

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

ANA GRAZIELA DE JESUS DEIRÓ

**ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *Toxoplasma gondii* EM GATOS E
COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA COM ISOLADOS DE
OUTRAS ESPÉCIES DE ANIMAIS DO ESTADO DA BAHIA**

ILHÉUS - BAHIA

2020

ANA GRAZIELA DE JESUS DEIRÓ

**ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *Toxoplasma gondii* EM GATOS E
COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA COM ISOLADOS DE
OUTRAS ESPÉCIES DE ANIMAIS DO ESTADO DA BAHIA**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como exigência para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Dias Munhoz

Co-Orientador: Prof. Dr. George Rego Albuquerque

ILHÉUS - BAHIA

2020

- D324 Deiró, Ana Graziela de Jesus.
Isolamento e genotipagem de toxoplasma gondii em gatos e comparação da diversidade genética com isolados de outras espécies de animais do estado da Bahia / Ana Graziela de Jesus Deiró. - Ilhéus : UESC, 2020.
106f. : il.
Orientador : Alexandre Dias Munhoz.
Co-orientador : George Rego Albuquerque.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz.
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.
- Inclui referências.
1. Genética animal.
 2. Gato – Diversidade genética – Bahia.
 3. Toxoplasmose em animais. I. Munhoz, Alexandre Dias. II. Albuquerque, George Rego. III. Título.
- CDD – 591.35

ANA GRAZIELA DE JESUS DEIRÓ

**ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *Toxoplasma gondii* EM GATOS E
COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA COM ISOLADOS DE
OUTRAS ESPÉCIES DE ANIMAIS DO ESTADO DA BAHIA**

Ilhéus – BA, 28 /02 /2020

Alexandre Dias Munhoz- DScUESC
– Orientador

George Rego Albuquerque – DSc
UESC – Co-orientador

Amauri Arias Wenceslau– DSc
UESC

Leandro Lopes Loguercio – DSc
UESC

Rodrigo Alves Bezerra– DSc

Fabio Santos Carvalho– DSc

ILHÉUS - BAHIA

2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho as minhas filhas Luana e Ana Letícia, minhas princesas e razão do meu viver, por me compreender e me transmitir amor, força e confiança, possibilitando-me vencer todos os obstáculos.

Dedico a minha mãe e meu pai, alicerces fundamentais na minha vida. Aos meus irmãos por acreditarem sempre em mim.

Ao meu esposo Walter Junior pelo amor, amizade, paciência e união.

E ao meu padrinho Ronaldo Silva Soares (In Memoriam), pelos ensinamentos e por todo amor a mim doado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a Nossa senhora da Conceição, ao Senhor do Bonfim e aos Espíritos de Luz, por terem me guiado e me dado força nos momentos mais difíceis dessa trajetória.

Agradeço aos meus pais Tereza Cristina Bomfim de Jesus Deiró e Haroldo Monteiro Fontes Deiró, pela educação que me deram, pelo carinho, colo, atenção sempre que precisei. Obrigado por estarem sempre ao meu lado e por acreditarem em mim. Vocês são exemplos de honestidade, bondade, companheirismo! Ensinarão-me a ser forte em momentos difíceis, me ensinaram a me reerguer quando estava triste e desmotivada, me elogiaram, me mostraram o caminho correto, por mais que eu fosse teimosa. Sem vocês com certeza não conseguiria! Meu muito obrigada, amo vocês!

Aos meus irmãos, Ricardo Deiró, Pablo Deiró, Renata Deiró, Paula Deiró, Haroldo Deiró Filho e Rodrigo Deiró, pelo amor, pela torcida, pelo apoio em todos momentos que precisei! Vocês são pessoas exemplares, que me espelho e me orgulho de tê-los como irmãos.

Agradeço ao meu esposo Walter Junior e minhas filhas Luana e Ana Letícia, por todo apoio que me deram, por todo carinho e peço desculpas pela ausência e pelo estresse. Essa conquista é nossa. Eu amo vocês!

A todos aos meus familiares e familiares de meu esposo, que torceram pelo meu sucesso. Em especial a minha Sogra Jeane e meu Sogro Adriano! Amo vocês! Agradeço de coração o apoio de todos vocês.

A meu orientador Professor Dr. Alexandre Dias Munhoz, pela confiança, por aceitar me orientar, pela atenção dada, pela amizade, pelos puxões de orelhas, quando necessário, você me ensinou a acreditar mais em mim e a ser uma pessoa mais responsável. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Professor Dr. George Rêgo Albuquerque, por todo apoio, incentivo e ensinamentos, sou grata de coração.

A Rodrigo Bezerra, a professora Dra. Daniele de Santana Rocha, a professora Fernanda Gaiotto, pela disponibilidade e paciência em me ajudar, vocês foram importantes na construção do meu trabalho.

Agradeço aos meus amigos do “coração” e aos amigos “acadêmicos”, por fazerem parte da minha vida e por não me permitirem desanimar.

Em especial Graziela Baroni, Hlltchaikra Ferraz, Gabriela Mota, Luciana Guimarães, Luciana Lacerda, Rebeca Dalite e William Machado, por toda ajuda dada e por compartilharem suas experiências, dúvidas e conhecimentos ao longo dessa jornada, vocês foram importantes para tornar essa jornada mais leve, se é que posso falar isso.

A todos os colegas, funcionários do Hospital Veterinário da UESC, em especial a minha amiga Roueda Abou Said, pela compreensão e apoio em todos os momentos que precisei. Te admiro muito como pessoa e como docente.

Aos meus ICs, Iuri Prates e Daniele Prado, que me ajudaram muito nessa trajetória, me socorreram em horas difíceis, muito obrigada mesmo! Espero ter contribuído positivamente com a formação de vocês. A todos ICs que me ajudaram diretamente ou indiretamente ao qual agradeço em nome de José Luis.

Aos CCZ's e as Clínicas Veterinárias, por terem acreditado na importância deste projeto e disponibilizarem alguns animais para estudo, permitindo a realização de coleta de amostras de gatos, material imprescindível para a realização deste trabalho.

Enfim a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a concretização desse trabalho.

O meu muito OBRIGADA!

“Não desanimes.
Persiste mais um tanto. Não
cultives pessimismo.
Centraliza-te no bem a fazer.
Esquece as sugestões do medo destrutivo.
Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros.
Avança, ainda que seja por entre lágrimas.
Trabalha constantemente.
Edifica sempre.
Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração.
Não te impressiones à dificuldade.
Convence-te de que a vitória espiritual é construção para o dia-a-dia.
Não desistas da paciência.
Não creias em realização sem esforço.
Silêncio para a injúria.
Olvido para o mal.
Perdão às ofensas.
Recorda que os agressores são doentes.
Não permitas que os irmãos desequilibrados te destruam o trabalho ou te apaguem
a esperança.
Não menosprezes o dever que a consciência te impõe.
Se te enganaste em algum trecho do caminho, reajusta a própria visão e procura o
rumo certo.
Não contes vantagens nem fracassos.
Estuda buscando aprender. Não
te voltes contra ninguém.
Não dramatizes provações ou problemas.
Conserva o hábito da oração para que se te faça luz na vida íntima.
Resguarda-te em Deus e persevera no trabalho que Deus te confiou.
Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que possas realizar.
Age auxiliando.
Serve sem apego. E
assim vencerás.”

Emmanuel (por Chico Xavier)

**ISOLAMENTO E GENOTIPAGEM DE *Toxoplasma gondii* EM GATOS E
COMPARAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA COM ISOLADOS DE
OUTRAS ESPÉCIES DE ANIMAIS DO ESTADO DA BAHIA**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar os genótipos e diversidade genética de *Toxoplasma gondii*, de gatos e outras espécies de animais, naturalmente infectados, do estado da Bahia, Nordeste do Brasil. Para tanto, o estudo foi dividido em duas partes. Na primeira, sete gatos soropositivos oriundos de diferentes municípios do estado da Bahia tiveram seus cérebros e corações colhidos e submetidos a digestão peptica e inoculados em camundongos. *Toxoplasma gondii* foi isolado em cinco gatos. Foi realizada a genotipagem dos 5 isolados utilizando a técnica de genotipagem PCR-RFLP com 11 marcadores e com a técnica de 15 Marcadores Microsatélites (SSR). Na análise do PCR- RFLP, resultou em 4 genótipos novos e um incompleto, denominados TgCatBr85, 86, 87, 88, 89. Os 5 isolados de *T. gondii* revelaram 5 genótipos distintos com diferentes combinações de linhagens clonais. Dos cinco isolados, três possuíam cepas virulentas, e em 2 isolados os animais encistaram o parasito. Na segunda parte, foi realizada genotipagem através da técnica de SSR e comparação dos genótipos nos cinco isolados dos gatos e mais outros 25 (2 cães, 15 galinhas, 1 suínos, 3 ovinos, 4 animais silvestres). A análise por microsatélites revelou no método de bayesiano que os isolados da Bahia, podem ser divididos em pelo menos duas populações, denominada de população 1 e 2. O (FST) foi igual a 0,036, e demonstra que apesar de observamos uma grande diversidade genética na população, há uma alta similaridade entre os isolados desse estudo. Na análise de AMOVA mostrou que a variação genética dentro das populações é superior que entre as populações 1 e 2. Os 15 SSR utilizados foram polimórficos e demonstraram altos níveis de diversidade. Pode-se observar que todos isolados mostraram alelos atípicos, quer seja nos marcadores de digitação ou nos de impressão digital. Assim, novos genótipos atípicos de *T. gondii* foram encontrados em

animais da Bahia. Os resultados encontrados aqui e estudos de genotipagem no Brasil sugerem que a região favorece ampla diversidade genética de *T. gondii* e a presença de genótipos virulentos como os encontrados na América Central e América do Sul.

Palavras-chave: PCR-RFLP; Marcadores Microsatélites; Toxoplasmose.

**ISOLATION AND GENOTYPING OF *Toxoplasma gondii* IN CATS
AND COMPARISON OF GENETIC DIVERSITY WITH
ISOLATES FROM OTHER ANIMAL SPECIES IN THE STATE
OF BAHIA**

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the genotypes and genetic diversity of *Toxoplasma gondii* from cats and other naturally infected animal species from the state of Bahia, Northeastern Brazil. Therefore, the study was divided into two parts. In the first, seven seropositive cats from different municipalities in the state of Bahia had their brains and hearts harvested and separated for peptic delivery and inoculated into mice. *Toxoplasma gondii* was isolated from five cats. A genotyping of 5 isolates was performed using the PCR-RFLP genotyping technique with 11 markers and with the technique of 15 Microsatellite Markers (SSR). The PCR-RFLP resulted in 4 new genotypes and one incomplete, named TgCatBr85, 86, 87, 88, 89. Of the five isolates, three had virulent strains, and 2 animal isolates encysted the parasite. In the second part, genotyping was performed using the SSR technique and genotypes were compared in the five isolates from cats and another 25 (2 dogs, 15 chickens, 1 pig, 3 sheep, 4 animals). A microsatellite analysis did not reveal any Bayesian method for Bahia, the isolates can be separated into at least two populations, called population 1 and 2. The (FST) was equal to 0.036, and demonstrates that although we observed a large race in the population, there is a high similarity between the isolates in this study. AMOVA analysis showed that genetic diversity within populations is superior as between populations 1 and 2. The 15 SSRs were primarily used as populations of diversity. It can be seen that all the security isolates, whether they are atypical in either typing or fingerprint indicators. Thus, new atypical genotypes of *T. gondii* were found in animals from Bahia. The results found here and genotyping studies in Brazil suggest that a region conducive to the genetic diversity of *T. gondii* and the presence of virulent genotypes such as those found in Central and South America.

Keywords: PCR- RFLP; Microsatellite markers; Toxoplasmosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	A) Taquizoítos em cultivo celular. (B) Fotomicrografia dos oocistos de <i>T. gondii</i> nas fezes de um felino. Aumento de 400x. Barra: 10 µm. (C) Cisto contendo bradizoítos encistados em cérebro, coloração Giemsa, aumento de 100x. Fonte: Arquivo Pessoal	24
2	O ciclo biológico do protozoário <i>Toxoplasma gondii</i> em hospedeiros intermediários e definitivos (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ 2012).	26
3	Esquema ilustrando as várias fontes de transmissão do protozoário <i>Toxoplasma gondii</i> para humanos e animais (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ 2012).	29
4	Mapa de ligação genética para os 14 cromossomos de <i>T. gondii</i> . Marcadores individuais são mostrados à direita da barra vertical e os números dos cromossomos são dados acima de cada mapa. Polimorfismos exclusivos para o tipo I são mostrados em vermelho, aqueles exclusivos para o tipo II é mostrado em verde, os únicos do tipo III são mostrados em azul e os marcadores que contêm polimorfismo múltiplo, são mostrados em amarelo. Fonte: KHAN et al, 2005	33/34
5	A) Estrutura genética da população de <i>T. gondii</i> . A análise da rede foi realizada usando 11 marcadores RFLP multilocus mais 1 marcador para o apicoplasto e quatro sequências de íntrons das 138 estirpes representativas representando haplótipos únicos. A análise da rede mostrou várias rotas para o fluxo gênico entre diferentes populações (linhas de interconexão entre estirpes representativas). Seis grandes clades (A até F) são indicados. Haplogrupos são mostrados em números circulados com base em designações, contendo 15 haplogrupos. Cepas representativas para cada haplogrupo são indicados por caixas amarelas. B) Análise de redes vizinhas de clades usando polimorfismos de microssatélites, RFLP e sequências de íntrons. Haplogrupos designados por diferentes cores de letras; preto indica deformações onde o agrupamento não coincidiu com a posição. As estirpes representativas para cada haplogrupo são indicadas por caixas amarelas. Fonte: Su et al., 2012.	38

- 6 16 Genomas de referência de *T. gondii*, compondo 16 haplogrupos Fonte: Lorenzi et al 2016. 39
- 7 Dendrograma de linhagens de *Toxoplasma gondii* determinadas por padrão de bandas de PCR-RFLP utilizando onze marcadores genéticos (SAG1, 5'+3'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, C29-2, L358, PK1, Apico e CS3). A árvore foi construída usando o método Neighbor joining clustering após bootstrapping com 10.000 repetições e as distâncias foram calculadas usando o método Dice. 70
- 8 Resultados de agrupamento para os indivíduos de *Toxoplasma gondii* obtidos utilizando o software Structure Harvester para detectar o melhor valor de K (número de grupos, K = 2) segundo método de Evanno. 83
- 9 Relações genéticas entre indivíduos de *Toxoplasma gondii* (30 indivíduos + 3 controles) estimadas utilizando programa Structure baseado em marcadores microssatélites. Cada indivíduo é representado como uma linha vertical. Linha dividida em segmentos K cujo comprimento está relacionado com as proporções de adesão para cada cluster K inferido. A figura (K = 2) 84

mostra o arranjo mais provável, baseado no valor de ΔK segundo método de Evanno et al. (2005). Os indivíduos são ordenados por sua proximidade geográfica de amostragem e divididos em dois clusters (População 01 e População 02).

- 10 Percentual da variação genética pela Análise Molecular de Variância (AMOVA) calculada usando as medidas de distância genética par a par a partir do *RST*. Em vermelho a variação atribuída a diferenças dentro das populações e em azul entre populações e $p < 0,01$. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Resumo dos Marcadores, gene, localização e enzimas utilizados no PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Su et al., 2010)	44
2	Marcadores microssatélites e primers de PCR utilizados para o ensaio de PCR	50
3	Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de gatos naturalmente infectados por PCR associadas ao ensaio biológico	65
4	Genotipagem de isolados de <i>T. gondii</i> utilizando a técnica PCR- RFLP, Bahia, Brasil.	67/68
5	Agrupamento dos genótipos encontrados, mostrando a similaridades com os genótipos já conhecidos, utilizando K-means cluster..	69
6	Genotipagem por MS de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de gatos da Bahia- Brasil. Três cepas arquetípicas de referência (ENT, ME49 e NED) estão incluídas.	71
7	Descrição dos 30 isolados de <i>T.gondii</i> e 3 controles de referencia utilizados. Organizados em população 1 e 2..	85
8	Estimativas da variabilidade genética utilizando 15 marcadores microssatélites para todos os 33 indivíduos agrupados (Pop. Total), indivíduos da População 01 (Pop. 01) e de indivíduos da População 02 (Pop. 02). As variáveis analisadas são: número de indivíduos testados (n), número total de alelos (N_A), alelos efetivos (N_E) e F_{st} (endogamia devido à subdivisão) entre a Pop. 01 e Pop. 02.	86

9	Estimativas da variabilidade genética produzida pelos 15 marcadores microssatélites testado com os 33 indivíduos agrupados (Pop. Total).	87
10	Resultado dos testes de gargalo genético utilizando 15 marcadores microssatélites (SSR) em três conjuntos: População total; População 01; População 02.	89
11	Resultados da análise de 15 Marcadores Microssatélites(MS) de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> do estado da Bahia, Brasil	90

LISTA DE ABREVIACOES

DNA	Ácido desoxirribonucleico.
HAI	Teste de aglutinação indireta
Kb	Kilobase
Mb	Megabase
MLST	Multilocus Sequence Typing
MS	Marcadores microssatélites
nPCR	Polymerase Chain Reaction nested
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfism
SNPs	Single Nucleotide Polymorphism
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
STR	Short Tandem Repeats
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz

LISTA DE ANEXOS

Anexos		Páginas
A	Protocolo de Digestão Péptica	107
B	Protocolo de extração de DNA com kit comercial Easy-DNA® (Invitrogen)	108
C	Protocolo do Teste de hemoaglutinação indireta (HAI)	109

SUMÁRIO

	Pág.
1	INTRODUÇÃO..... 21
2	OBJETIVOS..... 23
2.1	Objetivo geral..... 23
2.2	Objetivos específicos..... 23
3	REVISÃO DE LITERATURA..... 24
3.1	Agente etiológico <i>Toxoplasma gondii</i> 24
3.2	Ciclo Biológico..... 24
3.3	Reprodução do Parasito..... 25
3.3.1	Fase assexuada..... 26
3.3.2	Fase sexuada..... 27
3.4	Transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i> 28
3.5	Sinais Clínicos e diagnóstico..... 30
3.6	Genotipagem do <i>Toxoplasma</i> 30
3.6.1	O uso do PCR- RLFP (Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos) e a genotipagem de <i>T. gondii</i> 40
3.6.2	Microssatélites..... 46
3.6.2.1	Microssatélites utilizados na genotipagem de <i>T. gondii</i> 49
4.	Capítulo 1 Presença de genótipos atípicos de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de gatos no estado da Bahia, Brasil..... 55
4.1	INTRODUÇÃO..... 56
4.2	MATERIAL E MÉTODOS..... 57

4.2.1	Coleta de amostras e teste sorológico.....	57
4.2.2	Isolamento de <i>T. gondii</i>	57
4.2.3	Extração de DNA de amostras de tecido de camundongos infectados Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção de <i>T.gondii</i>	58
4.2.4	Genotipagem de <i>T. gondii</i> utilizando a técnica PCR- RFLP.....	59
4.2.5	Análise de agrupamentos e diversidade de isolados de <i>T. gondii</i>	59
4.2.6	Genotipagem de <i>T. gondii</i> por Marcadores microsatélites.....	60
4.2.7	Genotipagem no sequenciador automático (ABI PRISM 3130 xl;Applied Biosystems).....	61
4.3	RESULTADOS.....	62
4.4	DISCUSSÃO.....	72
4.5	CONCLUSÃO.....	75
5	Capítulo 2- Diversidade genética e estudo da estrutura populacional de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i>, oriundos de animas do estado da Bahia.....	76
5.1	INTRODUÇÃO.....	77
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	79
5.2.1.	Amostragem e área do estudo.....	79
5.2.2.	Genotipagem por Marcadores Microsatélites.....	79
5.2.3	Genotipagem no sequenciador automático (ABI PRISM 3130 xl;Applied Biosystems).....	80
5.2.4.	Análise de dados.....	80
5.2.4.1.	Análise de agrupamento Bayesiano.....	80
5.2.4.2.	Análise da Diversidade Genética dos clusters inferidos	81
5.3.	RESULTADOS.....	82

5.3.1	Análise de agrupamento bayesiano	82
5.3.2	Diversidade genética.....	86
5.3.3	Diferenciação genética e gargalo genético.....	89
5.4	DISCUSSÃO.....	91
5.5	CONCLUSÃO.....	95
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

O agente etiológico *Toxoplasma gondii* é um coccidio do filo Apicomplexa, que possui distribuição cosmopolita. Esse protozoário causa a toxoplasmose, uma zoonose de grande importância na medicina humana e veterinária, acometendo humanos e outras espécies homeotérmicas. Os felídeos domésticos e selvagens são importantes no ciclo de vida natural de *T. gondii*, por serem hospedeiros definitivos, onde apenas em suas células intestinais ocorre a reprodução sexuada que dará origem ao oocisto imaturo, que é excretado nas fezes, e no ambiente em condições ideais, esporulam e tornam-se infectantes. Os gatos domésticos, os humanos e outros animais de sangue quente geralmente tornam-se infectados com *T. gondii* pela ingestão de oocistos esporulados, no consumo de alimentos ou água contaminados ou pela ingestão de cistos teciduais originários de hospedeiros intermediários, no consumo de carne crua ou mal cozida.

Existe somente uma espécie de *Toxoplasma*, *T. gondii*, com mais de 100 cepas e pelo menos três linhagens gênicas deste parasito, sendo que a patogenicidade varia entre as diferentes espécies animais. Este parasito possui uma alta diversidade genética e os estudos têm permitido o agrupamento em três grandes genótipos I, II e III na América do Norte e Europa, sendo o genótipo I constituído por cepas altamente virulentas para todos os hospedeiros, que são as mais isoladas no caso de toxoplasmose congênita no homem e os genótipos II e III que são menos virulentos, denominados cistogênicos.

Através da utilização de técnicas de PCR-RFLP e microssatélites, isolados de *T. gondii* demonstraram que os três genótipos dominantes (tipos I, II e III) evoluíram de um ou mais episódios historicamente de recombinação sexual entre as linhagens ancestrais distintas de *T. gondii* dentro do felídeos, hospedeiros definitivos. No Brasil, as cepas de *T. gondii* têm alta diversidade genética em comparação com a América do Norte e Europa, apresentando combinações de alelos das linhagens I, II e III, assim como alelos ausentes em outras regiões do mundo, chamados de atípicos. Foram encontrados, no Brasil, genótipos dos tipos I, II, III, além de outras combinações denominadas atípicas, BrI, BrII, BrIII e BrIV.

A genotipagem com Microssatélites ou Simple Sequence Repeat (SSR), é uma técnica que utiliza a aplicação de um marcador molecular mais refinado e com maior poder de análise sobre a diversidade genética, sendo possível analisar as características da população de *T. gondii* presente no Brasil com um melhor poder de elucidação da sua diversidade.

