

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DE CISTOS TECIDUAIS E  
ESPOROCISTOS DE *Toxoplasma gondii* PELO ANTICORPO  
MONOCLONAL K8/15-15 E CARACTERIZAÇÃO DE SUA PROTEÍNA  
ALVO POR WESTERN BLOT E IMUNOBLLOT**

**MARIANA MARREGA REZENDE GONDIM**

Salvador - BA

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DE CISTOS TECIDUAIS  
E ESPOROCISTOS DE *Toxoplasma gondii* PELO ANTICORPO  
MONOCLONAL K8/15-15 E CARACTERIZAÇÃO DE SUA  
PROTEÍNA ALVO POR WESTERN BLOT E IMUNOBLOT**

**MARIANA MARREGA REZENDE GONDIM**

Médica Veterinária

Salvador - BA

2020

**MARIANA MARREGA REZENDE GONDIM**

**SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DE CISTOS  
TECIDUAIS E ESPOROCISTOS DE *Toxoplasma gondii*  
PELO ANTICORPO MONOCLONAL K8/15-15 E  
CARACTERIZAÇÃO DE SUA PROTEÍNA ALVO POR  
WESTERN BLOT E IMUNOBLOT**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva

Salvador - BA

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Marrega Rezende Gondim, Mariana

Separação imunomagnética de cistos teciduais e esporocistos de *Toxoplasma gondii* pelo anticorpo monoclonal K8/15-15 e caracterização de sua proteína alvo por western blot e imunoblot / Mariana Marrega Rezende Gondim. -- Salvador, 2020.

98 f.

Orientador: Aristeu Vieira da Silva.

Tese (Doutorado - Ciência Animal nos Trópicos) -- Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2020.

1. parasitologia. 2. proteômica. 3. coccídeos. I. Vieira da Silva, Aristeu. II. Título.

**Separação imunomagnética de cistos teciduais e esporocistos de Toxoplasma gondii por meio de um único anticorpo monoclonal e caracterização de sua proteína alvo por Western blot e imunoblot**

**Mariana Marrega Rezende Gondim**

**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal nos Trópicos.**

**Salvador, em 27 de fevereiro de 2020**

**Comissão Examinadora:**



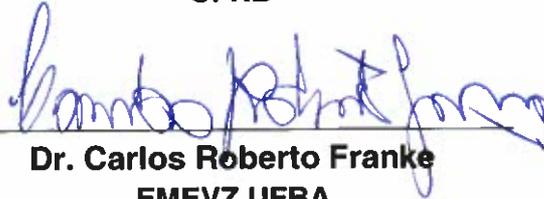
**Dr.ª Flaviane Alves de Pinho**

**UFBA**



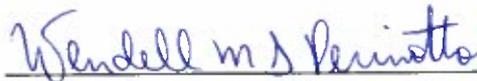
**Dr. Marcelo Biondaro Góis**

**UFRB**



**Dr. Carlos Roberto Franke**

**EMEVZ UFBA**



**Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto**

**UFRB**



**Dr. Aristeu Vieira da Silva**

**Orientador**

**UEFS**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

MARIANA MARREGA REZENDE GONDIM – Nascida em 10 de agosto de 1989 na cidade de Cruzeiro do Oeste, Paraná. Formada em Medicina Veterinária em 2012 pela Universidade Estadual de Maringá, onde foi monitora de Parasitologia e Doenças Parasitárias, além de participar de Projetos de Pesquisa nessa área durante o curso. Mestre em Ciência Animal nos Trópicos pela Universidade Federal da Bahia e aceita como pesquisadora visitante durante um ano no Instituto Federal Frederich Loeffler, na Alemanha. Possui experiência na área de Parasitologia, com ênfase em protozoários coccídeos. Atualmente possui quatro artigos e doze resumos publicados em anais de congresso.

## RESUMO

REZENDE-GONDIM, M. M. **Separação imunomagnética de cistos teciduais e esporocistos de *Toxoplasma gondii* pelo anticorpo monoclonal K9/15-15 e caracterização de sua proteína alvo por Western blot e Imunoblot.** 2020.110p. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia, 2020.

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório que infecta aproximadamente um terço da população mundial. A infecção horizontal do parasito ocorre, principalmente, pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos e/ou ingestão de oocistos esporulados. Assim, objetivou-se com o trabalho corrente, elaborar um protocolo de separação imunomagnética (SI) de cistos e esporocistos de *T. gondii*, e isolar a proteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal (AcMo) K8/15-15. Esse foi o primeiro AcMo descrito capaz de reconhecer simultaneamente proteínas de cistos e esporocistos do parasito. Mais de 2.000 cistos produzidos *in vitro* foram isolados após a SI do conteúdo de um frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, além de um aumento em até seis vezes da relação cisto/célula hospedeira após SI. Cistos produzidos *in vivo* foram separados com êxito, sem contaminação ou *debris* de tecido murino. Esporocistos também foram isolados por SI, mostrando, assim, que o método pode ser empregado para estudos proteômicos envolvendo paredes de cisto tecidual e esporocisto de *T. gondii*. Por meio da técnica de SI foi possível concentrar uma grande quantidade de cistos e, após imunoprecipitação, isolar o antígeno alvo marcado pelo AcMo K8/15-15. O antígeno foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e apresentou bandas de 272 e 381 kDa, identificadas por *imunoblot* e visualizadas em SDS-PAGE corado com azul de Comassie. Os resultados aqui obtidos possibilitarão, em experimentos futuros, a completa caracterização da proteína alvo do AcMo K8/15-15, empregando-se, especialmente, sequenciamento por espectrometria de massas da proteína alvo. A proteína purificada pode ser testada em estudos envolvendo diagnóstico sorológico, assim como, para a produção de vacinas contra toxoplasmose.

**Palavras-chave:** parasito, proteômica, antígeno

## ABSTRACT

REZENDE-GONDIM, M. M. **Immunomagnetic separation of tissue cysts and sporocysts of *Toxoplasma gondii* using a single monoclonal antibody and characterization of its target protein by Western blot e IMUNOBLOT.** 2020. 110p. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia, 2019.

*Toxoplasma gondii* is an obligatory intracellular parasite that infects about one third of the human population. Horizontal transmission of *T. gondii* occurs more often by ingestion of tissue cysts containing bradyzoites and/or ingestion of sporulated oocysts. The current study aimed to develop a protocol of immunomagnetic separation (IMS) directed to *T. gondii* tissue cysts and sporocysts, and to isolate the protein recognized by the monoclonal antibody (mAb) K8/15-15. This was the first described mAb that is able to simultaneously recognize proteins in tissue cyst and sporocyst walls of the parasite. Using IMS, more than 2,000 *in vitro* produced tissue cysts were isolated from a single culture flask of 25 cm<sup>2</sup>. Moreover, the ratio of tissue cyst/host cell was increased six times by IMS. *In vivo* generated cysts were successfully separated from murine cells, with no contamination by cell debris or mouse cells. Sporocysts were also separated by IMS, showing that this method may be employed for proteomic studies involving tissue cyst and sporocyst walls of *T. gondii*. Using IMS, a great amount of tissue cysts was concentrated from cell culture, and after immunoprecipitation, the target antigen was separated by polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The antigen was processed by Western blot, and bands of 272 and 381 kDa were labeled by *IMUNOBLOT*. The same bands were observed in a separate SDS-PAGE stained by Coomassie blue. The results obtained here will favor the conduction of further experiments to fully characterize the target protein of the mAb K8/15-15, in particular, by sequencing the isolated protein by mass spectrometry. The purified protein may be tested in serological studies, as well as in vaccines to prevent toxoplasmosis.

**Keywords:** parasite, proteomics, antigen

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µl	Microlitro
AcMo	Anticorpo monoclonal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HD	Hospedeiro definitivo
HI	Hospedeiro intermediário
IFI	Imunofluorescência indireta
<i>g</i>	Unidade de aceleração da gravidade
kDa	QuiloDaltons
mA	Miliampere
ml	Mililitros
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão salino fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Pós-infecção
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SI	Separação imunomagnética
SM	Suporte magnético
TI	Tampão de isolamento
V	Voltagem
W	Watt
WB	Western blot

## LISTA DE FIGURAS

Página

### REVISÃO DE LITERATURA GERAL

Figura 1 Oocistos de *Toxoplasma gondii* ..... 19

Figura 2 Desenhos esquemáticos de taquizoíto, à esquerda, e bradizoíto, à direita ..... 21

### CAPÍTULO 1

#### SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DE CISTOS E ESPOROCISTOS DE *Toxoplasma gondii* UTILIZANDO ANTICORPO MONOCLONAL K8/15-15

Figura 1 Esporocistos de *Toxoplasma gondii* ligados às esferas magnéticas contendo AcMo K8/15-15. (A) Duas esferas magnéticas ligadas a um esporocisto intacto. (B) Autofluorescência do esporocisto intacto sob excitação ultravioleta. (C) Esporocisto de *T. gondii* rompido mecanicamente sem esporozoítos no interior. (D) Autofluorescência da parede do esporocisto sob excitação ultravioleta. Barras = 10µm.....49

Figura 2 Cisto de *Toxoplasma gondii* ligado a esferas magnéticas acopladas ao AcMo K8/15-15. (A) As esferas cobrem a maior parte da superfície do cisto. (B) O mesmo cisto mostrado em A foi rompido mecanicamente, pressionando-se a lamínula contra a lâmina de vidro; note que algumas esferas desligaram-se das paredes do cisto e numerosos bradizoítos (seta preta) foram liberados do cisto.....50

Figura 3 Cisto de *Hammondia heydorni* produzido em cultura celular e capturado por esferas magnéticas acopladas ao AcMo K8/15-15. (A) O cisto capturado observado em campo claro. (B) Imunofluorescência utilizando-se o AcMo K8/15-15 e marcação em cor vermelha na parede cística do parasito.....51

- Figura 4 Cistos de *Toxoplasma gondii* produzidos *in vitro*, capturados por esferas magnéticas acopladas ao anticorpo monoclonal K8/15-15. (A e C) Microscopia de luz (BeD) Imunofluorescência.....51
- Figura 5. Valores mínimos, medianas e valores máximos do número de vezes que a relação cisto/célula foi aumentada após a captura de acordo com os testes. Box seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).....52
- Figura 6. Frequências relativas de células não infectadas capturadas após o protocolo em função do teste utilizado. Caixas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).....53

## CAPÍTULO 2

### **CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNA DE *TOXOPLASMA GONDII***

- Figura 1 Cisto de *Toxoplasma gondii* produzido *in vitro* após separação imunomagnética utilizando esferas ligadas covalentemente ao anticorpo monoclonal K8/15-15....67
- Figura 2 Proteínas reconhecidas pelo anticorpo monoclonal K8/15-15 após separação imunomagnética (SI) e imunoprecipitação. M: marcador de peso molecular em kDa (A) Membranas de PVDF após *IMUNOBLOT*, 1: Proteínas de *T. gondii* ; 2: Célula Marc-145 (B) C: Gel contendo antígenos de *T. gondii* corado com azul de Comassie.....68

## SUMÁRIO

### SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DE CISTOS TECIDUAIS E ESPOROCISTOS DE *Toxoplasma gondii* PELO ANTICORPO MONOCLONAL K8/15-15 E CARACTERIZAÇÃO DE SUA PROTEÍNA ALVO POR WESTERN BLOT E IMUNOBLOT

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	17
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
4.1 <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	18
4.1.1 Histórico .....	21
4.1.2 Ciclo de vida e morfologia.....	19
4.1.3 Imunopatogenia.....	22
4.1.4 Diagnóstico.....	24
4.1.4.1 Diagnóstico direto.....	24
4.1.4.2 Diagnóstico indireto.....	25
4.1.5 Tratamento e profilaxia de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	27
4.2 PRODUÇÃO DE CISTO DE <i>TOXOPLASMA GONDII IN VITRO</i> .....	28
4.3 ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	30
4.3.2 Anticorpo K8/15-15 .....	31
4.4 SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA.....	32
4.5 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	33
<b>5 CAPÍTULO 1: SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DE CISTOS E ESPOROCISTOS DE <i>Toxoplasma gondii</i> UTILIZANDO UM ÚNICO ANTICORPO MONOCLONAL</b>	
5.1 RESUMO .....	36
5.2 ABSTRACT.....	37
5.3 INTRODUÇÃO .....	38
5.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	39
5.5 RESULTADOS.....	48

5.6 DISCUSSÃO .....	53
5.7 CONCLUSÕES .....	56
5.8 REFERÊNCIAS.....	56

## **6 CAPÍTULO 2 CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNA DE *TOXOPLASMA GONDII***

6.1 RESUMO .....	60
6.2 ABSTRACT.....	61
6.3 INTRODUÇÃO .....	62
6.4 METODOLOGIA .....	63
6.5 RESULTADO „.....	67
6.6 DISCUSSÃO .....	68
6.7 CONCLUSÃO .....	70
6.8 REFERÊNCIA.....	71
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>73</b>

<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
----------------------------	-----------

ANEXO 1 – Immunomagnetic separation of <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Hammondia</i> spp. tissue cysts generated in cell culture.....	86
---	----

ANEXO 2 - Cytologic detection of <i>Toxoplasma gondii</i> in the cerebrospinal fluid of a dog and <i>in vitro</i> isolation of a unique mouse-virulent recombinant strain.....	95
--	----

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

*Toxoplasma gondii* é um protozoário coccídeo pertencente ao filo Apicomplexa e causador da toxoplasmose, uma zoonose de grande relevância para saúde pública e produção animal (FURTADO *et al.*, 2011). Desordens neurológicas, abortos e outras manifestações da doença podem ser desencadeadas a partir da infecção pelo parasito (TYEBJI *et al.*, 2019). A suscetibilidade da espécie animal, estado imune do hospedeiro e cepa parasitária, são fatores relevantes para definir o curso da infecção, sendo os humanos, ovinos e cangurus (*Macropus fuliginosus melanops*) mais suscetíveis à infecção congênita que outros animais (DUBEY *et al.*, 1988).

Taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (contidos em oocistos) são as formas infectantes de *T. gondii* encontradas em diferentes estágios durante o ciclo de vida do parasito. Os cistos teciduais e os esporocistos englobam os bradizoítos e esporozoítos, respectivamente. Os taquizoítos são encontrados durante a fase aguda da infecção, dentro ou fora das células, entretanto sua multiplicação é obrigatoriamente intracelular (LINDSAY *et al.*, 1991).

A infecção por *T. gondii* é amplamente prevalente em humanos e animais e pode ocorrer pela ingestão de carne malcozida contendo cistos, infecção congênita e ingestão de oocistos esporulados. Os felídeos, hospedeiros definitivos do parasito, são importantes fontes de transmissão de *T. gondii*, pois são os únicos a excretar oocistos no meio ambiente. As infecções clínicas mais graves em humanos ocorrem em crianças infectadas congenitamente, entretanto, o parasito também causa aborto e mortalidade neonatal em ovelhas, cabras e porcos (DUBEY, 1991).

Embora haja diversas pesquisas em andamento envolvendo *T. gondii* e as manifestações clínicas por ele causadas, muitos aspectos do diagnóstico e manejo da doença permanecem obscuros. Acrescenta-se a isso as poucas opções disponíveis para diagnóstico veterinário, que são mais restritas que as disponíveis para o diagnóstico humano, tornando crítica a interpretação precisa de cada resultado (WYROSDICK e SCHAEFER, 2015). As técnicas sorológicas, moleculares e de imagem têm suas próprias vantagens e limitações, contudo, o diagnóstico definitivo da toxoplasmose pode ser alcançado na combinação das técnicas (ROSTAMI *et al.*, 2018).

Cistos teciduais representam o estágio latente da infecção por *T. gondii*, porém, pouco se conhece acerca de seus componentes estruturais. Cistos produzidos *in vivo*, comumente em modelos murinos, podem ser concentrados em gradientes de Percoll<sup>®</sup>.

Contudo, após a purificação, é possível observar certo grau de contaminação por hemácias e debris celulares. Além disso, mesmo após o aprimoramento da técnica, o tempo mínimo para a separação dos cistos é de 2h30 (WATTS *et al.*, 2017). A elaboração de um protocolo de captura de cistos mais eficiente e com menor contaminação celular é extremamente útil, pois além de otimizar o tempo do operador, poderá favorecer estudos em proteômica, uma vez que possibilitará a concentração de cistos do parasito em larga escala.

A separação imunomagnética é uma técnica utilizada para seleção e captura de alvos específicos por meio de esferas magnéticas ligadas à anticorpos monoclonais, DNA ou estreptavidina que interagem com o alvo correspondente. A força magnética aplicada à solução separa os alvos ligados às esferas, permitindo a análise dos mesmos.

Estudos sobre a estrutura e funções da parede cística podem contribuir para a elaboração de novas estratégias terapêuticas para a eliminação e/ou prevenção de *T. gondii*. As proteínas de membrana do cisto são alvos importantes para estudos das funções bioquímicas e imunológicas desse estágio (ZHANG *et al.*, 2010). Atualmente, não há drogas que tenham como alvo cistos do parasito em hospedeiros cronicamente infectados (RUAN *et al.*, 2015).

Recentemente, pela primeira vez, foi descrito um anticorpo monoclonal (K8/15-15) capaz de reconhecer antígeno em cistos e esporocistos de *T. gondii* (GONDIM *et al.*, 2016). Identificar o antígeno reconhecido pelo AcMo K8/15-15 pode favorecer a elaboração de outras tecnologias, como métodos diagnósticos para a detecção de cistos em alimentos cárneos e novos testes sorológicos estágio-específicos. Por isso, objetivou-se com esse trabalho, elaborar um protocolo de captura de cistos de *T. gondii* utilizando esferas magnéticas revestidas com o AcMo K8/15-15, e caracterizar o antígeno reconhecido pelo AcMo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver uma técnica de separação imunomagnética de cistos e esporocistos de *T. gondii* e isolar a proteína identificada pelo anticorpo monoclonal K8/15-15.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Elaborar uma técnica de SI capaz de separar: cistos teciduais produzidos *in vivo*, cistos teciduais produzidos *in vitro* e esporocistos oriundo de oocistos esporulados;
- b. Avaliar, dentre quatro possibilidades de técnicas de SI (método direto e indireto, cada um em duas temperaturas diferentes), qual é a mais eficaz;
- c. Avaliar a compatibilidade do AcMo K8/15-15 com o kit de imunoprecipitação utilizando esferas de agarose para separar a proteína reconhecida pelo AcMo;
- d. Isolar a proteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal K8/15-15 em gel de poliacrilamida.

### **3. HIPÓTESE**

- a. Dada à capacidade do anticorpo monoclonal K8/15-15 em marcar toda a extensão da parede cística de *T. gondii*, seu emprego em um protocolo de captura imunomagnética deve permitir a separação e concentração de cistos do parasito.
  
- b. A proteína reconhecida pelo AcMo deve ser visualizada em gel de poliacrilamida após a concentração dos cistos por SI e imunoprecipitação

## 4. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

### 4.1 *TOXOPLASMA GONDII*

#### 4.1.1 Histórico

O protozoário *Toxoplasma gondii* foi descrito em 1908 por dois grupos de pesquisadores, um na Tunísia (NICOLLE e MANCEAUX, 1908) e outro no Brasil (SPLENDORE, 1908). Ambos identificaram erroneamente o parasito como *Leishmania* sp., contudo, no ano seguinte, Nicolle e Manceaux nomearam o parasito baseados na morfologia do taquizoítio (*tox*= arco; *plasma*= vida) e no roedor no qual foi encontrado *Ctenodactylus gundi* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909).

O isolamento do parasito em laboratório foi relatado pela primeira vez por Sabin e Olitsky em 1937. Nesse mesmo artigo, os autores descrevem as lesões observadas após diferentes vias de inoculação em camundongos, coelhos, porcos da Índia e macacos *rhesus* (SABIN e OLITSKY, 1937). A primeira infecção experimental em animais, utilizando tecido de humanos naturalmente infectados por *T. gondii*, foi descrita em 1939 por Wolf e colaboradores. A partir de então, ficou conhecida a capacidade zoonótica do parasito (WOLF *et al.*, 1939).

Em 1957, Hartley e Marshall isolaram *T. gondii* de feto ovino durante uma epidemia de abortos na Nova Zelândia (HARTLEY, 1966). Anos antes, Sabin e Feldman descreveram o primeiro teste diagnóstico sorológico específico para *T. gondii*, conhecido também como prova do corante ou “dye test” (SABIN e FELDMAN, 1948). A existência de hospedeiro definitivo no ciclo de *T. gondii* foi comprovada por Frenkel e colaboradores em 1970 (FRENKEL *et al.*, 1970). O primeiro isolamento em animal marinho foi descrito em 2000 por Cole e colaboradores.

