica da fase aguda. Além disso, muitos animais desenvolvem um quadro de retenção hídrica (ascite), decorrente da multiplicação de taquizoítas no epitélio intestinal devido à inoculação no local, e isso resulta em um aumento no peso corporal.

Os sinais clínicos mais comuns observados foram: pelos arrepiados, pelos aglutinados, torso encurvado, dispneia e ascite. Oliveira et al. (2014) também observaram a morbidade em camundongos infectados com isolados de suínos, do sul do Brasil, e os sinais mais frequentes foram pelos arrepiados, cianose e apatia. No entanto, devido à diversidade genotípica dos isolados de *T. gondii* encontrada no país, torna-se difícil fazer uma associação com virulência e patogenicidade (DARDÉ, 2008). Carneiro et al. (2013), ao analisar isolados provenientes de casos de toxoplasmose congênita em humanos, não encontraram associação entre o genótipo dos isolados e o desenvolvimento de retinocoroidite nos recém-nascidos infectados.

De acordo com a classificação determinada neste teste, alguns isolados que possuem o mesmo genótipo mostraram diferenças em relação à virulência em camundongos. Chiebao et al. (2016) observaram diferença na mortalidade de dois grupos de camundongos Swiss, um do isolado TgCatBr60 e outro do TgCatBr74, inoculados, via oral, com oocistos, sendo ambos do mesmo genótipo (BrIII). Carneiro et al. (2013), ao definir a virulência de 27 isolados brasileiros de *T. gondii*, provenientes de recém-nascidos com toxoplasmose congênita e, utilizando metodologia semelhante à esta, também encontraram um mesmo genótipo com virulências distintas entre si. Além disso, dois genótipos analisados por eles também se encontraram neste estudo, sendo: Toxo DB# 11 (tipo BrII) e # 8 (tipo BrIII). A virulência observada para o primeiro genótipo foi concordante entre ambos estudos. No entanto, para Carneiro et al. (2013) o isolado do tipo BrIII foi classificado como não virulento e, no presente trabalho, foi definido como virulento. Isso indica que o genótipo de isolados atípicos não está relacionado à virulência dos mesmos (DARDÉ, 2008).

O Brasil é cenário de grande diversidade fenotípica e genotípica de *T. gondii* (DUBEY et al., 2012), visto a enorme quantidade de isolados, com virulência e patogenicidade distintas. Apesar da relação genótipo e virulência ainda não ser bem esclarecida, muitos isolados recombinantes são identificados em casos de toxoplasmose congênita (CARNEIRO et al., 2013; HIGA et al., 2014) e em pacientes com AIDS (FERREIRA et al., 2008; SILVA et al., 2016), mostrando a importância clínica dessa zoonose. Além disso, já foram identificados isolados de vários animais domésticos, definidos, em sua maioria, como virulentos e de virulência intermediária para camundongos (BRANDÃO et al., 2006; SILVA et al., 2014), apesar da grande maioria desses terem sido isoladas de animais aparentemente saudáveis. Isso evidencia a importância epidemiológica desses hospedeiros no ciclo de transmissão do parasito.

A metodologia utilizada neste estudo, para determinação da virulência de isolados brasileiros de *T. gondii*, redefiniu precisamente essa característica para os isolados classificados pelo bioensaio como não virulentos e de virulência intermediária, pois das 10 alterações que foram feitas, baseado nos resultados do teste, 80% correspondem à mudanças nesses dois grupos. No entanto, para isolados considerados virulentos pelo bioensaio, a maioria (83%) se manteve nessa

mesma classificação. Como há predominância de isolados virulentos e patogênicos no Brasil, a aplicação dessa metodologia para estudos epidemiológicos no país se torna irrelevante. O uso da mesma com isolados menos virulentos, como os encontrados no hemisfério norte (VILARES, et al., 2017) pode ser de maior utilidade e permitir a diferenciação de virulência dos mesmos. Além disso, para estudos de marcadores de virulência, os resultados de testes semelhantes podem fornecer informações importantes, entretanto em isolados de alta patogenicidade para camundongos como os aqui utilizados, o teste foi de baixa discriminação.