A necessidade de obter-se mais informações sobre esse agente, principalmente na região Nordeste do Brasil onde há poucos estudos e a importância mesmo na transmissão da doença, tem instigado pesquisadores a estudar o parasita, para que possam contribuir para o controle dessa zoonose e diminuir o risco de infecção na população humana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar genotipagem de *Toxoplasma gondii* em gatos e comparar a diversidade genética e estrutura populacional encontrada com outros isolados de outras espécies de animais do estado da Bahia

2.2. Objetivo específico

- ✓ Realizar o isolamento de *T.gondii* através do ensaio biológico utilizando camundongos inoculados com tecidos de gatos soropositivos;
- ✓ Realizar genotipagem de cepas de *T. gondii* oriundas de tecidos de gatos, utilizando PCR-RFLP e Marcadores Microsatélites;
- ✓ Verificar a relação da presença dos genotipos I, II e III, obtidos a partir da análise do locus CS3, com a *patogenicidade* em camundongos para compreensão das características de *T. gondii* na Bahia;
- ✓ Determinar a diversidade genética de isolados de *T. gondii* oriundos de animais da Bahia utilizando 15 Marcadores Microsatélites.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agente etiológico- *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório com distribuição mundial e capacidade de infectar animais de sangue quente, incluindo aves e animais silvestres, domésticos e o homem, podendo atingir mais de 30% da população em determinados países (PETERSEN e DUBEY, 2001; PENA et al., 2006; DUBEY, 2010). Pertence ao subfilo Apicomplexa, classe Coccidia, Família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae (NICOLLE e MANCEAUX, 1909). O agente etiológico da toxoplasmose foi descoberto em 1908 na Tunísia por Nicolle e Manceaux no roedor *Ctenodactylus gundi* em Túnis, no norte da África, e no Brasil por Splendore em um coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*), em um laboratório na Faculdade de Medicina de São Paulo. Foi pensado primeiro ser *Leishmania* pelos dois grupos de investigadores; entretanto no ano seguinte, Nicolle e Manceaux constataram a descoberta de um novo organismo (NICOLLE; MANCEAUX, 1908,1909; SPLENDORE, 1908), baseado na sua morfologia (*toxos* = arco, *plasma* = forma) e no hospedeiro encontrado. O parasita foi chamado *Toxoplasma gondii* por Nicolle e Manceaux em 1909 (DUBEY, 2008, 2010).

3.2. Ciclo Biológico

No seu ciclo, *T. gondii* apresenta-se sob três formas infectantes (Figura 1): os taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (DUBEY, 1998b).

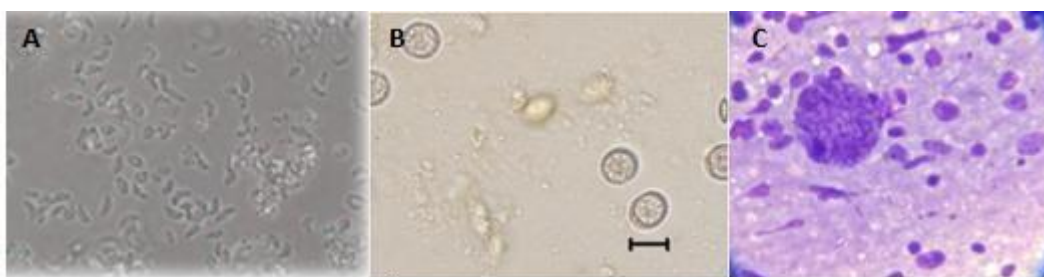


Figura 1. (A) Taquizoítos em cultivo celular. (B) Fotomicrografia dos oocistos de *T. gondii* nas fezes de um felino. Aumento de 400x. Barra: 10 μ m. (C) Cisto contendo bradizoítos encistados em cérebro de camundongo, coloração Giemsa, aumento de 100x. Fonte: Arquivo Pessoal

Os taquizoítos são estruturas que possuem rápida multiplicação, são móveis e caracterizam a fase aguda da doença, que pode culminar com o aparecimento de sintomas clínicos (DUBEY, 1998a, 2012). Os bradizoítos são confinados em cistos teciduais. É considerado o estágio latente do parasito, presentes durante a fase crônica da infecção (DUBEY, 1998a; DUBEY, 2008). A parede do cisto é resistente e elástica para isolar os bradizoítos da ação do sistema imunológico do hospedeiro. O cisto pode atingir o tamanho de 200 μm e permanecer viáveis nos tecidos por vários anos, sendo mais resistentes que os taquizoítos (DUBEY, 1998a). Os oocistos são formas resistentes do parasito no ambiente e são produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes e eliminados não esporulados junto com as fezes. São esféricos, apresentando parede dupla resistente e medindo em torno de 11,0 a 12,5 μm . Após esporulação apresentam dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (DUBEY e BEATTIE, 1988; LANGONI, 2006, DUBEY, 1998a).

3.3. Reprodução do parasito

Toxoplasma gondii apresenta dois tipos de reprodução: uma assexuada e outra sexuada, ou coccidiana, que ocorre no epitélio intestinal de felídeos (Figura 2). Os felídeos são considerados os hospedeiros definitivos ou completos, por possuírem uma fase sexuada dentro das células do epitélio intestinal e outra fase assexuada que ocorre em outros tecidos. Os demais animais homeotérmicos são hospedeiros intermediários, onde ocorre apenas a reprodução assexuada (NEVES, 2003).

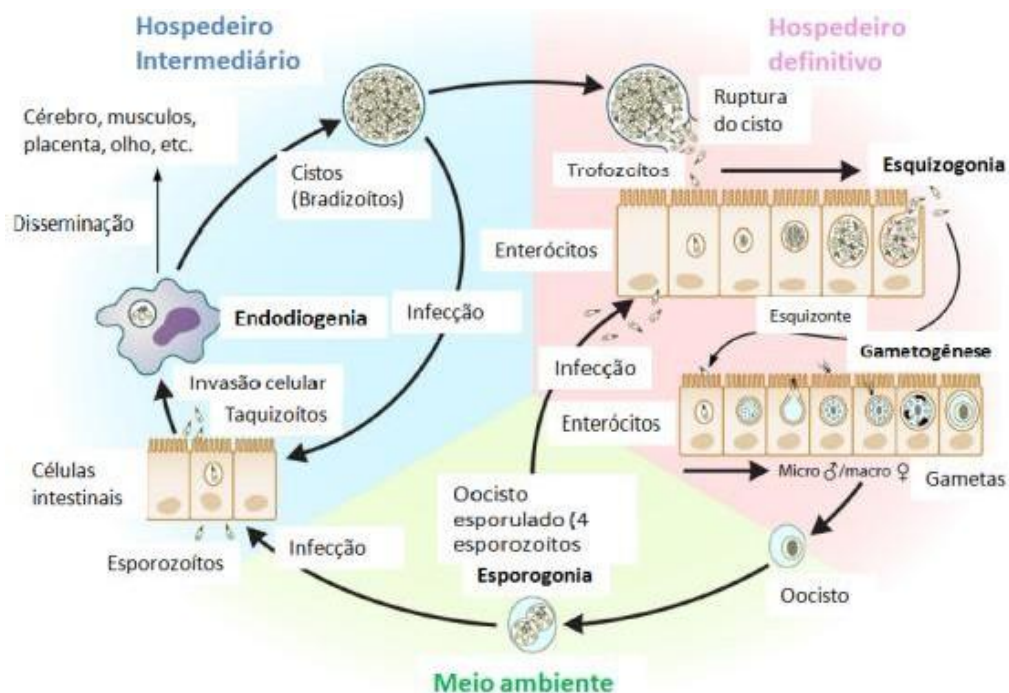


Figura 2. O ciclo biológico do protozoário *Toxoplasma gondii* em hospedeiros intermediários e definitivos (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ 2012). Fonte: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/16722/1/EfeitoImunomodulatorioLectinas.pdf>

3.3.1. Fase Assexuada

Na fase assexuada, após a ingestão das formas infectantes, os parasitas ao penetrarem nas células do intestino do hospedeiro iniciam um processo de multiplicação assexuada dentro do vacúolo parasitóforo, iniciando a endodiogenia, onde cada núcleo divide-se formando duas células-filhas. A reprodução ocorre rapidamente até romper as células, liberando os taquizoítos para invadir outras células e os taquizoítos produzidos invadem várias células nas proximidades, ou à distância, levados pela circulação sanguínea ou linfática (DUBEY et al., 1998, DUBEY, 1998b).

Com o desenvolvimento da resposta imune efetiva, ocorre a lise de taquizoítos extracelulares, por uma combinação de anticorpos e complemento (BEAMAN et al., 1995), porém alguns parasitas intracelulares podem persistir por algum tempo na medula espinhal ou no cérebro (DUBEY, 1993). O parasito se refugia dentro das células por um processo de diferenciação para bradizoítos, resultando na formação de cistos teciduais. Dentro do cisto, estes se multiplicam lentamente por endodiogenia, ou seja, divisão assexuada onde duas células filhas são formadas dentro da célula-mãe, permanecendo em estado de latência. Normalmente se desenvolvem a partir de seis a sete dias após a infecção nos hospedeiros (DUBEY et al., 1998; DUBEY, 2004).

No interior dos cistos podem conter centenas de bradizoítos (DUBEY, 1997; 1998b; 2010). Os cistos são mais comuns em tecidos musculares e nervosos, incluindo o cérebro, musculatura esquelética e cardíaca, embora possam se desenvolver em diversos órgãos (DUBEY et al., 1998). Em casos de comprometimento do sistema imunológico, os cistos latentes, contendo bradizoítos são reativados e os taquizoítos são liberados na circulação sanguínea provocando a reativação da doença (SUZUKI, 2002). Os cistos teciduais mostram-se importantes no ciclo de vida do *T. gondii*, pois hospedeiros carnívoros podem ser infectados pela ingestão de carne contendo cistos (DUBEY e JONES, 2008).

3.3.2. Fase Sexuada

A fase sexuada ocorre apenas nas células epiteliais do intestino delgado de felídeos, que ao ingerir taquizoítos, bradizoítos ou oocistos se infectam. Nas células intestinais haverá a reprodução por endodiogenia, seguida de merogonia, onde a célula parasitada se rompe e libera os merozoítos, que penetram em outras células epiteliais, realizando até 5 merogonias, até estarem prontos, dando início à formação de gametócitos, ou seja, início da reprodução sexuada (DUBEY, 2012).

A gametogonia dá origem aos gametas masculinos e femininos, o microgameta (masculino) móvel sai de sua célula e se dirige ao macrogameta (feminino) ocorrendo a fecundação e formação do ovo ou zigoto, que evolui dentro

do epitélio dando origem ao oocisto. A célula epitelial se rompe liberando o oocisto imaturo que alcançará o meio externo através das fezes (NEVES, 2003).

O oocisto é a forma que possui resistência ambiental, pois contém em sua estrutura uma parede bastante resistente as condições do meio ambiente (LANGONI, 2006). A sua maturação ocorre no meio externo, chamado de processo de esporulação (um a cinco dias), onde ocorre a esporogonia que resulta em dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada. Os oocistos tornam-se infectantes ao homem e aos animais, com a presença de esporozoítos no seu interior. Em condições favoráveis são capazes de manterem-se infectantes de 12 a 18 meses (DUBEY, 2010).

Um gato pode liberar 20 milhões de oocistos por dia em aproximadamente 20 gramas de fezes e, após decomposição das fezes, a contaminação do solo pode ser de 100.000 oocistos/grama (FAYER, 1981, SAEIJ et al., 2007). Gatos soropositivos, frente a quadros de imunossupressão, podem retomar a eliminação de oocistos, porém em quantidades bem inferiores à primoinfecção (DUBEY e FRENKEL 1974 ; DUBEY, 1995). A excreção de oocistos diminui pelo desenvolvimento da resposta imune adaptativa do animal (LAPPIN et al., 1996; DUBEY e SU, 2009). Os felídeos possuem uma grande importância na epidemiologia da doença, pois além de poder se reinfectar com outro tipo de cepa, são capazes de reeliminar oocistos (JAMR et al.,1985). A presença de cepas recombinantes estão sendo associadas a casos atípicos de toxoplasmose em animais e no ser humano, inclusive em áreas onde há contato entre o homem e animais silvestres tem aumentado o risco de casos graves da enfermidade (DEMAR et al., 2007).

3.4. Transmissão de *Toxoplasma gondii*

A transmissão do parasita pode ocorrer de três formas: primeiro pela ingestão de tecidos de animais infectados contendo cistos do parasita, através de carne crua ou mal cozida; segundo pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes de gatos, na água e alimentos contaminados, e; terceiro a infecção congênita, transplacentária, que pode ser causa de abortamento, natimortos ou mortalidade neonatal. A maioria

dos gatos se tornam infectados com *T. gondii* após nascer, ingerindo tecidos infectados ou oocistos esporulados (DUBEY et al., 2005; DUBEY e LAPPIN, 2006). A transmissão transplacentária pode ocorrer quando a gestante tiver os taquizoítos em sua fase de divisão rápida, circulantes na corrente sanguínea, o que é comum na infecção primária (LANGONI, 2006). Nos felídeos a transmissão congênita pode ocorrer, mas é rara, filhotes congenitamente infectados podem lançar oocistos no meio ambiente (DUBEY e CARPENTER, 1993). Segundo Dubey (2012) a transmissão também pode ocorrer via transplante de órgãos, leite de cabra, ovos e transfusão sanguínea, através dos taquizoítos, porém não é comum.

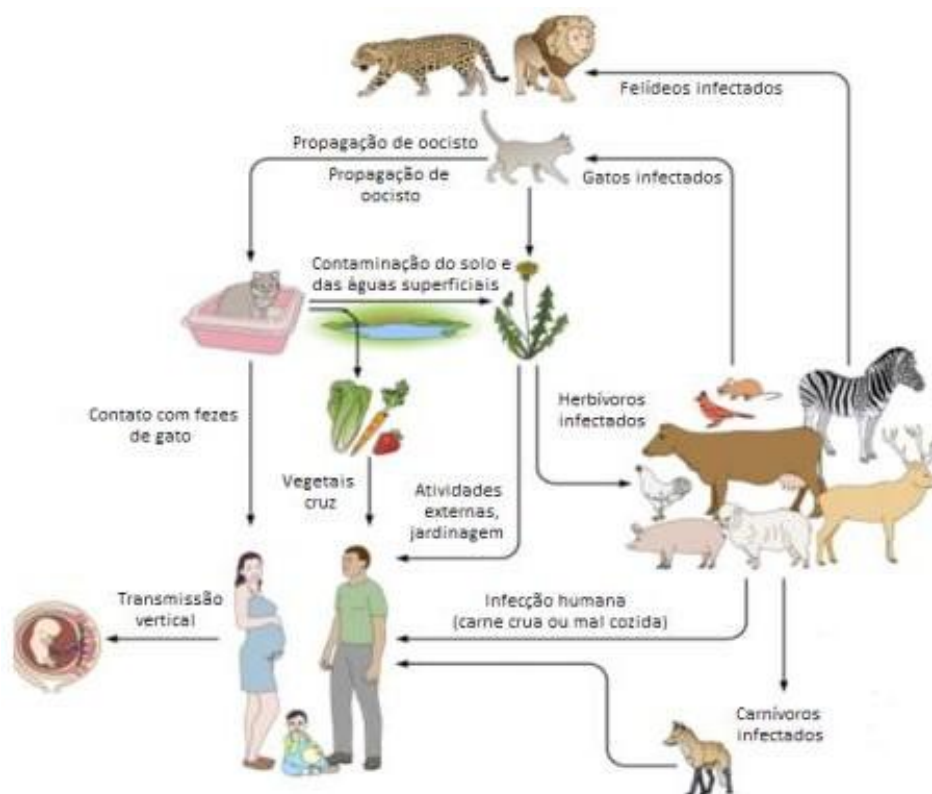


Figura 3. Esquema ilustrando as várias fontes de transmissão do protozoário *Toxoplasma gondii* para humanos e animais (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ 2012).

Fonte: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1096471/1/Toxoplasmosenacadeiaproduivadacarne.pdf>

3.5 Sinais clínicos e diagnóstico em gatos

Nos gatos, a doença clínica é rara (DUBEY e LAPPIN, 2006). Os sinais clínicos mais encontrados são: depressão, anorexia, enterite, linfonodos mesentéricos infartados, pneumonia, alterações degenerativas no sistema nervoso central e encefalite (DUBEY e JONES, 2008). Pneumonia é a manifestação clínica mais importante da toxoplasmose felina. Outras manifestações clínicas comuns são necrose pancreática, miocardite, uveíte e dermatite. A toxoplasmose clínica é mais grave em filhotes congenitamente infectados (DUBEY, 2008; PENA et al., 2017). Os sinais clínicos da toxoplasmose, na maioria das vezes, são secundários a uma infecção ou imunossupressão, seguido de reativação da doença, principalmente em animais velhos e imaturos. Ocorre raramente, embora a prevalência de anticorpos seja alta (DUBEY et al., 1977; LAPPIN et al., 1996; PENA et al., 2017).

Classicamente, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose tem se baseado na sorologia, histologia, bioensaio, diagnóstico molecular e exame parasitológico de fezes (gatos). Entretanto, a evidenciação do parasita pela demonstração de seus componentes, como antígenos e segmentos de DNA, é de alto valor diagnóstico (DUBEY, 1983; CAMARGO, 1996; DARDÉ, 2004).

3.6. Genotipagem do *Toxoplasma*.

Toxoplasma gondii é um coccídio que apresenta uma estrutura populacional altamente clonal, com elevada variação genética (DUBEY, 2008). As primeiras evidências da existência de linhagens bem definidas dentro da espécie *T. gondii*, com a observação de associações não aleatórias de alelos entre os *loci*, foram demonstradas inicialmente pelos perfis eletroforéticos de isoenzimas (DARDÉ et Al., 1988; 1992; 1998).

O genoma plastídico de *T. gondii* foi sequenciado em 1997, possui 34996 bp e DNA circular (GenBank accession U87145.2). Este parasito apresenta um genoma nuclear, um extracromossal na região do apicoplasto e um mitocondrial com 6 Kb (kilobase). O genoma nuclear é estável, de 87 Mb (megabase), possui 14 cromossomos, com marcadores espaçados, com intervalo em todo o genoma, com aproximadamente 300 kb. É haploide para a maioria dos estágios do ciclo do parasita, exceto para uma fase diploide breve, no intestino do gato antes da meiose (KHAN et al., 2005).

Os 14 cromossomos foram identificados compreendendo um tamanho genético total de aproximadamente 592 cM e uma unidade média de mapa de aproximadamente 104 kb / cM. Através de recombinações de cepas dos tipos II e III e cepas dos tipos I e III elaborou-se um mapa (Figura 4) com a segregação de 250 marcadores genéticos em 14 cromossomos designados: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI e XII. Vários cromossomos apresentam notavelmente padrões genéticos, por exemplo, o cromossomo IV é quase composto inteiramente por SNPs específicos do tipo III, e o cromossomo XI é composto principalmente pelo tipo I. Em alguns cromossomos, isso ocorre como um viés marcado em direção a uma extremidade, porções distais dos cromossomos III, VIIb e XII são principalmente do tipo I (KHAN et al 2005).

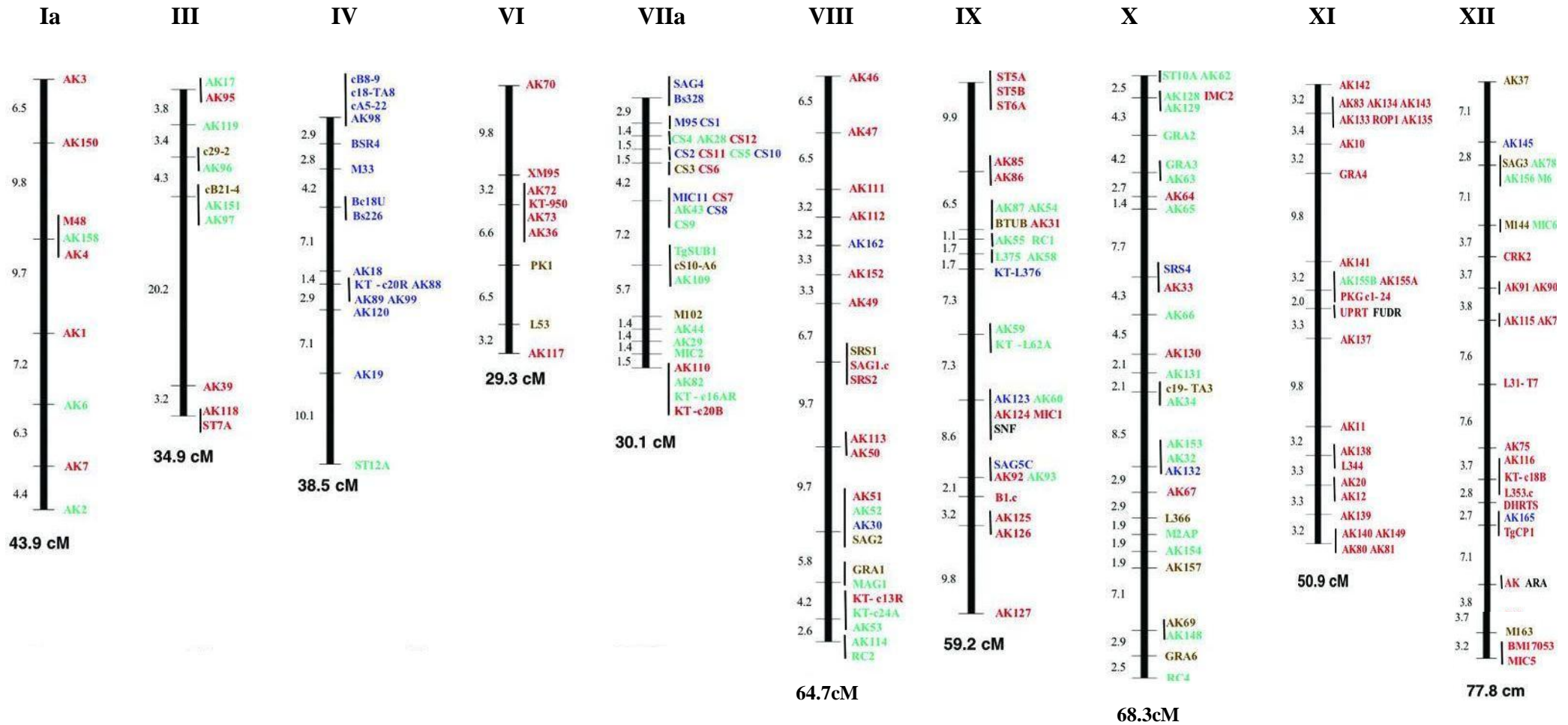


Figura 4: Mapas de ligação genética para os 14 cromossomos de *T.gondii*. Marcadores individuais são mostrados à direita da barra vertical e os números dos cromossomos são dados acima de cada mapa. Polimorfismos exclusivos para o tipo I são mostrados em vermelho, aqueles exclusivos para o tipo II é mostrado em verde, os únicos do tipo III são mostrados em azul e os marcadores que contêm polimorfismo múltiplo, são mostrados em amarelo. FONTE: KHAN et al, (2005).