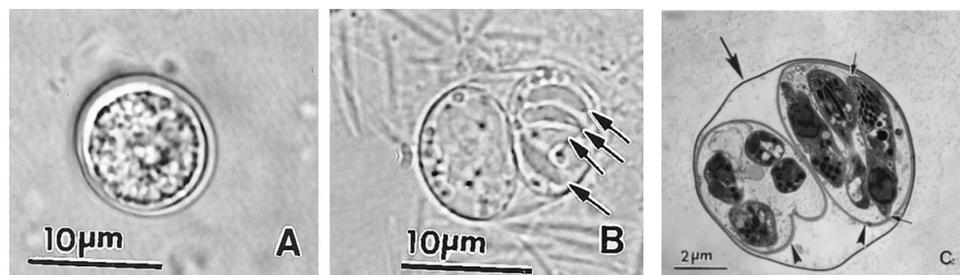
A partir de 1980, estudos sobre genética e diferenciação de cepas começaram a ser publicados. Nove anos depois foi desenvolvida a primeira PCR, possibilitando a identificação do material genético do parasito (BURG *et al.*, 1989). Os medicamentos utilizados em infecções agudas foram testados entre 1942 e 1974, já o estabelecimento de medidas preventivas entre 1973 até 1995 (DUBEY, 2008).

O maior surto de toxoplasmose no Brasil em humanos foi registrado em 2001 em Santa Isabel do Ivaí, onde 294 pessoas foram soropositivas e 155 reportaram sintomatologias relacionadas à doença (MOURA *et al.*, 2006).

#### 4.1.2 Ciclo de vida e morfologia

Durante o ciclo de vida de *T. gondii*, três formas infectantes podem ser observadas - esporozoítos, taquizoítos e bradizoítos - em diferentes estágios do ciclo. Os esporozoítos são encontrados em oocistos esporulados (Figura 1A). Cada oocisto esporulado contém dois esporocistos (Figura 1B) e oito esporozoítos (SHEFFIELD e MELTON, 1968). Os oocistos apresentam forma esférica, medindo aproximadamente 13 µm de diâmetro (DUBEY *et al.*, 1998). Os felídeos, hospedeiros definitivos (HD) do parasito, são os únicos a excretarem oocistos em suas fezes (TENTER *et al.*, 2000). A excreção pelo HD dá-se na forma não esporulada após a ingestão do parasito. A esporulação depende da aeração, umidade e temperatura do ambiente, sendo que o felino, após cinco dias de excreção de oocistos, a quantidade eliminada nas fezes pode chegar a 20 milhões por dia (DUBEY, 2001). A origem dos oocistos dá-se na fase sexuada do parasito no intestino dos HD (SPEER e DUBEY, 2005).

**Figura 1.** Oocistos de *Toxoplasma gondii*. (A) Oocisto não esporulado contendo massa única citoplasmática em seu interior. (B) Oocisto esporulado contendo dois esporocistos e quatro esporozoítos visíveis em um dos esporocistos (setas). (C) Microscopia eletrônica de transmissão de um oocisto esporulado. Parede do oocisto (seta grande), dois esporocistos (pontas de seta), e esporozoítos, um destes seccionado longitudinalmente (setas pequenas).



Fonte: DUBEY *et al.*, 1998.

Durante o ciclo, após a ingestão de oocistos esporulados, os esporozoítos são liberados no trato gastrointestinal e penetram o epitélio transformando-se em taquizoítos. Esses, por sua vez, disseminam-se pelos tecidos e podem atravessar barreiras biológicas como a placenta e a barreira hematoencefálica (BARRAGAN e SIBLEY, 2002). Os taquizoítos adentram as células hospedeiras através da membrana

celular (25-40s) ou por fagocitose (2-4 min), podendo romper as células após massiva replicação, destruindo assim os tecidos (MORISAKI *et al.*, 1995). A velocidade de multiplicação dos taquizoítos depende do tipo de célula infectada, temperatura corpórea do hospedeiro e cepa infectante (KAUFMAN e MALONEY, 1962; APPLEFORD e SMITH, 1997; REZENDE-GONDIM *et al.*, 2017).

O termo taquizoíto (*taqui*= rápido, *zoíto*=vida) foi proposto em 1973 por Frenkel devido à velocidade de multiplicação observada nesse estágio, que se multiplica obrigatoriamente dentro das células dos hospedeiros de forma assexuada por endodiogenia, em que dois taquizoítos são formados dentro do taquizoíto progenitor (SHEFFIELD e MELTON, 1968). Os taquizoítos (Figura 2) apresentam a parte anterior em forma de cone, a parte posterior arredondada e medem aproximadamente 2µm de diâmetro por 6µm de comprimento (DUBEY *et al.*, 1998).

Estudos realizados em camundongos mostraram que, após a ingestão dos oocistos, os esporozoítos se convertem em taquizoítos na lâmina própria do intestino 12 a 18h pós-infecção (p.i). Os taquizoítos podem ser encontrados em vários órgãos extra intestinais 3 dias p.i e os bradizoítos, forma infectante que se multiplica lentamente dentro de cistos teciduais, podem ser encontrados em órgãos extra intestinais 6-7 dias p.i (DUBEY, 1997a).

Os taquizoítos podem transformar-se em bradizoítos e vice-versa, a depender de vários fatores, entre eles: característica cistogênica da cepa, tipo de célula infectada, hospedeiro infectado, estresse exógeno (alteração do pH, temperatura) e resposta imune do hospedeiro (SOETE *et al.*, 1994; WEISS *et al.*, 1998; SKARIAH *et al.*, 2010; PAREDES-SANTOS *et al.*, 2013). Hospedeiros imunocompetentes eliminam a maioria dos taquizoítos, contudo, em alguns locais, os taquizoítos se convertem em bradizoítos formando cistos teciduais, na maioria das vezes no sistema nervoso central e tecido muscular, incluindo o coração (SKARIAH *et al.*, 2010).

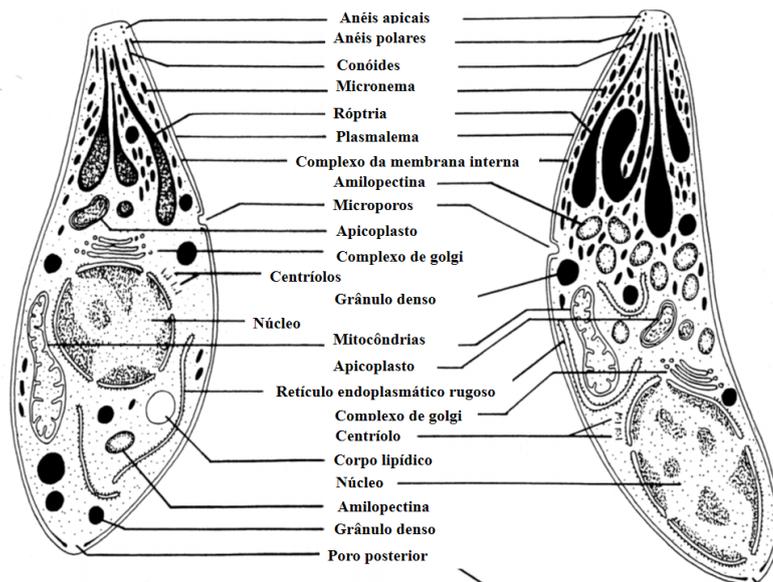
Diferenças ultraestruturais são observadas entre taquizoítos e bradizoítos (Figura 2), sendo a posição do núcleo e a quantidade de grânulos de amilopectina as diferenças mais evidentes (DUBEY *et al.*, 1998). Até o presente momento não se conhecem exatamente todas as funções dos grânulos de amilopectina, mas supõe-se que a reserva energética desse estágio seja proveniente da utilização da amilopectina, além de haver uma relação estrita entre a expressão de amilopectina e produção cística (SUGI *et al.*, 2017). Os bradizoítos também se multiplicam por endodiogenia no interior dos cistos,

porém essa multiplicação é bem mais lenta quando comparada aos taquizoítos (WATTS *et al.*, 2015).

Os cistos teciduais possuem uma parede fina e elástica, que é sensível aos ácidos produzidos pelo trato gastrointestinal. Portanto, ao serem ingeridos, os cistos se rompem. Os bradizoítos contidos nos cistos se convertem em taquizoítos e repetem o ciclo descrito nos parágrafos anteriores (DUBEY *et al.*, 1998; TENTER *et al.*, 2000). Uma grande variação do tamanho de cistos pode ser encontrada, sendo que cistos teciduais jovens podem ter apenas 5 µm de diâmetro e conter apenas dois bradizoítos, enquanto os mais velhos podem conter centenas e medir 70 µm (LAINSON, 1958; DUBEY *et al.*, 1998).

Em sua maioria, cistos encontrados em tecidos neuronais são esferoidais, enquanto que cistos intramusculares são alongados (DUBEY, 1997b). O tamanho dos cistos varia de acordo com o tempo de formação, tipo de célula hospedeira parasitada e método utilizado para a medição, já a localização do mesmo, depende da espécie do hospedeiro e cepa infectante (DUBEY *et al.*, 1998).

Figura 2. Desenhos esquemáticos de taquizoíto à esquerda e bradizoíto à direita.



Fonte: Adaptado DUBEY *et al.*, 1998.

### 4.1.3 Imunopatogenia

Os eventos que são desencadeados a partir da infecção por *T. gondii* e que chegam até à manifestação da doença são variáveis. O estado imune do animal, cepa infectante, suscetibilidade da espécie e dose infectante determinam o rumo da infecção que pode, ou não, levar à manifestação da doença (INNES, 1997). Em infecção maciça a multiplicação dos taquizoítos pode levar à necrose em órgãos vitais como miocárdio, coração, pulmão, fígado e cérebro (TAYLOR *et al.*, 2016).

A infecção por *T. gondii* induz uma resposta imune no hospedeiro, sendo a resposta imune inata a primeira a responder à infecção. Para proteção a longo prazo, é fundamental a resposta imune adaptativa. Na resposta adaptativa, as células T CD4 desempenham um importante papel recrutando células T CD8, responsáveis pelo controle da infecção. Contudo, a indução de células T CD8 durante a infecção aguda não erradica o parasito. Uma das razões para isso é a exaustão funcional das células T CD8 durante a infecção latente. Um estudo recente relata que a causa primária da exaustão das células T CD8 está associada às células T CD4 durante a toxoplasmose latente. A disfuncionalidade das células T CD8 é precedida pela exaustão de CD4 e a imunidade adaptativa é severamente comprometida (KHAN *et al.*, 2019).

Quando o hospedeiro suscetível ingere cistos/oocistos do parasito, os bradizoítos/esporozoítos penetram o intestino delgado, transformam-se em taquizoítos e chegam à corrente sanguínea. O parasito pode migrar pelo trato gastrointestinal de três maneiras: incidindo entre as células, através das células por migração transepitelial e/ou penetrando as células epiteliais e se replicando dentro das mesmas (BARRAGAN e SIBLEY, 2002; BARRAGAN *et al.*, 2005).

A disseminação do parasito no hospedeiro pode ocorrer via migração extracelular do taquizoíto no sangue ou linfa, migração intracelular ou migração do parasito aderido à membrana de células hospedeiras (RANDALL e HUNTER, 2011). Estudos *in vitro* demonstraram que taquizoítos são capazes de infectar trofoblastos de origem humana sugerindo, assim, que essa pode ser uma forma de entrada do parasito na placenta (ABBASI *et al.*, 2003).

Suspeita-se que o parasito alcance o sistema nervoso central através da migração intracelular de células dendríticas e monócitos, já que essas células podem ser detectadas no sangue e no cérebro e são sabidamente infectadas pelo parasito (COURRET *et al.*, 2006; UNNO *et al.*, 2008). Ainda no interior dessas células os

taquizoítos podem alcançar a retina pela migração oriunda do cérebro via nervo óptico e subsequente infecção do endotélio vascular da retina (ZAMORA *et al.*, 2008).

Em hospedeiros imunocompetentes a fase aguda da infecção é controlada, de forma geral, pela resposta imune inata e adaptativa que é caracterizada pela produção de interferon gama por células natural *killer* e linfócitos T (LIEBERMAN e HUNTER, 2002). No entanto, a imaturidade do sistema imunológico favorece a multiplicação de *T. gondii* em fetos cujas progenitoras suscetíveis foram infectadas pela primeira vez durante a gestação, sendo os humanos, as ovelhas e os cangurus (*Macropus fuliginosus melanops*) mais suscetíveis à infecção congênita que outros animais (DUBEY *et al.*, 1988; INNES, 1997).

Bebês infectados pelo parasito durante sua formação pode apresentar lesões neurológicas permanentes, com ou sem hidrocefalia, além de alterações oftálmicas (PETERSEN, 2007b). Quando os taquizoítos infectam fetos imaturos de hospedeiros suscetíveis durante o primeiro terço da gestação a infecção resulta, geralmente, em aborto por morte fetal. Já no segundo terço o feto pode estar mumificado, nascer morto ou fraco. O nascimento de fetos saudáveis e sem alterações clínicas geralmente são resultados de infecções no terceiro terço da gestação (TREES e WILLIAMS, 2005).

Assim como os humanos, as ovelhas não abortam em gravidezes subsequentes, pois a imunidade adquirida como resultado da infecção primária é suficiente para proteger contra a toxoplasmose congênita nas próximas gestações (BUXTON, 1990; INNES *et al.*, 2009). Entretanto, cabras infectadas durante a gravidez podem apresentar alterações nas gestações seguintes (DUBEY, 1982). Algumas espécies animais como coala (*Phascolarctos cinereus*), pinguim (*Eudyptula minor*) e macaco-de-cheiro (*Saimiri sciurreus*) são extremamente sensíveis à infecção por *T. gondii* (HARTLEY *et al.*, 1990; MASON *et al.*, 1991; CUNNINGHAM *et al.*, 1992).

Durante o processo evolutivo de determinadas espécies, a ausência de felídeos e, por conseguinte, a ausência de contato dessas espécies com oocistos do parasito, levou a uma deficiência de seus sistemas imunes em responder à infecção de forma rápida. Em hospedeiros com susceptibilidade “intermediária”, como seres humanos e ovelhas, o sistema imunológico age de forma eficiente e, geralmente, é capaz de controlar a parasitemia. Nessas espécies, a menos que haja uma mudança intensa no estado imunológico, o parasito geralmente persiste ao longo da vida do hospedeiro, como resultado de um impasse entre o hospedeiro e o parasito (INNES, 1997). A reativação da infecção latente em humanos imunocomprometidos pode causar encefalite,

miocardite e pneumonia. A maior causa de retinocorioidite em humanos é causada pela infecção aguda do parasito (EZA e LUCAS, 2006; SAADATNIA e GOLKAR, 2012).

A suscetibilidade do hospedeiro afeta a capacidade de conversão dos taquizoítos em bradizoítos e/ou persistência dos cistos teciduais. Raramente, cistos teciduais são encontrados em carne bovina ou bubalina, no entanto, os anticorpos anti-*T. gondii* são encontrados em frequências variáveis nessas espécies animais (DUBEY, 1983; DE MACEDO *et al.*, 2012). Os cistos de *T. gondii* são observados com maior frequência em porcos, ovelhas e cabras e menor frequência em aves, coelhos, cachorros, gatos e equinos infectados (TENTER *et al.*, 2000).

A disseminação dos taquizoítos ao infectar os hospedeiros intermediários pode ser especulada de acordo com o trabalho de Dadimoghaddam e colaboradores, em que camundongos suíços foram inoculados via intraperitoneal e a carga parasitária de sete de seus tecidos (coração, cérebro, baço, fígado, olho, músculo e rim) foi mensurada por PCR em tempo real. Os autores observaram que no primeiro dia p.i. o cérebro e o fígado tiveram maior carga parasitária detectada, em contraste com coração e baço, que apresentaram menor carga. No segundo dia, olhos e coração tiveram carga significativamente maior que no primeiro dia. Nos dias 3 e 4 a carga parasitária aumentou em todos os órgãos, exceto cérebro e fígado (DADIMOGHADDAM *et al.*, 2014).

#### **4.1.4 Diagnóstico**

##### *4.1.4.1 Diagnóstico direto*

O isolamento de taquizoítos de *T. gondii* em fluídos e tecidos é geralmente difícil e é mais provável de ser encontrado em secções do cérebro e placenta, mas também pode ser isolado de outros locais como musculatura esquelética, coração, diafragma, humor vítreo e linfonodos mesentéricos (SPYCHER *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 2016; KHAREL SITAULA *et al.*, 2018; ALVES *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2019). Oocistos do parasito podem ser isolados nas fezes de felídeos através do exame coproparasitológico durante o período de eliminação de oocistos, cerca de três a sete dias após a infecção do animal por cistos do parasito (DUBEY *et al.*, 2013).

A identificação baseada somente na observação microscópica é menos sensível e confiável que a coloração de Giemsa ou hematoxilina-eosina (HE), por exemplo. A coloração de Giemsa é uma mistura de corantes com características neutras que coram os componentes nucleares e citoplasmáticos das células, sendo útil para a detecção de *T. gondii*, principalmente quando encontrados em fluidos corporais (BOTTONNE, 1991; BARCIA, 2007; MONACO *et al.*, 2012). Já a coloração por HE facilita a visualização do parasito, principalmente em cortes histológicos, sendo a hematoxilina um corante básico que cora em azul componentes celulares como o núcleo e matriz extracelular. A eosina é um corante ácido que cora em rosa estruturas como citoplasma, mitocôndria e fibras colágenas (KUMAR *et al.*, 2013).

A detecção do material genético do parasito dá-se através de métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e em tempo real. Em humanos a PCR é utilizada para detecção do DNA do parasito em fluidos intraoculares e também considerada a técnica padrão ouro para o diagnóstico de infecções intrauterinas (LANDRE *et al.*, 1995; FARHADI *et al.*, 2017). A PCR em tempo real além de detectar o material genético do parasito permite verificar a quantidade exata da parasitemia, por isso é utilizada para avaliar a progressão da doença e eficácia de tratamento estabelecido (MENOTTI *et al.*, 2003).

#### 4.1.4.2 Diagnóstico indireto

As manifestações clínicas da toxoplasmose são extremamente variáveis entre hospedeiros e estágios da infecção, dificultando, assim, o diagnóstico da doença. Em infecções primárias, em fêmeas grávidas e na toxoplasmose congênita os sinais clínicos podem estar ausentes, porém, em casos reativados tardiamente, como na toxoplasmose ocular, as manifestações clínicas são detectáveis mais facilmente (SUKTHANA, 2006).

Técnicas sorológicas e exames de imagem são abordagens tradicionais para a obtenção do diagnóstico. Os testes sorológicos possibilitam a detecção de diferentes classes de anticorpos anti *T. gondii* sendo, portanto, sugestivo de que o hospedeiro em questão foi infectado pelo parasito. Uma variedade de testes, como imunofluorescência indireta (IFI), teste do corante de Sabin-Feldman (DT), imunoadsorção enzimática (ELISA) e hemaglutinação indireta, foram desenvolvidos para detectar as diferentes classes de anticorpos e antígenos (LIU *et al.*, 2015).

A imunofluorescência, como o nome sugere, envolve a visualização de estruturas reconhecidas pelos anticorpos ligados à corantes fluorescentes que revelam a formação do complexo antígeno-anticorpo (SHERWIN e READ, 1993). Na técnica de imunofluorescência indireta o soro teste é incubado com o parasito fixado em uma lâmina e a ligação dessas moléculas é detectada incubando a amostra com um anticorpo secundário específico para moléculas de imunoglobulina conjugado a um fluorocromo, gerando um sinal visível em microscópio de fluorescência (DONALDSON, 2015). Quando comparado a outros testes, como o dye-test, a IFI é um método mais econômico, além de ser um teste com elevadas sensibilidade e especificidade (SARAEI *et al.*, 2010).

O dye-test, ou teste de corante Sabin-Feldman, é baseado na observação do parasito *in vivo* após ser incubado com soro contendo, ou não, anticorpos e corados com azul de metileno. Quando o parasito é incubado com soro sem anticorpos, o mesmo incha e é corado. No entanto, o parasito exposto ao soro contendo anticorpos, nas mesmas condições, parece fino, distorcido e não é corado. O rompimento do parasito na presença de soro com anticorpos ocorre devido ao rompimento da membrana em consequência da ativação do sistema de complemento, sendo a lise observada em microscopia de fase (SABIN e FELDMAN, 1948; REMINGTON *et al.*, 2011).

O princípio do ELISA indireto, o mais comumente empregado na rotina laboratorial humana, é baseado na detecção de anticorpos da classe IgG e IgM anti-*T. gondii*. Resumidamente, o antígeno alvo é adsorvido em microplacas e, após bloqueio e lavagem da placa, diluições séricas do soro teste são adicionadas aos poços contendo antígeno. Na presença de anticorpos específicos para o antígeno em questão, haverá formação da ligação antígeno-anticorpo que é detectada por um anticorpo secundário ligado a uma enzima, também adicionado à placa e incubado. O local onde ocorre a reação antígeno-anticorpo é detectável por coloração característica após a adição de um substrato apropriado para a enzima, sendo a intensidade de cada reação realizada de forma automatizada (VOLLER *et al.*, 1976; CROWTHER, 1995).

O teste de aglutinação também possibilita a detecção de anticorpos contra o parasito, utilizando-se o soro teste e antígenos parciais ou totais de *T. gondii*. O teste é realizado em placa específica para tal e, basicamente, o antígeno é adicionado a essa placa e posteriormente o soro teste é adicionado. A leitura pode ser feita em lupa estereoscópica ou a olho nu, dependendo do operador. Diluições seriadas de soro são testadas quanto à sua capacidade de causar ou não aglutinação, e a diluição mais alta

que causa aglutinação é representa o “título do anticorpo”. Deve-se salientar que o efeito prozona pode levar à resultados falso negativos, por isso, o soro deve ser adequadamente diluído (DESMONTS e REMINGTON, 1980; SYKES e RANKIN, 2014).