7. CONCLUSÕES

- Os isolados brasileiros de *T. gondii* são predominantemente virulentos para camundongos.
- A utilização do teste de virulência em camundongos não permitiu boa discriminação com as doses de inóculo utilizadas.
- A morbidade observada nos camundongos infectados pelo parasito em questão não é relacionada à virulência dos isolados.
- Não se observou associação do genótipo e virulência dos isolados brasileiros de *T. gondii*.

8. REFERÊNCIAS

- AJIOKA, J. W.; SOLDATI, D. 2007. In: AJIOKA, J. W.; SOLDATI, D. ***Toxoplasma* molecular and cellular biology**. 1^a ed. Norfolk: Horizon Bioscience, 2007.
- AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M.H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M.L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Human Congenital Toxoplasmosis, and Correlation with Clinical Findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 684-689, 2002.
- ALEIXO, A.L.Q.C.; BENCHIMOL, E.I.; NEVES, E.S.; SILVA, C.S.P.; COURA, L.C.; AMENDOEIRA, M.R.R. Frequência de lesões sugestivas de toxoplasmose ocular em uma população rural do Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 165-169, 2009.
- AMARAL, R.O.; AMARAL, R.P.; SAIDNEUY, A.E.K.T.; RIBEIRO, W.L.; ANDRADE, J. Serological Profile of Potential Solid Organ Donors in Santa Catarina, Brazil. **Transplantation Proceedings**, v. 40, p. 665-667, 2008.
- BEHNKE, M.S.; KHAN, A.; LAURON, E.J.; JIMAH, J.R.; WANG, Q.; TOLIA, N.H.; SIBLEY, L.D. Rhoptry Proteins ROP5 and ROP18 Are Major Murine Virulence Factors in Genetically Divergent South American Strains of *Toxoplasma gondii*. **PLOS Genetics**, v. 11(8):e1005434, 2015.
- BLADER, I.J.; SAEIJ, J.P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 117, p. 458-476, 2009.
- BOOTHROYD, J.C.; GRIGG, M.E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 438-442, 2002.

BRANDÃO, G.P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M.N.; VITOR, R.W.A. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, p. 143-149, 2006.

BUTCHER, B.A.; FOX, B.A.; ROMMEREIM, L.M.; KIM, S.G.; MAURER, K.J.; YAROVINSKY, F.; HERBERT, D.R.; BZIK, D.J.; DENKERS, E.Y. *Toxoplasma gondii* Rhoptry Kinase ROP16 Activates STAT3 and STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control. **PLoS Pathogens**, v. 7(9):e1002236, 2011.

CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE, G.M.; COSTA, J.G.L.; PINHEIRO, B.V.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; FERREIRA, A.M.; SU, C.; JAUNÁRIO, J.N.; VITOR, R.W.A. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Revealed Highly Diverse Genotypes for Isolates from Newborns with Congenital Toxoplasmosis in Southeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 901-907, 2013.

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

CHIEBAO, D.P.; PENA, H.F.J.; CABRAL, A.D.; ROCCA, M.P.; LOPES, E.G.; VALADAS, S.Y.O.B.; KEID, L.B.; FILHO, J.H.H.G.; SOARES, R.M. Infection of mice with oocysts of *Toxoplasma gondii* by oral route showed differences of virulence from Brazilian RFLP genotypes Brl and BrIII. **Research in Veterinary Science**, v. 107, p.257-260, 2016.

CLOUGH, B.; FRICKEL, E.M. The *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole: An Evolving Host–Parasite Frontier. **Trends in Parasitology**, v. 33, p. 473-488, 2017.

DARDÉ, M.L. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. **Parasite**, v.15, p. 335-371, 2008.

DUBEY, J.P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, p. 337-339, 1987.

DUBEY, J.P.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; FRENKEL, J.K. Infection and Immunity with the RH Strain of *Toxoplasma gondii* in Rats and Mice. **The Journal of Parasitology**, v. 85, p. 657-662, 1999.

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; SHREKUMAR, C; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; KAWABATA, H.H.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 721-726, 2004.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. Flórida: CRC Press, 2010. 336 p.

DUBEY, J.P.; LAGO, E.G.; GENNARI, S.M.; SU, C.; JONES, J.L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012 (a).

DUBEY, J.P.; FERREIRA L.R.; MARTINS, J.; McLEOD, R. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. **Parasitology**, v. 139, p. 1-13, 2012 (b).