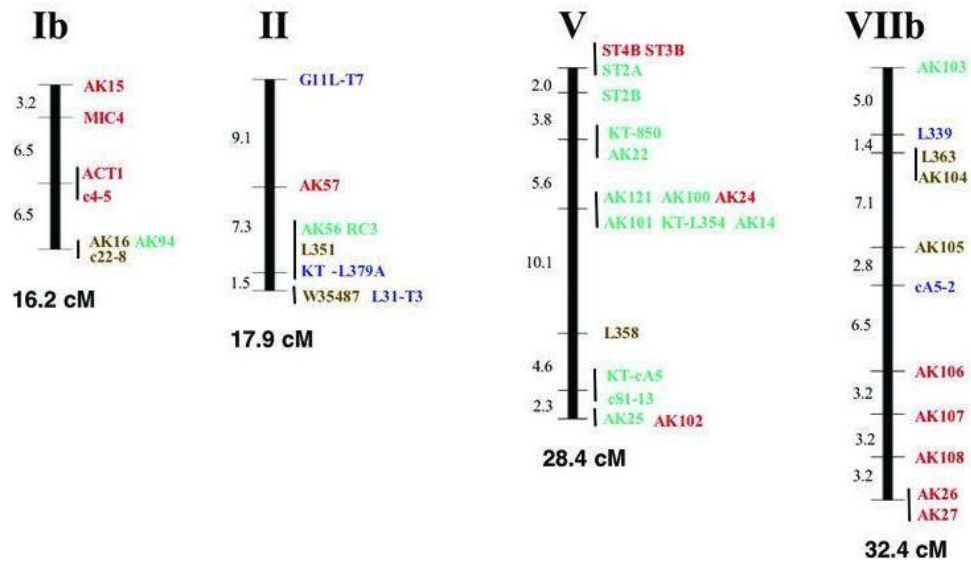


Figura 4 continuação: Mapas de ligação genética para os 14 cromossomos de *T.gondii*. Marcadores individuais são mostrados à direita da barra vertical e os números dos cromossomos são dados acima de cada mapa. Polimorfismos exclusivos para o tipo I são mostrados em vermelho, aqueles exclusivos para o tipo II é mostrado em verde, os únicos do tipo III são mostrados em azul e os marcadores que contêm polimorfismo múltiplo, são mostrados em amarelo. FONTE: KHAN et al, (2005).

O DNA circular extracromossomal do tipo plastídeo de 35Kb pertence a uma organela localizada na região apical ao núcleo denominada apicoplasto. Os apicoplastos são semelhantes aos cloroplastos, organelas essenciais para a maioria dos parasitas apicomplexos, incluindo *Toxoplasma*. A sequência e análise completa do genoma apicoplástico de *T. gondii* forneceu uma nova visão das relações taxonômicas da organela. Esses estudos sugerem que o tipo de organização, função organelar e comunicação com o núcleo, provavelmente desempenha um papel vital nas mudanças de desenvolvimento e patologia da doença consequente de *T. gondii* (KHAN et al., 2005). Avaliações estruturais e funcionais de genes de apicoplastos são um alvo validado para terapia medicamentosa e, portanto, estudos que caracterizam esses genes em isolados brasileiros podem ser relevantes para essa abordagem. Como a prevalência de *T. gondii* na população humana no Brasil é alta, o controle profilático e terapêutico precisa ser melhor adaptado para essa diversidade do parasita (SU et al., 2006; MACIEL, et al., 2014).

Nas últimas décadas, métodos de genotipagem (não baseados em sequenciamento) têm facilitado a detecção, diagnóstico e genotipagem de *T. gondii* incluindo análises de fragmentos de restrição PCR - RFLP e microssatélites (DUBEY, 2008). Estas ferramentas são usadas para identificar genótipos para um conjunto de loci entre indivíduos, e são úteis para ecologia e evolução dentro das espécies. Sendo frequentemente utilizadas para estudar a diversidade genotípica entre amostras de *T. gondii* (DARDÉ, 2004; AJZENBERG, 2004; KHAN et al., 2007; SU et al., 2010). Com esses métodos é possível estudar a variação de virulência das diferentes linhagens do parasita, podendo fazer a correlação entre o genótipo do parasita e os padrões de doença em pacientes infectados e realizar estudo da epidemiologia, bem como a biologia populacional (DUBEY et al., 2008).

Com estudos da diversidade genética é possível uma melhor compreensão da evolução do parasito, podendo realizar uma avaliação de suas características biológicas tais como a virulência, atividade imunológica e resistência às drogas, também esclarecendo as diferentes manifestações da doença (GRIGG e BOOTHROYD, 2001; TIBAYRENC, 1995; DARDÉ et al., 1996; PENA et al., 2008).

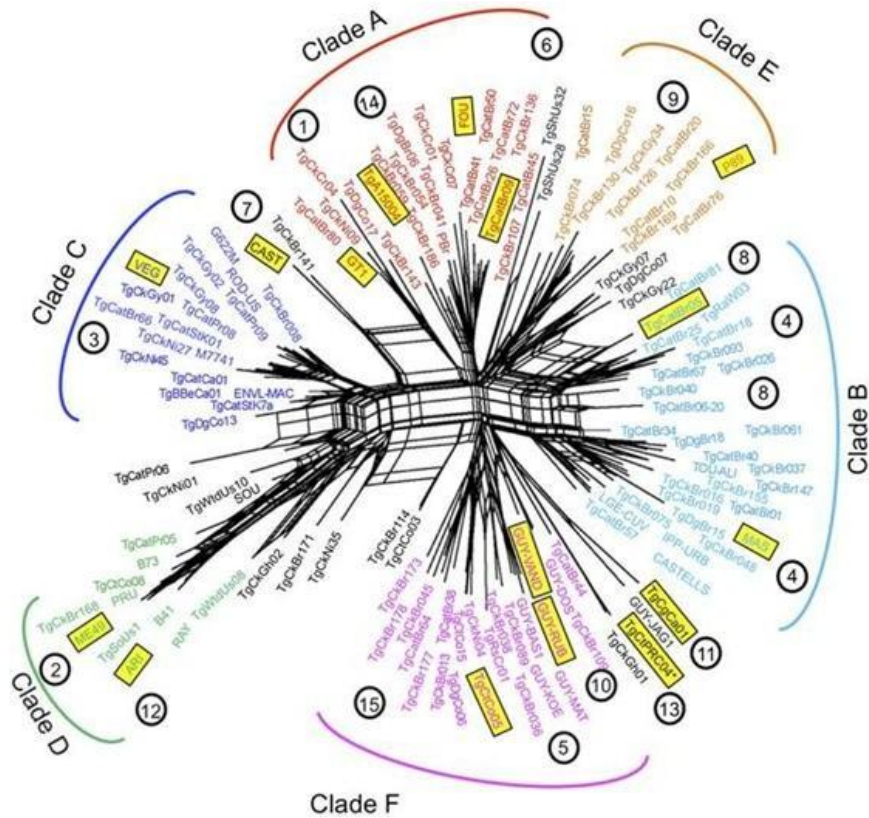
Os estudos iniciais de genotipagem mostraram que *T. gondii* apresentava três linhagens clonais I, II e III (HOWE e SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002; DUBEY et al., 2004). Utilizando técnicas como PCR- RFLP, isoenzimas e sequenciamento, observou-se que esses três tipos genéticos, possuem uma origem comum, com troca genética limitada, sendo similares, com diferenças inferiores a 1% em suas sequências de DNA (GRIGG e BOOTHROYD, 2001; SU et al., 2003). As cepas foram genotipadas inicialmente na Europa e América do Norte, em humanos (HOWE e SIBLEY, 1995). Posteriormente outros estudos evidenciaram linhagens divergentes dos tipos arquétipos, assim como linhagens recombinantes ou atípicas (SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007, PENA et al., 2008, BEZERRA et al., 2015, ROCHA et al., 2018).

A estrutura clonal das cepas de *T. gondii* justifica-se pelo fato do parasito ser haploide na maior parte do seu ciclo biológico e, como descrito anteriormente, pode ser disseminado com sucesso na natureza apenas pela ingestão de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos, sem a obrigatoriedade da fase sexuada nos hospedeiros definitivos; pela possibilidade de infecção simultânea no felídeo com diferentes cepas (AJZENBERG et al., 2004); e pelo fato de macrogametas do parasita que permanecem infertilizados, serem capazes de formar oocistos (HERMANN et al., 2010).

Su e colaboradores (2012) examinaram 956 isolados de *T. gondii* coletados em todo o mundo e realizaram a genotipagem usando um conjunto de 11 marcadores RFLP espalhados por 8 dos 14 cromossomos e no genoma plastídial. Um total de 138 genótipos foram reconhecidos entre as 956 cepas analisadas. Esses 138 genótipos foram analisados com três conjuntos de marcadores multilocus diferentes, incluindo RFLP, microssatélites e sequenciamento de íntrons. No total, esses marcadores pesquisaram polimorfismos em 30 locos distribuídos em todos os 14 cromossomos nucleares e no DNA do apicoplasto. Dois tipos de marcadores foram combinados para análise. Os dados do RFLP e dos marcadores baseados em íntron concordaram com haplogrupos previamente definidos. No entanto, vários grupos anteriormente considerados distintos foram mesclados, revelando um padrão bifásico que consiste em regiões do Hemisfério Norte, onde

predominam algumas linhagens altamente clonais e abundantes e em outros lugares, especialmente em partes da América do Sul, caracterizando-se por um conjunto diversificado de genótipos menos comuns que mostram maior evidência de recombinação. Métodos de agrupamento foram usados para organizar a diversidade genética de 138 genótipos, dividindo-os em 15 haplogrupos (Figura 5) que definem coletivamente seis principais ramos (“clados”). A análise do fluxo gênico indica que um pequeno número de linhagens ancestrais deu origem à diversidade existente através de um processo de mistura limitada.

No entanto, vários grupos anteriormente considerados distintos foram mesclados: principalmente os haplogrupos 4 e 8 (destacados na América do Sul), que compreendem um grupo único e altamente diversificado. Similarmente, haplogrupos 6 e 14, representando cepas encontradas na África e América do Sul (10, 17), fazem parte de uma grande região da rede que também inclui o haplogrupo clonal 1. Haplogrupos 2 e 12, grupos clonais relacionados comuns no Norte América (6), compreendem um único ramo principal. Um aglomerado de cepas relacionadas aos haplogrupos 5 e 10, originalmente isolados da Guiana Francesa, próxima a cepas originárias do Brasil, pertence ao haplogrupo 15 (Clado F).



B

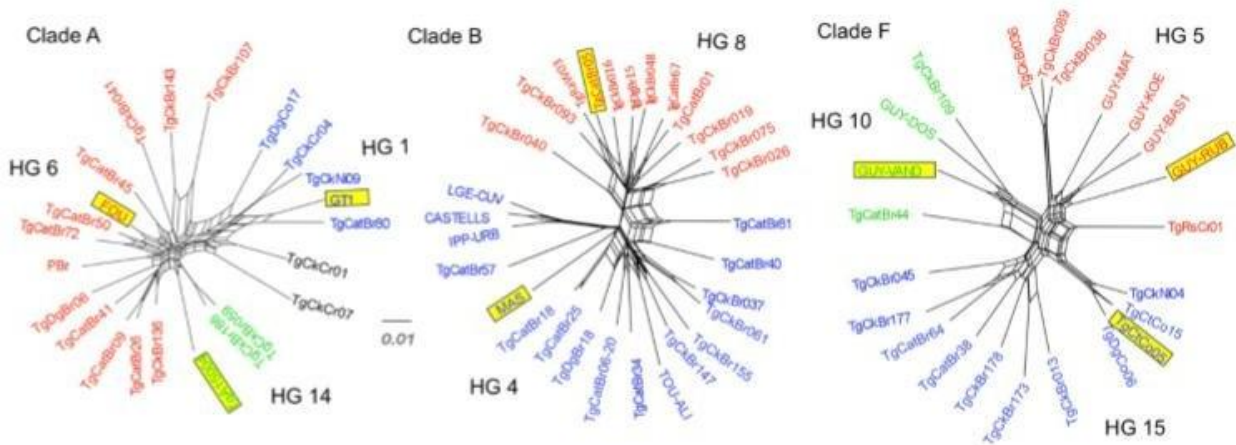


Figura 5. A) Estrutura genética da população de *T. gondii*. A análise da rede foi realizada usando 11 marcadores RFLP multilocus mais 1 marcador para o apicoplasto e quatro seqüências de introns das 138 estirpes representativas representando haplótipos únicos. A análise da rede mostrou várias rotas para o fluxo gênico entre diferentes populações (linhas de interconexão entre estirpes representativas). Seis grandes clades (A até F) são indicados. Haplogrupos são mostrados em números circulado com base em designações, contendo 15 haplogrupos. Cepas representativas para cada haplogrupos são indicados por caixas amarelas. B) Análise de redes vizinhas de clades usando polimorfismos de microssatélites, RFLP e seqüências de íntrons. Haplogrupos designados por diferentes cores de letras; preto indica deformações onde o agrupamento não coincidiu com a posição. As estirpes representativas para cada haplogrupos são indicadas por caixas amarelas. Fonte: Su et al., (2012).

Lorenzi et al. (2016), expandiu a análise sequenciando o genoma inteiro do *T. gondii* e dividiu em 16 principais haplogrupos. Demonstraram também a estrutura do *T. gondii* utilizando SNPs de todo o genoma (802.764 pontos de dados comuns) de 62 isolados, (Figura 6).

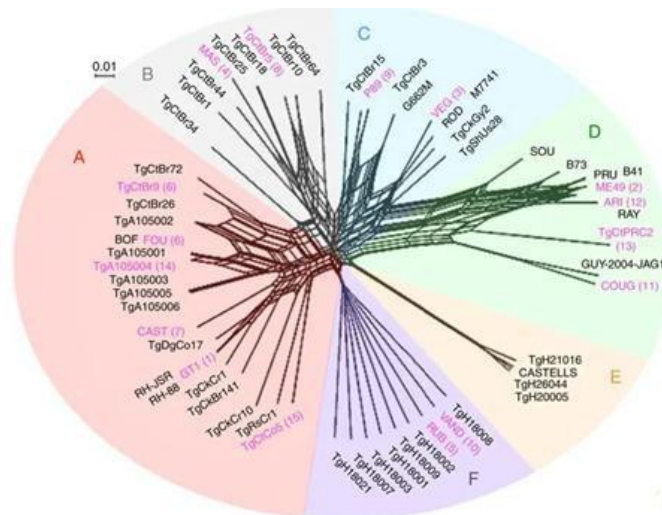


Figura 6. Estrutura genética da população de *T. gondii*. Utilizando SNPs de todo o genoma (802.764 pontos de dados comuns) de 62 isolados de *T. gondii*. A roda de cores indica os principais tipos de *T. gondii*. Os números de haplogrupos são indicados entre parênteses com base na designação anterior. Os nomes rosa indicam as cepas representativas. Barra de escala, número de SNPs por site. Fonte: Lorenzi et al 2016.

Os métodos comumente usados para realizar a genotipagem de *T. gondii* são PCR-RFLP multilocus, SSR, Tipagem Multilocus Sequence Typing (MLST) e SNP. O PCR-RFLP baseado na capacidade das endonucleases de restrição de reconhecer polimorfismos de nucleotídeo único, digerir produtos de PCR e subsequentemente exibir padrões distintos de bandas de DNA em géis de agarose eletroforese. Os SSR, são marcadores que possuem alto polimorfismo, decorrente das taxas de mutação, com sequencias unicas que se repetem e são muito utilizados na construção de mapas genéticos, estrutura genética de populações e análises de paternidade. (BLACKSTON et al., 2001; AJZENBERG et al., 2002, AJZENBERG, 2004). O MLST é baseado na sequência de polimorfismos de DNA, incluindo SNPs, inserção e deleção de nucleotídeos na sequência.

Para eucariotos em geral, a taxa de mutação para SNPs é estimada em 10^{-9} a 10^{-10} por posição nucleotídica por replicação, enquanto o taxa para microssatélites é 10^{-2} a 10^{-6} por locus por replicação. A taxa de mutação mais alta faz com que os microssatélites sejam mais informativos, sendo eficientes para conhecer fluxo gênico, assim como para estudo de paternidade ou estrutura clonal, podendo fornecer uma identificação de genotipo exclusivo para cada individuo, utilizando apenas alguns loci (GOLDSTEIN E SCHLOTTERER, 1999; SELKOE E TOONEN, 2006).

Estudos recentes compararam diretamente a utilidade dos microssatélites versus SNP genômicos. Devido ao número de alelos possíveis, cada locus microssatélites contém potencialmente muito mais informações do que um único locus SNP, que normalmente espera-se que tenha apenas 4 bases. Por exemplo, em estudos com ursos polares (*Ursus maritimus*) e carpa cruzada (*Carassius carassius*), descobriram que um conjunto de dados detectou melhor estrutura populacional em escala fina nos microssatélites (HOHENLOHE et al., 2018). Da mesma forma, um estudo das espécies vegetais da Amazônia *Amphirrhox longifolia* descobriu que oito microssatélites foram suficientes para estimar a diversidade, quando 1.000 SNPs foram usados (NAZARENO et al. 2017).

3.6.1. O uso do PCR- RFLP (Análise de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição) e a genotipagem de *T. gondii*

É um método de tipificação baseado no polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição sobre produtos amplificados pela PCR, que detecta

variações mínimas em um gene, onde uma única substituição de bases pode criar ou extinguir um sítio capaz de ser digerido por uma endonuclease (SINGH et al., 1997). As enzimas de restrição reconhecem uma sequência específica de quatro a oito bases e são classificadas de acordo com a estrutura, atividades e sítios de reconhecimento e clivagem de DNA.

O método da PCR-RFLP, consiste em clivar o DNA em pontos específicos resultando fragmentos de massas moleculares diferentes, sendo assim possível diferenciar os tipos de cepas, com a visualização da eletroforese (HOWE e SIBLEY, 1995; KHAN et al., 2005; PENA et al., 2008). Se houver uma mudança de uma única base dentro da sequência, a enzima não será capaz de clivar o DNA, permitindo a diferenciação dos genótipos das diferentes tipos de cepas (GRIGG et al., 2001). A PCR-RFLP é a técnica mais utilizada para genotipagem de *T. gondii*, apesar do uso de microsátélites ser mais específico do que o PCR-RFLP (HOWE e SIBLEY, 1995; SU et al., 2006). No Brasil, os trabalhos pioneiros de genotipagem por PCR-RFLP utilizando um único marcador mostraram a predominância de cepas do tipo I e tipo III (considerando a classificação inicial). Foi utilizado, apenas um locus, o gene SAG2, que codifica a proteína p22 que é expressa na superfície do antígeno, tanto em taquizoítos quanto bradizoítos, localizado no cromossomo VIII, limitando a identificação de isolados (KHAN et al., 2007; DUBEY et al., 2003; DUBEY et al., 2006). Posteriormente, os estudos foram feitos utilizando um número maior de marcadores moleculares, mostrando uma estrutura populacional bastante diversificada com genótipos recombinantes ou atípicos entre os três arquétipos (tipos I, II e III) (DA SILVA et al., 2011; DUBEY et al., 2004; PENA et al., 2006, ROCHA et al., 2018). Em 2008, Pena e colaboradores, em seu estudo feito com 125 isolados de *T. gondii* provenientes de galinhas, cães e gatos do estado de São Paulo revelou 48 genótipos e mais quatro com linhagens típicas do Brasil denominadas BrI, BrII, BrIII, BrIV. Essa elevada diversidade genética indica na população uma estrutura recombinante do protozoário (PENA et al., 2006; PENA et al., 2008; BEZERRA et al., 2012; SILVA et al., 2014; ROCHA et al., 2018).

As investigações das características genóticas de *T. gondii* em animais são de extrema importância para um melhor entendimento da epidemiologia, identificando as fontes de infecção ou vias de transmissão, visto o potencial zoonótico da toxoplasmose (DERMAR et al., 2007; DUBEY 2008). Cepas não - clonais, recombinantes ou atípicas foram determinadas em isolados de cães, gatos, gatos selvagens, gambás, ratos, esquilos, tucanos, capivaras e ursos de diversas partes do mundo. Em vários estudos foram utilizados os 11 de marcadores moleculares padronizadas (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt - SAG2 e Apico) (PENA et al., 2008; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; CHIKWETO et al., 2017; ROCHA et al., 2018).

Na América do Sul, os estudos mostraram uma predominância de cepas I e III. Já na América do Norte, Europa e África, a maioria dos isolados pertencem aos tipos clonais I, II e III, com predominância de cepas do tipo II (SU et al., 2012, PENA et al., 2008). No Brasil novos genótipos são frequentemente identificados em diferentes espécies de animais, sugerindo uma alta diversidade genética do parasito. Todos estes estudos anteriores demonstraram que a estrutura populacional de *T. gondii* é altamente clonal na América do Norte e Europa, enquanto que na América do Sul as cepas são geneticamente distintas e mais diversificadas. Na Europa, América do Norte, norte da África e Ásia os genótipos de *T. gondii* são não-letais a camundongos com baixa dose de infecção, enquanto as cepas identificadas na América do Sul são altamente virulentas e letais (SHWAB et al., 2016).