Outros testes específicos, como o Western blot, são recomendados em casos particulares, por exemplo, quando há dubiedade em outros testes sorológicos e também como ferramenta complementar no diagnóstico precoce da toxoplasmose congênita (PETERSEN, 2007b; LIU *et al.*, 2015). O Western blot permite a identificação e caracterização de proteínas, que são previamente separadas por eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio e transferidas eletroforeticamente para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (KIM, 2017). Nessa técnica, as proteínas antigênicas contidas na membrana podem ser reconhecidas pelo soro teste por diferentes classes de imunoglobulinas (KING, 1998; HIRANO, 2012).

Embora as técnicas de imagem não sejam específicas, elas facilitam o diagnóstico da doença e permitem monitorar o efeito da terapia em andamento (LIU *et al.*, 2015). A ressonância magnética, por exemplo, é utilizada para determinar a extensão da lesão, já a ultrassonografia recomendada no diagnóstico pré-natal (BATRA *et al.*, 2004). A tomografia computadorizada é recomendada para detecção de hidrocefalia difusa e calcificações cerebrais em recém-nascidos (LAGO *et al.*, 2007).

#### **4.1.5 Tratamento e profilaxia**

A toxoplasmose é tratada de forma abrangente com sulfadiazina e pirimetamina que, embora controlem a multiplicação do parasito em infecções agudas, não erradicam a infecção. Outros medicamentos como atovaquona, espiramicina, clindamicina e dapsona são utilizados em infecções mais difíceis de serem controladas (HILL e DUBEY, 2002). Uma das dificuldades do tratamento é o fato de que algumas cepas de *T. gondii* são mais sensíveis aos medicamentos que outras (SILVA *et al.*, 2019). Vale ressaltar que o uso de medicamentos isoladamente, ou a combinação de drogas, varia com a finalidade, por exemplo: alterações oftálmicas; hidrocefalia em fetos humanos e surto de aborto em ovelhas (PETERSEN, 2007a; SANCHEZ-SANCHEZ *et al.*, 2018).

Além dos problemas que comprometem o diagnóstico efetivo e o tratamento da toxoplasmose, não há vacina que proteja totalmente da doença (ASSOLINI *et al.*,

2017). A vacina viva atenuada existente, Toxovax™ (Schering-Plough Animal Health Ltd, Nova Zelândia), resulta em diminuição da incidência de aborto em ovelhas, contudo não erradica o parasito e deve ser reaplicada a cada dois anos (BUXTON e INNES, 1995).

A ingestão de cistos teciduais, oocistos em água e/ou comida contaminada e infecção congênita são três formas comuns de transmissão primária, logo, evitar o consumo de carnes cruas, lavar bem verduras e frutas, realizar exames sorológicos preventivos em gestantes e controlar gatos errantes são medidas profiláticas relevantes (VERMA e KHANNA, 2013; HISZCZYNSKA-SAWICKA *et al.*, 2014). Algumas medidas preventivas, no entanto, aplicam-se a determinados hospedeiros e/ou situações específicas. Mulheres gestantes, pacientes portadores do vírus HIV e transplantados requerem medidas profiláticas específicas (RAJAPAKSE *et al.*, 2017). Para diminuir a infecção em animais de criação, principalmente ovinos, caprinos e suínos, recomenda-se incinerar membranas fetais, fetos abortados e reduzir a população de felinos na propriedade (FIALHO *et al.*, 2009).

#### 4.2 PRODUÇÃO DE CISTOS *IN VITRO*

A expressão *in vitro* é utilizada para designar experimentos realizados em meio artificial, fora de um organismo vivo. Como citado anteriormente, *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório, possibilitando, assim, a multiplicação do mesmo *in vitro* desde que haja células nucleadas disponíveis para a manutenção do crescimento (EVANS *et al.*, 1999). Atualmente há uma grande variedade de células cultivadas em laboratórios podendo ser eucariota, procariota, oriunda de planta e/ou animal (DAVIS, 2002). O sucesso do primeiro cultivo celular foi relatado em 1907 pelo pesquisador Ross Granville Harrison. Entre as vantagens da técnica, destaca-se a multiplicação do parasito *in vitro* possibilitando, assim, uma diminuição significativa no uso de animais (HERNANDEZ *et al.*, 2014).

Os tipos de culturas celulares podem ser classificados em: primárias, finitas e contínuas. Quando a cultura é formada por células que se originaram diretamente do tecido, esta cultura é classificada como primária. A cultura formada após a primeira passagem *in vitro* a partir de uma cultura primária e que depois entra em processo apoptótico é nominada como cultura finita. A cultura contínua também é formada por

células que tiveram origem, em algum momento, *in vivo*, entretanto, a cultura se mantém indefinitivamente ao longo das passagens (DAVIS, 2002).

Virtualmente, *T. gondii* é capaz de infectar qualquer célula nucleada facilitando, assim, a escolha do tipo celular a ser empregada para a proliferação do parasito (MALKWITZ *et al.*, 2018). Contudo, o crescimento *in vitro* do parasito varia a depender da célula hospedeira utilizada para a infecção (FISCHER *et al.*, 1997; KHAN e GRIGG, 2017; JABARI *et al.*, 2018). As células a serem infectadas por taquizoítos de *T. gondii* devem ser mantidas em frascos ou placas enriquecidas com meio de cultura celular (pH 7,2), soro fetal inativado, antibiótico e antimicótico em estufa úmida à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, proporcionando assim o crescimento das células e possibilitando a multiplicação do parasito (KHAN e GRIGG, 2017; JABARI *et al.*, 2018).

O cultivo de taquizoítos pode ser mantido em laboratório continuamente (KHAN e GRIGG, 2017). Algumas cepas de *T. gondii* recém isoladas *in vivo* têm a capacidade de formar cistos, contudo, após algumas passagens, as mesmas podem perder essa característica (LINDSAY *et al.*, 1993; SULLIVAN e JEFFERS, 2012). Outras cepas geneticamente modificadas também formam cistos espontaneamente, contudo, também perdem essa característica ao longo das passagens (PAREDES-SANTOS *et al.*, 2018). A indução da formação de cistos em cultura celular pode ser realizada induzindo-se alguma condição de estresse para o parasito, a exemplo da alteração do pH do meio, temperatura, saturação de CO<sub>2</sub> e adição de interferon gama (JONES *et al.*, 1986; KHAN e GRIGG, 2017).

Para a formação de cistos por alteração do pH, o meio contendo soro fetal, antibiótico, antimicótico e outros adjuvantes deve ter seu pH elevado para 8, por meio da adição de NaOH, e ser mantido durante quatro dias em média. Há necessidade do cultivo em estufa sem CO<sub>2</sub> e troca diária do meio, durante quatro dias, a fim de evitar a restabilização do pH do meio (SALIMI *et al.*, 2016). Outro modo de formação cística é pela alteração da temperatura de cultivo, o que requer um pré-tratamento das células não infectadas para que as mesmas se adequem à nova temperatura. A mudança de 37 para 43°C deve ser realizada em etapas, e o tempo total que as células permanecem em temperatura elevada varia de acordo com o tipo de célula e o tipo de parasito (SOETE *et al.*, 1994).

Algumas cepas de *T. gondii*, como ME49 e NED, sustentam sua multiplicação *in vitro* quando cultivadas em células de galinha DF-1 à 42°C (REZENDE-GONDIM *et al.*, 2017). Também é relatado o desenvolvimento espontâneo de bradizoítos em células

musculares esqueléticas primárias e permanentes; esse tipo celular alberga, geralmente, cistos de *T. gondii* quando o hospedeiro tem uma infecção crônica. Esses resultados indicam fortemente que o tipo de células hospedeira, além de fatores de estresse exógenos, podem determinar a diferenciação do desenvolvimento de *T. gondii* (FERREIRA DA SILVA *et al.*, 2008).

#### 4.3 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos são formados por glicoproteínas e estão presentes nos tecidos, mucosas e sistema circulatório de mamíferos, compondo o sistema imune humoral (BUYUKKOROGLU e SENEL, 2018). Também nominados de imunoglobulina, os anticorpos são secretados por plasmócitos e podem ser classificados em cinco isotipos (IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM), sendo que o isotipo IgG é o único capaz de atravessar a barreira placentária e representa 80% das imunoglobulinas presentes no soro humano (BUYUKKOROGLU e SENEL, 2018; GAO *et al.*, 2018).

Os anticorpos monoclonais são assim designados porque são produzidos, em laboratório, a partir de um único clone de um hibridoma nomeado “célula monoclonal” (BUYUKKOROGLU e SENEL, 2018). O hibridoma é produto da fusão de células cancerígenas imortalizadas com células produtoras de anticorpos. A partir do isolamento de células esplênicas, oriundas de animal previamente imunizado, obtém-se as células produtoras de anticorpos. Na etapa de identificação, os sobrenadantes da cultura de todas as células de hibridoma são rastreados para a produção do anticorpo de interesse. As células de hibridoma que produzem o anticorpo de interesse são separadas por diluição até que um hibridoma monoclonal seja individualizado (HANACK *et al.*, 2016). Os clones de um mesmo hibridoma produzem anticorpos idênticos (KOHLENER e MILSTEIN, 2005).

A produção de anticorpos monoclonais revolucionou o tratamento de doenças autoimunes e oncológicas, além de ser utilizado como parte do tratamento de asma, reações de hipersensibilidade, osteoporose, hiperlipidemia, desenvolvimento de vacinas, preparação para kit diagnóstico, imunoenaios e purificação de antígenos específicos (SHEPARD *et al.*, 2017; BUYUKKOROGLU e SENEL, 2018; LAPTOS e OMERSEL, 2018). Alguns exemplos da utilização de anticorpos monoclonais que reconheçam estruturas de *T. gondii* são: estudos de antígenos que podem ser utilizados como alvo de

drogas e produção de vacina; caracterização de proteínas específicas de uma cepa; identificar diferenças antigênicas de oocistos excretados em diferentes tempos; identificar alterações na virulência de algumas cepas; melhoramento de testes imunodiagnóstico entre outras possibilidades (HU *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2010; HARITO *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2016; PAN *et al.*, 2019).

#### **4.3.1 Anticorpo monoclonal K8/15-15**

O primeiro anticorpo monoclonal (AcMo) capaz de reconhecer antígenos presentes em esporocistos e cistos produzidos *in vivo* ou *in vitro* de *T. gondii* foi descrito pela primeira vez em 2016 por Gondim e colaboradores. Para a produção do AcMo, dois camundongos isogênicos BALB/c com 11 semanas foram imunizados por via subcutânea com uma suspensão contendo 100 mg de antígeno oriundo de fragmentos de oocisto de *T. gondii*. Para a inativação dos esporocistos, os oocistos foram congelados durante uma semana antes da preparação do antígeno. Os oocistos foram então tratados com hipoclorito de sódio, emulsificados e administrados aos animais. Os camundongos foram eutanasiados e as células esplênicas dos animais fundidas com células de mieloma. A triagem do sobrenadante dos hibridomas por imunofluorescência resultou em 58 AcMos, sendo o K8/15-15 um deles. Após a clonagem por diluição do hibridoma específico, foram realizados exames de imunofluorescência e Westernblot (WB) para a caracterização do AcMo e constatou-se, então, que o AcMo reconhece antígenos de aproximadamente 350 kDa utilizando esporocistos e cistos gerados *in vivo* para realização do WB.

Cistos e esporocistos de *Hammondia hammondi* e *Hammondia heydorni*, e cistos de *Neospora caninum* também foram reconhecidos pelo AcMo K8/15-15, além de esporocistos de *Cystoisospora felis*. Cistos de *Sarcocystis* sp. e *Besnoitia besnoiti* não foram reconhecidos pelo mAb K8/15-15. O AcMo K8/15-15 mostrou-se, então, útil na identificação de cistos e esporocistos do parasito, e potencial para ser empregado em estudos proteômicos e identificação de novos componentes das paredes de cistos e esporocistos de *T. gondii* (GONDIM *et al.*, 2016).

#### 4.4 SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA

A seleção e captura de alvos específicos por meio de esferas magnéticas são utilizadas para diversos fins, por exemplo, remoção de células tumorais da medula óssea, isolamento de células linfóides do sangue periférico, identificação e análise genética de sequências específicas de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) e purificação de DNA ligados às proteínas (HAUKANES e KVAM, 1993; ZHANG *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2017).

Esferas magnéticas ligadas à anticorpos monoclonais, DNA ou revestidas com estreptavidina garantem uma interação específica com o alvo correspondente. A força magnética aplicada à solução separa os alvos ligados às esferas, permitindo a análise dos mesmos. Além do isolamento e captura de células específicas, algumas dessas análises também provaram ser úteis na detecção de vírus, bactérias e ácidos nucleicos específicos (ZHANG *et al.*, 2010 ; PAN *et al.*, 2016; DAI *et al.*, 2017).

As esferas magnéticas são ligadas primeiramente a um marcador. Os denominados “marcadores”, neste tipo de técnica, são aqueles que se ligam covalentemente às moléculas existentes nas células alvo e, embora haja vários tipos de marcadores, os mais usados são os anticorpos (CHALMERS *et al.*, 1998 23912; CLARKE e DAVIES, 2001 23907). As esferas magnéticas, juntamente com o complexo antígeno-anticorpo, são concentradas usando um suporte magnético, evitando, assim a mistura das células alvo por debris celulares. O uso de esferas magnéticas impõe menos restrições aos volumes de amostra usados, entretanto, a seletividade das células alvo dependerá da especificidade do anticorpo usado, como acontece em outras metodologias baseadas em imunoafinidade (YU *et al.*, 1998).

Os anticorpos monoclonais são amplamente utilizados em métodos de separação magnética. A captura das células alvo por separação magnética pode ser realizada através da incubação da mistura de células diretamente com AcMo ligado às esferas magnetizáveis. As células podem ser purificadas a partir de amostras não processadas, como sangue total, medula óssea e tecidos homogêneos quando utilizado AcMo como marcador (RAHMANIAN *et al.*, 2017).

A captura de protozoários coccídeos por esferas magnetizáveis é relatada na literatura desde 1999 por Di Giovanni e colaboradores. Oocistos e esporocistos de *T. gondii* também são sabidamente capturáveis utilizando AcMo, além de outros

protozoários, como *Giardia lamblia* (DI GIOVANNI *et al.*, 1999; DUMETRE e DARDE, 2005; RAMADAN *et al.*, 2010)

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Todos os organismos vivos, desde uma simples célula procariota até organismos multicelulares complexos, apresentam proteínas em sua composição. Virtualmente, todos os processos realizados por seres vivos dependem de proteínas (HARVEY e FERRIER, 2011). Quando há falha em um processo celular dependente de proteína, seja ele de produção, regulação ou controle, inúmeras complicações podem ocorrer, como hemofilia, diabetes tipo I e alergias. As funções realizadas pelas proteínas são inúmeras e, embora muitas funções sejam conhecidas, outras permanecem obscuras (WITHFORD, 2005).

As proteínas são formadas por polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas e podem, ou não, estar ligadas a outras biomoléculas como lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos, grupos heme e elementos metálicos (PETSKO e RINGE, 2004; WITHFORD, 2005). A purificação da proteína é o primeiro passo para determinar a sequência dos aminoácidos e investigar as funções bioquímicas das mesmas.

Com os avanços das técnicas de purificação, estima-se que qualquer proteína possa ser purificada dentro dos padrões aceitáveis de homogeneidade. Geralmente, executa-se uma série de etapas para a purificação, pois dificilmente as proteínas podem ser purificadas em uma única etapa, mesmo quando essa etapa é baseada em uma característica biológica específica (LABROU, 2014). Algumas técnicas como diálise, imunoprecipitação e cromatografia são utilizadas na separação de proteínas.

A diálise convencional basicamente separa moléculas pequenas de moléculas grandes, permitindo a difusão das moléculas pequenas através de membranas seletivamente permeáveis. Existem vários métodos simples e relativamente baratos para concentrar soluções de proteínas e, alternativamente, podem ser utilizados também concentradores centrífugos, que são operados com o auxílio de centrífugas comuns de laboratório (ANDREW *et al.*, 2002).

Para o isolamento de proteínas pela técnica de imunoprecipitação há necessidade de anticorpos específicos que reconheçam a proteína alvo. No método tradicional, o

anticorpo e a proteína são incubados com esferas de proteína A ou G, formando assim um complexo imune. O isolamento ocorre após a sedimentação desse complexo por centrifugação. Contudo, essa abordagem resulta na contaminação da proteína alvo com o anticorpo do complexo, podendo interferir nas análises (KABOORD e PERR, 2008).

A cromatografia permite o isolamento das proteínas pois os diferentes métodos de realizar a técnica possuem a capacidade de separar moléculas a partir de características importantes como adsorção (líquido-sólido), partição (líquido-sólido) e diferenças ou semelhanças entre pesos moleculares. As proteínas podem ser purificadas com base em características como tamanho e forma, carga total e grupos hidrofóbicos presentes na superfície. A separação que ocorre na técnica dá-se após a aplicação das moléculas de uma mistura em uma superfície ou mesmo em um líquido na fase estacionária. Numa segunda fase, a fase móvel, as moléculas se movem e se separam. A cromatografia em coluna é um dos métodos mais comuns de purificação de proteínas (COSKUN, 2016).

As proteínas são purificadas em sua forma ativa com base em características como solubilidade, tamanho, carga e ligações de afinidade específicas. Há uma variedade de técnicas disponíveis; uma maneira de constatar se a escolha da técnica está correta, é pela verificação da atividade específica da proteína, que aumenta a cada etapa da purificação, ou pela visualização das proteínas presentes em cada etapa da purificação pela técnica de eletroforese (BERG *et al.*, 2002).

A técnica de eletroforese possibilita a separação das proteínas, após desnaturação, com base em suas massas, utilizando-se um gel de poliacrilamida. A desnaturação proteica pode ser realizada por aquecimento, por exemplo, pois a energia do calor e a vibração dentro das moléculas possibilita o rompimento de estruturas terciárias das proteínas (CAMPBELL e FARRELL, 2006). Além do aquecimento, adiciona-se dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente com forte efeito desnaturante. Na presença de SDS e de um agente redutor que cliva ligações dissulfeto, as proteínas se desdobram em cadeias lineares com carga negativa proporcional ao comprimento da cadeia polipeptídica. As proteínas pequenas se movem rapidamente através do gel, enquanto as proteínas grandes ficam no topo, perto do ponto de aplicação da mistura. A mobilidade da maioria das cadeias polipeptídicas nessas condições é linearmente proporcional ao logaritmo de sua massa (BERG *et al.*, 2002).

Para a visualização e recorte da banda proteica em um gel de acrilamida usa-se um corante. Contudo, para análise da proteína de interesse por espectrometria de massas

(EM), a banda necessita ser descorada. Há diferentes tipos de espectrômetros de massa, mas todos eles requerem a gaseificação e ionização da amostra, aceleração da molécula por um campo elétrico, dispersão dos íons de acordo com a razão  $m/z$ , detecção dos íons e registro do sinal. Os espectrômetros de massa são usados para medir a massa molecular de um polipeptídeo ou para determinar características estruturais, como a sequência de aminoácidos e o tipo de modificações pós-traducionais (DOMON e AEBERSOLD, 2006).

Os espectrômetros de massa permitem a identificação das sequências de aminoácidos das proteínas, além de informarem a massa molecular com grande precisão, tornando possível a comparação com as sequências descritas nos quadros abertos de leitura de genomas conhecidos e, assim, identificar qual quadro geraria uma proteína com aquela massa molecular. Outra área de estudo de proteínas é a identificação de sua estrutura, para que seja possível a correlação entre a estrutura e sua função biológica. As proteínas têm uma estrutura tridimensional única, que pode ser determinada por ressonância magnética nuclear (RMN) e multidimensional. Como proteínas com estruturas semelhantes geralmente têm funções semelhantes, a atividade bioquímica de uma proteína pode ser prevista pela pesquisa de proteínas conhecidas, que são semelhantes em suas sequências de aminoácidos (BERG *et al.*, 2002).

## 5. CAPÍTULO 01: SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DE CISTOS E ESPOROCISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* UTILIZANDO UM ÚNICO ANTICORPO MONOCLONAL

### 5.1 RESUMO

*Toxoplasma gondii* é comumente transmitido entre animais e humanos pela ingestão de cistos do parasito em tecidos animais ou pelo consumo de comida e/ou água contaminada com oocistos excretados por felinos. Cistos teciduais e oocistos têm paredes peculiares cujas estruturas e composições são pouco conhecidas. Neste capítulo descrevemos um método de separação imunomagnética (SI) adequado para a captura de cistos e esporocistos de *T. gondii* utilizando um único anticorpo monoclonal (AcMo) que reconhece antígenos presentes nas paredes de cistos teciduais e esporocistos. O AcMo foi acoplado às esferas magnéticas com anti-IgG de camundongo e utilizado para três procedimentos de isolamento: i) cistos teciduais produzidos *in vitro*, ii) cistos teciduais originários de camundongos e iii) liberação de esporocistos provenientes de oocistos excretados nas fezes de felinos. Foi observada uma grande quantidade de cistos isolados produzidos *in vitro* após a técnica de SI, chegando à 2.000 cistos em único frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup>. Cistos teciduais de camundongos também foram isolados pela técnica de SI e não foi observada contaminação com o tecido hospedeiro na fração purificada. Os esporocistos também foram isolados pela SI e a suspensão final não continha oocistos não esporulados. Os métodos de isolamento descritos podem ser apropriados para estudos proteômicos envolvendo paredes de cisto tecidual e esporocisto de *T. gondii*.