DUBEY, J.P.; WHY, K.V; VERMA, S.K.; CHOUDHARY, S.; KWOK, O.C.H.; KHAN, A.; BEHINKE, M.S.; SIBLEY, L.D.; FERREIRA, L.R.; OLIVEIRA, S.; WEAVERD, M.; STEWARD, R.; SU, C. Genotyping *Toxoplasma gondii* from wildlife in Pennsylvania and identification of natural recombinants virulent to mice. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 74-84, 2014.

DUBREMETZ, J.F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1403-1410, 2012.

FEKKAR, A.; AJZENBERG, D.; BODAGHI, B.; TOUAFEK, F.; HOANG, P.L.; DELMAS, J.; ROBERT, P.Y.; DARDÉ, M.L.; MAZIER, D.; PARIS, L. Direct Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Ocular Fluid Samples from 20 Patients with Ocular Toxoplasmosis: Predominance of Type II in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 1513-1517, 2011.

FERREIRA, A.M.; MARTINS, M.S.; VITOR, R.W.A. Virulence for Balb/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil. **Parasite**, v. 8, p. 99-105, 2001.

FERREIRA, I.M.R.; VIDAL, J.E.; COSTA-SILVA, T.A.; MEIRA, C.S.; HIRAMOTO, R.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR–RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 221-227, 2008.

FERREIRA, I.M.; VIDAL, J.E.; MATTOS, C.C.B.; MATTOS, L.C.; QU, D.; SU, C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 190-195, 2011.

FERREIRA, A.I.; De MATTOS, C.C.; FREDERICO, F.B.; MEIRA, C.S.; ALMEIDA, G.C.; NAKASHIMA, F.; BERNARDO, C.R.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; De MATTOS, L.C. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. **Epidemiology & Infection**, v. 142, p. 142-148, 2014.

FOROUTAN-RAD, M.; MAJIDIANI, H.; DALVAND, S.; DARYANI, A.; KOOTI, W.; SAKI, J.; HEDAYATI-RAD, F.; AHMADPOUR, E. Toxoplasmosis in Blood Donors: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 30, p. 116-122, 2016.

FOX, B.A.; ROMMEREIM, L.M.; GUEVARA, R.B.; FALLA, A.; TRIANA, M.A.H; SUN, Y.; BZIK, D.J. The *Toxoplasma gondii* Rhoptry Kinome Is Essential for Chronic Infection. **mBio**, v. 7(3):e00193-16, 2016.

FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P.; HOFF, R.L. Loss of Stages after Continuous Passage of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. **J. Protozool**, v. 23, p 421-424, 1976.

GILBERT, R.E.; FREEMAN, K.; LAGO, E.G.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; TAN, H.K.; WALLON, M.; BUFFOLANO, W.; STANFORD, M.R.; PETERSEN, E. Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2(8): e277, 2008.

HALONEN, S.K.; WEISS, L.M. Toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 114, p. 125-145, 2013.

HIGA, L.T.; GARCIA, J.L.; SU, C.; ROSSINI, R.C.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from pregnant women with follow-up of infected children in southern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, p. 244-246, 2014.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* is comprised of three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J Infect Dis**, v. 172, p. 1561–1566, 1995.

HUNTER, C.A.; SIBLEY, L.D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 766-778, 2012.

JOHNSON, J.; SUZUKI, Y.; MACK, D.; MUI, E.; ESTES, R.; DAVID, C.; SKAMENE, E.; FORMAN, J.; McLEOD, R. Genetic analysis of influences on survival following *Toxoplasma gondii* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 179-185, 2002.

KHAN, A.; BEHNKE, M.S.; DUNAY, I. R.; WHITE, M.W; SIBLEY, L.D. Phenotypic and Gene Expression Changes among Clonal Type I Strains of *Toxoplasma gondii*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, p. 1828-1836, 2009.

KIM, E.W.; NADIPURAM, S.M.; TETLOW, A.L.; BARSHOP, W.D.; LIU, P.T.; WOHLSCHLEGEL, J.A.; BRADLEY, P.J. The Rhoptry Pseudokinase ROP54 Modulates *Toxoplasma gondii* Virulence and Host GBP2 Loading. **mSphere**, v. 1(2):e00045, 2016.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; BLAGBURN, B.L.; TOIVIO-KINNUCAN, M. Examination of Tissue Cyst Formation by *Toxoplasma gondii* in Cell Cultures Using Bradyzoites, Tachyzoites, and Sporozoites. **The Journal of Parasitology**, v. 77, p. 126-132, 1991.