Tabela 1- Resumo dos Marcadores, gene, localização e enzimas utilizados no PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Su et al., 2010)

Marcador	Gene	Localização	Multiplex PCR primers (externos)	nPCR primers (internos)	nPCR (bp)	Enzimas de restrição	Temperatura e tempo de incubação	Referência
SAG1	SAG1	cromossomo VIII	F*:GTTCTAACCACGCACCCTGAG R***:AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R:GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau96I + HaeII	37°C 1h. 2,5% gel	Grigg et al., 2001b ; Khan et al., 2005a
5'SAG2	SAG2	cromossomo VIII	Não é necessário. O fragmento de DNA para 5'SAG2 é coberto pelos iniciadores externos de alt.SAG2.	F:GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R:GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	MboI	37°C 1h. 2,5% gel	Howe et al., 1997; Khan et al., 2005a
3'SAG2	SAG2	cromossomo VIII	F:TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R:TCAAAGCGTGCAATTATCGC	F:ATTCTCATGCCTCCGCTTC R:AACGTTTACGAAGGCACAC	222	HhaI	37°C 1h. 2,5% gel	Lehmann et al., 2005a
alt.SAG2	SAG2	cromossomo VIII	F:GGAACGCGAACAATGAGTTT R:GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F:ACCCATCTGCGAAGAAAACG R:ATTTCCGACCAGCGGGAGCAC	546	HinfI + TaqI	37°C 30min, 65°C 30 min. 2,5% gel	Grigg et al., 2001b; Khan et al., 2005a
SAG3	SAG3	cromossomo XII	F:CAACTCTCACCATTCACCC R:GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F:TCTTGTGCGGGTGTTCCTCA R:CACAAGGAGACCGAGAAGGA	225	NciI	37°C 1h. 2,5% gel	Khan et al., 2005a
BTUB	BTUB	cromossomo IX	F:TCCAAAATGAGAGAAATCGT R:AAATTGAAATGACGGAAGAA	F:GAGGTCATCTCGGACGAACA R:TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	BsiEI + TaqI	60°C 1h. 2,5% gel	Khan et al., 2005a
GRA6	GRA6	cromossomo X	F:ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R:GCACCTTCGCTTGTGGTT	F:TTTCCGAGCAGGTGACCT R:TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	MseI	37°C 1h. 2,5% gel	Khan et al., 2005a
C22-8	C22-8	cromossomo Ib	F:TGATGCATCCATGCGTTTAT R:CTCCACTTCTTCGGTCTCA	F:TCTCTCTACGTGGACGCC R:AGGTGCTTGATATTCCG	521	BsmAI + MboII	37°C 30min, 55°C 30 min. 2,5% gel	Khan et al., 2005a
C29-2	C29-2	cromossomo III	F:ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R:AGGGTCTCTTGCGCATAACAT	F:AGTTCTGCAGAGTGTCGC R:TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	HpyCH4IV + RsaI	37°C 1h. 2% gel	Khan et al., 2005a
L358	L358	cromossomo V	F:TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R:GCAATTTCTCGAAGACAGG	F:AGGAGGCGTAGCGCAAGT R:CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	HaeIII + NlaIII	37°C 1h. 2,5% gel	Khan et al., 2005a
PK1	PK1	cromossomo VI	F:GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R:AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F:CGCAAAGGGAGACAATCAGT R:TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	AvaI + RsaI	37°C 1h. 2,5% gel	Khan et al., 2005a
APICO	Apico	Cromossomo do apicoplasto	F:ATGGTTTTAACCTAGATTGTGG R:ACGGAATTAATGAGATTGAA	F:GCAAATCTTGAATTCTCAGTT R:GGGATTCTGAACCCTTGATA	640	AfIII + DdeI	37°C 1h. 2,5% gel	Dubey et al., 2007

* Em todas as reações foi usado o CutSmart Buffer®; **F: forward primer; ***R: reverse primer

O marcador SAG1 amplifica uma região do gene SAG1, localizado no cromossomo nuclear VIII (Grigg et al., 2001, Khan et al., 2005). Os produtos do nPCR são digeridos com as enzimas de restrição Sau96I e HaeII (dupla digestão) e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguindo os genótipos I, II/III e u-1.

O marcador Alt- SAG2 amplifica uma região do gene SAG2, localizado no cromossomo nuclear VIII (Lehmann et al., 2006; Khan et al., 2005). Os produtos do nPCR são digeridos com as enzimas de restrição HinfI e TaqI (dupla digestão) e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguindo os genótipos I, II e III.

O marcador 5'- SAG2 amplifica uma sequência próxima a extremidade 5' do gene SAG2. Por outro lado o 3'- SAG2 amplifica uma sequência próxima a extremidade 3' do gene, ambos localizados no cromossomo nuclear VIII (Howe et al., 1997; Khan et al., 2005). Os produtos do nPCR são digeridos com as enzimas de restrição MboI e HhaI respectivamente e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos no marcador 5'- SAG2 diferenciam o genótipo III dos genótipos I e II e os fragmentos digeridos no marcador 3'- SAG2 distinguem o genótipo II dos genótipos I e III.

O marcador SAG3 amplifica uma região do gene SAG3, localizado no cromossomo nuclear VII (Grigg et al., 2001; Khan et al., 2005). Os produtos do nPCR são digeridos com a enzima de restrição NciI e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguindo os genótipos I, II e III.

O marcador GRA6 amplifica uma região do gene GRA6, localizado no cromossomo nuclear X (Khan et al., 2005). Os produtos do nPCR são digeridos com a enzima de restrição MseI e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguindo os genótipos I, II e III.

O marcador BTUB amplifica uma região do gene BTUB, localizado no cromossomo nuclear IX (Khan et al., 2005). Os produtos do nPCR são digeridos com as enzimas de restrição BsiEI e TaqI (dupla digestão) e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguindo os genótipos I, II e III.

O marcador C22-8 amplifica uma região do gene C22-8, localizado no cromossomo nuclear Ib (Khan et al., 2005). Os produtos do nPCR são digeridos com

as enzimas de restrição BsmAI e MboII (dupla digestão) e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguindo os genótipos I, II, III e u- 1(IV — genótipo misto).

O marcador C29-2 amplifica uma região do gene C29-2, localizado no cromossomo nuclear III (Khan et al., 2005). Os produtos do nPCR são digeridos com as enzimas de restrição HpyCH4IV e RsaI (dupla digestão) e analisados em gel de agarose eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I,II, III e u-1(IV).

O marcador L358 amplifica uma região do gene L358, localizado no cromossomo nuclear V (Khan et al., 2005). Os produtos do nPCR foram digeridos com as enzimas de restrição HaeIII e NlaIII (dupla digestão) e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguindo os genótipos I, II e III.

O marcador PK1 amplifica uma região do gene PK1, localizado no cromossomo nuclear VI (Khan et al., 2005). Os produtos de nPCR são digeridos com as enzimas de restrição Aval e RsaI (dupla digestão) e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguiram os genótipos I, II, III, u-1 (IV) e u-2 (V).

O marcador Apico amplifica uma região do gene Apico, localizado no cromossomo apicoplasto (Dubey et al; 2007). Os produtos de nPCR são digeridos com as enzimas de restrição AfIII e DdeI (dupla digestão) e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguindo os genótipos I, II e III.

O marcador CS3 amplifica uma região do gene CS3, localizado no cromossomo nuclear VIIa (Khan et al., 2005). Os produtos de nPCR são digeridos com as enzimas de restrição NlaIII e MboI (dupla digestão) e em gel de agarose por eletroforese observa-se fragmentos digeridos distinguindo os genótipos I, II, III e u-1.

3.6.2. Microssatélites

Os marcadores microssatélites (MS), também conhecidos como STR (Short Tandem Repeats), SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) ou SSR (Simple Sequence Repeat) são tipos de marcadores codominante que está sendo ultimamente utilizado para estudos de *T. gondii*. São sequências de DNA com repetições curtas

contendo de 1 a 6 nucleotídeos, sendo multialélicos e codominantes, e são encontrados no genoma dos organismos eucariotos, que por sua vez possuem uma grande quantidade de sequências repetidas (GOLDSTEIN e SCHLÖTTERER, 1999; BLACKSTON et al., 2001; AJZENBERG et al., 2002; AJZENBERG, et al., 2010).

Os SSRs são considerados poderosos marcadores genéticos devido a sua abundância, dispersão no genoma e por serem altamente polimórficos, por causa da variabilidade no número de repetições, e conseqüentemente, à existência de múltiplos alelos, os que os tornam muito informativos em estudos genéticos. Os SSRs são amplamente empregados em análises de parentesco, caracterização de espécies, construção de mapas genéticos de alta densidade com o objetivo de identificar loci envolvidos em doenças genéticas e estudos filogenéticos, inferindo possíveis relações filogenéticas a nível intraespecífico ou em casos de espécies divergentes. Possuem elevada capacidade discriminatória e podem auxiliar a avaliar a estrutura genética populacional (GOLDSTEIN e SCHLÖTTERER, 1999; AJZENBERG, et al., 2002; VALADARES et al., 2008).

O que gera uma grande variação genética é a alta taxa de mutação dos loci de microssatélite quando comparado com outras regiões do DNA (AJZENBERG et al., 2002; AJZENBERG et al., 2004). O polimorfismo permite o processo de genotipagem, com os dados da diversidade de alelos, exigindo uma pequena quantidade de DNA (AJZENBERG, et al., AJZENBERG, 2004; AJZENBERG, et al., 2010). Quanto ao tamanho da sua repetição, os SSRs podem ser mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, para repetições de um, dois, três, quatro, cinco ou seis pares de bases, respectivamente. Quanto à estrutura da repetição, podem ser classificados quanto à presença ou ausência de interrupção na unidade repetitiva e ainda, quanto à presença de mais um tipo de unidade repetitiva. Podem ser: **Perfeitos**, consistem um único motivo de repetições, não sendo interrompidos, por exemplo (CACACACACACACA); **Imperfeitos**, quando apresentam uma ou mais repetições que contém uma base que altera o padrão do motivo repetitivo, por

exemplo: GAGAGAGACAGAGA; **Compostos**, consistem de dois ou mais microssatélites adjacentes com motivos repetitivos diferentes(CACACACAGATGATGATGATGAT); **Interrompidos**, quando existe uma um pequeno número de bases nucleotídicas que não faz parte do motivo de repetição, por exemplo (CACACACACAGGGCACACA) (GOLDSTEIN e SCHLOTTERER, 1999).

Os microssatélites possuem tamanho total em torno de 100 a 400pb, incluindo as regiões flangeadoras, o que permite sua amplificação por PCR visando à variabilidade genética do organismo estudado. Possuem alto grau de polimorfismo ligada aos processos mutacionais, com variação no número de repetições de um alelo para outro, modificando o tamanho da região repetida, pela adição ou redução dos motivos de repetição (ELLEGREN, 2004). As taxas de mutação para a grande parte dos locus de microssatélites são de elevada magnitude, superiores às taxas de mutação para outros locos dentro do mesmo genoma, possuindo variação de loco para loco de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco por geração (LI et al., 2002).

O mecanismo proposto para mutação de microssatélites é a “derrapagem” na replicação pela DNA Polimerase, ocorrendo predominantemente durante a replicação, (KHAN et al 2007). Os números de repetições diferem em uma população, criando assim múltiplos alelos em um locus. Os produtos marcados com corante são separados por tamanho usando eletroforese automatizada e identificada por detecção de fluorescência (AJZENBERG, et al.,2010).

Cada espécie possuem iniciadores de regiões microssatélites, permitindo analisar desde indivíduos até espécies proximamente relacionadas, devido ao fato de que as sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites, são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie ou entre espécies de gêneros correlatos, havendo assim a existência de bibliotecas genômicas. Essas bibliotecas encontram-se clones, desejadas para fins de análise de marcadores moleculares. o que permite o desenho de primers para ampliações específicas desses locos(OLIVEIRA et al., 2006)

Tais características fazem dos microssatélites poderosos marcadores genéticos, podendo ser utilizados em estudos filogenéticos e populacionais de vários organismos. No ramo da parasitologia, os microssatélites têm sido descritos e já foram analisados em diversos parasitos (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 2000; VALADARES et al., 2008; AJZEMBERG et al., 2010; SU, WELLEMS, 1996).

3.6.2.1 Microssatélites utilizados na genotipagem de *T. gondii*

Ajzenberg e colaboradores (2010), em seu estudo desenvolveram um método de genotipagem rápido e fácil de usar que visa assegurar os dois níveis de discriminação genética de isolados de *T. gondii* em um único ensaio de PCR multiplex usando 15 marcadores localizados em 11 cromossomos diferentes de *T. gondii* (Tabela 2). Verificaram que a associação dos 15 marcadores MS com diferentes padrões de mutabilidade permitiu dois níveis diferentes de resolução genética para diferenciar as cepas de *T. gondii* ao nível de digitação (tipos I, II e III versus cepas atípicas) e ao nível das impressões digitais (isolados intimamente relacionados dentro de uma linhagem clonal). Nesse contexto, a identificação de cepas atípicas é muito importante do ponto de vista clínico e epidemiológico, porque as cepas atípicas são geralmente associadas a doença grave e infecção de indivíduos por cepas de outros países, durante alguma viagem ou após consumo de carne importada (AJZENBERG,et al., 2009; AJZENBERG,et al., 2010).

Tabela 2. Marcadores microssatélites e primers de PCR utilizados para o ensaio de PCR multiplex

Marcador	Cromossomo (posição) ^a	Motivo de Repetição (s)	Sequência de Primer ^b	Tamanho da faixa (bp)
<i>TUB2</i>	IX (974608 to 974896)	[TG/AC] _n	(F) 5' 6-FAM-GTCCGGGTGTTCTACAAAA 3' (R) 5' TTGGCCAAAGACGAAGTTGT 3'	287-291
<i>W35</i>	II (633241 to 633482)	[TC/AG] _n , [TG/AC] _n	(F) 5' HEX-GGTTCACCTGGATCTTCTCCAA 3' (R) 5' AATGAACGTCGCTTGTTC 3'	242-248
<i>TgM-A</i>	X (4824879 to 4825083)	[TG/AC] _n	(F) 5' HEX-GGCGTCGACATGAGTTTCTC 3' (R) 5' TGGGCATGTAATGTAGAGATG 3'	203-211
<i>B18</i>	VIIa (2921536 to 2921693)	[TG/AC] _n	(F) 5' 6-FAM-TGGTCTTCACCTTTCATCC 3' (R) 5' AGGGATAAGTTTCTTCACAACGA 3'	156-170
<i>B17</i>	XII (6474746 to 6475079)	[TC/AG] _n	(F) 5' HEX-AACAGACACCCGATGCCTAC 3' (R) 5' GGCAACAGGAGGTAGAGGAG 3'	334-366
<i>M33</i>	IV (672591 to 672760)	[TC/AG] _n	(F) 5' 6-FAM- TACGCTTCGCATTGTACCAG 3' (R) 5' TCTTTTCTCCCTTCGCTCT 3'	165-173
<i>IV.1</i>	IV (742419 to 742693)	[TG/AC] _n	(F) 5' HEX-GAAGTTCGGCCTGTTCCCTC 3' (R) 5' TCTGCCTGAAAAAGGAAAGA 3'	272-282
<i>XI.1</i>	XI (189702 to 190058)	[TG/AC] _n	(F) 5' 6-FAM-GCGTGTGACGAGTTCTGAAA 3' (R) 5' AAGTCCCCTGAAAAGCCAAT 3'	354-362
<i>M48</i>	Ia (332951 to 333166)	[TA/AT] _n	(F) 5' 6-FAM-AACATGTCGCGTAAGATTCG 3' (R) 5' CTCTTCACTGAGCGCCTTTC 3'	209-243
<i>M102</i>	VIIa (3093491 to 3093664)	[TA/AT] _n	(F) 5' NED-CAGTCCAGGCATACCTCACC 3' (R) 5' CAATCCCCAAAATCCCCAACCC 3'	164-196
<i>N60</i>	Ib (1766079 to 1766221)	[TA/AT] _n	(F) 5' NED-GAATCGTCGAGGTGCTATCC 3' (R) 5' AACGGTTGACCTGTGGCGAGT 3'	132-157
<i>N82</i>	XII (1621472 to 1621585)	[TA/AT] _n	(F) 5' HEX-TGCGTGCTTGTGACAGATTC 3' (R) 5' GCGTCCTTGACATGCACAT 3'	105-145
<i>AA</i>	VIII (5836880 to 5837144)	[TA/AT] _n	(F) 5' NED-GATGTCCGGTCAATTTGCT 3' (R) 5' GACGGGAAGGACAGAAACAC 3'	251-332
<i>N61</i>	VIIb (4217145 to 4217238)	[TA/AT] _n	(F) 5' 6-FAM-ATCGGCGGTGGTTGTAGAT 3' (R) 5' CCTGATGTTGATGTAAGGATGC 3'	79-123
<i>N83</i>	X (1772898 to 1773209)	[TA/AT] _n	(F) 5' 6-FAM-ATGGGTGAACAGCGTAGACA 3' (R) 5' GCAGGACGAAGAGGATGAGA 3'	306-338

a)Com base na posição dentro de cada cromossomo da cepa ME49, conforme indicado no site do Toxo DB (<http://toxodb.org>).

b)(F), iniciador direto; (R), iniciador reverso. Em cada par de iniciadores, o iniciador direto foi marcado na extremidade 5 com fluorescência: 6-carboxifluorescência (6-FAM)para MS TUB2, XI.1, B18, N83, N61, M33 e M48, hexaclorofluorescência (HEX) para MS TgM-A, B17, N82, W35 e IV.1 e 2,7, 8-benzo -5-fluoro-2, 4,7-tricloro-5-carboxifluorescência (NED) para MS AA, N60 e M102. FONTE: Ajzenberg et al., (2010).

Ajzenberg e colaboradores em 2010, utilizaram sequências de SSRs com motivos de dinucleotídeos. Sequências com repetições $[TG / AC]_n$ e $[TC / AG]_n$ são conhecidas por exibir menor mutabilidade do que aqueles com repetições $[TA / AT]_n$. Oito marcadores SSRs com um motivo de repetição consistindo em $[TG / AC]_n$ ou $[TC / AG]_n$, foram utilizados como marcadores de digitação (TUB2, W35, TgM-A, B18, B17, M33 IV.1 e XI.1). Sete marcadores SSRs com um motivo de repetição consistindo em $[TA / AT]_n$ foram usados como marcadores de impressão digital (N60, N82, AA, N61, N83, M48 e M102). Foram analisados 26 isolados, os resultados do ensaio utilizando os 15-MS mostraram que os 8 marcadores de digitação distinguem facilmente os tipos clonais I, II e III de todos os genótipos atípicos. Em cada uma das linhagens clonais I a III ou haplogrupos 1 a 3, as cepas representativas apresentaram tipagem uniforme padrões, exceto um para a linhagem II, onde o alelo 244 no marcador W35 foi identificado para um isolado. Tais variantes dentro da linhagem clonal II também foram previamente determinados no locus Apico com marcadores de PCR-RFLP. Isolados atípicos foram caracterizados por uma mistura diferente de alelos de haplogrupos 1 a 3 e por alelos atípicos adicionais em alguns loci. A detecção de alelos atípicos pelos marcadores SSRs destaca a capacidade desses marcadores para capturar a diversidade genética de cepas altamente divergentes, como as cepas América do Sul. Os 7 marcadores de impressão digital forneceram resolução genética aprimorada, além do nível de digitação, na distinção entre isolados dentro de uma linhagem clonal ou haplogrupo. Sendo portanto os SSRs, uma ferramenta útil para identificar se os isolados são geneticamente idênticos ou diferentes, ou seja, identificar uma fonte comum de infecção em um surto, um contaminação laboratorial e infecções mistas (AJZENBERG, et al., 2010).

Can et al., (2014) isolaram 22 cepas de *T. gondii* oriundos de gatos não domiciliados, utilizou 15 marcadores microssatélites para realizar a genotipagem, segundo metodologia de Ajzenberg et al. (2010). Atraves da análise dos microssatélites, 19 isolados eram do tipo II, 2 isolados eram do tipo III e um isolado foi o genótipo África

1. As 22 cepas genotipadas foram designadas TgCatTr_Izmir 1 a 22. África 1, Tipo II, e cepas tipo III foram definidas por oito marcadores microssatélites (TUB2, W35, TgM-A, B18, B17, M33, IV.1 e XI.1), mas graus variados de polimorfismos em outros

microsatélites foram detectados (M48, M102, N60, N82, AA, N61 e N83) especialmente em cepas do tipo II.

Pena e colaboradores (2017) analisaram uma cepa de *T. gondii* de um gato por PCR-RFLP e pela técnica de microsatélites por meio de 15 marcadores microsatélites (MS): TUB2, W35, TgMA, B18, B17, M33, IV.1 e X1.1 (marcadores de digitação); e N60, N82, AA, N61, N83, M48 e M102 (marcadores de impressão digital), de acordo com os protocolos de Ajzenberg et al. (2010), de modo a aumentar a resolução da genotipagem. Foi identificado o genótipo ToxoDB-PCR-RFLP #10, o arquétipo tipo I. A análise por microsatélites mostrou que a cepa era uma variante do tipo I, com dois alelos atípicos. O PCR-RFLP mostrou uma análise típica de perfil clonal tipo I e os microsatélites (que possui maior resolução de genotipagem) revelaram alelos atípicos em dois marcadores de digitação, enfatizando a diversidade desse parasita no Brasil.

Silva e colaboradores (2017b) utilizando um conjunto de 11 marcadores de PCR-RFLP e 15 microsatélites, genotiparam cepas de *T. gondii* de um gato e três ratos na Ilha Fernando de Noronha. Dentro de cada grupo, as diferenças entre, estirpes eram limitadas mesmo com marcadores microsatélites polimórficos. Apenas um marcador de microsatélites foi capaz de diferenciar cepas com o genótipo ToxoDB-RFLP # 146 no grupo tipo III, apesar de serem coletados de diferentes hospedeiros e em diferentes momentos e locais na ilha. Isolados com o genótipo ToxoDB-RFLP nº 3 que pertence ao grupo tipo II também foram muito semelhantes, com apenas três marcadores microsatélites capazes de diferenciá-los tiveram o alelo 329 no marcador de microsatélites N83. Este último alelo está ausente em cepas de Europa e América do Norte e, até o momento, foram identificados somente em cepas brasileiras. Estirpes de linhagens clonais comuns em Brasil continental (BrI e BrII) não foram identificados em Fernando de Noronha.

Pena e colaboradores (2020) isolou *T. gondii* em um tamandua. Genotipou o isolado utilizando 11 marcadores PCR-RFLP e 15 marcadores microsatélites. Para a análise de microsatélites, a genotipagem foi realizada com 15 marcadores de acordo com Ajzenberg et al. (2010). A cepa de referência PTG foi usada como

controle positivo. A genotipagem utilizando PCR-RFLP revelou o genótipo clonal brasileiro do tipo BrIII e os microssatélites revelaram um genótipo atípico único.

Valenzuela-Moreno et al. (2020) realizaram genotipagem em 6 cães não domiciliados, de Chiapas, México, utilizaram 12 marcadores PCR- RFLP e 15 microssatélites. Apenas dois isolados foram analisados por microssatélites, seguindo a metodologia descrita por Ajzenberg et al. (2010). Dois genótipos completos foram identificados por PCR-RFLP (tipo BrIII e # 28). Na análise por MS revelou que ambos os isolados são atípicos, TgDogMxChp3 está muito próximo da linhagem P89 (ToxoDB # 08) e o isolado TgDogMxChp11 corresponde a um novo genótipo atípico, até agora exclusivo do México.

CAPÍTULOS

A presente tese será apresentada em forma de capítulos

4. CAPÍTULO 1: Presença de genótipos atípicos de *Toxoplasma gondii* isolados de gatos no estado da Bahia, Brasil.

5. CAPÍTULO 2: Diversidade genética e estudo da estrutura populacional de isolados de *Toxoplasma gondii*, oriundos de animais do estado da Bahia, utilizando 15 Marcadores microssatélites

4. CAPÍTULO 1

Presença de genótipos atípicos de *Toxoplasma gondii* isolados de gatos no estado da Bahia, Brasil.

4.1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um coccidio que possui distribuição cosmopolita, podendo acometer humanos e outras espécies homeotérmicas. Possui grande relevância na saúde pública, por causar a toxoplasmose, uma zoonose que provoca alterações oculares, doenças congênitas e complicações graves em humanos e animais podendo levar a morte (DUBEY, 2004; DUBEY et al., 2012) tendo nos felídeos seus hospedeiros definitivos (DUBEY, 2008, 2010). Seu genoma foi sequenciado em 1997, com 34996 pares de base e DNA circular (GenBank accession U87145.2), este genoma é dividido em nuclear, extracromossal na região do apicoplasto e um mitocondrial (KHAN et al., 2005) .