Palavras chave: separação imunomagnética, anticorpo monoclonal, oocistos, cistos teciduais.

## 5.2 ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is commonly transmitted among animals and humans by ingestion of parasite cysts in animal tissues or by consumption of food and water contaminated with environmentally-resistant oocysts excreted by cats. Both, tissue cysts and oocysts have peculiar walls, whose structures and compositions are poorly known. Herein, we describe an immunomagnetic separation (SI) method that is suitable for obtaining clean *T. gondii* tissue cysts and sporocysts. We used a single IgG monoclonal antibody (AcMo) that reacts against antigens in tissue cyst and sporocyst walls. The AcMo was coupled to anti-IgG magnetic beads and used for three isolation procedures: i) *in vitro* produced tissue cysts, ii) tissue cysts originated from mice, and iii) sporocysts release from oocysts excreted in feline feces. Many *in vitro* produced tissue cysts were obtained by this SI; > 2,000 *T. gondii* tissue cysts were isolated from a single culture flask of 25 cm<sup>2</sup>. When tissue cysts from mice were isolated using this method, no contamination with host tissue was observed in the purified fraction. After purification of sporocysts, the final suspension was free of unsporulated oocysts. The isolation methods described should be suitable for proteomic studies involving tissue cyst and sporocyst walls of *T. gondii*.

**Keywords:** Immunomagnetic separation; monoclonal antibody; oocyst; tissue cyst.

### 5.3 INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário distribuído globalmente, que pode infectar quase todos os animais homeotérmicos, incluindo seres humanos (HILL *et al.*, 2005). Os principais estágios do parasito envolvidos em sua transmissão horizontal são oocistos e cistos teciduais. Os oocistos são gerados após a reprodução sexuada do parasito no epitélio intestinal dos felídeos e são excretados nas fezes de forma não esporulada e não infecciosa. Após 24-48 h no ambiente, os oocistos esporulam e se tornam infecciosos, possuindo dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (FEGURSON *et al.*, 1979).

Os cistos teciduais são formados no cérebro, músculos e outros órgãos dos hospedeiros - mamíferos e aves - podendo conter milhares de bradizoítos (DUBEY *et al.*, 1998). Animais e seres humanos são infectados principalmente pelo consumo de água ou alimentos contaminados com oocistos e pela ingestão de cistos teciduais contidos em carnes malcozidas. Outras formas de transmissão incluem: infecção transplacentária, transplante de órgãos, transfusão de sangue e inoculação acidental usando agulhas, contudo acredita-se que a ingestão de oocistos e cistos nos tecidos ocorra com mais frequência (ROBERT-GANGNEUX *et al.*, 2012).

Atualmente, não existe uma maneira eficaz de inativar oocistos no ambiente ou eliminar cistos teciduais em animais vivos. Tanto oocistos quanto cistos possuem paredes peculiares, cujas composições e estruturas são pouco conhecidas. As paredes do oocisto não são destruídas ou permeabilizadas pela maioria dos compostos químicos usados como desinfetantes (ITO *et al.*, 1975; DUMETRE *et al.*, 2013; WAINWRIGH *et al.*, 2007).

As paredes dos oocistos e esporocistos são compostas por duas camadas (externa e interna) e, em ambas, a camada interna é mais espessa e mais resistente que a camada externa (DUMETRE *et al.*, 2013). A parede do cisto tecidual é formada por uma combinação de moléculas da célula hospedeira e por proteínas secretadas pelo parasito, conferindo assim resistência ao cisto e ajudando o mesmo a se camuflar do sistema imunológico do hospedeiro (ZHANG *et al.*, 2001; TOMITA *et al.*, 2017)

O passo inicial para entender melhor a composição das paredes dos oocistos, esporocistos e cistos de *T. gondii* é obter frações puras dessas estruturas. O desenvolvimento de anticorpos direcionados às proteínas em outros parasitos protozoários como *Cryptosporidium* sp. e *Giardia* sp. facilitaram o desenvolvimento de

uma técnica de separação imunomagnética (SI) que tem sido amplamente empregada para detectar esses parasitos em amostras de água (USPHS/IDSA *et al.*, 2000) em que a água primeiramente é filtrada e, em seguida, há o uso de esferas magnéticas acopladas aos anticorpos direcionados aos parasitas.

A técnica de separação imunomagnética para oocistos e esporocistos de *T. gondii* também foi desenvolvida, mas apresentou baixa sensibilidade e eficiência quando utilizada com amostras de água turva (DUMETRE *et al.*, 2005; DUMETRE *et al.*, 2007). Um método aprimorado de SI para captura de oocistos de *T. gondii*, juntamente com qPCR, foi avaliado em framboesa e manjeriço contaminados com oocistos e obteve resultados promissores (HOHWEYER *et al.*, 2016).

O uso de separação magnética empregando-se lectina, em vez de anticorpos monoclonais, tem sido relatado para a separação de oocistos de *T. gondii* (HARITO *et al.*, 2017a; HARITO *et al.* 2017b); no entanto, o uso da separação magnética com lectina (LMS) para a detecção de oocistos do parasito em amostras de água exige procedimentos adicionais, incluindo o uso de qPCR, pois a SI pode resultar em ligação não específica das esferas magnéticas.

Recentemente, foi demonstrado que um anticorpo monoclonal designado K8/15-15, que se liga às paredes de cisto tecidual e esporocisto de *T. gondii* (GONDIM *et al.*, 2016). Esse anticorpo monoclonal (AcMo) também reconhece antígenos presentes na parede de cistos de coccídios relacionados, incluindo *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi* e *Hammondia heydorni*, bem como parede de esporocistos de *Cystoisospora felis*, *H. hammondi* e *H. heydorni* (GONDIM *et al.*, 2016). No presente estudo, descrevemos a técnica de SI para a obtenção de esporocistos purificados e cistos teciduais de *T. gondii*. A SI também foi qualitativamente testada para capturar cistos de *H. hammondi* e *H. heydorni* produzidos *in vitro*.

## 5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.4.1 Planejamento

Cistos teciduais de *T. gondii* produzidos em camundongos e cistos de *Hammondia spp.* gerados *in vitro* foram derivados de outro experimento (GONDIM *et al.*, 2016). O uso do AcMo K8/15-15 foi crucial para o estudo, uma vez que esse AcMo tem a capacidade de se ligar às paredes de cisto e esporocisto de *T. gondii*. Devido ao

número limitado de oocistos, cistos de *T. gondii* gerados *in vivo*, e cistos de *Hammondia spp.*, a SI desses estágios foram avaliadas qualitativamente. Os cistos de *T. gondii* produzidos *in vitro* capturados pela SI foram avaliados quantitativamente.

#### **5.4.2 Células hospedeiras, cepas de *T. gondii* e anticorpo monoclonal**

Células renais de macaco designadas Marc-145 (ATCC® CRL-12231) foram selecionadas para este estudo pois essas células resistiram às condições de estresse induzidas durante a cultura celular para a produção *in vitro* de cistos de *N. caninum* (RISCO-CASTILLO *et al.*, 2004). Três cepas de *T. gondii* foram utilizadas: ME49, P14/534 e TgCkBr284. Oocistos ME49 foram gerados conforme descrito por Dubey e colaboradores (2010) e foram armazenados por sete anos em 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 4°C. Oocistos P14/534 foram considerados oocistos frescos, pois foram excretados por um gato naturalmente infectado e armazenados somente por três semanas antes de serem utilizados no experimento. As fezes do gato foram enviadas por um laboratório privado para o instituto Friedrich-Loeffler-, Alemanha, e confirmado como *T. gondii* por uma PCR em tempo real específica (TALABANI *et al.*, 2009). Para a produção de cistos *in vitro* foi utilizada uma cepa isolada de galinha, designada TgCkBr284 (GONÇALVES *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2012).

#### **5.4.3 Cultura celular e produção *in vitro* de cistos teciduais**

Células Marc-145 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 1% de antibiótico/antimicótico (100U penicilina e 100µg de estreptomicina/ml) e 5 % de soro bovino inativado (Invitrogen / Gibco®, Auckland, NZ), à 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para produção de cisto *in vitro* de *T. gondii*, foram adicionadas 7x10<sup>5</sup> células Marc-145 em frascos de 25 cm<sup>2</sup> e, após 48 h, 7x10<sup>6</sup> taquizoítos do parasito foram adicionados ao frasco. Após 24 horas da infecção, as culturas foram transferidas para uma estufa sem suprimento de CO<sub>2</sub> e o meio de cultura foi substituído por meio alcalinizado (pH 8,1) pela adição de NaOH 1M. O meio alcalinizado foi substituído a cada 24 horas por quatro dias consecutivos. As monocamadas celulares foram tripsinizadas e, após o destacamento das células da superfície do frasco, a tripsina foi bloqueada pela adição de 2 ml de meio. O conteúdo de cada frasco foi transferido para um tubo de 15 ml. Alíquotas foram coletadas de cada tubo e colocadas em lâminas

revestidas com teflon para exame de imunofluorescência. Às amostras não submetidas à SI foram denominadas amostras "pré-captura". Os tubos de 15 ml foram então centrifugados (300 g, 24°C, sem freio), o sobrenadante descartado, e o sedimento utilizado para a SI.

#### **5.4.4 Esferas magnéticas e separador magnético de partículas**

Foram utilizadas esferas magnéticas com diâmetros de 4,5 µm revestidas com IgG de cabra anti IgG de camundongo (Dynabeads®, Invitrogen da Life Technologies). O volume mínimo de esferas por reação sugerido pelo fabricante é de 25 µl (~  $1 \times 10^7$  esferas), no entanto, foram utilizados 5 µl (~  $2 \times 10^6$  esferas) ou 10 µl (~  $4 \times 10^6$  esferas) da suspensão original das esferas por reação. Utilizou-se um separador magnético de partículas (MPG® 3-em-1 SPM®, Lincoln Park, EUA) que contém inserções para tubos de 1,5, 15 e 50 ml para atrair as esferas.

#### **5.4.5 Lavagem e acoplamento de esferas magnéticas ao anticorpo monoclonal K8/15-15**

O método usado para acoplar o AcMo às esferas magnéticas de IgG anti IgG de camundongo foi realizado de maneira semelhante à sugerida pelo fabricante. Algumas pequenas modificações e adaptações para tubos de 1,5 ml foram realizadas. O frasco de 5 ml contendo as esferas ( $4 \times 10^8$  esferas/ml) foi agitado em vórtex por 40 segundos e 25 µl (~ 1 a  $10^7$  esferas) foram transferidos para um tubo de centrífuga de 1,5 ml. As esferas foram suspensas em 1 ml de tampão de isolamento (PBS livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  com BSA à 0,1% e EDTA 2 mM, pH 7,4) e colocadas em um separador de partículas magnéticas (SPM) por 1 min. O sobrenadante foi descartado usando-se uma bomba de aspiração enquanto o tubo ainda estava no SPM. O tubo foi removido do SPM e as esferas ressuspensas com 25 µl de tampão de isolamento. Um volume de 200 µL de AcMo K8/15-15 diluído a 1:10 ou 1: 5 em tampão de isolamento foi homogeneizado com esferas (25 µl) e incubado a 7°C em um misturador com agitação suave dos tubos a cada 3-4 minutos durante 40 minutos. O tubo foi colocado no SPM por 1 minuto e o sobrenadante aspirado e descartado enquanto o tubo estava no SPM. O tubo foi removido do SPM e foram adicionados 1,5 ml de tampão de isolamento para lavar o excesso de anticorpos não ligados. O sobrenadante foi removido enquanto o tubo estava

conectado ao SPM usando-se uma pipeta. O passo de lavagem foi repetido uma vez. O tubo foi removido do SPM e as esferas suspensas com 1 ml de tampão de isolamento. A suspensão contendo as esferas acopladas ao AcMo foi armazenada a 4°C. No final do procedimento de acoplamento das esferas ao AcMo, o volume de esferas em 1 ml foi de  $6,4 \times 10^6$ , que foi dividido em frações de 200 µl ( $1,26 \times 10^6$  esferas por alíquota) para as etapas subsequentes.

#### **5.4.6 Tratamento de oocistos para SI**

Dois experimentos semelhantes (A e B) foram realizados utilizando-se oocistos. No experimento A, foram empregados oocistos armazenados a longo prazo, e no experimento B, oocistos frescos. No experimento A, os oocistos foram submetidos a quatro procedimentos diferentes: 1) oocistos intactos ou não tratados; 2) oocistos tratados com hipoclorito de sódio; 3) uma mistura de oocistos quebrados contendo paredes de oocistos, paredes de esporocistos e esporocisto intacto; 4) esporocistos purificados por gradientes de iodixanol (EVERSON *et al.*, 2002). Nos procedimentos 1, 2 e 3 foi utilizada a mesma concentração de oocistos ( $1 \times 10^6$  no total, sendo  $2,65 \times 10^5$  oocistos esporulados) para cada tratamento. No experimento B, os oocistos frescos foram processados da mesma forma que no experimento A, contudo, o procedimento 4 (pré-purificação de esporocistos usando iodixanol) não foi realizado. O número de oocistos utilizados em cada tratamento correspondeu a  $7 \times 10^5$  oocistos, sendo  $3,5 \times 10^5$  oocistos esporulados.

No procedimento 1 do experimento A, os oocistos foram suspensos em 200 µl de tampão de isolamento sem tratamento adicional. No procedimento 2, os oocistos foram suspensos em 200 µl de PBS, misturados com a mesma quantidade de uma solução a 10% de hipoclorito de sódio (Sigma-Aldrich, Noruega) e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. A suspensão foi lavada três vezes em PBS e o sedimento final foi suspenso em tampão de isolamento. No procedimento 3, os oocistos foram rompidos pela adição de esferas de vidro de 0,25 a 0,55 mm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemanha) seguido de vórtex por 2,5 minutos à velocidade máxima e centrifugação do sobrenadante. Os oocistos rompidos no procedimento 3 foram então ressuspensos em 200 µl de tampão de isolamento.

No procedimento 4, os esporocistos foram isolados a partir de oocistos usando-se gradientes de iodixanol de acordo com os métodos descritos por Everson e

colaboradores (2002) e modificado por Dumetre e colaboradores (2005). Resumidamente, os oocistos foram suspensos em 500 µl de iodixanol a 30% (Optiprep, Sigma-Aldrich, Noruega) e tampão de sacarose (sacarose 250 mM contendo tris-HCl 15 mM, pH 7,5), adicionado a tubo de 1,5ml contendo 400 µl de esferas de vidro de 0,25-0,55 mm e agitado em vórtex por 2,5 minutos na velocidade máxima. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 15 ml e as esferas restantes foram lavadas duas vezes com 1 ml da solução de iodixanol a 30% (v/v). O sobrenadante (2 ml) foi adicionado ao tubo de 15 ml, totalizando 2,5 ml de oocistos rompidos em iodixanol a 30%. Esta solução foi revestida por frações de 2,5 ml das seguintes soluções: 25, 20, 15 e 5% (v / v) de iodixanol em tampão de sacarose. Os esporocistos e oocistos não esporulados foram coletados na interface das soluções de iodixanol a 5% e 15%. O total de esporocistos correspondeu a  $2 \times 10^5$  esporocistos.

#### *5.4.6.1 Separação imunomagnética utilizando-se oocistos e esporocistos (método direto)*

Os oocistos e suas frações foram suspensos em 200 µl de tampão de isolamento, como descrito acima. Cada fração foi acondicionada em tubo contendo 200 µl de esferas magnéticas acopladas ao AcMo K8/15-15. O tubo foi incubado por 20 minutos à 7°C em um misturador automático com agitação suave dos tubos a cada 3-4 minutos. Em seguida os tubos foram alocados no SM por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado por aspiração. O tubo foi removido do SM e foi adicionado 1 ml de tampão de isolamento. Para o isolamento dos esporocistos a solução foi homogeneizada no vórtex por 3 segundos. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Este passo de lavagem associado ao vórtex ou pipetagem foi repetido duas vezes. O tubo foi removido do SM e as esferas suspensas em 200 µl de PBS (para oocistos e esporocistos). Alíquotas de 10 µl de cada reação foram observadas em um microscópio Nikon Eclipse-Ti-U com ampliações de 200, 400 e 600 ×. As imagens foram analisadas usando-se microscopia de luz e iluminação por luz ultravioleta para autofluorescência de oocistos e esporocistos.

Os esporocistos acoplados às esferas foram separados como descrito por Dumetre e colaboradores (2005). Resumidamente, o complexo esporocisto/esfera foi alocado no SM por 2 minutos e após esse tempo o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% e o tubo agitado em vórtex por 30 segundos. Em

seguida, o tubo foi incubado em temperatura ambiente durante 30 minutos e, posteriormente, agitado em vórtex por 1 minuto. O tubo foi colocado no SM novamente por 2 minutos e o sobrenadante utilizado. Alíquotas do sobrenadante foram observadas microscopicamente como descrito acima.

#### **5.4.7 Separação imunomagnética de cistos produzidos em camundongos e cistos de coccídios relacionados**

Dois camundongos C57 foram inoculados intraperitonealmente com dois cistos de *T. gondii* (cepa ME49). Quatro meses depois, os camundongos foram eutanasiados e seus cérebros removidos assepticamente. Cada cérebro foi misturado com 1 ml de PBS/T (0,05% de Tween 20) e os cistos teciduais foram quantificados por contagem microscópica de três alíquotas de 10 µl da suspensão cerebral em uma lâmina de vidro com uma lamínula (ampliação de 200 ×).

Os cistos teciduais foram concentrados por gradientes de Percoll como relatado na literatura (BLEWETT *et al.*, 1983; BUCHHOLZ *et al.*, 2011). Resumidamente, 1 ml de suspensão cerebral foi alocado em tubo de 15 ml com 10 ml de PBS/T (Tween 20 a 0,05%). Em seguida, foram adicionados ao fundo do tubo com uma seringa e agulha 1,5 ml de Percoll a 30% em PBS/T e 1,5 ml de Percoll a 90% em PBS/T. O tubo foi, então, centrifugado a 1500 g à 4 °C por 15 minutos e, após a centrifugação, o conteúdo dos gradientes de Percoll a 30 e 90% foi coletado, adicionado a um tubo de 50 ml e preenchido com PBS. O tubo foi centrifugado por 1200 g por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 200 µl de PBS.

Os cistos purificados por gradientes de Percoll foram misturados com 200 µl de tampão de isolamento e cada fração de cistos foi acondicionada em tubo de 1,5 ml contendo 200 µl de esferas magnéticas acopladas ao AcMo K8/15-15. O tubo foi incubado por 20 minutos a 7°C em um misturador automático. Cada tubo foi colocado no SM por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado por aspiração. O tubo foi removido em seguida do SM e 1 ml de tampão de isolamento foi adicionado ao tubo. A solução foi homogeneizada por pipetagens suaves e o tubo colocado novamente no SM por 2 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi aspirado e descartado. Esse passo de lavagem foi repetido duas vezes. Após as lavagens, o tubo foi removido do SM e as esferas suspensas com 100 µL de PBS. Uma alíquota de 10 µl foi observada em

microscópio Nikon Eclipse-Ti com ampliações de 200, 400 e 600 × e as imagens foram analisadas por microscopia de contraste de fase.

Os cistos teciduais de *H. hammondi* e *H. heydorni* foram gerados em uma linhagem celular finita de embriões de bovinos (KH-R; Friedrich-Loeffler-Institut, linhagem celular RIE 090), como descrito anteriormente (GONDIM *et al.*, 2016). Em resumo, os sobrenadantes dos frascos de 25 cm<sup>2</sup> contendo culturas de *H. hammondi* e *H. heydorni* foram aspirados individualmente e centrifugados a 200 g por 10 minutos. O pellet foi suspenso com 200 µl de tampão de isolamento e adicionado à 400 µl de esferas magnéticas acopladas ao AcMo K8/15-15. O material foi incubado em temperatura ambiente por 30 minutos em agitação contínua e, após esta etapa, colocado no SM. O sobrenadante foi descartado e as esferas foram novamente suspensas em 100 µl de tampão de isolamento. Duas alíquotas de 10 µl cada foram observadas ao microscópio. Uma amostra de cistos de *H. heydorni* foi examinada por imunofluorescência, conforme descrito na seção 5.4.6, contudo não foi utilizado IgG anti-camundongo conjugado à fluoresceína, e sim, IgG anti-camundongo com fluorocromo vermelho (Alexa fluor 555, Invitrogen).

#### **5.4.8 Separação imunomagnética de cistos produzidos *in vitro***

A SI para cistos de *T. gondii* produzidos *in vitro* foi testada por métodos direto e indireto, cada um avaliado em duas temperaturas (4°C e 24°C), no total de quatro testes. Esses testes também foram avaliados utilizando-se células hospedeiras não infectadas (pré e pós SI) para testar a especificidade do método. A contagem das células antes e após a SI foi realizada em câmara de Neubauer.