LIU, Q.; LI, F.C.; ZHOU, C.X.; ZHU, X.Q. Research advances in interactions related to *Toxoplasma gondii* microneme proteins. **Experimental Parasitology**, v.176, p.89-98, 2017.

MITSUKA, R.; BECKNER DA SILVA, A.C.; NAVARRO, I.T.; BREGANO, J.W.; VIDOTTO O. *Toxoplasma gondii*: I. Evaluation of the virulence of eight strain. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, p. 29-31, 1998.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

NIEDELMAN, W.; GOLD, D.A.; ROSOWSKI, E.E.; SPROKHOLT, J.K.; LIM, D.; ARENAS, A.F.; MELO, M.B.; SPOONER, E.; YAFFE, M.B.; SAIEJ, J.P. The Rhoptry Proteins ROP18 and ROP5 Mediate *Toxoplasma gondii* Evasion of the Murine, But Not the Human, Interferon-Gamma Response. **PLoS Pathogens**, v. 8(6):E1002784, 2012.

OLIVEIRA, L.N.; COSTA JUNIOR, L.M.; De MELO, C.F.; RAMOS SILVA, J.C.; BEVILLAQUA, V.M.L.; AZAVEDO, S.S.; MURADIAN, V.; ARAÚJO, D.A.F.V.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the Northeast region of Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 235-237, 2009.

OLIVEIRA, P.A.; OLIVEIRA, F.C.; FARIA, L.M.J.; CADEMARTORI, B.G.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; COELHO, A.C.B.; PAPPEN, F.G.; FARIAS, N.A. Patogenicidade e virulência de *Toxoplasma gondii* isolado de suínos de criação artesanal no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 1186-1190, 2014.

OLIVEIRA, G.B.; SILVA, M.A.L.; WANDERLEY, L.B.; CORREIA, C.C.; FERREIRA, E.C.B.; MEDEIROS, Z.M.; FILHO, J.L.L.; MELO, F.L.; ARAÚJO, P.S.R.; SANTOS, A.H.C.M. Cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immune deficiency syndrome in the neurological emergency department of a tertiary hospital. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 150, p. 23-26, 2016.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M.E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1385-1394, 2009.

PENA, H.F.J.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 58-67, 2006.

PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**. v. 38, p. 561-569, 2008.

PETERSEN, E.; KIJLSTRA, A.; STANFORD, M. Epidemiology of Ocular Toxoplasmosis. **Ocular Immunology & Inflammation**, v. 20, p. 68-75, 2012.

PINHEIRO, B.V.; NOVIELLO, M.L.M.; CUNHA, M.M.; TAVARES, A.T.; CARNEIRO, A.C.A.V.; ARANTES, R.M.E.; VITOR, R.W.A. Pathological changes in acute experimental toxoplasmosis with *Toxoplasma gondii* strains obtained from human cases of congenital disease. **Experimental Parasitology**, v. 156, p. 87-94, 2015.

RAGOZO, A.M.A.; YAI, L.E.O.; OLIVEIRA, L.N.; DIAS, R.A.; GONÇALVES, H.C.; AZEVEDO, S.S.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Isolation of *Toxoplasma gondii* from goats from Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 323-326, 2009.

RAGOZO, A.M.A.; YAI, L.E.O.; OLIVEIRA, L.N.; DIAS, R.A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo State, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 1259-1263, 2008.

SAADATNIA, G.; GHANI, H.; KHOO, B.Y.; MAIMUNAH, A.; RAHMAH, N. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. **Tropical Biomedicine**, v. 27, p. 125-130, 2010.

SAEIJ, J.P.J.; BOYLE, J.P.; COLLIER, S.; TAYLOR, S.; SIBLEY, L.D.; BROOKE-POWELL, E.T.; AJIOKA, J.W.; BOOTHROYD, J.C. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1780-1783, 2006.