O parasito possui uma alta diversidade genética e os estudos têm permitido o agrupamento em três genótipos I, II e III na América do Norte e Europa, sendo o genótipo I constituído por cepas altamente virulentas para todos os hospedeiros, que são as mais isoladas no caso de toxoplasmose congênita no homem e os genótipos II e III que são menos virulentos, denominados cistogênico (AJZENBERG et al., 2010. Na América Central e do Sul, a grande maioria das cepas são únicas, identificadas por estudos em animais domésticos e selvagens (VITALIANO et al., 2014). Ao contrário do Canadá e dos Estados Unidos, descrições de genótipos de

T. gondii no norte e no centro do México mostraram presença de cepas recombinantes e atípicas, juntamente com os clássicos tipos I e III (DUBEY et al., 2009; RICO-TORRES et al., 2015,2018)

No Brasil foram encontrados genótipos dos Tipos I, II e III, além de outras combinações denominadas atípicas, tendendo ser mais graves do que as infecções em países da América do Norte, Europa e África. Estes dados foram obtidos em isolados de animais, incluindo gatos, utilizando a técnica de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase, associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzima de Restrição) e Marcadores Microssatélites (DUBEY et al., 2004; PENA et al., 2006; PENA et al., 2008; PENA et al., 2017; 2020). O uso destas técnicas demonstraram que os isolados do Brasil não se encaixam em um padrão de propagação exclusivamente clonal, mas sim indicaria uma incidência frequente de

recombinações genômicas que geram diversidade (PENA et al., 2008; AJZENBERG et al., 2009; SHWAB et al., 2014),

Este estudo teve com objetivo, realizar o isolamento de *T.gondii* através do ensaio biológico utilizando camundongos inoculados com tecidos de gatos soropositivos oriundos das mesorregiões de Salvador e Sul Baiano - Nordeste do Brasil, realizar genotipagem de cepas de *T. gondii* oriundas de tecidos de gatos não domiciliados, utilizando PCR-RFLP e Marcadores Microssatélites Verificar a relação da presença dos alelos I, II e III, obtidos a partir da análise do locus CS3, com a *patogenicidade* em camundongos para compreensão das características de *T. gondii* na Bahia e avaliar a relação filogenética dos isolados genotipados entre si e com os controles utilizados, através do padrão de bandas da PCR/RFLP

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Coleta de amostras e teste sorológico

Vinte gatos da mesorregião de Salvador e Sul Baiano estado da Bahia, , no período de abril a dezembro de 2018, provenientes de Centros de Controle de Zoonoses (CCZ), ou clinicas veterinárias localizadas, eutanasiados por apresentarem alguma doença pré-existente, tiveram sangue, cérebro e coração colhidos e devidamente acondicionados. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal protocolo 04/2018, da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

O sangue foi coletado em tubos sem anticoagulante e, posteriormente, centrifugado a 1.465 g por 10 min a 25 °C para obtenção do soro, que utilizado para a detecção de anticorpos contra *T. gondii* pelo Teste de hemaglutinação (HAI) (Imuno-HAI Toxoplasmose Wana Diagnóstica®) com um ponto de corte 1:64 (ARAUJO, 2003). O coração e o cérebro de cada gato foram colocados individualmente em coletores limpos contendo solução salina (0,9% NaCl) e uma solução antibiótica (1.000 UI de penicilina G potássica e 100 mg de estreptomicina) e refrigerada até a realização do ensaio biológico.

4.2.2. Isolamento de *T. gondii*

Cérebro e coração de cada gato soropositivo foram homogeneizados juntos e realizada a digestão péptica segundo Dubey (1998). Uma alíquota de 1 mL do produto da digestão foi inoculada intraperitonealmente e por via subcutânea em camundongos albinos. Quatro

camundongos foram inoculados por gato soropositivo (2 intraperitoneal e 2 subcutâneo). Os camundongos foram observados diariamente por 60 dias e, aqueles que apresentaram mudança de comportamento foram imediatamente eutanasiados, e realizados exames para visualização do parasito em líquido peritoneal e impressão de órgãos em lâmina histológica. Quando observado taquizoítos de *T. gondii* no líquido, os mesmos eram congelados, utilizando DMSO e soro fetal bovino, para posterior extração de DNA.

Os camundongos que não adoeceram foram eutanasiados 60 dias após a inoculação utilizando a técnica de deslocamento cervical, sendo realizado “*imprint*” do cérebro desses animais, para visualização de cistos.

Foram coletadas amostras dos órgãos (cérebro, coração, pulmão, fígado e baço) de todos camundongos inoculados, para posterior extração de DNA.

4.2.3. Extração de DNA de amostras de tecido de camundongos infectados e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção de *T. gondii*

Fragmento de 100 mg de baço, fígado, coração, pulmão e cérebro de todos os camundongos foram macerados individualmente e tiveram o seu DNA extraído com kit Easy-DNA kit® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) com o número de protocolo 3 do kit.

A amplificação do DNA de *T. gondii* foi realizada utilizando o método descrito por Homan et al. (2000). *Primers* Tox4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e Tox5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) foram usados e resultou em um fragmento com 529 bp (Genebank Nº AFI46527) do DNA do *T. gondii*. A reação de PCR foi estabelecida com 1x de tampão de PCR, 2mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 0,30µM de cada *primer* (direto e reverso), 0,5U de Taq DNA Polymerase Platinum® (Invitrogen) e 1,5µL de DNA extraído. As condições termocíclicas foram as seguintes: 95°C durante 4 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto e 72°C durante 1,5 minutos, seguido de extensão final a 72°C durante 2 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com SYBR® Safe (Invitrogen) e fotodocumentados por LPix Image-Loocus Biotecnologia. Taquizoítos da cepa RH foram utilizados como controle positivo. O controle negativo consistiu de DNA extraído de amostras de cérebro dos camundongos não inoculados.

4.2.4. Genotipagem de *T. gondii* utilizando a técnica PCR- RFLP

Algumas modificações foram feitas a partir de SU et al. (2010), onde a temperatura de anelamento da Nested PCR passou de 58 °C para 60°C. Realizou-se uma reação de PCR primária em 25µL de volume total contendo 1x de tampão de PCR, 2mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 0,10µM de cada *primer* (direto e reverso), 0,5U de Taq DNA Polymerase Platinum®, 1,5µL do DNA extraído e água ultrapura Milli-Q até completar o volume. A reação foi incubada a 95°C durante 4 minutos, seguida por 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante 1,5 minutos, seguido de extensão final a 72°C durante 2 minutos.

Os produtos da PCR foram utilizados na nested PCR. Cada reação de 25µL continha 1x tampão de PCR, 2mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 0,3µM de cada *primer* utilizado separadamente (direto e reverso), 0,5 U de Taq DNA Polymerase Platinum®, 1,5µL de produto de PCR e água ultrapura Milli-Q até completar o volume. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 95°C durante 4 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto e 72°C durante 2 minutos, seguido de extensão final a 72°C durante 2 minutos.

Os produtos nPCR foram tratados com suas respectivas enzimas de restrição (Tabela 4), analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, 2,5% e 3%, corados com SYBR® Safe (Invitrogen) e fotodocumentados para revelar os padrões PCR-RFLP dos isolados. Cada isolado foi genotipado utilizando marcadores genéticos (SAG1, 5'+3'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3) (Dubey et al., 2006; Pena et al., 2008 e Rocha et al., 2018). Dois controles negativos foram utilizados: estirpe de fibroblastos de prepúcio humano (HFF) e água ultrapura Milli-Q. Os controles positivos utilizados foram: cepas de referência do tipo I (RH), tipo II (PTG) e tipo III (CTG) e cepas atípicas (TgCgCa1, MAS e TgCatBr5). Os padrões das bandas de DNA das amostras foram comparados com os genótipos depositados em ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). Os isolados que não demonstraram bandas frente a algum marcador genético, foram considerados incompletos.

4.2.5. Análise de agrupamentos e diversidade de isolados de *T. gondii*

O dendrograma foi construído com base nos padrões de banda obtidos através de PCR-RFLP usando os onze marcadores genéticos testados por meio do algoritmo de agrupamento de vizinho mais próximo, com auxílio do programa PAST versão 2.17c.

A análise de agrupamento baseou-se numa matriz binária que representa a presença/ausência de bandas numa amostra. A matriz de similaridade foi obtida de acordo com os dados do coeficiente de similaridade (SD). SD (valores entre 0 e 1) é uma determinação aritmética do grau em que os padrões de banda são semelhantes (isto é, contêm as mesmas bandas). O SD foi calculado utilizando a fórmula $SD = 2n_{AB}/(n_A + n_B)$, onde n_A é o número de bandas de PCR-RFLP na linha A, n_B é o número de bandas na linha B e n_{AB} é o número de bandas comuns às linhas A e B. Os agrupamentos foram determinados por comparação sequencial dos padrões e construção de um dendrograma refletindo as semelhanças relativas utilizando o método Dice. Utilizando a ferramenta K-means cluster, é possível realizar o agrupamento dos genótipos encontrados, dividindo clusters, demonstrando diferenças e similaridades dos genótipos. Foram analisados os isolados de *T. gondii* dos gatos, bem como as cepas de *T. gondii* utilizadas como controlos neste estudo (RH, PTG, CTG, TgCgCa1, MAS e TgCatBr5).

4.2.6 Genotipagem de *T. gondii* por Marcadores Microsatélites

Para a análise de microsatélites das cepas isoladas foi realizado PCR convencional utilizando 15 marcadores microsatélites (TUB-2, W35, TgM-A, B18, B17, M33, IV.1, XI.1, M48, M102, N60, N82, AA, N61, N83) Applied Biosystems, localizado em 11 cromossomos diferentes de *T. gondii* (AJZENBERG et al., 2010). Para cada reação de PCR foi preparado um mix contendo 1 μ l DNA (extraído de líquido ascítico de camundongo, de bradizoítos de cérebro de camundongos e de outros tecidos de camundongo e de animais), 3,25 mM de cada dNTP, MgCl₂ (20 mM), 1x tampão, 0,2 μ l de DNA polimerase Taq Platinum, 5 pmol do primer reverse, 5 pmol do primer forward e água ultra-pura a um volume final de 12 μ L. A reação de amplificação foi realizada em um Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 15 minutos de desnaturação inicial a 95° C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 3 minutos a 61°C e 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 30 minutos a 60°C (AJZENBERG et al., 2010). A reação de amplificação foi verificada em gel de agarose a 2%. Para 2 marcadores B17 e IV- 1, foi necessário realizar padronização para a temperatura de anelamento, de 61°C para 62° C e 63° C respectivamente, obtendo assim um padrão de banda desejado. Após padronização, o amplicon foi utilizado para realização da genotipagem no sequenciador automático (ABI PRISM 3130 xl; Applied Biosystems).

4.2.7 Genotipagem no sequenciador automático (ABI 3500; Applied Biosystems).

Foram combinados dois marcadores em cada corrida, os quais foram analisados simultaneamente, reduzindo custos e tempo. Para montagem do painel, cada poço da placa de genotipagem recebeu 2 μ L da mistura do produto da PCR de quatro locos amplificados, acrescidos de 7,8 μ l de formamida e 0,2 μ l do marcador de tamanho padrão LIZ-500 (Applied Biosystems). A placa foi desnaturada em Veriti® 96-Well Thermal Cyclor (Applied Biosystems) a 94° por 3 minutos e em seguida disposta em gelo por 5 minutos para choque térmico. A eletroforese capilar foi realizada em analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems). As análises subsequentes, para determinação de tamanhos de alelos (genotipagem), foram realizadas no software GeneMarker version 2.6.0 (Soft Genetics, State College, PA, USA).

4.3. RESULTADOS

Sete (35%) dos vinte gatos tinham anticorpos anti-T. anticorpos gondii. Portanto, 28 camundongos foram necessários para realizar o experimento. O isolamento foi possível através de bioensaios em cinco gatos (Tabela 3). A realização de PCR-RFLP com 11 marcadores genéticos revelou quatro genótipos distintos (TgCatBr85, 86, 88, 89), um incompleto (TgCatBr87) e nenhuma formação de banda contra dois marcadores (GRA6 e PK1). Dois isolados (TgCatBr86 e 88) foram virulentos em camundongos, com aparecimento de sinais clínicos entre 7 e 14 dias após a inoculação. Os outros dois isolados (TgCatBr 85 e 87) foram os únicos que causaram encistamento. O comportamento de TgCatBr89 foi diferente dos demais isolados. Ela causou a doença em camundongos que foram inoculados por via intraperitoneal e causou encistamento em um dos dois camundongos que foram inoculados por via subcutânea.

Tabela 3. Detecção de *Toxoplasma gondii* por PCR em amostras de gatos naturalmente infectados, associada ao bioensaio.

Isolados <i>T.gondii</i>		Sinais Clínicos				PCR camundongos
	Dia eutanásia	Camundongo IP*	Camundongo SC**	Presença de cisto/Total	Nº Positivo/Total	
TgCatBr85	d60	0/2	0/2	4/4	4/4	
TgCatBr86	d7-d14	2/2	2/2	0/4	3/4	
TgCatBr87	d60	0/2	0/2	4/4	4/4	
TgCatBr88	d7-d14	2/2	2/2	0/4	4/4	
TgCatBr89	d7-d14/ d60***	2/2	1/2	1***/4	3/4	

*IP- Inoculação intraperitoneal

**SC- inoculação subcutânea

*** encistamento em um dos dois camundongos inoculados por via subcutânea

Na análise do marcador de virulência CS3, quatro isolados em que este marcador era específico para o Tipo I eram da Mesorregião Sul Baiano e um único isolado que apresentava o alelo u-1 pertencia à Mesorregião de Salvador. O isolado TgCatBr87, no qual este marcador era específico para o Tipo I, não causou doença nos camundongos, demonstrando assim um comportamento diferente dos demais isolados.

Tabela 4. Genotipagem de isolados de *T. gondii* de gatos e outros animais do estado da Bahia, Brasil, por análise de PCR- RFLP,.

Referencia	Isolado	Marcador Molecular											
		SAG1	5'+3'SAG2	alt. SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3
Reference (I)	RH	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Reference (II)	PTG	II or III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
Reference (III)	CTG	II or III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
Reference	TgCgCa 1 (COUGAR)	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	II
Reference	MAS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II
Reference	TgCatBr 5	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	II
Este estudo	TgCatBr 85	I	I	I	I	III	u-1	I	III	III	I	III	u-1
	TgCatBr 86	I	I	III	III	I	I	I	III	I	I	I	I
	TgCatBr 87	I	I	III	I	III	Nd	II	III	III	nd	III	I
	TgCatBr 88	I	I	III	III	III	III	II	III	I	I	III	I
	TgCatBr 89	I	I	III	u-1	I	III	II	I	u-1	u-1	I	I
Silva et al 2017 (Dog)	TgDgBA 6			Nd									Nd
		I	III		III	I	III	I	II	I	u-2	I	
	TgDgBA 13	I	III	Nd	III	II	III	I	II	III	u-2	I	Nd
	TgDgBA 17	I	II	Nd	III	II	III	u-1	II	I	u-2	I	Nd
	TgDgBA 21	I	I	Nd	III	I	III	u-1	II	III	u-2	I	Nd
Bezerra et al (Pigs)	TgPgBr 06, 08, 11, 12, 14, 15	I	I	Nd	III	III	Nd	I	Nd	Nd	I	III	Nd
	TgPgBr7	I	I	Nd	III	III	Nd	u-1	Nd	Nd	NA	III	Nd
	TgPgBr9	I	I	Nd	III	II	Nd	I	Nd	Nd	I	III	Nd
	TgPgBr10	u-1	I	Nd	III	III	Nd	III	Nd	Nd	I	III	Nd
	TgPgBr13	I	I	Nd	III	I	Nd	III	Nd	Nd	u-1	III	Nd
	TgPgBr16	I	I	Nd	III	I	Nd	I	Nd	Nd	I	III	Nd
Maciel et al (Sheep)	#54	I	I	Nd	I	III	III	III	u-1	u-1	u-1	III	Nd
	#124	I	I	Nd	I	III	III	III	u-1	u-1	u-1	III	Nd
	#127	I	I	Nd	I	III	III	III	u-1	u-1	u-1	III	Nd

*u-1, u-2 – alelos atípicos; Nd - não determinado

Bezerra et al 2015 (<i>Chaetomys subspinosus</i>)	TgCsBr 01	I	I	Nd	III	Nd	Nd	I	Nd	Nd	III	III	Nd
	TgCsBr 01	I	I	Nd	III	Nd	Nd	III	Nd	Nd	I	III	Nd
	TgCsBr 01	I	I	Nd	III	Nd	Nd	III	Nd	Nd	I	III	Nd
Rocha et al 2018 (Chickens)	6 (TgCkBr 288, 289, 290, 291, 292, 293)	I	I	I	I	I	III	II	III	III	I	III	III
	2 (Tg294, 295)	I	III	III	III	I	III	u-1	I	I	I	III	I
	4 (TgCkBr 296, 301, 305, 308)	I	III	III	III	III	III	I	III	III	I	III	I
	1 (TgCkBr 302)	I	I	I	III	I	I	II	I	III	I	III	I
	1 (TgCkBr303)	I	III	III	III	III	II	I	III	III	I	III	I
	1 (TgCkBr 304)	I	I	I	III	I	III	u-1	I	I	I	I	I
	1 (TgCkBr307)	I	I	I	III	I	III	II	I	III	I	III	I
	1 (TgCkBr 300)	I	III	III	III	I	Nd	Nd	III	I	Nd	III	I
	1 (TgCkBr306)	I	III	III	III	Nd	III	Nd	Nd	Nd	I	III	I
	1 (TgCkBr284)	I	I	I	I e III	I	III	III	III	I	I	III	III
	1 (TgCkBr 287)	I	I	I	I e III	I	III	II	III	III	I	III	III
	1 (TgCkBr 297)	I	I e III	III	III	I	II	u-1	I	I	I	I	I
	2 (TgCkBr 298, 299)	I	I	II	III	III	III	I	I e III	I	II	III	I

*u-1, u-2 – alelos atípicos; Nd - não determinado

As cepas isoladas da região sul da Bahia foram consideradas virulentas, comparadas às da região de Salvador. Os isolados TgCatBr 86 e 88 encontrados neste estudo foram agrupados no cluster I. Os isolados TgCatBr 85, 87 e 89 foram agrupados no cluster III (Tabela 5).

Tabela 5. Agrupamento dos genótipos encontrados, mostrando a similaridades com os genótipos já conhecidos, utilizando K-means cluster.

Isolado	Cluster
TgCatBr85	III
TgCatBr86	I
TgCatBr87	III
TgCatBr88	I
TgCatBr89	III
RH	I
PTG	II
CTG	III
TgCgCa1	II
COUGAR	
MAS	I
TgCatBR5	I

Por meio da análise de agrupamento, os isolados foram agrupados em dois agrupamentos, Tipo I e Tipo III, com base nas semelhanças dos isolados dentro de cada tipo.

O dendrograma dos genótipos, avaliado pelo método de neighbor-joining, demonstrou que os isolados deste estudo estavam próximos dos isolados RH (mais próximos do Tipo I) (Figura 8).

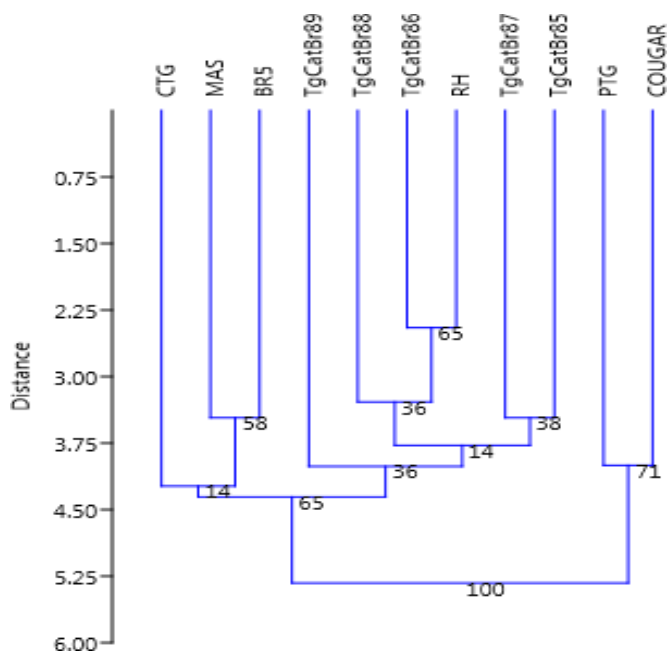


Figura 7. Dendrograma de linhagens de *Toxoplasma gondii* determinadas por padrão de bandas de PCR-RFLP utilizando onze marcadores genéticos (SAG1, 5'+3'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, C29-2, L358, PK1, Apico e CS3). A árvore foi construída usando o método Neighbor joining clustering após bootstrapping com 10.000 repetições e as distâncias foram calculadas usando o método Dice.

Na análise de genotipagem com marcadores microssatélites (MS), observou-se que os isolados apresentaram alelos atípicos nos marcadores de tipagem e impressão digital (Tabela 6). A presença de alelos atípicos foi observada nos marcadores de tipagem em todos os isolados analisados, sendo que o marcador B17 apresentou o maior grau de atipia. O MS se comportou conforme o esperado na distinção entre os tipos clonais e na identificação de alelos atípicos. Observamos a presença de alelos atípicos na tipagem (TUB2, B18 e B17) e marcadores de impressão digital.

Tabela 6 Genotipagem por MS de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos da Bahia- Brasil. Três cepas arquetípicas de referência(ENT, ME49 e NED) estão incluídas.

		Marcadores Microsatélites														
Isolado	MS tipo	Marcadores de Ditação							Marcadores de Impressão Digital							
		TUB2	W35	TgM-A	B18	B17	M33	IV.1	XI.1	M48	M102	N60	N82	AA	N61	N83
TgCatBr85	Atipico	289	242	205	158	332	165	0	0	211	162	131	111	245	103	302
TgCatBr86	Atipico	261*	0	205	0	332	165	274	356	0	164	0	109	0	101	302
TgCatBr87	Atipico	289	242	205	158	332	165	274	352	0	162	131	109	247	103	302
TgCatBr88	Atipico	289	242	205	144	336	0	274	0	211	164	131	111	247	101	302
TgCatBr89	Atipico	289	242	0	160	332	0	274	356	209	162	131	0	245	103	302
ENT	I	291	248	209	160	342	169	274	358	209	166	145	119	267	87	308
ME49	II	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	142	111	265	91	310
NED	III	289	242	205	160	336	165	278	356	215	190	147	111	267	91	312

*em negrito alelos atipicos

4.4. DISCUSSÃO

A análise molecular dos 5 isolados por PCR-RFLP utilizando 11 marcadores, resultou em três genótipos únicos, diferentes com os encontrados em estudos na Bahia e no Brasil, sugerindo uma alta diversidade genética na população de *T. gondii* circulante, corroborando com os resultados de genotipagem de isolados de outros animais no mesmo estado (BEZERRA et al, 2012, MACIEL ET AL, 2014; BEZERRA et al , 2015; SILVA et al 2017a; ROCHA et al 2018) e em outros estados do Brasil (PENA et al 2006, 2008, 2017; SILVA et al 2017b). Apenas 1 genótipo (TgCatBr 85) foi descrito anteriormente, por um único isolado encontrado em um cão na Colômbia por Chanlei Su em 2016. Essa diversidade é resultado da alta taxa de recombinação sexual desses parasitas (PENA et al., 2008; DUBEY et al., 2012).