##### *5.4.8.1 Captura de cistos produzidos in vitro pelo método direto (teste 1 e 2)*

O AcMo K8/15-15 foi diluído 1:10 em tampão de isolamento (200 µl) e foi incubado com 20 µl de esferas magnéticas em tubo de 1,5 ml. O tubo foi acoplado a um misturador orbital automático, onde permaneceu por 40 minutos à 4°C (teste 1) ou 24 °C (teste 2), seguido pela colocação do tubo no SM por 1 minuto. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o tubo removido do SM. Adicionou-se ao tubo 1,5ml de tampão de isolamento e o conteúdo foi homogeneizado por pipetagens suaves. O tubo foi novamente alocado no SM e, após 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e o passo

de adição e remoção do tampão de isolamento foi repetido como descrito acima. Posteriormente as esferas acopladas ao AcMo K8/15-15 foram suspensas em 1 ml de tampão de isolamento e armazenadas num tubo estéril de 1,5 ml a 4°C.

Pellets contendo células Marc-145 não infectadas e cistos de *T. gondii* produzidos *in vitro* foram adicionados a 250 µl de tampão de isolamento e 250 µl de esferas magnéticas acopladas ao AcMo K8/15-15. Cada suspensão foi colocada num tubo de 1,5 ml. Os tubos permaneceram à 4°C (teste 1) ou 24°C (teste 2) por 20 minutos em misturador automático e, em seguida, foram colocados no SM por 2 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o conteúdo atraído por magnetismo permaneceu no tubo. Os tubos foram removidos do SM e 1 ml de tampão de isolamento foi suavemente adicionado ao tubo. O conteúdo foi homogeneizado pipetando suavemente a solução por três vezes. Os tubos foram colocados novamente no SM por 1 minuto e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram submetidos novamente à lavagem, adicionando-se e removendo-se o tampão de isolamento, e com o uso do SM. Após a lavagem, as estruturas atraídas pelo SM foram homogeneizadas com 100 µl de PBS e, posteriormente, foram retirados 30 µl de cada tubo, que foram colocados em três poços de lâminas revestidas com teflon para análise por imunofluorescência.

#### 5.4.8.2 Captura de cistos produzidos *in vitro* pelo método indireto (testes 3 e 4)

Foram adicionados 500 µl de tampão de isolamento e 5 µl de AcMo K8/15-15 a cada pellet contendo cistos de *T. gondii* produzidos *in vitro*, e células Marc-145, em tubos de 1,5ml. Os tubos foram acondicionados em misturador orbital automático à 4 °C (teste 3) ou 24 °C (teste 4) por 10 minutos e, em seguida, 1 ml de tampão de isolamento foi adicionado a cada tubo. Os tubos foram centrifugados em seguida (400 g, 4 °C ou 2 °C, sem freio) por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e cada pellet foi suspenso com 200 µl de tampão de isolamento e 5 µl de esferas lavadas. Os tubos foram novamente acoplados em misturador automático à 4°C (teste 3) ou 24 °C (teste 4) por 20 minutos e, em seguida, 1 ml de tampão de isolamento foi adicionado a cada tubo, seguido pela colocação dos tubos no SM por 2 minutos. Após esse período, o conteúdo não aderido à parede do SM foi descartado e o tubo retirado do SM.

Posteriormente adicionou-se 1 ml de tampão de isolamento suavemente ao tubo. O conteúdo foi ressuspensão pipetando gentilmente a solução três vezes. Os tubos foram colocados novamente no SM por 1 minuto e, em seguida, o sobrenadante com conteúdo não ligado foi coletado e descartado. Os tubos foram submetidos novamente à lavagem adicionando e removendo o tampão de isolamento e usando o SM. Após a lavagem, o material restante foi homogeneizado com 100 µL de PBS. De cada tubo foi retirado 30 µl e colocado em três poços de lâminas revestidas com teflon para análise de imunofluorescência.

#### **5.4.9 Imunofluorescência**

Lâminas revestidas com teflon, contendo 12 poços de 5 mm de diâmetro cada, foram usadas nas reações de imunofluorescência. Os poços foram preenchidos com suspensões de 10µl de células hospedeiras contendo cistos de *T. gondii* antes da captura e após a captura por SI. A lâmina foi seca por 15 min a 37 °C e armazenada a -20 °C até análise. Para a reação de imunofluorescência, a lâmina foi fixada em acetona durante 5 minutos, imersa em PBS por 10 minutos e seca à temperatura ambiente. O anticorpo primário (AcMo K8/15-15) diluído a 1: 2 em PBS foi adicionado aos poços e a lâmina foi incubada em câmara úmida à 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, a lâmina foi imersa em tampão de lavagem (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 100 mM e NaCl 35 mM, pH 9,0) por 10 minutos, seguido de uma lavagem em PBS por 10 minutos. A lâmina foi seca à temperatura ambiente e o anticorpo secundário (FITC anti-IgG de camundongo, Sigma Aldrich, EUA) foi aplicado na diluição de 1:50 com 0,05% de azul de Evans. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos e lavadas como descrito para o anticorpo primário. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e montadas com glicerina (90% de glicerol e 10% de PBS) e lamínula de vidro. As reações foram analisadas em microscópio Nikon e software Nikon NIS-Elements.

#### **5.4.10 Análise estatística**

A captura imunomagnética para cistos produzidos *in vitro* foi realizada em quadruplicata, resultando em um total de 16 frascos de cultura para os testes 1, 2, 3 e 4. A razão cisto/células hospedeiras foi determinada para as amostras de pré-captura após análise de cinco campos microscópicos (aumento de 600 ×) por imunofluorescência.

Cada amostra pré-captura e pós-captura foi avaliada em triplicata, resultando em 96 amostras. O teste de Kruskal-Wallis foi empregado para comparar as amostras pré e pós-captura. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quanto  $p < 0,05$ .

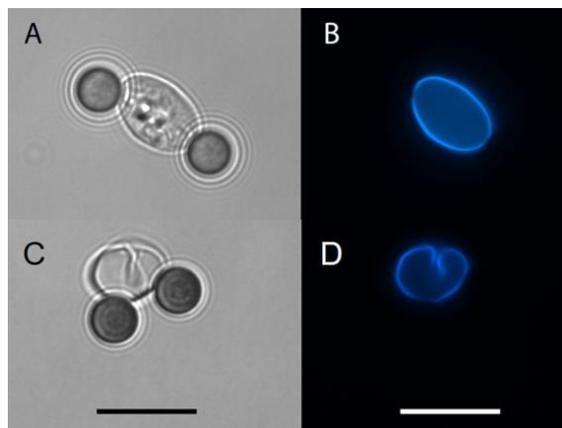
## 5.5 RESULTADOS

### 5.5.1 Separação imunomagnética de esporocistos

As esferas magnéticas acopladas ao AcMo K8/15-15 se ligaram especificamente às paredes dos esporocistos sob diferentes protocolos, independentemente do tempo de armazenamento (três semanas ou sete anos). Quando os esporocistos obtidos a partir de oocistos armazenados a longo prazo foram purificados usando gradientes de iodixanol, a solução apresentou 10-20% de oocistos não esporulados. Não houve ligação com oocistos não esporulados, apenas esporocistos foram capturados pelas esferas.

As esferas acopladas ao AcMo foram testadas com amostra contendo oocistos fragmentados e observou-se que as esferas se ligaram especificamente aos esporocistos intactos e às paredes vazias de esporocistos (Figura 1). Não foi observada ligação às outras frações como, por exemplo, oocistos esporulados intactos, oocistos não esporulados ou paredes vazias de oocistos. Oocistos tratados com hipoclorito de sódio, que não contêm suas paredes externas, não foram ligados pelas esferas. Não foi observada diferença na capacidade de ligação das esferas aos esporocistos derivados de oocistos armazenados a longo prazo (cepa ME49) em comparação com esporocistos obtidos de oocistos frescos (P14 / 534).

**Figura 1.** Esporocistos de *Toxoplasma gondii* ligados às esferas magnéticas contendo AcMo K8/15-15. (A) Duas esferas magnéticas ligadas a um esporocisto intacto. (B) Autofluorescência do esporocisto intacto sob excitação ultravioleta. (C) Esporocisto de *T. gondii* rompido mecanicamente sem esporozoítos no interior. (D) Autofluorescência da parede do esporocisto sob excitação ultravioleta. Barras = 10µm.



Fonte: REZENDE-GONDIM *et al.*, 2020

A ligação das esferas aos esporocistos ocorreu em todas as regiões da parede dos esporocistos. Observou-se que os esporocistos se ligaram a uma única esfera ou a várias esferas ao mesmo tempo. A ligação esfera-esporocisto foi rompida após a combinação de vórtex e incubação com ácido sulfúrico a 2%, levando a uma solução com esporocistos ou paredes de esporocistos altamente purificados.

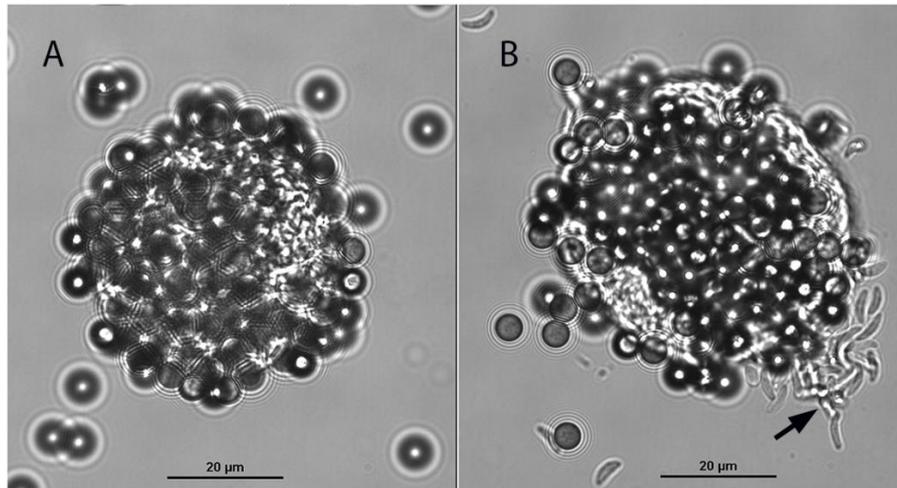
### 5.5.2 Separação imunomagnética de cistos de *T. gondii* oriundos de camundongos

Cistos teciduais (n = 100 ou 1060) foram obtidos de dois camundongos infectados cronicamente. Cerca de 50% dos cistos foram recuperados após purificação usando gradientes de Percoll. A suspensão resultante com cistos purificados (n = 500-600) continha aproximadamente nove eritrócitos de camundongo por cisto. Após a incubação com as esferas, a amostra foi diluída com 100 µl ou 200 µl de PBS para facilitar a visualização microscópica do complexo cisto/esfera. Foi observada a ligação das esferas às superfícies dos cistos por completo. Para visualizar melhor os cistos e para garantir que eles eram realmente cistos e não artefatos, a lamínula foi pressionada mecanicamente contra a lâmina de vidro. A pressão na lamínula ocasionou a remoção de algumas esferas ligadas à parede do cisto e a ruptura do cisto, induzindo a liberação

de bradizoítos (Figura 2). Não foram observados eritrócitos de camundongo na amostra após SI.

**Figura 2.** Cisto de *Toxoplasma gondii* ligado às esferas magnéticas acopladas ao AcMo K8/15-15.

(A) As esferas cobrem a maior parte da superfície do cisto. (B) O mesmo cisto mostrado em A foi rompido mecanicamente, pressionando-se a lamínula contra a lâmina de vidro; note que algumas esferas desligaram-se das paredes do cisto e numerosos bradizoítos (seta preta) foram liberados do cisto.

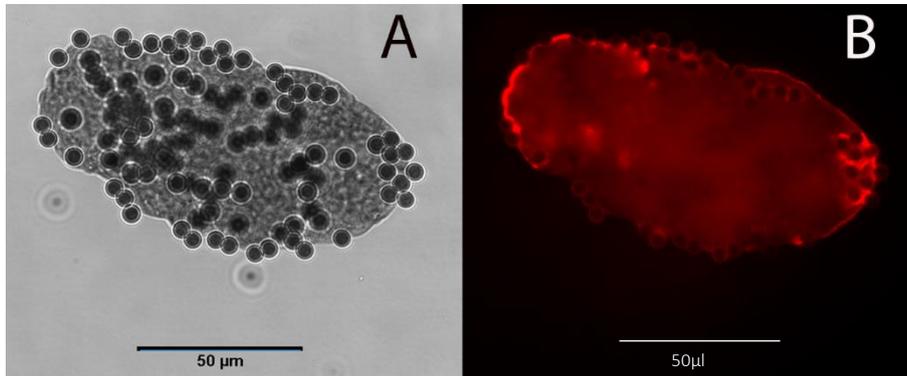


Fonte: REZENDE-GONDIM *et al.*, 2020

### 5.5.3 Separação imunomagnética de cistos de *H. hammondi* e *H. heydorni*

Os cistos teciduais de *H. hammondi* e *H. heydorni* foram obtidos de sobrenadantes de células cardíacas bovinas (KH-R) infectadas com esporozoítos dos parasitos. Após a SI as esferas magnéticas ligadas aos cistos de ambos os parasitos foram suspensas em 100µl de PBS. Alíquotas de 10 µl continham aproximadamente 7 a 10 cistos, que variavam em dimensões. A imunofluorescência foi realizada usando cistos capturados de *H. heydorni* (Figura 3).

**Figura 3.** Cisto de *Hammondia heydorni* produzido em cultura celular e capturado por esferas magnéticas acopladas ao AcMo K8/15-15. (A) O cisto capturado observado em campo claro. (B) Imunofluorescência utilizando-se o AcMo K8/15-15 e marcação em cor vermelha na parede cística do parasito.

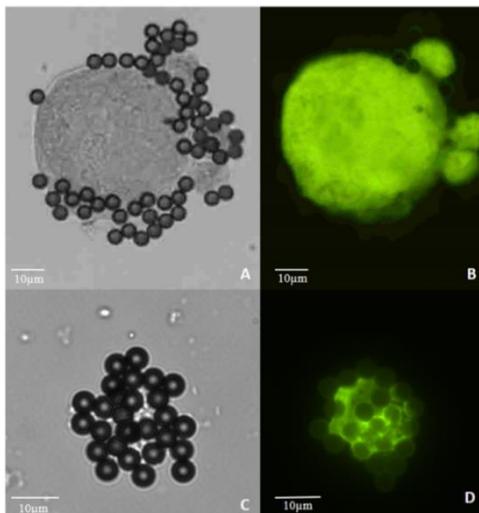


Fonte: REZENDE-GONDIM *et al.*, 2020

#### 5.5.4 Separação imunomagnética de cistos de *T. gondii* produzidos *in vitro*

A relação cisto/célula hospedeira para amostras pré-captura foi obtida após a leitura de cinco campos microscópicos. A relação para amostras pré-captura foi determinada após a leitura de todo os poços. Os cistos capturados exibiram fluorescência e as esferas magnéticas ligaram-se às suas paredes (Figura 4).

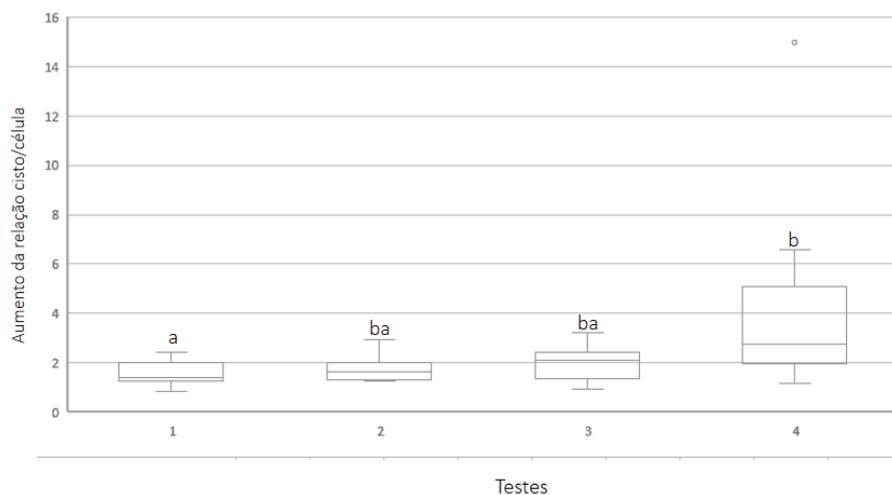
**Figura 4.** Cistos de *Toxoplasma gondii* produzidos *in vitro* capturados por esferas magnéticas acopladas ao anticorpo monoclonal K8/15-15. (A e C) Microscopia de luz. (B e D) Imunofluorescência.



Fonte: REZENDE-GONDIM *et al.*, 2020

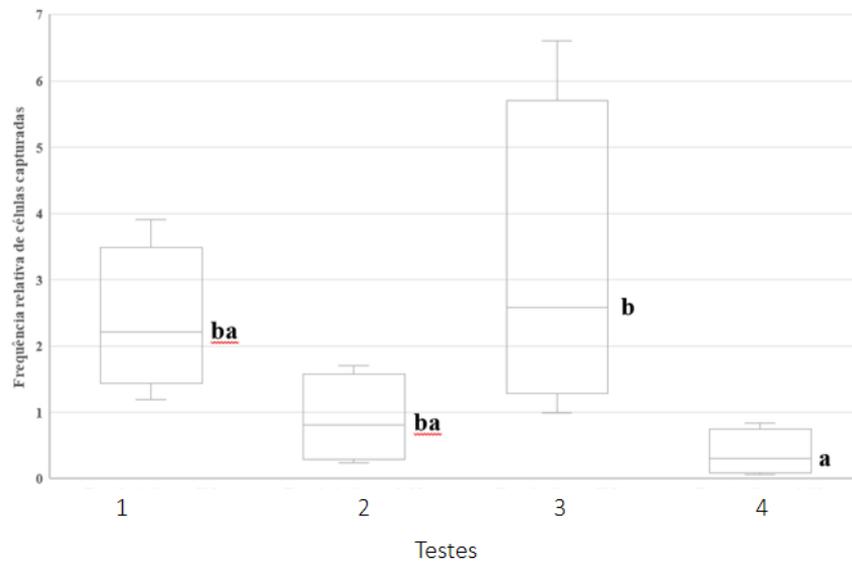
Todos os métodos de SI (testes 1, 2, 3 e 4) empregados no presente estudo mostraram aumentos significativos da relação cisto/célula hospedeira, atingindo um aumento máximo de 3,78 vezes no teste 4. Foi observada diferença estatística entre o teste 4 e o teste 1, contudo não houve diferença estatística entre os testes 2, 3 e 4 (Figura 5). A mediana dos cistos teciduais isolados em cada teste (4 frascos por teste) correspondeu a 305 (teste 1), 610 (teste 2), 480 (teste 3) e 2170 (teste 4). A captura inespecífica também foi avaliada e baseou-se na ligação das esferas magnéticas às células hospedeiras não infectadas (Marc-145). Em todos os testes, foi observado algum grau de ligação não específica. No teste 3, um número maior de células hospedeiras foi capturada em comparação com o teste 4 (Figura 6). O tempo dispendido para a realização dos métodos indireto e direto foram de 1h e 1h10 min, respectivamente.

**Figura 5.** Valores mínimos, medianas e valores máximos do número de vezes que a relação cisto/célula foi aumentada após a captura de acordo com os testes. Box seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).



Fonte: REZENDE-GONDIM *et al.*, 2020

**Figura 6.** Frequências relativas de células não infectadas capturadas após o protocolo em função do teste utilizado. Caixas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).



Fonte: REZENDE-GONDIM *et al.*, 2020

## 5.6 DISCUSSÃO

Foi descrito nesse capítulo um método de SI para isolamento de esporocistos e cistos de *T. gondii* usando um único AcMo IgG-murino. Demonstrou-se que as esferas magnéticas ligadas ao AcMo se ligam às paredes de esporocistos, bem como às paredes de cistos do parasito. Este é o primeiro método de SI direcionado para cistos de *T. gondii*. As mesmas esferas ligadas ao AcMo também capturaram com sucesso cistos de *H. hammondi* e *H. heydorni* produzidos em cultura celular.

Um método para obter oocistos altamente purificados utilizando gradientes de cloreto de céσιο foi relatado por Dumetre e colaboradores (2004), sendo a técnica muito útil para purificar um grande número de oocistos do parasito. A separação de frações de oocisto, bem como paredes e esporocistos de oocisto, pode ser realizada através do uso de gradientes de iodixanol ou Percoll (EVERSON *et al.*, 2002). Usando gradientes de iodixanol é possível obter um alto nível de purificação de esporocistos, contudo os oocistos não esporulados flutuam na mesma densidade que os esporocistos e são isolados na mesma interface de gradiente resultando em uma suspensão rica em

esporocistos com alguma contaminação de oocistos não esporulados (EVERSON *et al.*, 2002).