SANDERS, A.P.; SANTOS, T.; FELIPE, C.K.K.; ESTEVÃO, M.L.; CÍCERO, C.; EVANGELISTA, F.; MANRIQUE, C.A.; MIZUTANI, A.S.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Ocular Lesions in Congenital Toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Paraná, Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, p. 817-820, 2017.

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

SEVÁ, A.P.; SILVA, R.C.; SILVA, A.V.; CASTRO, A.P.B.; MENOZZI, B.D.; LANGONI, H. Avaliação da virulência de cepas de *Toxoplasma gondii* em camundongos, isoladas de cães com sinais neurológicos, em Botucatu, SP. **Veterinária e Zootecnia**, v. 13, p. 33-43, 2006.

SHASTRI, A.J.; MARINO, N.D.; FRANCO, M.; LODOEN, M.B.; BOOTHROYD, J.C. GRA25 Is a Novel Virulence Factor of *Toxoplasma gondii* and Influences the Host Immune Response. **Infection and Immunity**, v. 82, p. 2595-2605, 2014.

SHWAB, E.K.; ZHU, X.Q.; MAJUMDAR, D.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, p. 453-461, 2014.

SHWAB, E.L.; JIANG, T.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 46, p. 141-146, 2016.

SIBLEY, L.D.; MORDUE, D.; HOWE, D.K. Experimental Approaches to Understanding Virulence in Toxoplasmosis. **Immunobiology**, v. 201, p. 210-224, 1999.

SILVA, L.A.; ANRADE, R.O.; CARNEIRO, A.C.A.V.; VITOR, R.W.A. Overlapping *Toxoplasma gondii* Genotypes Circulating in Domestic Animals and Humans in Southeastern Brazil. **Plos One**, v. 9 (2): e90237, 2014.

SILVA, I.B.; BATISTA, T.P.A.; MARTINES, R.; KANAMURA, C. T.; FERREIRA, I.M.R.; VIDAL, J.E.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Genotyping of *Toxoplasma gondii*: DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues from AIDS patients who died by severe disseminated toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 16-21, 2016.

SILVA, J.C.R.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; AJZENBERG, D.; MARVULO, M.F.V.; MAGALHÃES, F.J.R.; FILHO, C.D.F.L.; OLIVEIRA, S.; SOARES, H.S.; FEITOSA, T.F.; AIZAWA, J.; ALVES, L.C.; MOTA, R.A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J. Cat-rodent *Toxoplasma gondii* Type II variant circulation and limited genetic diversity on the Island of Fernando de Noronha, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 2-6, 2017.

SZABO, E.K.; FINNEY, C.A.M. *Toxoplasma gondii*: One Organism, Multiple Models. **Trends in Parasitology**, v. 33, p. 113-127, 2017.

TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS, S.J.; TANG, K.; BEATTY, W.L.; HAJJ, H.E.; JEROME, M.; BEHNKE, M.S.; WHITE, M.; WOOTTON, J.C.; SIBLEY, L.D. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1776-1780, 2006.

VERMA, S.K.; AJZENBERG, D.; RIVERA-SANCHEZ, A.; SU, C.; DUBEY, J.P. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from Portugal, Austria and Israel reveals higher genetic variability within the type II lineage. **Parasitology**, v. 142, p. 948-957, 2015.

VILARES, A.; GARGATÉ, M.J.; FERREIRA, I.; MARTINS, S.; GOMES, J.P. Molecular and virulence characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated from humans in Portugal. **Parasitology Research**, v. 116, p. 979-985, 2017.

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

XIA, J.; CHENG, X.Y.; WANG, X.J.; PENG, H.J. Association between *Toxoplasma gondii* types and outcomes of human infection: a meta-analysis. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 64, p. 229-224, 2017.

YAI, L.E.O.; RAGOZO, A.M.A.; AGUIAR, D.M.; DAMACENO, J.T.; OLIVEIRA, L.N.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Isolation of *Toxoplasma gondii* from capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 94, n. 2, p. 1060-1063, 2008.

YAMAMOTO, L.; TARGA, L.S.; SUMITA, L.M.; SHIMOKAWA, P.T.; RODRIGUES, J.C.; KANUNFRE, K.A.; OKAY, T. S. Association of Parasite Load Levels in Amniotic Fluid With Clinical Outcome in Congenital Toxoplasmosis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 130, p. 335-345, 2017.