A circulação de muitos genótipos no Brasil é justificada pela alta biodiversidade, pelo grande número de espécies de felinos encontrados, pela grande quantidade de gatos errantes e o contato próximo de animais infectados com *T. gondii* (DUBEY et al., 2008). Além disso, a grande biodiversidade de animais, a Mata Atlântica conservada e outros territórios florestais permitem o movimento frequente de felídeos selvagens entre felinos domésticos e outros hospedeiros, o que também pode justificar a diferença destes isolados com outros descritos anteriormente na região (BEZERRA et al., 2015, ROCHA et al, 2018).

A virulência desses isolados foi avaliada através das interações parasita-camundongo e essa relação pode ser correlacionada com o genótipo do isolado (BEZERRA et al., 2012; SILVA et al, 2017; ROCHA et al, 2018). Três isolados deste estudo foram virulentos para os camundongos, se assemelhando a outros estudos (SILVA et al, 2017a; ROCHA et al, 2018). Esses isolados apresentaram alelo I no locus CS3. A virulência observada neste estudo pode estar relacionada ao fato destes isolados apresentarem alelos do tipo I em vários marcadores. Os achados são consistentes com o adoecimento observado em camundongos infectados pois, o alelo I é frequentemente associado com a patogenicidade alta e intermediária, causando alterações clínicas em camundongos. Ao contrário do alelo III, responsável pela sobrevivência desses animais (PENA et al., 2008, 2017; SILVA et al., 2014).

O marcador CS3 pode ser amplamente utilizado como indicador de virulência do *T. gondii*, uma vez que é uma potencial alternativa rápida e prática para analisá-la, comparado com o ensaio biológico em camundongos (PENA et al., 2008; SILVA et al., 2014, SILVA et al., 2017a, ROCHA et al., 2018). A análise dos 5 isolados no locus CS3, no presente estudo, revelou alelos I e u-1. Sendo que os 4 isolados que apresentaram tipo I nesse marcador são da Mesorregião Sul Baiano e um único isolado que apresentou alelo u-1 pertence a Mesorregião de Salvador, corroborando com achados de Rocha et al. (2018). Dardé (2008) propõe que a presença de alelos atípicos pode afetar o fenótipo de cepas recombinantes, resultando em maior virulência. Um recombinante pode ter novos mecanismos de patogenicidade, resultando em um novo genótipo que exibe maior patogenicidade e casos mais graves de toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes, causando também doenças emergentes com sua expansão.

Através da análise de agrupamento pode-se agrupar os isolados em 2 clusters, I e III, mostrando a similaridade dos isolados com o Tipo I e Tipo III, corroborando com os achados de outros estudos no Brasil, que demonstram que há poucos atípicos ou recombinantes com o genótipo II (PENA et al., 2006;2008;2017;2020; BEZERRA et al., 2012; MACIEL et al., 2014; ROCHA et al.,2018). No dendograma os isolados tiveram mais proximidade com o Tipo I.

Na análise da genotipagem utilizando marcadores microssatélites, observamos a presença de alelos atípicos nos marcadores de digitação e de impressão digital em todos os isolados analisados, considerando todos já descritos como atípicos em trabalhos no Brasil (PENA et al. 2017, 2020; SILVA et al. 2017). O marcador de digitação B17 revelou ser um bom marcador de atipia, em relação aos outros marcadores de digitação, sendo biologicamente, um bom marcador de alelos atípicos como encontrado no trabalho de Ajzenberg et al., 2010 e Pena et al., 2020.

A alta diversidade genética de *T. gondii* na América do Sul e no Brasil pode ser devido a cruzamentos ao acaso, com maiores oportunidades de recombinação genética desse agente em gatos domésticos e selvagens, explicando a existência de um número significativo de linhagens do parasita, devido à presença antiga neste continente. Essa história evolutiva pode ter permitido a constituição de um pool genético substancial através de mutações e de recombinações sexuais (GALAL et al., 2019). Supomos que os genótipos atípicos encontrados em gatos neste estudo também possam estar circulando em seres humanos e em outros animais, uma vez que vivem próximos e podem compartilhar fontes de infecção,

podendo levar a quadros graves de toxoplasmose.

Estudos em algumas regiões do Brasil, Colômbia e norte da Argentina relatam uma alta prevalência de formas oculares graves em humanos, representando um significativo problema na saúde pública (DE-LA-TORRE et al., 2013; RUDZINSKI et al., 2016; GALAL et al., 2019). Essas formas graves de toxoplasmose ocular estão relacionadas a cepas patogênicas de *T. gondii* circulando na América do Sul em associação com o hot spot de diversidade genética do parasita neste continente (KHAN et al., 2006; DEMAR et al., 2007).

A atual globalização, o comércio marítimo, com o transporte de produtos contaminados à base de carne, o transporte de animais domésticos ou outros animais infectados por *T. gondii*, além das aves migratórias, podem contribuir para a disseminação intercontinental de novas cepas do parasita, direcionando o fluxo da América do Sul para outros continentes ou vice e versa. Esse fato pode causar situações de risco e grandes desafios a saúde pública.

4.6 CONCLUSÃO

Observamos alta variabilidade genética de *T. gondii* nas amostras analisadas, corroborando com estudos de diversidade parasitária no Brasil e na América do Sul, onde genótipos clonais são comuns. Neste estudo, o marcador CS3 foi útil para avaliar a virulência desse parasita em camundongos. O marcador microssatélite B17 apresentou atipia em quatro dos cinco isolados, sugerindo que pode servir como um bom marcador de alelos atípicos. Por meio de análise utilizando duas técnicas de genotipagem, comprovou-se que os isolados de *T. gondii* de gatos em municípios baianos eram atípicos.

5. CAPÍTULO 2

**Diversidade genética e estudo da estrutura populacional de isolados de
Toxoplasma gondii, oriundos de animais do estado da Bahia**

5.1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário do filo apicomplexa, um parasito intracelular obrigatório com distribuição mundial. Este parasita pode infectar animais de sangue quente e os felídeos são seus hospedeiros definitivos (DUBEY, 2010; PENA et al., 2017). Genótipos de *T.gondii* demonstram ter diferentes distribuição geográfica. Na Europa e América do Norte, a maioria dos isolados pertencem aos tipos clonais I, II e III, com predominância de cepas do tipo II (AJZENBERG et al., 2010). Na África subsaariana, genótipos não-arquetípicos chamados África 1, 2 e 3 foram isolados de humanos e animais domésticos, além das três grandes linhagens (AJZENBERG et al., 2009; BONTELL et al., 2009). No norte da África, no Oriente Médio e na península arábica, cepas do tipo II e III são predominantes (AL-KAPPANY et al., 2010). Na Ásia, os três principais linhagens clonais foram identificadas, além do genótipo predominante, chinês 1 (WANG et al., 2013). Na América do Norte e Central, existem as três principais linhagens (tipo I, II e III) e cepas recombinantes (KHAN et al., 2011, PENA et al., 2008).

No Brasil e em outros países da América do Sul, a população de *T. gondii* possui alta diversidade genética, com genótipos atípicos e recombinantes, fato este que pode ser justificado pelas trocas genéticas frequentes (PENA et al., 2008; AJZENBERG et al., 2010; LORENZI, 2016; ROCHA et al., 2018; PENA et al., 2020).

Os Marcadores Microssatélites (SSR - Simple Sequence Repeat) têm sido as ferramentas utilizadas para estudos da diversidade, fluxo gênico, parentesco, estrutura genética e tamanho efetivo populacional, por serem mais polimórficos e úteis para rastrear surtos e eventos recentes da história evolutiva de organismos vivos (AJZENBERG et al., 2010; LORENZI, 2016).

Ajzenberg e colaboradores (2010), desenvolveram 15 marcadores microssatélites, localizados em 11 cromossomos diferentes de *T. gondii*. Nesse trabalho verificaram que a associação destes marcadores permitiu dois níveis diferentes de resolução genética para diferenciar as cepas de *T. gondii*, ao nível de digitação (tipos I, II e III versus cepas atípicas) e ao nível das impressões digitais (isolados intimamente relacionados dentro de uma linhagem clonal). A designação

de linhagens clonais genotipadas por esta técnica geralmente se refere às suas origens geográficas. O nome “genótipo único” ou “atípico” é atribuído a cepas pertencentes a nenhuma das linhagens clonais definidas por esse método de genotipagem (GALAL et al., 2019). A técnica vem sendo utilizada para analisar diversos isolados no Brasil (PENA et al., 2017, 2020; SILVA et al., 2017), assim como em diversas partes do mundo (CAN et al., 2014; VALENZUELA-MORENO et al., 2020)

A estrutura populacional de *Toxoplasma gondii* é caracterizada por contrastes geográficos, alta diversidade em diferentes escalas espaciais: global, regional e até local em algumas regiões. Os determinantes desse padrão de diversidade e seus possíveis mecanismos evolutivos ainda são amplamente explorados. Atualmente, os genótipos de *T. gondii* estão sendo associado a várias apresentações clínicas. O estudo da estrutura populacional do *T. gondii* é de grande importância, para que haja melhor compreensão da epidemiologia da doença, da diversidade do parasita, assim como das manifestações da doença ou para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento ou diagnóstico (CAN et al., 2014, PENA et al., 2020).

Considerando a necessidade de identificação dos genótipos, alelos e recombinação em linhagens de *T. gondii* no Brasil que contribuam no esclarecimento da virulência do parasito, na epidemiologia da infecção e nos reflexos em saúde pública, o presente estudo objetivou determinar e analisar a diversidade genética de 30 isolados de *T. gondii* oriundos de diferentes tipos de animais do estado da Bahia, Brasil, utilizando 15 Marcadores Microsatélites; Realizar o estudo da estrutura populacional; Estimar número de clusters existentes nos isolados analisados, avaliar diferenças genéticas entre os clusters detectados e avaliar eventos de gargalo genético.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Amostragem e área do estudo

Foram utilizadas amostras de DNA de 30 isolados de *Toxoplasma gondii*, de diferentes espécies de animais, do estado da Bahia - Nordeste do Brasil. Os isolados são das seguintes espécies: cão - 2 isolados (SILVA et al., 2017), ovino — três isolados (MACIEL et al., 2014), galinha caipira - quinze isolados (ROCHA et al. 2018), suíno - um isolado (BEZERRA et al, 2012) e um catitu, cinco gatos e três roedores silvestres (01 *Thapytomys nigrita* e 2 *Hylaeamys laticeps*) armazenados no Laboratório de Parasitologia Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz. Foram utilizadas três cepas de referência, ENT (tipo I- França); ME49((tipo II -USA); NED (tipo III — França), cepas de referência arquetípicas de humanos, cabras e humanos, respectivamente.

5.2.2 Análise de genotipagem por microssatélites

Para a análise de microssatélites foi realizado PCR convencional utilizando 15 marcadores microssatélites (TUB-2, W35, TgM-A, B18, B17, M33, IV.1, XI.1, M48, M102, N60, N82, AA, N61, N83) Applied Biosystems, localizado em 11 cromossomos diferentes de *T. gondii* (AJZENBERG et al., 2010). Para cada reação de PCR, de cada isolado foi preparado um mix contendo 1 µL do DNA, 3,25 mM de cada dNTP, MgCl₂ (20 mM), 1x tampão, 0,2 µl de DNA polimerase Taq Platinum, 5mM do primer reverse, 5mM do primer forward e água ultra-pura a um volume final de 12 µL. A reação de amplificação foi realizada em um Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 15 minutos de desnaturação inicial a 95° C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 3 minutos a 61°C e 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 30 minutos a 60°C (AJZENBERG et al., 2010). A reação de amplificação foi verificada em gel de agarose a 2%. Para 2

marcadores B17 e IV- 1, foram necessárias padronizações para a temperatura de anelamento, de 61°C para 62° C e 63° C respectivamente, obtendo assim um padrão de banda desejado. Após padronização, o amplicon foi utilizado para realização da genotipagem no sequenciador automático (ABI PRISM 3130 xl; Applied Biosystems).

5.2.3 Genotipagem no sequenciador automático (ABI 3500 (Applied Biosystems)).

Foram combinados dois marcadores em cada corrida, os quais foram analisados simultaneamente, reduzindo custo e tempo. Para montagem do painel, cada poço da placa de genotipagem recebeu 2 µL da mistura do produto da PCR de quatro locos amplificados, acrescidos de 7,8 µL de formamida e 0,2 µL do marcador de tamanho padrão LIZ-500 (Applied Biosystems). A placa foi desnaturada em Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) a 94° por 3 minutos e em seguida disposta em gelo por 5 minutos para choque térmico. A eletroforese capilar foi realizada em analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems). As análises subsequentes, para determinação de tamanhos de alelos (genotipagem), foram realizadas no software GeneMarker version 2.6.0 (Soft Genetics, State College, PA, USA).

5.2.4 Análise de dados

5.2.4.1 Análise de agrupamento Bayesiano

Foi realizado um conjunto de testes estatísticos para avaliar a existência de estrutura genética populacional. Foi estimada a estrutura da população das 33 amostras (incluindo as cepas de referência) utilizando o programa STRUCTURE v.2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007). Utilizamos modelos de *clustering* bayesiano para estimar o número de populações (K). Nós inicialmente conduzimos 10 simulações independentes para cada valor de K (número de clusters), variando entre 1 e 10. Foram feitas simulações utilizando um período de “*burn-in*” de 10⁶ interações, seguido por um procedimento MCMC (Monte Carlo e

Cadeia de Markov) de 10^6 interações. O número mais provável de populações foi estimado utilizando o programa STRUCTURE HARVESTER (EARL and VONHOLDT, 2012), disponível no site <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>, incluindo uma avaliação do número mais provável de clusters genéticos distintos através do método proposto por Evanno et al. (2005).

5.2.4.2 Análise da Diversidade Genética dos clusters

Resumiu-se a variação genética através do número total de alelos (NA), alelosefetivos (NE), utilizando o programa CERVUS versão 3.0.3 (KALINOWSKI et al. 2007) para cada um dos conjuntos inferidos (clusters) e para o conjunto de dados completo (todos os indivíduos). Foi calculado o valor de F_{ST} (WEIR and COCKERHAM 1984) e testado para diferenças genéticas entre os clusters identificados pelo modelo bayesiano com o uso do programa FSTAT v 2.9.3.2 (GOUDET 1995; GOUDET 2001). Além disso, a análise de variância molecular (AMOVA) também foi realizada para testar o significado da estrutura populacional inferida com o GenAlEx 6.4 (PEAKALL e SMOUSE, 2006) em três níveis: (i) entre as populações (População 1 e 2), (ii) entre indivíduos dentro das populações e (iii) nos indivíduos. Eventos de gargalo genético entre os *clusters* detectados (População 1 e 2) e todos os indivíduos (População Total) foram avaliados utilizando o programa BOTTLENECK version 1.2.02 (CORNUET e LUIKART 1996; PIRY et al. 1999). As análises foram realizadas utilizando três modelos de mutação de microssatélites disponíveis: (i) modelo do alelo infinito (IAM), (ii) passo a passo (SMM) e (iii) modelo de mutação em duas fases (TPM), com 95% de mutação por cada etapa.

5.3 RESULTADOS.

5.3.1 Análise de agrupamento bayesiano

A análise de estrutura genética forneceu resultados consistentes com a utilização de 10 replicações para cada K. O cálculo do valor ΔK (EVANNO et al. 2005) produziu um valor elevado (Delta K = 38.0528) e distinto quando o K = 2, o que implicou a presença provável de dois grupos geneticamente distintos (Figura 9A). O valor de MeanLnP(K) (- 1923.950) é o mais elevado com o menor desvio-padrão quando atinge K = 2 e tende em seguida a um grande decréscimo com Variação da Probabilidade de Ln = 63.9 (Figura 9B).

Em geral, o método de bayesiano indicou que os indivíduos podem ser analisados em pelo menos duas populações (Figura 10).

A

B

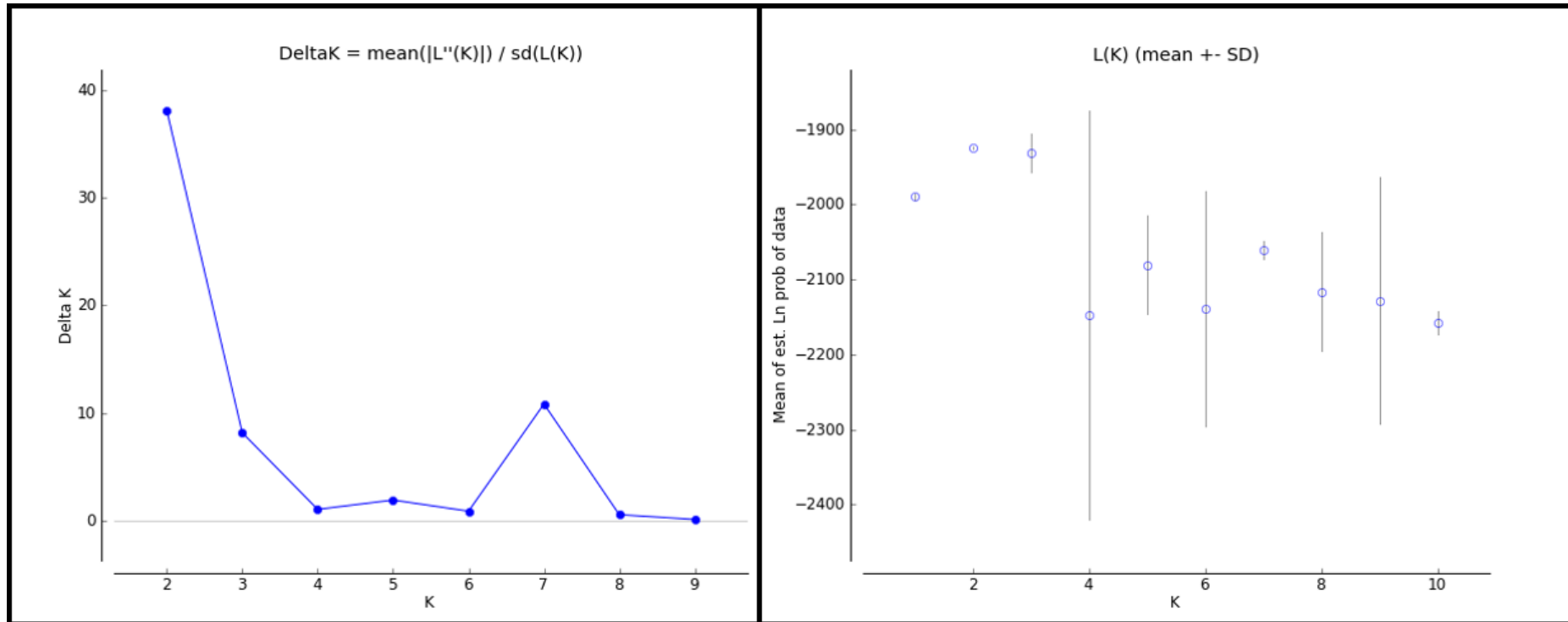


Figura 8. Resultados de agrupamento para os indivíduos de *Toxoplasma gondii* obtidos utilizando o software Structure Harvester para detectar o melhor valor de K (número de grupos, $K = 2$) segundo método de Evanno. **9 A-** Delta K - O cálculo do valor ΔK produziu um valor elevado (Delta $K = 38.0528$) e distinto quando o $K = 2$; **9 B-** MeanLnP(K) O valor de MeanLnP(K) (- 1923.950) é o mais elevado com o menor desvio-padrão quando atinge $K = 2$.

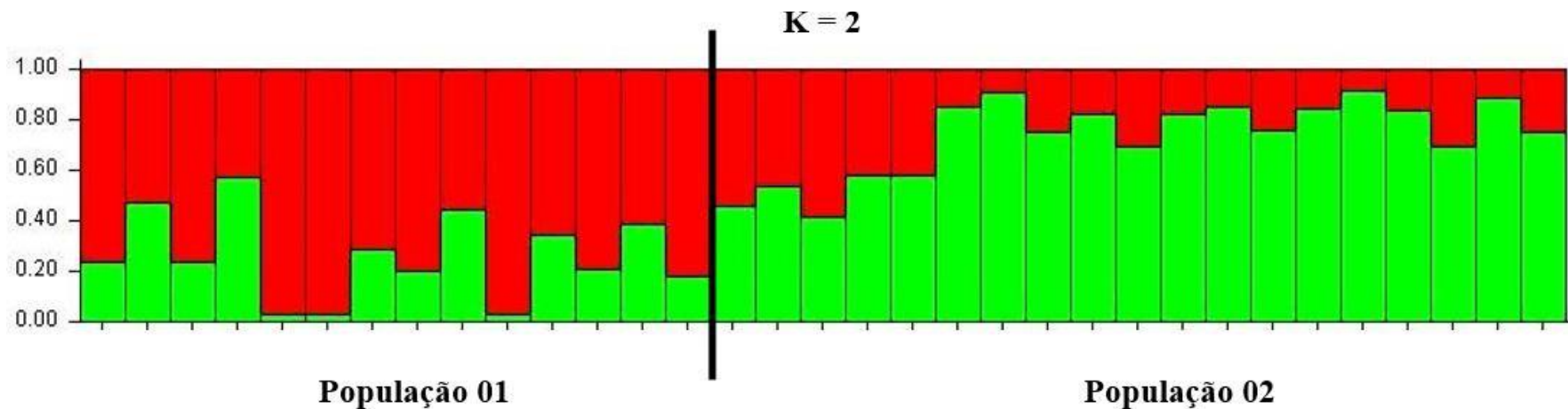


Figura 9. Relações genéticas entre as cepas de *Toxoplasma gondii* (30 indivíduos + 3 controles) estimadas utilizando programa Structure baseado em marcadores microssatélites. Cada indivíduo é representado como uma linha vertical. Linha dividida em segmentos K cujo comprimento está relacionado com as proporções de adesão para cada cluster K inferido. A figura ($K = 2$) mostra o arranjo mais provável, baseado no valor de ΔK segundo método de Evanno et al. (2005). Os indivíduos são ordenados por sua proximidade geográfica de amostragem e divididos em dois clusters (População 01 e População 02).

Os dois grupos foram nomeados como população 1 e população 2 para facilitar sua identificação durante as discussões dos resultados das análises genéticas subsequentes (Tabela 7).

Tabela 7. Descrição dos 30 isolados de *T.gondii* e 3 controles de referencia utilizados. Organizados em população 1 e 2.