Até a elaboração dessa tese três métodos de SI foram desenvolvidos para detectar oocistos ou esporocistos de *T. gondii* em amostras contaminadas. No primeiro método, os autores realizaram uma ligação indireta utilizando um AcMo IgM direcionado para a parede de oocisto de *T. gondii*, contudo quando o método foi testado com água turva contendo detritos observou-se ligações não específicas aos detritos pelas esferas magnéticas (DUMETRE *et al.*, 2005). No segundo método, descrito também por Dumetre e colaboradores (2007), foi utilizado um AcMo-IgM direcionado para a parede de esporocisto de *T. gondii*. Nesse segundo método a captura foi realizada de forma direta, ou seja, as esferas magnéticas foram primeiramente acopladas ao AcMo seguido da adição da amostra teste, sendo necessária a sonicação da amostra, pois os esporocistos precisam ser liberados dos oocistos antes da adição das esferas magnéticas. Além disso, os esporocistos de coccídios relacionados, como *N. caninum* e *Hammondia* sp., também foram reconhecidos pelo AcMo, exigindo assim análise adicional das amostras por PCR. O terceiro método de SI consistiu em uma melhoria do método anterior mostrando resultados promissores para a detecção de oocistos em framboesas e manjeriço contaminados (HOHWEYER *et al.*, 2016).

A SI de cistos de *T. gondii* no presente trabalho foi testada pelo métodos direto e indireto, cada um avaliado em duas temperaturas. O método indireto, que consistiu na adição do AcMo à suspensão celular seguido pela inclusão das esferas magnéticas na reação, apresentou o melhor desempenho. A proporção de cisto/célula hospedeira aumentou significativamente usando o método indireto à 24°C. Embora o método indireto à 24°C (teste 4) não tenha diferido estatisticamente do método indireto à 4°C (teste 3), o último (teste 3) mostrou uma ligação inespecífica significativa às células Marc-145.

Algumas técnicas foram desenvolvidas por outros pesquisadores para obter oocistos de *T. gondii* altamente purificados, fragmentos de oocisto e cistos produzidos *in vivo* e/ou *in vitro*. Cornelissen e colaboradores (1981) desenvolveram uma técnica de purificação de cistos teciduais oriundos de cérebro de camundongos usando gradientes de Percoll. Uma grande recuperação dos cistos teciduais foi alcançada com esse método, realizado em diferentes versões e aplicado para isolar cistos teciduais de outras espécies animais, além de camundongos (BLEWETT *et al.*, 1983; BUCHHOLZ *et al.*, 2011).

Os cistos isolados obtidos pelos gradientes de Percoll são bastante puros, com alguma contaminação com glóbulos vermelhos, sendo que essa contaminação geralmente não representa um problema na maioria das aplicações, contudo, as proteínas dos eritrócitos podem causar alguma interferência nos estudos proteômicos envolvendo cistos teciduais. Um método refinado para purificar cistos de *T. gondii* foi desenvolvido e direcionado a uma glicoproteína localizada no cisto denominada CST1 (ZHANG *et al.*, 2010). Esses autores haviam demonstrado anteriormente que aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) se liga à CST1 na parede do cisto de *T. gondii* (ZHANG *et al.*, 2001). Esferas magnéticas foram, então, acopladas à DBA e foram capazes de se ligar em paredes de cistos rompidos mecanicamente produzidos *in vitro* e *in vivo* (ZHANG *et al.*, 2010).

A SI descrita nessa tese representa um método único que combina a capacidade de separar esporocistos ou cistos de *T. gondii*. Como mostrado acima, quando os esporocistos foram isolados por esse método, não houve contaminação com paredes de oocistos, oocistos “branqueados”, não esporulados, quebrados ou intactos. Também não observamos a ligação do complexo esfera-AcMo aos detritos presentes no sedimento de oocistos, pois normalmente estão presentes após a flutuação com sacarose. O AcMo usado nesse trabalho pertence a classe IgG, o que parece minimizar a ligação não específica do AcMo em detritos, conforme testado em um método de separação imunomagnética anteriormente para captura de oocistos de *T. gondii* utilizando anticorpos IgM (DUMETRE *et al.*, 2005).

Os cistos teciduais são maiores e mais frágeis que os esporocistos, portanto, a lavagem do complexo cisto/esfera e esporocisto/esfera foi realizado de maneira diferente. Para a lavagem do complexo com esporocisto foi utilizado o vórtex, porém como esse equipamento pode danificar os cistos, a lavagem do complexo com os cistos foi realizada pipetando a amostra usando pipetas automáticas de 1 ml.

## 5.7 CONCLUSÃO

Um método de SI baseado no uso de um AcMo IgG que reconhece parede de cisto tecidual e esporocisto de *T. gondii* foi elaborado. A SI descrita permite isolar cistos produzidos em cultura de células, bem como frações purificadas de esporocistos e paredes de esporocistos quando oocistos são usados como material de partida. Os procedimentos aqui relatados deverão facilitar a identificação de moléculas nas paredes dos esporocistos e cistos de *T. gondii*.

## 5.8 REFERÊNCIAS

1999 USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. U.S. Public Health Service (USPHS) and Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Dis Obstet Gynecol* **2000**, *8*, 5-74, doi:10.1155/S1064744900000028.

Blewett, D.A.; Miller, J.K.; Harding, J. Simple technique for the direct isolation of toxoplasma tissue cysts from fetal ovine brain. *Vet Rec* **1983**, *112*, 98-100.

Buchholz, K.R.; Fritz, H.M.; Chen, X.; Durbin-Johnson, B.; Rocke, D.M.; Ferguson, D.J.; Conrad, P.A.; Boothroyd, J.C. Identification of tissue cyst wall components by transcriptome analysis of in vivo and in vitro *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *Eukaryot Cell* **2011**, *10*, 1637-1647, doi:10.1128/EC.05182-11.

Cornelissen, A.W.; Overdulve, J.P.; Hoenderboom, J.M. Separation of *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii* cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. *Parasitology* **1981**, *83*, 103-108.

Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* **1998**, *11*, 267-299.

Dubey, J.P.; Dubey, J.P. *Toxoplasmosis of animals and humans*; Taylor & Francis: Boca Raton, **2010**.

Dumetre, A.; Darde, M.L. Purification of *Toxoplasma gondii* oocysts by cesium chloride gradient. *J Microbiol Methods* **2004**, *56*, 427-430, doi:10.1016/j.mimet.2003.11.020.

Dumetre, A.; Darde, M.L. Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. *J Microbiol Methods* **2005**, *61*, 209-217, doi:10.1016/j.mimet.2004.11.024.

Dumetre, A.; Darde, M.L. Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. *Parasitol Res* **2007**, *101*, 989-996, doi:10.1007/s00436-007-0573-0.

Dumetre, A.; Dubey, J.P.; Ferguson, D.J.; Bongrand, P.; Azas, N.; Puech, P.H. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *PNAS* **2013**, *110*, 11535-11540, doi:10.1073/pnas.1308425110.

Everson, W.V.; Ware, M.W.; Dubey, J.P.; Lindquist, H.D. Isolation of purified oocyst walls and sporocysts from *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* **2002**, *49*, 344-349.

Ferguson, D.J.; Birch-Andersen, A.; Siim, J.C.; Hutchison, W.M. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. II. Formation of the sporocyst and structure of the sporocyst wall. *Acta Pathol Microbiol Scand. Section B, Microbiology* **1979**, *87B*, 183-190.

Goncalves, I.N.; Uzeda, R.S.; Lacerda, G.A.; Moreira, R.R.; Araujo, F.R.; Oliveira, R.H.; Corbellini, L.G.; Gondim, L.F. Molecular frequency and isolation of cyst-forming coccidia from free ranging chickens in Bahia State, Brazil. *Vet Parasitol* **2012**, *190*, 74-79, doi:10.1016/j.vetpar.2012.05.007.

Gondim, L.F.; Wolf, A.; Vrhovec, M.G.; Pantchev, N.; Bauer, C.; Langenmayer, M.C.; Bohne, W.; Teifke, J.P.; Dubey, J.P.; Conraths, F.J., *et al.* Characterization of an IgG

monoclonal antibody targeted to both tissue cyst and sporocyst walls of *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* **2016**, *163*, 46-56, doi:10.1016/j.exppara.2016.01.014/S0014-4894(16)30014-5 [pii].

Harito, J.B.; Campbell, A.T.; Tysnes, K.R.; Dubey, J.P.; Robertson, L.J. Lectin-magnetic separation (LMS) for isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts from concentrated water samples prior to detection by microscopy or qPCR. *Water Res* **2017**, *114*, 228-236, doi:10.1016/j.watres.2017.02.044.

Harito, J.B.; Campbell, A.T.; Tysnes, K.R.; Robertson, L.J. Use of lectin-magnetic separation (LMS) for detecting *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental water samples. *Water Res* **2017**, *127*, 68-76, doi:10.1016/j.watres.2017.10.012.

Hill, D.E.; Chirukandoth, S.; Dubey, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev* **2005**, *6*, 41-61, doi:10.1079/AHR2005100

Hohweyer, J.; Cazeaux, C.; Travaille, E.; Languet, E.; Dumetre, A.; Aubert, D.; Terryn, C.; Dubey, J.P.; Azas, N.; Houssin, M., *et al.* Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiol* **2016**, *57*, 36-44, doi:10.1016/j.fm.2016.01.002.

Ito, S.; Tsunoda, K.; Shimada, K.; Taki, T.; Matsui, T. Disinfectant effects of several chemicals against *Toxoplasma* oocysts. *Nihon juigaku zasshi. Jpn J Vet Sci* **1975**, *37*, 229-234.

Risco-Castillo, V.; Fernandez-Garcia, A.; Ortega-Mora, L.M. Comparative analysis of stress agents in a simplified in vitro system of *Neospora caninum* bradyzoite production. *J Parasitol* **2004**, *90*, 466-470.

Robert-Gangneux, F.; Darde, M.L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* **2012**, *25*, 264-296, doi:10.1128/CMR.05013-11

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* **2018**, 10.1645/18-9, doi:10.1645/18-9.

Schares, G.; Herrmann, D.C.; Beckert, A.; Schares, S.; Hosseininejad, M.; Pantchev, N.; Globokar Vrhovec, M.; Conraths, F.J. Characterization of a repetitive DNA fragment in *Hammondia hammondi* and its utility for the specific differentiation of *H. hammondi* from *Toxoplasma gondii* by PCR. *Mol Cell Probes* **2008**, 22, 244-251, doi:10.1016/j.mcp.2008.04.003.

Talabani, H.; Asseraf, M.; Yera, H.; Delair, E.; Ancelle, T.; Thulliez, P.; Brezin, A.P.; Dupouy-Camet, J. Contributions of IMUNOBLOTting, real-time PCR, and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. *J Clin Microbiol* **2009**, 47, 2131-2135, doi:10.1128/JCM.00128-09.

Tomita, T.; Sugi, T.; Yakubu, R.; Tu, V.; Ma, Y.; Weiss, L.M. Making Home Sweet and Sturdy: *Toxoplasma gondii* ppGalNAc-Ts Glycosylate in Hierarchical Order and Confer Cyst Wall Rigidity. *MBio* **2017**, 8, doi:10.1128/mBio.02048-16.

Wainwright, K.E.; Miller, M.A.; Barr, B.C.; Gardner, I.A.; Melli, A.C.; Essert, T.; Packham, A.E.; Truong, T.; Lagunas-Solar, M.; Conrad, P.A. Chemical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *J Parasitol* **2007**, 93, 925-931, doi:10.1645/GE-1063R.1.

Zhang, Y.W.; Halonen, S.K.; Ma, Y.F.; Wittner, M.; Weiss, L.M. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect Immun* **2001**, 69, 501-507, doi:10.1128/IAI.69.1.501-507.2001.

Zhang, Y.W.; Halonen, S.K.; Ma, Y.F.; Tanowitz, H.B.; Weiss, L.M. A Purification Method for Enrichment of the *Toxoplasma gondii* Cyst Wall. *J Neuroparasitology* **2010**, 1, doi:10.4303/jnp/N101001.

## **6. CAPÍTULO 02: CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNA DE *TOXOPLASMA GONDII***

### **6.1 RESUMO**

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular distribuído em todo o mundo, que infecta cerca de um terço da população mundial. Os cistos teciduais do parasito, encontrados em infecções latentes, têm papel importante na transmissão de *T. gondii*. Recentemente, foi caracterizado um anticorpo monoclonal denominado K8/15-15, que reconhece antígenos nas paredes de cistos e esporocistos do parasito. No estudo corrente, objetivamos isolar a proteína alvo reconhecida pelo AcMo K8/15-15. Para a concentração desse antígeno, uma grande quantidade de cistos foi produzida em cultura celular com uma cepa de *T. gondii* isolada de galinha. Em seguida, os cistos gerados *in vitro* foram capturados utilizando-se técnica de separação imunomagnética. O isolamento do antígeno alvo foi realizado por imunoprecipitação e o material obtido foi separado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Duas bandas de aproximadamente 381 e 272 kDa foram identificadas por *IMUNOBLLOT*. A proteína também foi visualizada em gel corado com azul de Comassie G-250, evidenciando a viabilidade das técnicas de separação imunomagnética e imunoprecipitação realizadas com esse AcMo. Os resultados aqui obtidos possibilitarão, em experimentos futuros, a completa caracterização da proteína alvo do AcMo K8/15-15, empregando-se, especialmente, sequenciamento por espectrometria de massas da proteína isolada.

Palavras-chave: anticorpo monoclonal, cisto, esporocisto, parasito

## 6.2 ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is a worldwide distributed parasite, that infects approximately one third of the human population. Tissue cysts of the parasite, observed in latent infections, have a major role in *T. gondii* transmission. Recently, a monoclonal antibody named K8/15-15 was characterized; it has the unique ability to recognize antigens in tissue cyst and sporocyst walls of the parasite. In the current study, we aimed to isolate the target protein recognized by the mAb K8/15-15. To concentrate the referred antigen, a great amount of tissue cysts was produced in cell culture using a *T. gondii* strain isolated from chicken. Then, the *in vitro* generated tissue cysts were captured by immunomagnetic separation. Isolation of the target antigen was conducted by immunoprecipitation and the obtained material was separated by polyacrilamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). Two bands of approximately 381 and 272 kDa were identified by IMUNOBLOT. The proteins were also visualized in SDS-PAGE stained with Comassie blue G-250, showing the viability of immunomagnetic separation and immunoprecipitation using this mAb. The results obtained here will favor further studies aiming the complete characterization of the protein recognised by mAb K8/15-15, in particular, sequencing the isolated protein by mass spectrometry.

Keywords: monoclonal antibody, cyst, sporocyst, parasite

### 6.3 INTRODUÇÃO

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário coccídeo formador de cisto capaz de infectar, virtualmente, qualquer tipo de célula nucleada. A toxoplasmose, doença causada pelo parasito, é uma zoonose relevante para saúde humana e animal, pois pode levar a abortos ou anomalias congênitas em seus hospedeiros intermediários (TENTER *et al.*, 2000).

Os taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos representam as formas infectantes de *T. gondii*, sendo os bradizoítos encontrados em cistos teciduais, e os esporozoítos, em oocistos esporulados (LINDSAY *et al.*, 1991). A ingestão de cistos teciduais e de oocistos esporulados são as formas mais recorrentes de infecção horizontal pelo parasito (DUBEY, 2004). A diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos e a manutenção dos cistos nos tecidos são essenciais para a transmissão de *T. gondii*.

A infecção aguda pode ser reativada em hospedeiros infectados cronicamente pelo rompimento dos cistos teciduais de *T. gondii*, em razão da imunossupressão dos hospedeiros. Assim, os cistos teciduais servem de reservatório para a reativação do parasito (TOMITA *et al.*, 2013). A persistência do cisto tecidual varia de acordo com a duração da infecção, cepa infectante e hospedeiro infectado (DUBEY, 1998 8796).

Atualmente, não existe qualquer vacina disponível para a prevenção da infecção por *T. gondii* em humanos e não há terapia capaz de erradicar o parasito (REZAEI *et al.*, 2019). Identificar antígenos imunogênicos essenciais para o desenvolvimento do parasito *in vitro* e *in vivo* é um dos primeiros passos para produção de vacinas. Nos últimos anos, esforços constantes dos pesquisadores mostraram avanços consideráveis para esclarecer os diferentes aspectos da biologia celular e molecular do parasito, a exemplo da identificação de antígenos secretados pelas róprias, micronemas, grânulos densos e antígenos de superfície (FOROUTAN *et al.*, 2019).

Alguns antígenos presentes nas paredes de cistos já foram caracterizados, incluindo CST1, CST2, CST3, BPK1, MCP4, MAG1, GRA2, GRA3 e GRA5. Embora a exclusão isolada dos genes precursores de algumas dessas proteínas não tenha impedido a formação de cistos *in vitro*, o bloqueio da produção de CST1 e CST2 pelos parasitos transgênicos resultou em menor virulência *in vivo* quando inoculados em camundongos (TU *et al.*, 2019). A exclusão de BPK1 mostrou uma redução na habilidade do parasito em causar infecção oral em murinos (BUCHHOLZ *et al.*, 2013).

Faz-se necessário o estudo contínuo de proteínas que possam ser utilizadas para a elaboração de medicamentos e/ou vacinas, tendo em vista a importância da prevalência da infecção pelo parasito em humanos e a gravidade da doença em hospedeiros suscetíveis. Recentemente, foi descrito, pela primeira vez, um anticorpo monoclonal (K8/15-15) que possui a capacidade única de reconhecer antígenos tanto na parede de cistos quanto na parede de esporocistos de *T. gondii* (GONDIM *et al.*, 2016). No presente estudo, realizamos as técnicas de Western blot, *imunoblot*, separação imunomagnética e imunoprecipitação, que podem ser utilizadas para obtenção de antígeno purificado reconhecido pelo AcMo K8/15-15.

## 6.4 METODOLOGIA

### 6.4.1 Obtenção do anticorpo monoclonal K8/15/15 e antígeno de *Toxoplasma gondii*

O anticorpo monoclonal (AcMo) K8/15-15 foi produzido em dois camundongos BALB/c imunizados com antígeno oriundo de fragmentos de oocistos de *T. gondii* no Instituto Federal de Saúde Animal Friedrich-Loeffler, Alemanha, e cedido para a realização desse estudo (GONDIM *et al.*, 2016). O isolado utilizado para a produção dos cistos, nominado TgCkBr284, estava sendo mantido em nitrogênio líquido no Hospital de Medicina Veterinária Renato R. de Medeiros Neto – UFBA e foi cedido pelos pesquisadores que isolaram o parasito de galinhas de vida livre (GONCALVES *et al.*, 2012). O isolado TgCkBr284 possui características moleculares tipicamente encontradas em isolados brasileiros do parasito, ou seja, um alto grau de recombinação genética (ROCHA *et al.*, 2018).

### 6.4.2 Formação de cistos de *Toxoplasma gondii* *in vitro*

Células renais de macacos (MARC-145) foram mantidas no Laboratório de Pesquisa em Protozoários Coccídios (LPPC), situado no Hospital de Medicina Veterinária Renato R. de Medeiros Neto - UFBA. As células foram cultivadas em quatro frascos de 175cm<sup>2</sup> (CellStar<sup>®</sup>) contendo meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico com

antimicótico (100U penicilina e 100µg de estreptomicina/ml) e mantidas à 37 °C em estufa úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> até a formação de monocamada completa.

Posteriormente, adicionaram-se taquizoítos de TgCkBr284 e, após 24h, os frascos foram transferidos para uma estufa à 37 °C, porém, sem suprimento de CO<sub>2</sub>. Utilizou-se meio de cultura alcalinizado (pH 8,1) por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH) 1M, sendo a troca de meio realizada a cada 24 horas e a cultura mantida por quatro dias subsequentes.

Após esse período, o meio foi retirado dos frascos e 8 ml de tripsina foram adicionados em cada frasco. Após a ação da tripsina (10-15 minutos) foram adicionados 8 ml de meio de cultura. O conteúdo foi transferido para tubos cônicos de 15 ml e centrifugado à 24°C, 300 g, sem freio. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* alocado em tubo de 1,5ml. Frascos contendo apenas células Marc-145 não infectadas, foram submetidos ao mesmo processo descrito acima e originaram os *pellets* usados como controle.

#### **6.4.3 Separação imunomagnética**

Esferas magnéticas comerciais (IgG Dynabeads® Catálogo 11033), com 4,5 µm de diâmetro, ligadas em sua superfície, de forma covalente à IgG caprino anti-IgG murino, foram ressuspendidas durante 40 segundos em vórtex no próprio frasco em que estavam acondicionadas. Posteriormente, 1ml de tampão de isolamento (solução fosfato salina com 0,1% de albumina sérica bovina liofilizada e 2 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético, pH 7.4) foi adicionado à um tubo de 1,5ml e 25µl de esferas também foram acondicionadas no mesmo tubo. Posteriormente, o tubo foi inserido em suporte magnético (LifeSep magnetic separation stand, Sigma®) e, após um minuto, o conteúdo não atraído para a parede do tubo próximo ao suporte foi descartado. Adicionaram-se às esferas 200µl de AcMo K8/15-15 na diluição de 1:10 em tampão de isolamento (TI) e colocou-se o tubo em homogeneizador orbital (HulaMixer® Sample Mixer) à 24°C durante 40 minutos a 4 rpm (rotação por minuto).

Após esse período, o tubo foi novamente acoplado em suporte magnético (SM) durante um minuto e, em seguida, o conteúdo não atraído para a parede do tubo foi descartado. O tubo foi, então, removido do suporte e 1ml de TI foi adicionado ao tubo. As etapas de acoplamento ao SM, remoção do conteúdo não atraído, retirada do SM,

adição de 1ml de TI foi realizada mais duas vezes. Após essas etapas, as esferas acopladas ao anticorpo foram ressuspensas em 1ml de tampão de isolamento e armazenadas em frasco estéril a 4°C até o uso.