População	Número	Isolado	Município
1	2	TgCatBr86	Itabuna
1	3	TgCatBr87	Itabuna
1	4	TgCatBr88	Barro Preto
1	5	TgCatBr89	Itabuna
1	6	TgDgBA6	Ilhéus
1	7	TgDgBA 3	Ilhéus
1	8	#54	Itabuna
1	9	# 124	Itabuna
1	10	#127	Itabuna
1	11	Suíno 20	Ilheus
1	12	Silvestre -80	UNA
1	13	Silvestre 244	UNA
1	14	Silvestre 253	Ilheus
1	15	Catitu	Ilhéus
2	21	TgCkBr298	Itabuna
2	22	TgCkBr299	Itabuna
2	23	TgCkBr300	Itabuna
2	24	TgCkBr301	Itabuna
2	25	TgCkBr302	Itabuna
2	1	TgCatBr85	Dias Dávila
2	16	CEPA Galinha	Itabuna
2	17	TgCkBr294	Itabuna
2	18	TgCkBr295	Itabuna
2	19	TgCkBr296	Itabuna
2	20	TgCkBr297	Itabuna
2	26	TgCkBr303	Itabuna
2	27	TgCkBr304	Itabuna
2	28	TgCkBr305	Itabuna
2	29	TgCkBr306	Itabuna
2	30	TgCkBr307	Itabuna
2	31	ENT	Referência I
2	32	ME49	Referência II
2	33	NED	Referência III

5.3.2 Diversidade genética

Na análise da variabilidade genética, observou-se que os 15 locos utilizados foram polimórficos e demonstraram altos níveis de diversidade. Quando todas as amostras foram reunidas em conjunto (População Total), obtivemos o Número de Alelos Total (N_A) de 12.8 e Número de Alelos Efetivo (N_E) de 6.39. Quando avaliamos as populações separadamente, observamos N_A de 11.00 e N_E de 7,78 para população 1 e N_A de 7.80 e N_E de 4.34 para população 2. Podendo afirmar que existe maior diversidade na população 1.

O Valor do parâmetro de endogamia devido a subdivisão (F_{ST}) foi igual a 0,036, e demonstra que apesar de observamos uma grande diversidade genética na população, há uma alta similaridade entre os isolados desse estudo (Tabela 9).

Tabela 8. Estimativas da variabilidade genética utilizando 15 marcadores microssatélites para todos os 33 indivíduos agrupados (Pop. Total), indivíduos da População 01 (Pop. 01) e de indivíduos da População 02 (Pop. 02). As variáveis analisadas são: número de indivíduos testados (n), número total de alelos (N_A), alelos efetivos (N_E) e F_{ST} (endogamia devido à subdivisão) entre a Pop. 01 e Pop. 02.

Amostragem	N	N_A	N_E	F_{ST}
Pop. Total	33	12.800	6.393	-
Pop. 01	14	11.000	7.781	0.036
Pop. 02	19	7.800	4.344	

Na avaliação de cada Marcador Microsatélite observou-se que o marcador de digitação que teve maior numero de AE foi o B17 e o marcador de impressão digital com maior numero de AE foi o N82 (Tabela 9).

Tabela 9. Estimativas da variabilidade genética produzida pelos 15 marcadores microsatélites testado com os 33 indivíduos agrupados (Pop. Total).

Locus	N	Na	Ne	I
TUB2 (287-291)A	31	11,000	5,653	1,939
W35 (242-248)A	30	13,000	4,972	1,988
TgM-A (203-211)A	29	13,000	6,810	2,147
B18 (156-170)A	29	14,000	6,161	2,148
B17 (334-366)A	33	16,000	7,383	2,317
M33 (165-173)A	27	12,000	4,893	1,958
IV.1 (272-282)A	29	14,000	6,323	2,158
XI.1 (354-362)A	28	14,000	7,193	2,243
M48 (209-243)A	29	12,000	5,533	2,036
M102 (164-196)A	30	11,000	6,792	2,091
N60 (132-157)A	28	11,000	7,467	2,187
N82 (105-145)A	29	14,000	8,410	2,332
AA (251-332)A	30	10,000	5,422	1,916
N61 (79-123)A	31	14,000	6,428	2,150
N83 (306-338)A	30	13,000	6,452	2,128

N- Número de indivíduos testados; Na- número total de alelos; Ne- alelos efetivos; I- índice de informação;

5.3.3 Diferenciação genética e gargalo genético

Na análise de AMOVA mostrou uma variação genética dentro das populações de 97% e de apenas 3% entre as populações 1 e 2 (Figura 3).

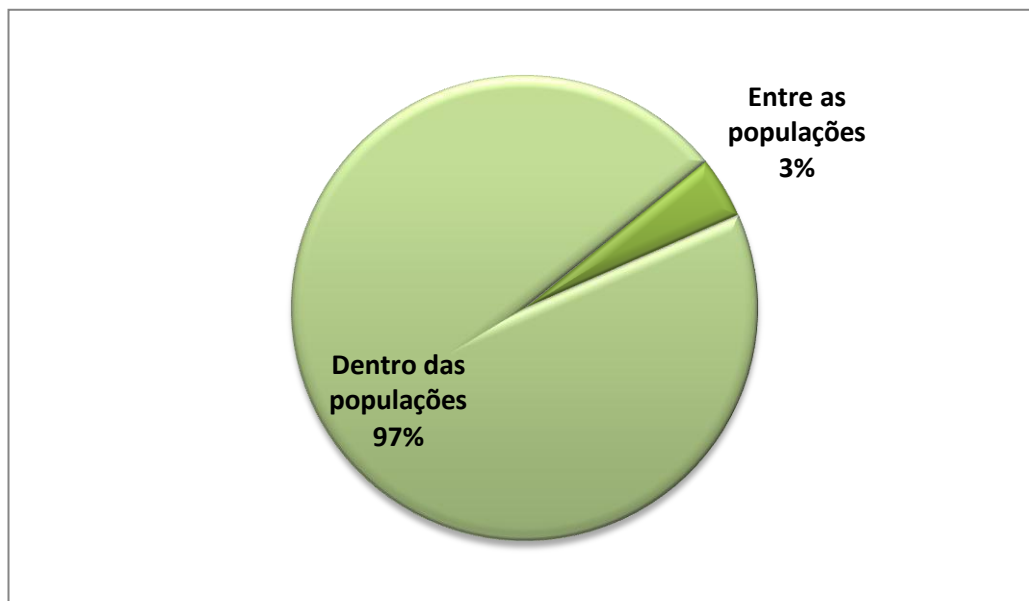


Figura 10. Percentual da variação genética pela Análise Molecular de Variância (AMOVA) calculada usando as medidas de distância genética par a par a partir do *RST*. Em verde claro variação atribuída a diferenças dentro das populações e em verde escuro entre populações e $p < 0,01$.

Análises de gargalo genético revelaram valores significativos ($p < 0,05$) para as reduções históricas no tamanho efetivo da População Total, na população 1 e 2. Sendo considerado o gargalo genético onde 2 ou mais teste possuem $p < 0,05$, entre os 3 agrupamentos o único modelo com resultado significativo em SMM (stepwise mutation model) e TPM (two phase model) foi a população total, sendo que SMM é modelo mais apropriado para explicação das mutações no genoma utilizando marcadores microssatélites (SSR), e possuiu resultado mais significativo na população total (Tabela 10).

Tabela 10. Resultado dos testes de gargalo genético utilizando 15 marcadores microssatélites (SSR) em três conjuntos: População total; População 01; População 02.

Populações	Indivíduos	Sing test ¹		
		IAM ²	SMM ³	TPM ⁴
População total	33	0.09849	0.00003	0.00973
População 01	14	0.03094	0.59437	0.10650
População 02	19	0.21683	0.00242	0.39452

¹Valores do *Sing test* são valores P. Resultados significativos para *Sing test* estão em negrito.

Modelos de mutação: modelo de alelos infinitos (IAM)²; modelo de mutação passo a passo (SMM)³; e uma combinação dessas duas hipóteses extremas, o modelo de duas fases (TPM)⁴.

Analisando a genotipagem realizada utilizando marcadores microssatélites, pode-se observar que os isolados identificados mostraram alelos atípicos nos marcadores de digitação e de impressão digital (Tabela 11). Observou-se a presença de alelos atípicos nos marcadores de digitação em 28 dos 30 isolados analisados, sendo que o marcador B17, foi o que mais detectou atipia. As amostras #54 e #124, não apresentaram alelos atípicos nos marcadores de digitação. Todas amostras apresentaram alelos atípicos nos marcadores de impressão digital.

Tabela 11. Resultados da análise de 15 Marcadores Microsatélites (SSR) deisolados de *Toxoplasma gondii* do estado da Bahia, Brasil.

Isolado	MS tipo	Marcadores Microsatélites														
		Marcadores de Digitação						Marcadores de Impressão Digital								
		TUB2	W35	TgM-A	B18	B17	M33	IV.1	XI.1	M48	M102	N60	N82	AA	N61	N83
TgCatBr85	Atípico	289	242	205	158	332	165	0	0	211	162	131	111	245	103	302
TgCatBr86	Atípico	261	0	205	0	332	165	274	356	0	164	0	109	0	101	302
TgCatBr87	Atípico	289	242	205	158	332	165	274	352	0	162	131	109	247	103	302
TgCatBr88	Atípico	289	242	205	144	336	0	274	0	211	164	131	111	247	101	302
TgCatBr89	Atípico	289	242	0	160	332	0	274	356	209	162	131	0	245	103	302
TgDgBA6	Atípico	261	210	191	146	342	145	244	356	185	144	111	91	165	91	310
TgDgBA 3	Atípico	289	212	191	144	346	165	244	352	185	140	113	95	165	91	310
#54	Atípico	291	242	0	158	336	169	274	356	213	164	133	109	247	103	302
# 124	Atípico	291	242	205	158	336	169	0	356	213	164	133	109	247	101	302
#127	Atípico	289	0	201	158	332	165	274	356	211	164	133	109	245	103	0
Suíno 20	Atípico	265	210	191	144	330	145	244	356	191	146	111	95	165	93	310
Silvestre -80	Atípico	289	248	207	158	332	165	274	0	211	162	0	111	245	101	300
Silvestre 244	Atípico	289	248	207	0	332	165	274	358	209	0	131	111	247	103	300
Silvestre 253	Atípico	289	242	205	158	332	165	274	356	211	162	133	111	245	0	302
Catitu	Atípico	0	248	205	158	332	145	244	358	211	162	131	0	247	103	302
CEPA Galinha	Atípico	289	242	205	158	330	0	274	356	0	160	131	111	245	103	302
TgCkBr294	Atípico	289	242	205	158	332	165	274	356	211	162	0	95	165	0	302
TgCkBr295	Atípico	289	210	205	158	332	165	0	356	211	160	131	109	245	101	302
TgCkBr296	Atípico	289	242	191	158	332	165	274	356	211	162	131	111	165	103	302
TgCkBr297	Atípico	289	242	205	158	332	145	274	356	211	160	111	111	0	101	302
TgCkBr298	Atípico	289	242	0	146	330	165	244	356	211	162	131	90	245	103	310
TgCkBr299	Atípico	261	0	205	158	332	0	274	356	211	162	111	111	245	99	310
TgCkBr300	Atípico	289	210	191	0	332	165	274	356	191	146	131	0	165	103	300
TgCkBr301	Atípico	289	242	205	144	330	165	244	0	211	162	131	99	245	101	300
TgCkBr302	Atípico	289	242	191	158	332	145	274	356	191	0	111	109	245	101	300
TgCkBr303	Atípico	0	242	205	158	332	165	0	356	211	146	131	111	0	103	300
TgCkBr304	Atípico	289	242	205	158	300	165	274	356	0	162	131	109	245	99	0
TgCkBr305	Atípico	289	242	205	144	332	0	274	356	211	162	0	111	245	103	300
TgCkBr306	Atípico	289	242	205	0	332	165	274	0	211	162	131	109	245	101	300
TgCkBr307	Atípico	289	242	0	158	332	0	274	356	191	162	131	111	245	89	0
ENT	I	291	248	209	160	342	169	274	358	209	166	145	119	267	87	308
ME49	II	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	142	111	265	91	310
NED	III	289	242	205	160	336	165	278	356	215	190	147	111	267	91	312

5.5 DISCUSSÃO

Neste estudo, exploramos a diversidade genética de isolados de *T. gondii*, obtidos de diferentes hospedeiros, oriundos do estado da Bahia. Para esse fim, analisamos dados de 15 locos microssatélites, distribuídos em 11 cromossomos diferentes.

Através da análise bayesiana foi revelado que o conjunto de indivíduos amostrados pode ser subdividido em dois grupos genéticos distintos, indicando a ocorrência de estrutura genética populacional. Observamos uma diversidade genética substancial, com a formação de 2 clusters com alta similaridade. Os níveis de diferenciação genética entre os grupos representado pelo F_{ST} (0,036) confirmou baixo nível de diferenciação entre as populações. Can et al, (2014) e Lorenzi et al, (2017) também dividiram isolados em clusters, apesar de existir grande similaridade entre as amostras.

A análise de AMOVA demonstrou que 97% da variação genética encontra-se dentro das populações e apenas 3% entre as populações. Apesar de ser dividido em duas populações, encontramos relações genéticas estreitas entre as amostras da População 1 e População 2, sendo os isolados geneticamente similares, sugere-se que houve um único genótipo ancestral. GALAL et al. (2019) sugere que história evolutiva pode ter permitido a constituição de um pool genético substancial através de mutações e de recombinações sexuais, o que justifica a similaridade entre as populações.

Quando observamos a população 1, o número de alelos totais e efetivos foram superiores a população 2, revelando que os indivíduos com maior diversidade genética pertencem a População 1.

Na análise da estimativa da variabilidade genética produzida pelos 15 marcadores microssatélites observou-se que o marcador de digitação que teve maior número de total de alelos e alelos efetivos foi o B17. O marcador de digitação B17 apresentou-se no presente estudo, biologicamente, como um bom marcador de alelos atípico, assim como encontrado no trabalho de Ajzenberg et al., (2010) e Pena e Colaboradores (2020).

As análises de gargalo genético revelaram que a População Total sofreu reduções históricas no seu tamanho efetivo, apresentando $p < 0,05$ em dois modelos, SMM (stepwise mutation model) e TPM (two phase model).

Na análise da genotipagem utilizando marcadores microssatélites, observamos a presença de alelos atípicos nos marcadores de digitação e de impressão digital, corroborando ainda mais com a alta diversidade de cepas brasileiras de *T. gondii* (PENA et al., 2017; 2020; SILVA et al., 2017). Diferentemente dos estudos de Can e colaboradores 2014, na Turquia (Eurásia) utilizando 15 MS, encontraram entre os 22 isolados (19 eram do tipo II, dois eram do tipo III e um erado genótipo África 1), corroborando com outros estudos realizados nessa região (AJZENBERG et al., 2010; WANG et al., 2013).

Oito marcadores de digitação distinguem facilmente os tipos clonais I, II e III de todos os genótipos atípicos, e com eles podemos classificar todos os isolados analisados no presente trabalho como atípicos, corroborando com os estudos realizados no Brasil e América do Sul, onde há predominância de isolados atípicos (PENA et al., 2017, 2020; SILVA et al., 2017; GALAL et al., 2019). Em nosso trabalho encontramos a presença de alelos atípicos nos marcadores de digitação em 28 dos 30 isolados analisados. As amostras #54 e #124, não apresentaram alelos atípicos nos marcadores de digitação, mas demonstraram ser genótipos distintos e atípicos no marcador de impressão digital (N61).

Assim como Pena e colaboradores (2017) utilizando 15 marcadores microssatélites, de acordo com os protocolos de Ajzenberg et al. (2010) analisou um isolado de um gato. A análise dos SSR mostrou que a cepa era uma variante do tipo I, com dois alelos atípicos em dois marcadores de digitação (B17 e M33). Já em 2020, Pena e Colaboradores analisaram 1 isolado de tamanduá, utilizando 15 SSR, na análise observou apenas um alelo atípico em 1 marcador de digitação o B17, sendo a cepa um variante do tipo III, nos marcadores de impressão digital todos os alelos foram distintos das cepas de referência, corroborando com os achados de nosso estudo, onde os isolados possuem características atípicas.

Valenzuela-Moreno e colaboradores (2020) em seu estudo no México, encontraram em 2 isolados de cães, um dos isolados (TgDogMxChp3) com alelos nos marcadores de digitação iguais ao tipo BrIII e outro isolado (TgDogMxChp11) com atipia em um marcador de digitação (IV-1) com número de alelo 276, sendo

considerado um novo genótipo, concordando com outros estudos realizados nessa região (DUBEY et al., 2009; RICO-TORRES et al., 2015, 2018).

Na análise dos 7 marcadores de impressão digital, observamos a presença predominantemente de alelos atípicos, principalmente nos marcadores M48, M102, N60, e AA. Os 7 marcadores de impressão digital fornecem resolução genética aprimorada, além do nível de digitação, na distinção entre isolados dentro de uma linhagem clonal ou haplogrupo. Silva e colaboradores (2017) genotipou cepas de *T. gondii* de um gato e três ratos na Ilha Fernando de Noronha. Dentro de cada grupo, as diferenças entre, estirpes eram limitadas. Apenas um marcador de microssatélites de digitação foi capaz de diferenciar cepas com o genótipo ToxoDB-RFLP # 146 no grupo tipo III, o TgMA, na ilha. 2 Isolados com o genótipo ToxoDB-RFLP nº 3 que pertence ao grupo tipo II também foram muito semelhantes, com apenas dois marcadores microssatélites de impressão digital capazes de diferenciá-los (M48 e N61) e tiveram o alelo 329 no marcador de microssatélites N83, este alelo está ausente em cepas de Europa e América do Norte e, até o momento, foram identificados somente em cepas brasileiras. 1 isolado com genótipo ToxoDB-RFLP nº 13 pertence ao grupo Caribe1.

A detecção de alelos atípicos pelos marcadores SSR destaca a capacidade desses em capturar a diversidade genética de cepas altamente divergentes, como as cepas América do Sul. Sendo portanto os SSR, uma ferramenta útil para identificar se os isolados são geneticamente idênticos ou diferentes, ou seja, identificar uma fonte comum de infecção em um surto, uma contaminação laboratorial e infecções mistas e assim pode-se adotar medidas preventivas.

A patogenicidade do *T. gondii* no Brasil pode estar associada a cepas atípicas decorrentes da recombinação sexual, que pode ocorrer nos felídeos (AJZENBERG, et al., 2004). Acredita-se que a recombinação afeta a virulência do parasita, com base em casos graves de toxoplasmose associada a infecções por *T. gondii* em humanos imunocompetentes, não havendo diferenças morfológicas nas cepas de *T. gondii* isoladas de animais ou humanos (DUBEY et al., 2012). Assim, a identificação destas estirpes é de importância clínica e epidemiológica (Ajzenberg et al., 2010).

O impacto em termos de saúde pública dessa diversidade notavelmente contrastante das populações de *T. gondii* é bastante discutida, com ênfase no papel

da globalização de trocas, que pode levar à rápida evolução da estrutura espacial da população de *T. gondii* e a novos desafios no contexto da Saúde Única

5.5 CONCLUSÃO

Os SSRs são ferramentas eficientes para realizar genotipagem e detectar alelos atípicos.

Os isolados analisados nesse estudo apresentam grande similaridade

Os isolados analisados se dividiram em dois grupos geneticamente distintos.

O marcador B17 apresentou ser um bom marcador de alelos atípicos nesse estudo.

Através da análise de genotipagem dos marcadores Microssatélites, podemos afirmar que os isolados analisados nesse estudo são atípicos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJZENBERG, D., BAÑULS, A.L. SU, C., DUMÈTRE, A., DEMAR, M., CARME B., DARDÉ, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 34:1185–1196, .2004.

AJZENBERG, D, BAÑULS, A.L., TIBAYRENC, M., DARDÉ, M.L.. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal of Parasitology** v. 32, p. 27-38, 2002.

AJZENBERG, D., YEAR, H., MARTY , P., PARIS, L., DALLE, F., MENOTTI, J., AUBERT, D., FRANCK , J., BESSIE`RES, M. H., QUINIO, D., PELLOUX , H., DELHAES, L., DESBOIS, N., THULLIEZ, P., ROBERT-GANGNEUX, F., KAUFFMANN-LACROIX , C., PUJOL, S., RABODONIRINA, M., BOUGNOUX, M.E., CUISENIER, B., DUHAMEL, C., DUONG, T. H., FILISETTI , D., FLORI, P., GAY-ANDRIEU, F., PRATLONG, F., NEVEZ , G., TOTET, A., CARME, B., BONNABAU, H., DARDE ,M. L. ´, AND VILLENA, I.. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. **J. Infect. Dis.** 199:1155–1167. 2009.

AJZENBERG, D., COLLINET, F., MERCIER, A., VIGNOLES, P., DARDÉ, M.L... Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates with 15 Microsatellite Markers in a Single Multiplex PCR Assay_ **Journal of clinical microbiology**, , p. 4641–4645 Vol. 48, No. 12. 2010.

AL-KAPPANY YM, RAJENDRAN C, ABU-ELWAFSA SA, HILALI M, SU C, et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes. **J Parasitol** 96: 1112–1114. ,2010.

APPLIED BIOSYSTEMS. SDS Compendium 7000 SDS ver 2.1. Disponível em:<
<http://www.appliedbiosystems.com.au/sdscompendiums.htm>.>

ARAÚJO, F.A.P. et al. Anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de gatos internados no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, detectados através da técnica de hemaglutinação indireta. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, n.2, p.89-92, 2003.

BEAMAN, M.H. et al. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell, G. L.; Douglas, R. G.; Bennett, J. E. Principles and practices of infectious diseases. 4.ed. New York: **ChurchillLivingstone**. p. 2455- 2475. 1995.

BEZERRA, R.A., CARVALHO, F.S., GUIMARÃES, L.A., ROCHA, D.S., MACIEL, B.M., WENCESLAU A.A., LOPES, C.W., ALBUQUERQUE, G.R. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. **Vet Parasitol.** 189:153–161. 2012;

BEZERRA, R.A., GINÉ, G. A. F., MACIEL, B.M., GAIOTTO, F. A., ALBUQUERQUE, G.R. Identification and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in free-ranging bristled porcupine (*Chaetomys subspinosus*), a threatened arboreal mammal from the Brazilian Atlantic Forest. **Parasites & Vectors**, 8:277, 2015.

BLACKSTON, C. R. et al., High-resolution typing of *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1472-1475. 2001.

BONTELLI, H., HALL N, ASHELFORD KE, DUBEY JP, BOYLE JP, ET AL. Whole genome sequencing of a natural recombinant *Toxoplasma gondii* strain reveals chromosome sorting and local allelic variants. **Genome Biol** 10: R53, 2009.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose. In: FERREIRA, A. W.; DE AVILO, S. L. M. Diagnóstico Laboratorial. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 165-174. 1996.

CAN. H.S. , KAYA M.S., AJZENBERG D. , H. GOÖ KHAN OÖ ZDEMIR , AYS, E CANER2 , SULTAN GUÖ LCE IÖZ , AYSU DEGÖ IRMENCIDOÖ S, KAYA2 , ESRA ATALAY , C, AGÖ DAS, C, ETINKAYA , SAYGUN UÖ RGEN , SABIRE KARAC, ALI , CEMAL UÖ N , MARIE-LAURE DARDEÖ , YUÖ KSEL GUÖ RUÖ Z2 Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates and Toxoplasmosis Seroprevalence in Stray Cats of Izmir, Turkey **PLOS ONE**, Volume 9 | Issue 8, 2014.

CHIKWETO, A. , SHARMA ,R. N. , TIWARI, K. P. , VERMA, S. K. , BERNAL, R.C.-, JANG, T.,, SU, C , KWOK, O. C. , DUBEY ,J. P. Isolation and RFLP Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Free-Range Chickens (*Gallus domesticus*) in Grenada, West Indies, Revealed Widespread and Dominance of Clonal Type III Parasites **J. of Parasitology**, 103(1):52-55.2017

CORRÊA-OLIVEIRA, R; CALDAS, I. R; GAZZINELLI, G. Natural versus drug induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitol. Today**. v. 16, n. 9, p. 397- 399, 2000

CORNUET, J.M., LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics** 144:2001–2014. 1996.

DA SILVA, R.C., LANGONI, H., SU, C., DA SILVA, A.V.. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p.173-177, 2011.

DARDÉ ML, BOUTEILLE B, PESTRE-ALEXANDRE M.. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, v. 78, p. 786-794, 1992.

DARDÉ, M.L., VILLENA, I., PINON, J.M., BEGUINOT, I.. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guiana. **Current Topical Microbiology Immunology**. v. 36, p. 32-41, 1998.

- DARDE, M.L.¹, BOUTEILLE, B., PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**. v. 39, p.551-558, 1988.
- DARDÉ, M. L. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. **Current Topics Microbiology Immunology** . v. 219, p. 27-41, 1996.
- DARDÉ, M. L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 40, p. 57-63, 2004.
- DARDÉ ML. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. **Parasite**;15: 366-371. 2008
- DEMAR, M., D. AJZENBERG, D. MAUBON, F. DJOSSOU, D. PANCHOE, W. PUNWASI, N. VALERY, C. PENEAU, J. L. DAIGRE, C. AZNAR, B. COTTRELLE, L. TERZAN, M. L. DARDE', AND B. CARME. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. **Clin. Infect. Dis.** 45:e88–e95. 2007.
- DE-LA-TORRE, A., SAUER, A., PFAFF, A.W., BOURCIER, T., BRUNET, J., SPEEG-SCHATZ, C., BALLONZOLI, L., VILLARD, O., AJZENBERG, D., SUNDAR, N., GRIGG, M.E., GOMEZ-MARIN, J.E., CANDOLFI, E.,. Severe South American ocular toxoplasmosis is associated with decreased Ifn- γ /Il-17a and increased Il-6/Il-13 intraocular levels. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 7, 2013.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis-a waterborne zoonosis. **Vet Parasitol.** ;126:57–72, 2004.
- 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.** ;139:1375–1424, 2012.
- DUBEY, J.P., LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and neosporidiosis. In: Greene CE, editor. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed. St Louis: **Saunders Elsevier**;p. 754-768, 2006.
- DUBEY, J.P., RAJENDRAN, C., COSTA, D.G., FERREIRA, L.R., KWOK, O.C., ET AL. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **J Parasitol** 96: 709–712. 2010.
- DUBEY, J.P., HILL, D.E., JONES, J.L., HIGHTOWER, A.W., KIRKLAND, E., ROBERTS, J.M., MARCET, P.L., LEHMANN, T., VIANNA, M.C., MISKA, K., SREEKUMAR, C., KWOK, O.C., SHEN, S.K., GAMBLE, H.R. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 1082-1093, 2005.

- DUBEY, J.P., NAVARRO, I.T., GRAHAM, D.H., DAHL, E., FREIRE, R.L., PRUDENCIO, L.B., SREEKUMAR, C., VIANNA, M.C., LEHMANN, T.. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Parana, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 229-234, 2003.
- DUBEY, J.P., ROLLOR, E.A., SMITH, K., KWOK, O.C., THULLIEZ, P.. Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 839-841, 1997.
- DUBEY, J.P., THULLIEZ, P., ROMAND, S., KWOK, O.C., SHEN, S.K., GAMBLE, H.R. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for food in North America. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 235-238, 1999.
- DUBEY, J.P., NAVARRO, I.T., SREEKUMAR, C., DAHL, E., FREIRE, R.L., KAWABATA, H.H., VIANNA, M.C., KWOK, O.C., 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 **The Journal of Parasitology** v. 90, n. 4, 2004.
- DUBEY, J.P., GENNARI, S.M., LABRUNA, M.B., CAMARGO, L.M., VIANNA, M.C., MARCET, P.L., LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 92, p. 36-40, 2006
- DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, V. 74, n. 1, p. 75-77, 1998c.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998a.
- DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 44, p. 592-602, 1997.
- DUBEY, J. P. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and preagnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 13, p. 199-211, 1983.
- DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 410-415, 1995.
- DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* - the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 862-865. 1998b.
- DUBEY, J. P. et al. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Review**. v. 11, p. 67-69, 1998b.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2 Ed. **Boca Raton: CRC Press**, 2010.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. *Toxoplasmosis of animals and man*. **CRC Press**, Boca Raton, Florida. 220 p. 1988.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 350-379, 1974.

DUBEY, J. P.; HOOVER, E. A.; WALL, K. W.. Effects of age and sex on the acquisition of toxoplasmosis. **Journal of Protozoology**, V. 21. P. 184-186, 1977.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257- 1278, 2008.

DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 190-195, 2009.

DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L., Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 203, 1546–1549. 1993

DUBEY, J.P., RUFF, M.D., CAMARGO, M.E., SHEN, S.K., WILKINS, G.L., KWOK, O.C., THULLIEZ, P. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 1668-1672, 1993.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cyst. **Clinical Microbiological Review**, v.11, n. 2, p.267-299, 1998.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.

EARL, D.A., VONHOLDT, B.M .STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conserv Genet Resour** 4:359–361. 2012.

EVANNO, G., REGNAUT, S., GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology** 14: 2611–2620. 2005.

FAYER, R. Toxoplasmosis update and public health implications. **Canadian Veterinary Journal**, v. 22, p. 344-352, 1981.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E., SUNDAR, N., DUBEY, J.P., GRIGG, M.E., DE OLIVEIRA, F.C.R. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Vet Parasitol* 175(1-2): 33-39 2011;.

FALUSH, D., STEPHENS, M., PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567–1587. 2003.

FALUSH, D., STEPHENS, M. PRITCHARD, J.K . Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574–578. 2007.

GALAL , L. , HAMIDOVIĆ, A. , DARDÉ , M.L. MERCIER ,M. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. *Food and Waterborne Parasitology*. V. 12, 2019.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. *Microsatellites: Evolution and Applications*. New York: Oxford University Press, 368 p., 1999. GENBANK ACCESSION U87145.2

GOUDET, J . FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485–486. 1995.

GOUDET ,J. FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3, updated from Goudet 1995. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. 2001

GRIGG, M.E., GANATRA, J., BOOTHROYD, J.C., MARGOLIS, T.P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *Journal of Infection Disease*, v.184, p.633–639, 2001.

GRIGG, M. E., BOOTHROYD, J. C. Rapid identification of virulent typ I strains of the protozoan pathogen *T. gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. *Journal of clinical Microbiology*, v. 39, p. 398-400, 2001.

HERRMANN, D.C., PANTCHEV, N., VRHOVEC, M.G., BARUTZKI, D., WILKING, H., ET AL. Atypical *Toxoplasma gondii* genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany. *Int J Parasitol* 40: 285–292, 2010.

HOMAN, W.L., VERCAMMEN, M., DE BRAEKELEER, J., VERSCHUEREN, H.. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal of Parasitology*, v. 30, p. 69-75, 2000.

HOWE, D.K., SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease, *J Infect Dis.* , 172(6), pp. 1561-6. 1995

HOHENLOHE ,P., BRIAN. K. HAND, KIMBERLY R. ANDREWS, AND GORDON, L.. Population Genomics Provides Key Insights in Ecology and Evolution. *Nature*, 2018

JAMR, L. M. F., SOGOR, F. B. S. GUIMARÃES, E. C. Reinfecção pelo *Toxoplasma gondii* nicolle & manceaux, 1909 em camundongos e gatos. estudo experimental.

Revista Inst. Med. trop. são paulo 27(6) 318-327, 1985

KHAN, A., DUBEY, J.P., SU, C., SIBLEY, L.D., AJIOKA, J.W., Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America.

Int J Parasitol 41: 645–655,2011.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A.L.; RIZZO, L.V.; BELFORT R JR.; VITOR, R.W.A.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L.D. Genetic Divergence of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Ocular Toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 12, n. 6, 2006.

KHAN, A, TAYLOR, S., SU, C., MACKAY, A.J., BOYLE ,J., COLE, R., GLOVER,D., TANG, K., PAULSEN, I.T., BERRIMAN, M., BOOTHROYD, J.C., PFEFFERKORN, E.R., DUBEY, J.P., AJIOKA, J.W., ROOS, D.S., WOOTTON, J.C., SIBLEY, L.D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 2980-2992, 2005.

KHAN, A., B. FUX, C. SU, J. P. DUBEY, M. L. DARDE´, J. W. AJIOKA, B. M ROSENTHAL, AND L. D. SIBLEY. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**104:14872–14877,2007.

KALINOWSKI, S.T . HP-RARE 1.0: a computer program for perform infrared factionon measures of allelic richness. **Molecular Ecology Notes** 5: 187–189. 2005.

LANGONI, H. Doenças ocupacionais em avicultura. In: ANDREATTI FILHO, R. L.Saúde aviária e doenças. São Paulo: **Roca**, p. 52-60, 2006.

LAPPIN, M.R., GEORGE, J.W., PEDERSEN, N.C., BARLOUGH, J.E., MURPHY ,C.J., MORSE, L.S.. Primary and secondary *Toxoplasma gondii* infection in normal and feline immunodeficiency virus-infected cats. **Journal for Parasitology**, v. 82, p.733-742, 1996.

LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T. BEILES, A.; NEVO. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, n. 11, p. 2453-2465, 2002.

LORENZI, H., , KHAN, A., BEHNKE, M.S. , NAMASIVAYAM, S., HADJITHOMAS L.S. S. M.,W, KARAMYCHEVA, S., PINNEY, D., BRUNK, B. P. , AJIOKA, J. W. , AJZENBERG ,D., BOOTHROYD, J. C. , BOYLE , J. P. , DARDE ,M. L. ´ DIAZ-MIRANDA , M. A. , DUBEY ,J. P. , FRITZ, H. M. , GENNARI ,S. M. , GREGORY, B.D. , KIM ,K., SAEIJ ,J. E. P.J. , SU, C. , WHITE, M. W. , ZHU, X. , HOWE, D.K. , ROSENTHAL, B. M. , GRIGG M.E. , PARKINSON, J. , LIU, L., KISSINGER, J. C. , ROOS. D. S., L. SIBLEY, D., Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis eteterminants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes . **Nature communications** .2016

MACIEL, B.M. MOURA, R.L.S, CARVALHO, F.S, COSTA, E.A., ALBUQUERQUE, G.R. . Identification and genetic characterization of a new Brazilian genotype of *Toxoplasma gondii* from sheep intended for human consumption. **Parasitology International** .63 567–570,2014 .

NAZARENO, A. G., BEMMELS J. B., ET AL. minimum sample size for population genomics an empirical study from Amazonian plant specie. *MSL ECOL RESOUR*,17, 1136-47, 2017

NEVES, D. P. Parasitologia Dinâmica. Capítulo 25. pag. 177, 188. Sao Paulo: **Editora Atheneu**, 2003.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L., Sur un protozoaire nouveau du gondii. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris**, v. 148, p. 369-372, 1909.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L., Sur une infection à corps de Leishman (ou organism voisins) du gondi. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris.**, v. 147, p. 736-766, 1908.

OLIVEIRA, E.J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v.29, n.2, p.294-307, 2006

PINTO, L.D. ARAUJO, F. A. P. STOBBS, N. S. MARQUES, S.M. T. Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clínicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil, *Ciência Rural*, Santa Maria, Online ,2009

PENA, H.F., 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.

PENA, H.F.; EVANGELISTA, C.; CASAGRANDE, R. A.; BIEZUS, G.; WISSER, C. S. ; FERIAN, P. E. ; MOURA ,A. B.; ROLIM, V. M.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA ,S .; ALVES, B. F.; GENNARI ,S .M. . ; TRAVERSO, S. D. Fatal toxoplasmosis in an immunosuppressed domestic cat from Brazil caused by *Toxoplasma gondii* clonal type I **Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 177-184, apr.-june 2017

PENA, H; SOARES, A.R; AMAKUA, M; DUBEY, J.P. GENNARI,S. *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** 81. 58–67, 2006.

PENA, H. F. J. , FERRARI, V. M.S , AIRES, L.P. N. , SOARES, H. S., OLIVEIRA, S., ALVES, B. F. , GENNARI ,S. M. , DUBEY J. P. , MATTOS, L. C. , MATTOS, C. C´.B. , CASTIGLIONI ,L., First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in a free-living giant anteater (*myrmecophaga tridactyla*) revealed a unique non-archetypal genotype, **Acta Tropica** (2020)

- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155: 945–959. 2000.
- PETERSEN, E., DUBEY, J.P.. Biology of toxoplasmosis. In DHM Joynson, TG Wreghitt (eds.), *Toxoplasmosis*, **Cambridge University Press**, Cambridge, p. 1-42,2001.
- PEAKALL, R., SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** 6:288–295. 2006.
- PIRY, S., LUIKART, G., CORNUET, J.M . BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity** 90: 502–503. 1999.
- RICO-TORRES, C.P., DEL VIENTO-CAMACHO, A., CABALLERO-ORTEGA, H., BESNÉ-MÉRIDA, A., LUNA-PASTÉN, H., CORREA, D., PALMA-GARCÍA, J.M., First isolation of *Toxoplasma gondii* from cats of Colima, Mexico: Tissue distribution and genetic characterization. *Vet. Parasitol.* 209, 125–128. 2015.
- RICO-TORRES, C.P., VALENZUELA-MORENO, L.F., LUNA-PASTÉN, H., FIGUEROA-DAMIÁN, R., GÓMEZ-TOSCANO, V., HERNÁNDEZ-DELGADO, L., ESCOBEDO-TORRES, M.P., CORREA, D., High heterogeneity, mixed infections and new genotypes in human congenital toxoplasmosis cases in the mega- metropolis of Central Mexico. **Acta Trop.** 178, 124–129, 2018
- 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. **Int. J. Parasitol.** Parasites Wildl. 3, 276–283. 2014.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev.**;25(2):264-96. 2012
- ROCHA, D.S.; NILSSON, M.G; MACIEL, B.M.; PENA, H.F.J., ALVES, B.F., SILVA, A.V., GONDIM, L.F.P., ALBUQUERQUE, G.R. Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* Isolates From Free-Range Chickens In Bahia, Brazil. **J Parasitol.** ;104(4):377-382. 2018
- RUDZINSKI, M., KHOURY, M., COUTO, C., AJZENBERG, D., Reactivation of ocular toxoplasmosis in non-Hispanic persons, Misiones Province, Argentina. **Emerg. Infect. Dis.** 22, 912–913, 2016.
- SHWAB, E.K. X.Q. ZHU, D. MAJUMDAR, H.F.J. PENA, S.M. GENNARI, J.P. DUBEY, C. SUGeographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, 141 , pp. 453-461, 2014

SAEIJ, J.P., COLLER, S., BOYLE, J.P., JEROME, M.E., WHITE, M.W., AND BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of apolymorphic kinase homologue. **Nature** 445, 324–327. 2007

SARAF, P., SHWAB, K., DUBEY, J. P., SU, C., A. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. **Experimental Parasitology** 174 25 e 30, 2017.

SELKOE, K.A. E TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, 9: 615–629, 2006.

SHWAB, E. K.; JIANG, T.; PENA, H. F.; GENNARI, S. M., DUBEY, J. P., AND 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** 46: 141–146. 2016

SIBLEY, L.D., KHAN, A., AJIOKA, J.W., ROSENTHAL, B.M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 364: 2749–2761, 2009.

SILVA, J.R., MACIEL, B. M., SANTOS, K. N. S. S, CARVALHO, F. S., ROCHA D. S., LOPES, C. W. G., ALBUQUERQUE, G. R. Isolation and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Brazilian Dogs **Korean J Parasitol** Vol. 55, No. 3: 239-246, 2017.

SILVA, J.C.R., FERREIRA, F., DIAS, R.A., AJZENBERG, D., MARVULO, M.F.V., MAGALHÃES, F.J.R., LIMA FILHO, C.D.F., Cat-rodent *Toxoplasma gondii* Type II variant circulation and limited genetic diversity on the Island of Fernando de Noronha, Brazil, **Parasites & Vectors**, 10:220, 2017.

SILVA, L.A., ANDRADE, R.O., CARNEIRO, A.C., VITOR, R.W. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in southeastern Brazil. **PLoS One**. ;9:1–7. 2014

SINGH, B., Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 1135-1145, 1997.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoo parassita de' conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala - azar dell'uomo. Nota preliminare per, **Revista Social Ciência e Medicina**, v. 03, p. 109, 1908.

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

SU, C., SHWAB, E.K, ZHOU, P., ZHU, X.Q, DUBEY, J.P. Moving towards an integrated approach to Molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, p. 1-11, 2010.

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

SU, C., KHAN, A., ZHOU, P., MAJUMDAR, D., AJZENBERG, D., DARDÉ, M.L., ZHU, X.Q., AJIOKA, J.W., ROSENTHAL, B.M., DUBEY, J.P., SIBLEY, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proc Natl Acad Sci USA.** ;109:5844–5849, 2012.

SU, X; WELLEMS, T. E.Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map, polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. **Genomics.** v.33, p. 430-444. 1996.

SUZUKI, Y. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. **J.Infect.Dis.**, 186Suppl 2; p.234-40, dec, 2002.

TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. **Adv Parasitol** 36: 47-115. 1995

VALADARES, H.M., PIMENTA, J.R., DE FREITAS, J.M., DUFFY, T., BARTHOLOMEU, D.C., OLIVEIRA, R.D.E. P., CHIARI, E., MOREIRA, M.D.AC., FILHO, G.B., SCHIJMAN, A.G., FRANCO, G.R., MACHADO, C.R., PENA, S.D., MACEDO, A.M. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in human and animal infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 7, p. 839-850, 2008.

VAN, OOSTERHOUT. C., HUTCHINSON, W.F., WILLS, D.P.M., SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes** 4: 535–538. 2004.

VALENZUELA-MORENO, L.F., RICO-TORRES, C.P, CEDILLO-PELÁEZ, C. A, LUNA-PASTÉN, H., MÉNDEZ-CRUZ, S.T. , REYES-GARCÍA, M.E , CORREA, D, ALVES ,B. F., PENA, H. F. J. CABALLERO-ORTEGA, H. Stray dogs in the tropical state of Chiapas, Mexico, harbour atypical and novel genotypes of *Toxoplasma gondii* **International Journal for Parasitology** 50 () 85–90,2020.

WANG, L., CHEN, H., LIU, D., HUO, X., GAO, J., ET AL. Genotypes and Mouse Virulence of *Toxoplasma gondii* Isolates from Animals and Humans in China. **PLoSOne** 8: e53483, 2013.

WEIR. B.S., COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38: 1358–1370. 1984.

Anexo A

Protocolo de Digestão Péptica segundo Dubey (1998c)

- Os órgãos serão triturados juntamente com um volume mínimo de PBS.
- De cada homogeneizado será retirado 40g, colocados em *Erlenmeyer* e, a este, adicionada solução de pepsina ácida até completar o volume de 200ml.
- Cada *Erlenmeyer*, contendo o material de cada amostra a ser digerida, será colocado em uma incubadora *shaker* e mantido à temperatura de 37°C por uma hora.
- Decorrido este tempo, cada amostra digerida será passada em tamis com gaze dupla e o filtrado de cada uma destas será então centrifugado a 1200g por 10 minutos.
- Após a centrifugação o sobrenadante será descartado e ao material restante adicionar-se-á solução neutralizadora de bicarbonato de sódio até completaro volume de 50ml.
- Novamente o material será centrifugado a 3400rpm por 20 minutos e o sobrenadante descartado.
- Por fim, a cada uma das amostras será adicionado de 5 a 10 ml de solução antibiótica, contendo 1000UI de penicilina G potássica e 100mg de estreptomicina por ml de solução.
- O produto esta pronto para inoculação.

Anexo B

Protocolo de extração de DNA com kit comercial Easy-DNA® (Invitrogen)

1. Obtenha 100 mg de tecido;
2. Adicione 350 μ L da solução A para uma suspensão de tecidos e vortequise (agite) em intervalos de 1 segundo até espalhar de maneira uniforme;
3. Incube a 65 °C por 10 minutos;
4. Adicione 150 μ L da Solução B e vortequise (agite) vigorosamente até que o precipitado se mova livremente no tubo, sendo a amostra uniformemente viscosa (1 minuto);
5. Adicione 500 μ L de clorofórmio e vórtice até que a viscosidade diminua e a mistura fique homogênea (1 minuto);
6. Centrifugue a velocidade máxima de 10 minutos a 4°C para separar as fases. Transfira a fase superior para um tubo de microcentrífuga novo;
7. Para a solução de DNA, adicione 1 mL de etanol a 100% (-20°C) e vortequise (agite) brevemente;
8. Incube o tubo em gelo (freezer) por 30 minutos;
9. Centrifugue a velocidade máxima por 10 minutos a 4 °C. Remova o etanol do peleti com uma pipeta;
10. Adicione 500 μ L de etanol 80% (-20 °C) e misture invertendo o tubo 3-5 vezes;
11. Centrifugue a velocidade máxima por 5 minutos a 4°C. Salve o peleti e remova o etanol 80% com uma pipeta;
12. Centrifugue a velocidade máxima por 3 minutos a 4°C. Remova o etanol residual com um pipetador. Deixe secar por 5 minutos;
13. Ressuspenda o peleti em 100 μ L tampão TE. Adicione 2 μ L de RNAase 2 mg/mL para trazer a concentração para 40 μ g/mL;
14. Incube a 37 °C por 30 minutos e congele.

Anexo C

Teste de Hemaglutinação Indireta

Protocolo utilizando o kit comercial (Imuno-HAI Toxoplasmose Wana Diagnóstica®)

1. Diluir o soro em solução diluidora do kit em uma microplaca de fundo em “U”-1:64;
2. Transferir 25µL do soro diluído para a microplaca de fundo em “V”;
3. Colocar 25µL dos controles positivos e negativos, em poços distintos na placa em “V”;
4. Adicionar 25µL solução de hemácia contendo o antígeno de *T. gondii*. Em todos os poços, incluindo os controles;
5. Agitar a microplaca por 2-3 minutos e colocar em repouso sobre um pano úmido por 1 hora;
6. A leitura é realizada a olho nu, sendo considerados negativos quando havia formação de botão vermelho/marrom no fundo do poço em “V” e positivos quando havia formação de uma malha/tapete vermelho/marrom no poço.