Esferas acopladas ao AcMo foram adicionadas aos pellets oriundos do cultivo e adicionadas em tubo de 1,5ml. Para cada pellet oriundo de um frasco de 175 cm<sup>2</sup>, 200 µl de esferas acopladas ao anticorpo monoclonal K8/15-15 mais 400 µl de TI foram utilizados. O tubo foi inserido em homogeneizador automático à 24°C durante 20 minutos a 4 rpm. Após esse período, o tubo foi inserido em SM por dois minutos. O conteúdo não aderido à parede foi removido, restando apenas as esferas acopladas aos cistos. O tubo foi retirado do SM e adicionou-se 1 ml de TI. Três pipetagens suaves foram realizadas a fim de homogeneizar a amostra para posterior lavagem. Novamente, o tubo foi colocado em SM e o conteúdo não aderido após um minuto foi descartado. O tubo foi retirado do SM e 1ml de TI foi adicionado a ele. O conteúdo foi novamente homogeneizado por pipetagens suaves, seguido de acoplamento em SM por um minuto e retirada do conteúdo não atraído. Foram adicionados 100µl de PBS e o conteúdo foi utilizado para a realização da técnica de imunoprecipitação.

#### **6.4.4 Imunoprecipitação**

O protocolo foi realizado de acordo com o manual do kit comercial empregado (Pierce Classic IP Kit<sup>®</sup> Catálogo 26146, Thermo) e sem modificações. Os tubos contendo cistos ligados às esferas imunomagnéticas foram centrifugados a 1.000 g durante 10 minutos à 4 °C sem freio. O PBS contido nos tubos foi descartado e os *pellets* ressuspensos em 1ml de tampão de lise gelado (0,025M Tris, 0,15M NaCl, 0,001M EDTA, 1% NP-40, 5% glicerol, pH 7,4). Os tubos foram então incubados em gelo durante 5 minutos e, posteriormente, centrifugados a 13.000g durante 10 minutos à 4°C para deposição dos *debris* celulares.

Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para colunas de centrifugação inclusas no kit. As colunas foram previamente lavadas com 160 µl de Controle de Resina de Agarose (incluído no kit) e 100 µl de uma solução (0.1M fosfato de sódio, 0.15M cloreto de sódio, pH 7.2) preparada previamente. As colunas contendo os sobrenadantes foram vedadas com plugue e incubadas por 30 minutos à 4°C em homogeneizador orbital. Posteriormente, os plugues foram retirados e as colunas

acopladas à tubos de 1.5ml. As colunas com os tubos foram centrifugadas à 1.000 g durante um minuto. Os conteúdos coletados nos tubos foram transferidos para novas colunas contendo 20 µl de proteína A e 30 µl de anticorpo monoclonal K8/15-15 cada, previamente incubados durante uma hora.

As colunas permaneceram por 12h em homogeneizador orbital à 4°C para a formação do imunocomplexo com plugues. Após esse tempo, os plugues foram retirados e as colunas centrifugadas durante um minuto a 1.000 g, seguido de três lavagens com 200 µl de tampão de lavagem. Posteriormente, foi adicionado o tampão de condicionamento (incluído no kit) e realizada nova centrifugação. Foram adicionados 5 µl de tampão com marcador de corrida não reduzido e 5µl de água ultrapura à cada coluna. Um tubo coletor de 1,5ml contido no kit foi alocado abaixo de cada coluna. Para a eluição do imunocomplexo, as colunas ficaram incubadas com tubo coletor à 100°C durante 10 minutos em banho-maria. As colunas foram posteriormente descartadas e o conteúdo passado através dela contendo a proteína foi mantido no tubo coletor sob refrigeração até o momento do uso.

#### **6.4.5 Imunoblot**

A técnica de Western blot foi realizada de acordo com Towbin e colaboradores, com pequenas modificações. Resumidamente, o conteúdo obtido pela imunoprecipitação foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida à 5% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) durante 1 hora e 20 minutos (120 V, 500 mA e 150 W) em câmara de eletroforese vertical (Mini-protean<sup>®</sup>).

Após a eletroforese, parte do gel contendo o imunoprecipitado foi seccionada e corada com azul de Coomassie G-250 para visualizar a proteína alvo. Outra parte do gel, contendo o imunoprecipitado e o controle, foi transferida para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) durante 1h30 por transferência eletroforética (5V, 70 mA e 5 W). A membrana foi, em seguida, bloqueada durante 30 minutos com PBS adicionado de 2% gelatina em pó pura e 0,05% Tween-20. Após o bloqueio, a membrana foi seca em temperatura ambiente e guardada entre papel filtro à -20 °C até o uso.

Para o imunoblot, o AcMo foi utilizado na diluição de 1:10 e permaneceu incubado durante 1 h com a membrana. Após 5 lavagens com PBS adicionado de Tween-20 a 0,05%, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo

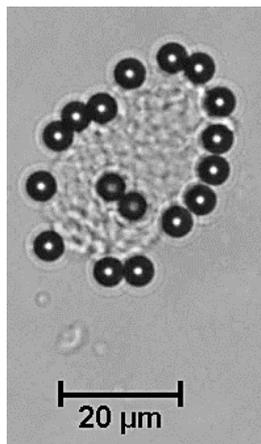
conjugado com peroxidase, na diluição de 1:600, que também permaneceu incubado durante 1 h. Após três lavagens com PBS Tween-20 (0,05%) e três lavagens com PBS, as reações foram reveladas com 3,3'-diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) na presença de peróxido de hidrogênio.

## 6.5 RESULTADOS

### 6.5.1 Separação imunomagnética e imunoprecipitação

Cistos de *T gondii* foram produzidos *in vitro* e capturados com sucesso por separação imunomagnética (Figura 1). Foram necessários o cultivo de 4 frascos de 175cm<sup>2</sup> para obtenção de cada pellet contendo material necessário (500-1000µg) para cada reação de imunoprecipitação (IP).

**Figura 1.** Cisto de *Toxoplasma gondii* produzido *in vitro* após separação imunomagnética utilizando esferas ligadas covalentemente ao anticorpo monoclonal K8/15-15.



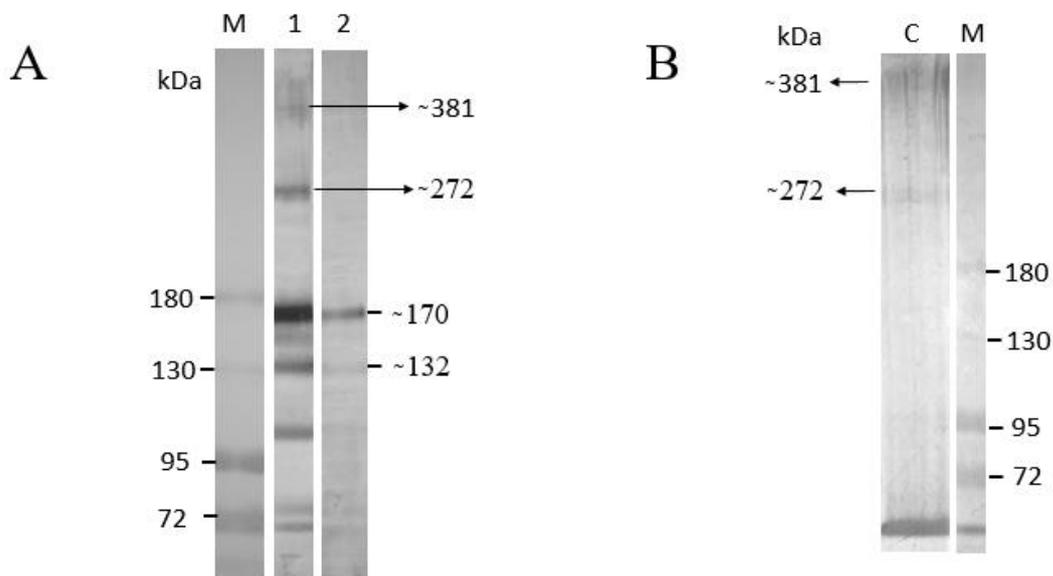
Fonte:REZENDE-GONDIM (2020)

### 6.5.2 Imunoblot

Foram observadas duas bandas de peso molecular aproximado de 170 e 132 kDa no imunoblot do imunoprecipitado contendo células Marc-145 infectadas com TgCkBr284 e células Marc-145 não infectadas (Figura 2A). Outras duas bandas de aproximadamente 381 e 272 kDa também foram observadas no imunoprecipitado contendo células Marc-145

infectadas com TgCkBr284 e não observadas no grupo controle. Essas mesmas bandas foram observadas em gel corado com azul de Coomassie (Figura 2B). Nenhuma banda foi reconhecida pelo AcMo K8/15-15 quando células Marc-145 não infectadas e que não passaram pelo processo de captura e imunoprecipitação foram submetidas ao imunoblot. O peso molecular das bandas foi estimado por regressão linear com fórmula obtida utilizando as distâncias entre os fragmentos e o peso do padrão de massa molecular como referência.

**Figura 2.** Proteínas reconhecidas pelo anticorpo monoclonal K8/15-15 após separação imunomagnética (SI) e imunoprecipitação. M: marcador de peso molecular em kDa . (A) Membranas de PVDF após imunoblot, 1: Proteínas de *T. gondii* ; 2: Célula Marc-145 (B) C: Gel contendo antígenos de *T. gondii* corado com azul de Coomassie.



Fonte: REZENDE-GONDIM (2019)

## 6.6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizadas técnicas de captura imunomagnética, imunoprecipitação e Western blot/imunoblot para o isolamento de proteína reconhecida por um AcMo (K8/15-15) murino. O resultado das técnicas utilizando-se o AcMo foi comparado com o controle, em que somente células Marc-145 foram empregadas como antígeno para detectar a presença de bandas inespecíficas. Duas bandas (~ 381 e 272

kDa) de proteínas presentes nas paredes de cistos e esporocistos, possuindo alto peso molecular (>250 kDa) foram descritas pela primeira vez. Nossos resultados mostraram que a combinação das técnicas, juntamente com o processo de formação de cistos *in vitro*, possibilita o isolamento da proteína.

Uma pré-análise da proteína reconhecida pelo mesmo anticorpo foi descrita anteriormente (GONDIM *et al.*, 2016), contudo, a visualização das bandas não se deu da mesma forma como apresentada nesse capítulo. Também não foram utilizadas técnicas de captura e imunoprecipitação para purificação da mesma, além de não ser apresentado dados sobre a visualização em gel de Comassie, dado importante quando pretende-se caracterizar a proteína por espectrometria de massas.

Outras proteínas, como a reconhecida pelo AcMo CC2, além da proteína CST1, também apresentam alto peso molecular, sendo eles 350 e 250 kDa, respectivamente (TOMITA *et al.*, 2013; GONDIM *et al.*, 2016). Embora o AcMo CC2 reaja com uma proteína com peso molecular semelhante à proteína reconhecida pelo AcMo K8/15-15, não se trata da mesma proteína, pois CC2 reconhece antígenos presentes em taquizoítos, característica não comum à proteína isolada nesse trabalho.

Especula-se que a proteína reconhecida pelo AcMo K8/15-15 tenha sido glicosilada ou modificada em um ou mais resíduos de aminoácidos, por isso foram apresentadas duas bandas. Outras possíveis causas de separação de bandas, como ausência de inibidor de proteinase ou o uso da amostra não fresca, foram excluídas desse trabalho, pois o inibidor de protease foi utilizado e as amostras foram testadas por SDS-PAGE imediatamente após a imunocaptura.

O primeiro anticorpo monoclonal (AcMo) capaz de reconhecer antígenos presentes em esporocistos e cistos produzidos *in vivo* ou *in vitro* de *T. gondii* foi descrito pela primeira vez em 2016 por Gondim e colaboradores (Gondim *et al.*, 2016). O AcMo K8/15-15 mostrou-se, então, útil na identificação desses estágios do parasito, com potencial para ser empregado em estudos proteômicos e identificação de novos componentes das paredes de cistos e esporocistos.

Proteínas como CST1 e SRS13 são encontradas em cistos de *T. gondii* e, embora parasitos nocauteados para a proteína SRS13 (mutados em laboratório) se multipliquem e apresentem características de encistamento similares aos não mutados, isso não ocorre com parasitos que não produzem CST1, revelando assim, a importância dessa proteína na manutenção dos cistos celulares (TOMITA *et al.*, 2013; TOMITA *et al.*, 2018).

Além da detecção do antígeno reconhecido pelo AcMo K8/15-15, é interessante analisar quais os efeitos na formação de cisto após a deleção do gene que produz esse antígeno. Além disso, avaliar se há ou não resistência à infecção após a imunização de animais com o antígeno reconhecido é outra informação importante a ser buscada, pois sabe-se que esses estudos nesta linha já mostraram capacidade de aumentar a sobrevivência de animais e diminuir o número de cistos formados em animais imunizados (REZAEI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019). Para tais análises, faz-se necessário, primeiramente, a caracterização do antígeno, sendo o sucesso no isolamento do mesmo o primeiro passo para tais estudos.

Como mostrado nos resultados acima, o AcMo K8/15-15 também reconheceu proteínas císticas de outra cepa de *T. gondii*, demonstrando, assim, que a proteína reconhecida pelo anticorpo não é exclusiva da cepa ME49. O uso de antígeno obtido de células hospedeiras (Marc-145), utilizado como controle, foi importante para se descartar possíveis reações cruzadas induzidas por possíveis proteínas semelhantes àquelas reconhecidas pelo AcMo K8/15-15.

## 6.7 CONCLUSÃO

Foi isolada com sucesso a proteína reconhecida pelo AcMo K8/15-15 após a captura imunomagnética e imunoprecipitação. Bandas de aproximadamente 381 e 272 kDa foram detectadas e isoladas em gel corado por azul de Coomassie, possibilitando a condução de análises proteômicas em estudos futuros. A identificação dessa proteína por espectrometria de massas possibilitará o desenvolvimento de experimentos a fim de avaliar o uso potencial dessa proteína em testes diagnósticos ou em vacinas.

## 6.8 REFERÊNCIAS

- BUCHHOLZ, K. R.; BOWYER, P. W.; BOOTHROYD, J. C. Bradyzoite pseudokinase 1 is crucial for efficient oral infectivity of the *Toxoplasma gondii* tissue cyst. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 3, p. 399-410, 2013.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 7, p. 1019-24, 1998.
- DUBEY. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Vet Parasitol**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.
- FOROUTAN, M.; GHAFFARIFAR, F.; SHARIFI, Z.; DALIMI, A.; JORJANI, O. Rhoptry antigens as *Toxoplasma gondii* vaccine target. **Clin Exp Vaccine Res**, v. 8, n. 1, p. 4-26, 2019.
- GONCALVES, I. N.; UZEDA, R. S.; LACERDA, G. A.; MOREIRA, R. R.; ARAUJO, F. R.; OLIVEIRA, R. H.; CORBELLINI, L. G.; GONDIM, L. F. Molecular frequency and isolation of cyst-forming coccidia from free ranging chickens in Bahia State, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 190, n. 1-2, p. 74-9, 2012.
- GONDIM, L. F.; WOLF, A.; VRHOVEC, M. G.; PANTCHEV, N.; BAUER, C.; LANGENMAYER, M. C.; BOHNE, W.; TEIFKE, J. P.; DUBEY, J. P.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. Characterization of an IgG monoclonal antibody targeted to both tissue cyst and sporocyst walls of *Toxoplasma gondii*. **Exp Parasitol**, v. 163, p. 46-56, 2016.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L.; TOIVIO-KINNUCAN, M. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. **J Parasitol**, v. 77, n. 1, p. 126-32, 1991.
- REZAEI, F.; SARVI, S.; SHARIF, M.; HEJAZI, S. H.; PAGHEH, A. S.; AGHAYAN, S. A.; DARYANI, A. A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. **Microb Pathog**, v. 126, p. 172-184, 2019.
- 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**, v. 104, n. 4, p. 377-382, 2018.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-58, 2000.
- TOMITA, T.; BZIK, D. J.; MA, Y. F.; FOX, B. A.; MARKILLIE, L. M.; TAYLOR, R. C.; KIM, K.; WEISS, L. M. The *Toxoplasma gondii* cyst wall protein CST1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 12, p. e1003823, 2013.

TOMITA, T.; MA, Y.; WEISS, L. Characterization of a SRS13: a new cyst wall mucin-like domain containing protein. **Parasitol Res**, v. 117, n. 8, p. 2457-2466, 2018.

TU, V.; MAYORAL, J.; SUGI, T.; TOMITA, T.; HAN, B.; MA, Y. F.; WEISS, L. M. Enrichment and Proteomic Characterization of the Cyst Wall from In Vitro *Toxoplasma gondii* Cysts. **MBio**, v. 10, n. 2, 2019.

ZHANG, Z.; LI, Y.; XIE, Q.; LI, P.; NAN, X.; KONG, L.; ZENG, D.; DING, Z.; WANG, S. The Molecular Characterization and Immunity Identification of Rhoptry Protein 22 of *Toxoplasma gondii* as a DNA Vaccine Candidate Against Toxoplasmosis. **J Eukaryot Microbiol**, v. 66, n. 1, p. 147-157, 2019.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de separação imunomagnética apresentada neste estudo foi capaz de capturar uma grande quantidade de cistos produzidos *in vitro*, aumentar a relação cisto/célula hospedeira, eliminar a contaminação do material isolado *in vivo* e eliminar a presença de oocistos não esporulados em materiais isolados de esporocistos. O protocolo de SI concebe, então, uma nova opção para a concentração de cistos e esporocistos de *T. gondii* em futuros estudos.

A proteína reconhecida pelo AcMo K8/15-15 foi isolada com êxito pelas metodologias propostas neste estudo, possibilitando, assim, que análises como espectrometria de massas sejam realizadas. A identificação dos peptídeos, potencial imunogênico e identificação das características relacionadas à esta proteína podem ser de grande relevância, pois é a única descrita presente em paredes de cistos e de esporocistos do parasito.

Durante a realização dos experimentos direcionados à tese, um caso suspeito de neosporose/toxoplasmose canina foi investigado e o diagnóstico sorológico, isolamento e caracterização molecular da cepa isolada foram realizados. Esses resultados encontram-se como anexo dessa tese, uma vez que não estão relacionados diretamente aos experimentos principais propostos no projeto.

## 8. REFERÊNCIAS

ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, M. A.; KILANI, R. T.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L. J. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. **J Infect Dis**, v. 188, n. 4, p. 608-16, 2003.

ALVES, B. F.; OLIVEIRA, S.; SOARES, H. S.; PENA, H. F. J.; CONTE-JUNIOR, C. A.; GENNARI, S. M. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from organs and Brazilian commercial meat cuts of experimentally infected pigs. **Parasitol Res**, v. 118, n. 4, p. 1331-1335, 2019.

ANDREW, S. M.; TITUS, J. A.; ZUMSTEIN, L. Dialysis and concentration of protein solutions. **Curr Protoc Toxicol**, v. Appendix 3, p. A 3H 1-5, 2002.

APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. **Acta Trop**, v. 65, n. 2, p. 97-104, 1997.

ASSOLINI, J. P.; CONCATO, V. M.; GONCALVES, M. D.; CARLOTO, A. C. M.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R.; MELANDA, F. N.; COSTA, I. N. Nanomedicine advances in toxoplasmosis: diagnostic, treatment, and vaccine applications. **Parasitol Res**, v. 116, n. 6, p. 1603-1615, 2017.

BARCIA, J. J. The Giemsa stain: its history and applications. **Int J Surg Pathol**, v. 15, n. 3, p. 292-6, 2007.

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cell Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 561-8, 2005.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **J Exp Med**, v. 195, n. 12, p. 1625-33, 2002.

BATRA, A.; TRIPATHI, R. P.; GORTHI, S. P. Magnetic resonance evaluation of cerebral toxoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Acta Radiol**, v. 45, n. 2, p. 212-21, 2004.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5. New York: W. H. Freeman and Company., 2002. 1100 ISBN 0-7167-3051-0.

BOTTONE, E. J. Diagnosis of acute pulmonary toxoplasmosis by visualization of invasive and intracellular tachyzoites in Giemsa-stained smears of bronchoalveolar lavage fluid. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 11, p. 2626-7, 1991.

BUXTON, D. Ovine toxoplasmosis: a review. **J R Soc Med**, v. 83, n. 8, p. 509-11, 1990.

BUXTON, D.; INNES, E. A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 110 Suppl, p. S11-6, 1995.

BUYUKKOROGLU, G.; SENEL, B. Engineering Monoclonal Antibodies: Production and Applications,. In: BARH, D. e AZEVEDO, V. (Ed.). **Omics Technologies and Bio-Engineering**: Academic Press, v.1, 2018. cap. 6, p.353-389. ISBN 9780128046593.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Biochemistry**. 15. United States: Thomson Learnig, 2006.

CHALMERS, J. J.; ZBOROWSKI, M.; SUN, L.; MOORE, L. Flow through, immunomagnetic cell separation. **Biotechnol Prog**, v. 14, n. 1, p. 141-8, 1998.

CLARKE, C.; DAVIES, S. Immunomagnetic cell separation. **Methods Mol Med**, v. 58, p. 17-23, 2001.

COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; HOWE, D. K.; RODERICK, C. L.; DUBEY, J. P.; THOMAS, N. J.; BAETEN, L. A. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **J Parasitol**, v. 86, n. 3, p. 526-30, 2000.

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **North Clin Istanb**, v. 3, n. 2, p. 156-160, 2016.

COURRET, N.; DARCHE, S.; SONIGO, P.; MILON, G.; BUZONI-GATEL, D.; TARDIEUX, I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309-16, 2006.

CROWTHER, J. R. ELISA. Theory and practice. **Methods Mol Biol**, v. 42, p. 1-218, 1995.

CUNNINGHAM, A. A.; BUXTON, D.; THOMSON, K. M. An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **J Comp Pathol**, v. 107, n. 2, p. 207-19, 1992.

DADIMOGHADDAM, Y.; DARYANI, A.; SHARIF, M.; AHMADPOUR, E.; HOSSIENIKHAH, Z. Tissue tropism and parasite burden of *Toxoplasma gondii* RH strain in experimentally infected mice. **Asian Pac J Trop Med**, v. 7, n. 7, p. 521-4, 2014.

DAI, F.; ZHANG, M.; XU, D.; YANG, Y.; WANG, J.; LI, M.; DU, M. The development of methods for the detection of *Salmonella* in chickens by a combination of immunomagnetic separation and PCRs. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 64, n. 6, p. 888-894, 2017.

DAVIS, J. M. **Basic Cell Culture: A Practical Approach**. 2. Oxford University Press, 2002. ISBN 0-19-963854-3.

DE MACEDO, M. F.; DE MACEDO, C. A.; EWALD, M. P.; MARTINS, G. F.; ZULPO, D. L.; DA CUNHA, I. A.; TARODA, A.; CARDIM, S. T.; SU, C.; GARCIA, J. L. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, n. 1, p. 74-7, 2012.

DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRACA, R. M.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 2, p. 326-9, 2006.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **J Clin Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 562-8, 1980.

DI GIOVANNI, G. D.; HASHEMI, F. H.; SHAW, N. J.; ABRAMS, F. A.; LECHEVALLIER, M. W.; ABBASZADEGAN, M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 8, p. 3427-32, 1999.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-7, 2006.

DONALDSON, J. G. Immunofluorescence Staining. **Curr Protoc Cell Biol**, v. 69, p. 4.3.1-7, 2015.

DONG, H.; SU, R.; LI, T.; SU, C.; ZHANG, L.; YANG, Y. Isolation, genotyping and pathogenicity of a *Toxoplasma gondii* strain isolated from a Serval (*Leptailurus serval*) in China. **Transbound Emerg Dis**, 2019.

DUBEY, J. P. Repeat transplacental transfer of *Toxoplasma gondii* in dairy goats. **J Am Vet Med Assoc**, v. 180, n. 10, p. 1220-1, 1982.

DUBEY, J. P. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Vet Parasitol**, v. 13, n. 3, p. 199-211, 1983.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis--an overview. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 22 Suppl, p. 88-92, 1991.

DUBEY, J. P. Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **J Parasitol**, v. 83, n. 4, p. 755-7, 1997a.

DUBEY, J. P. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. **Parasitology**, v. 115 ( Pt 1), p. 15-20, 1997b.

DUBEY, J. P.. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **J Parasitol**, v. 87, n. 1, p. 215-9, 2001.

DUBEY, J. P.; HILL, D.; ZARLENGA, D.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L. R.; OLIVEIRA, S.; VERMA, S. K.; KWOK, O. C.; DRISCOLL, C. P.; SPIKER, H.; SU,

C. Isolation and characterization of new genetic types of *Toxoplasma gondii* and prevalence of *Trichinella murrelli* from black bear (*Ursus americanus*). **Vet Parasitol**, v. 196, n. 1-2, p. 24-30, 2013.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 2, p. 267-99, 1998.

DUBEY, J. P.; OTT-JOSLIN, J.; TORGERSON, R. W.; TOPPER, M. J.; SUNDBERG, J. P. Toxoplasmosis in black-faced kangaroos (*Macropus fuliginosus melanops*). **Vet Parasitol**, v. 30, n. 2, p. 97-105, 1988.

DUMETRE, A.; DARDE, M. L. Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. **J Microbiol Methods**, v. 61, n. 2, p. 209-17, 2005.

EVANS, R.; CHATTERTON, J. M.; ASHBURN, D.; JOSS, A. W.; HO-YEN, D. O. Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 18, n. 12, p. 879-84, 1999.

EZA, D. E.; LUCAS, S. B. Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. **HIV Med**, v. 7, n. 6, p. 415-20, 2006.

FARHADI, A.; HANILOO, A.; FAZAELI, A.; MORADIAN, S.; FARHADI, M. PCR-based Diagnosis of *Toxoplasma* Parasite in Ocular Infections Having Clinical Indications of Toxoplasmosis. **Iran J Parasitol**, v. 12, n. 1, p. 56-62, 2017.

FERREIRA DA SILVA MDA, F.; BARBOSA, H. S.; GROSS, U.; LUDER, C. G. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. **Mol Biosyst**, v. 4, n. 8, p. 824-34, 2008.

FIALHO, C. G.; TEIXEIRA, M. C.; ARAUJO, F. A. P. Toxoplasmose animal no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae.**, v. 37, 2009.

FISCHER, H. G.; NITZGEN, B.; REICHMANN, G.; GROSS, U.; HADDING, U. Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. **Parasitol Res**, v. 83, n. 7, p. 637-41, 1997.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893-6, 1970.

FURTADO, J. M.; SMITH, J. R.; BELFORT, R., JR.; GATTEY, D.; WINTHROP, K. L. Toxoplasmosis: a global threat. **J Glob Infect Dis**, v. 3, n. 3, p. 281-4, 2011.

GAO, Y.; HUANG, X.; ZHU, Y.; LV, Z. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. **J Immunoassay Immunochem**, v. 39, n. 4, p. 351-364, 2018.

GONDIM, L. F.; WOLF, A.; VRHOVEC, M. G.; PANTCHEV, N.; BAUER, C.; LANGENMAYER, M. C.; BOHNE, W.; TEIFKE, J. P.; DUBEY, J. P.; CONRATHS,

F. J.; SCHARES, G. Characterization of an IgG monoclonal antibody targeted to both tissue cyst and sporocyst walls of *Toxoplasma gondii*. **Exp Parasitol**, v. 163, p. 46-56, 2016.

HANACK, K.; MESSERSCHMIDT, K.; LISTEK, M. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. **Adv Exp Med Biol**, v. 917, p. 11-22, 2016.

HARITO, J. B.; CAMPBELL, A. T.; PRESTRUD, K. W.; DUBEY, J. P.; ROBERTSON, L. J. Surface binding properties of aged and fresh (recently excreted) *Toxoplasma gondii* oocysts. **Exp Parasitol**, v. 165, p. 88-94, 2016.

HARTLEY, W. J. A review of the epidemiology of toxoplasmosis. **Med J Aust**, v. 1, n. 6, p. 232-6, 1966.

HARTLEY, W. J.; DUBEY, J. P.; SPIELMAN, D. S. Fatal toxoplasmosis in koalas (*Phascolarctos cinereus*). **J Parasitol**, v. 76, n. 2, p. 271-2, 1990.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Biochemistry**. 5. Wolters Kluwer 2011. ISBN 978-1609139988.

HAUKANES, B. I.; KVAM, C. Application of magnetic beads in bioassays. **Biotechnology (N Y)**, v. 11, n. 1, p. 60-3, 1993.

HERNANDEZ, R.; TORRES-GARCÍA, C.; OLVERA, S.; CASTILLO, C. R.; MURO, F. L.; GONZÁLEZ, A.; BARRERA, A. F. G. B. Cell culture: History, Development and Prospects. **International Journal of Current Research and Academic Review**, v. 2, p. 188-200, 2014.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 10, p. 634-40, 2002.

HIRANO, S. Western blot analysis. **Methods Mol Biol**, v. 926, p. 87-97, 2012.

HISZCZYNSKA-SAWICKA, E.; GATKOWSKA, J. M.; GRZYBOWSKI, M. M.; DLUGONSKA, H. Veterinary vaccines against toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 141, n. 11, p. 1365-78, 2014.

HU, X.; ZHUGE, Q. Y.; LI, Y. F.; PAN, C. W.; TAN, F. [Application of double antibody sandwich ELISA for detection of nucleoside triphosphate hydrolase-II protein of *Toxoplasma gondii*]. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 28, n. 5, p. 343-7, 2010.

INNES, E. A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 20, n. 2, p. 131-8, 1997.

INNES, E. A.; BARTLEY, P. M.; BUXTON, D.; KATZER, F. Ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1887-94, 2009.

JABARI, S.; KESHAVARZ, H.; SALIMI, M.; MOROVATI, H.; MOHEBALI, M.; SHOJAEE, S. *In vitro* culture of *Toxoplasma gondii* in HeLa, Vero, RBK and A549 cell lines. **Infez Med**, v. 26, n. 2, p. 145-147, 2018.

JIANG, W.; XUE, J. X.; LIU, Y. C.; LI, T.; HAN, X. G.; WANG, S. H.; CHEN, Y. J.; QI, J.; YU, S. Q.; WANG, Q. Identification and characterization of an immunogenic antigen, enolase 2, among excretory/secretory antigens (ESA) of *Toxoplasma gondii*. **Protein Expr Purif**, v. 127, p. 88-97, 2016.

JONES, T. C.; BIENZ, K. A.; ERB, P. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. **Infect Immun**, v. 51, n. 1, p. 147-56, 1986.

KABOORD, B.; PERR, M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. **Methods Mol Biol**, v. 424, p. 349-64, 2008.

KAUFMAN, H. E.; MALONEY, E. D. Multiplication of three strains of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. **J Parasitol**, v. 48, p. 358-61, 1962.

KHAN, A.; GRIGG, M. E. *Toxoplasma gondii*: Laboratory Maintenance and Growth. **Curr Protoc Microbiol**, v. 44, p. 20C 1 1-20C 1 17, 2017.

KHAN, I. A.; OUELLETTE, C.; CHEN, K.; MORETTO, M. Toxoplasma: Immunity and Pathogenesis. **Curr Clin Microbiol Rep**, v. 6, n. 1, p. 44-50, 2019.

KHAREL SITAULA, R.; JOSHI, S. N.; SAH, R.; KHADKA, S.; KHATRI KC, A.; POKHAREL, B. M. *Toxoplasma gondii* bradyzoites and tachyzoites isolation from vitreous of atypical necrotizing retinitis. **J Ophthalmic Inflamm Infect**, v. 8, n. 1, p. 8, 2018.

KIM, B. Western Blot Techniques. **Methods Mol Biol**, v. 1606, p. 133-139, 2017.

KING, D. J. **Applications And Engineering Of Monoclonal Antibodies**. 1998. ISBN 0748404228

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. **J Immunol**, v. 174, n. 5, p. 2453-5, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. 9. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LABROU, N. E. Protein purification: an overview. **Methods Mol Biol**, v. 1129, p. 3-10, 2014.

LAGO, E. G.; BALDISSEROTTO, M.; HOEFEL FILHO, J. R.; SANTIAGO, D.; JUNGBLUT, R. Agreement between ultrasonography and computed tomography in detecting intracranial calcifications in congenital toxoplasmosis. **Clin Radiol**, v. 62, n. 10, p. 1004-11, 2007.

LAINSON, R. Observations on the development and nature of pseudocysts and cysts of *Toxoplasma gondii*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 52, n. 5, p. 396-407, 1958.

LANDRE, P. A.; GELFAND, D. H.; WATSON, R. M. The Use of Cosolvents to Enhance Amplification by the Polymerase Chain Reaction. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H., *et al* (Ed.). **PCR Strategies**, 1995. ISBN 9780123721822.

LAPTOS, T.; OMERSEL, J. The importance of handling high-value biologicals: Physico-chemical instability and immunogenicity of monoclonal antibodies. **Exp Ther Med**, v. 15, n. 4, p. 3161-3168, 2018.

LIEBERMAN, L. A.; HUNTER, C. A. The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. **Int Rev Immunol**, v. 21, n. 4-5, p. 373-403, 2002.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L.; TOIVIO-KINNUCAN, M. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. **J Parasitol**, v. 77, n. 1, p. 126-32, 1991.

LINDSAY, D. S.; TOIVIO-KINNUCAN, M. A.; BLAGBURN, B. L. Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture. **J Parasitol**, v. 79, n. 2, p. 289-92, 1993.

LIU, Q.; WANG, Z. D.; HUANG, S. Y.; ZHU, X. Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 292, 2015.

MALKWITZ, I.; BERNDT, A.; DAUGSCHIES, A.; BANGOURA, B. Characterisation of susceptibility of chicken macrophages to infection with *Toxoplasma gondii* of type II and III strains. **Exp Parasitol**, v. 187, p. 22-29, 2018.

MASON, R. W.; HARTLEY, W. J.; DUBEY, J. P. Lethal toxoplasmosis in a little penguin (*Eudyptula minor*) from Tasmania. **J Parasitol**, v. 77, n. 2, p. 328, 1991.

MENOTTI, J.; VILELA, G.; ROMAND, S.; GARIN, Y. J.; ADES, L.; GLUCKMAN, E.; DEROUIN, F.; RIBAUD, P. Comparison of PCR-enzyme-linked immunosorbent assay and real-time PCR assay for diagnosis of an unusual case of cerebral toxoplasmosis in a stem cell transplant recipient. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 5313-6, 2003.

MONACO, S. E.; MONAGHAN, S. A.; STAMM, J. A.; KHALBUSS, W. E.; NICHOLS, L.; PANTANOWITZ, L. Toxoplasmosis in a post-transplant bronchoalveolar lavage: a case report. **Diagn Cytopathol**, v. 40, n. 7, p. 629-34, 2012.

MORISAKI, J. H.; HEUSER, J. E.; SIBLEY, L. D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **J Cell Sci**, v. 108 ( Pt 6), p. 2457-64, 1995.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **C R Acad Sci**, v. 147, p. 736, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. v. 148, 1909.

PAN, L.; GONG, P.; WANG, X.; DONG, J.; YANG, J.; LI, J.; ZHANG, X. The expressive identification and localization of bicoid-interacting protein 3 in the *Toxoplasma gondii* Chinese I genotype Wh3 strain. **Acta Trop**, v. 197, p. 105040, 2019.

PAN, Y.; PENG, X.; YANG, P.; SHI, W.; CUI, S.; ZHANG, D.; LU, G.; ZHAO, J.; WANG, Q. Development of an immunomagnetic beads-based test and its application in influenza surveillance. **Clin Chem Lab Med**, v. 54, n. 1, p. e25-9, 2016.

PAREDES-SANTOS, T. C.; MARTINS-DUARTE, E. S.; DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. *Toxoplasma gondii* reorganizes the host cell architecture during spontaneous cyst formation in vitro. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1027-1038, 2018.

PAREDES-SANTOS, T. C.; MARTINS-DUARTE, E. S.; VITOR, R. W.; DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Spontaneous cystogenesis in vitro of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Int**, v. 62, n. 2, p. 181-8, 2013.

PETERSEN, E. Prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 5, n. 2, p. 285-93, 2007a.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 12, n. 3, p. 214-23, 2007b.

PETSKO, G. A.; RINGE, D. **Protein Structure and Function**. New Science Press, 2004. ISBN 9780878936632.

RAHMANIAN, N.; BOZORGMEHR, M.; TORABI, M.; AKBARI, A.; ZARNANI, A. H. Cell separation: Potentials and pitfalls. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 47, n. 1, p. 38-51, 2017.

RAJAPAKSE, S.; WEERATUNGA, P.; RODRIGO, C.; DE SILVA, N. L.; FERNANDO, S. D. Prophylaxis of human toxoplasmosis: a systematic review. **Pathog Glob Health**, v. 111, n. 7, p. 333-342, 2017.

RAMADAN, Q.; CHRISTOPHE, L.; TEO, W.; LI, S.; FENG, H. H. Flow-through immunomagnetic separation system for waterborne pathogen isolation and detection: application to *Giardia* and *Cryptosporidium* cell isolation. **Anal Chim Acta**, v. 673, n. 1, p. 101-8, 2010.

RANDALL, L. M.; HUNTER, C. A. Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. **Eur J Microbiol Immunol (Bp)**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 2011.

REMINGTON, F. S.; MC LEOD, R.; WILSON, C. B.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, F. S.; KLEIN, J. O., *et al* (Ed.). **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn**, 2011. p.1280. ISBN 9781416064008.

REZENDE-GONDIM, M. M.; DA SILVA, A. V.; SCHARES, G.; GONDIM, L. F. In contrast to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* tachyzoites did not sustain

multiplication in vitro at increased incubation temperatures. **Vet Parasitol**, v. 234, p. 19-24, 2017.

ROSTAMI, A.; KARANIS, P.; FALLAHI, S. Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Infection**, v. 46, n. 3, p. 303-315, 2018.

RUAN, J.; MOUVEAUX, T.; LIGHT, S. H.; MINASOV, G.; ANDERSON, W. F.; TOMAVO, S.; NGO, H. M. The structure of bradyzoite-specific enolase from *Toxoplasma gondii* reveals insights into its dual cytoplasmic and nuclear functions. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 71, n. Pt 3, p. 417-26, 2015.

SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scand J Infect Dis**, v. 44, n. 11, p. 805-14, 2012.

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoan Parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, n. 2815, p. 660-3, 1948.

SABIN, A. B.; OLITSKY, P. K. *Toxoplasma* and Obligate Intracellular Parasitism. **Science**, v. 85, n. 2205, p. 336-8, 1937.

SALIMI, M.; SHOJAEE, S.; KESHAVARZ, H.; MOHEBALI, M. Cyst Formation from Virulent RH Strain of *Toxoplasma gondii* Tachyzoite: In Vitro Cultivation. **Iran J Parasitol**, v. 11, n. 1, p. 81-5, 2016.

SANCHEZ-SANCHEZ, R.; VAZQUEZ, P.; FERRE, I.; ORTEGA-MORA, L. M. Treatment of Toxoplasmosis and Neosporosis in Farm Ruminants: State of Knowledge and Future Trends. **Curr Top Med Chem**, v. 18, n. 15, p. 1304-1323, 2018.

SARAEI, M.; SHOJAEE, S.; ESMAELI, A.; JAHANI-HASHEMI, H.; KESHAVARZ, H. Evaluation of confounders in toxoplasmosis indirect fluorescent antibody assay. **Iran J Parasitol**, v. 5, n. 4, p. 55-62, 2010.

SHEFFIELD, H. G.; MELTON, M. L. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 54, n. 2, p. 209-26, 1968.

SHEPARD, H. M.; PHILLIPS, G. L.; C, D. T.; FELDMANN, M. Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. **Clin Med (Lond)**, v. 17, n. 3, p. 220-232, 2017.

SHERWIN, T.; READ, M. Immunofluorescence of parasites. **Methods Mol Biol**, v. 21, p. 407-14, 1993.

SILVA, L. A.; FERNANDES, M. D.; MACHADO, A. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C.; ALMEIDA VITOR, R. W. Efficacy of sulfadiazine and pyrimetamine for treatment of experimental toxoplasmosis with strains obtained from human cases of congenital disease in Brazil. **Exp Parasitol**, v. 202, p. 7-14, 2019.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol Res**, v. 107, n. 2, p. 253-60, 2010.

SOETE, M.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. **Exp Parasitol**, v. 78, n. 4, p. 361-70, 1994.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. **Int J Parasitol**, v. 35, n. 2, p. 193-206, 2005.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. **Nota preliminare pel. Rev Soc Sci Sao Paulo**, v. 3, p. 3, 1908.

SPYCHER, A.; GEIGY, C.; HOWARD, J.; POSTHAUS, H.; GENDRON, K.; GOTTSTEIN, B.; DEBACHE, K.; HERRMANN, D. C.; SCHARES, G.; FREY, C. F. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* causing fatal systemic toxoplasmosis in an immunocompetent 10-year-old cat. **J Vet Diagn Invest**, v. 23, n. 1, p. 104-8, 2011.

SUGI, T.; TU, V.; MA, Y.; TOMITA, T.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii* Requires Glycogen Phosphorylase for Balancing Amylopectin Storage and for Efficient Production of Brain Cysts. **MBio**, v. 8, n. 4, 2017.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 3, p. 137-42, 2006.

SULLIVAN, W. J., JR.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 717-33, 2012.

SUN, C.; HSIEH, Y. P.; MA, S.; GENG, S.; CAO, Z.; LI, L.; LU, C. Immunomagnetic separation of tumor initiating cells by screening two surface markers. **Sci Rep**, v. 7, p. 40632, 2017.

SYKES, J. E.; RANKIN, S. C. Immunoassays. In: SYKES, J. E. (Ed.). **Canine and Feline Infectious Diseases**, 2014. cap. 2, ISBN 978-1-4377-0795-3.

TAN, F.; HU, X.; PAN, C. W.; DING, J. Q.; CHEN, X. G. Monoclonal antibodies against nucleoside triphosphate hydrolase-II can reduce the replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Int**, v. 59, n. 2, p. 141-6, 2010.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary Parasitology**. 2016. ISBN 978-0-470-67162-7.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-58, 2000.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 12, p. 558-61, 2005.

TYEBJI, S.; SEIZOVA, S.; HANNAN, A. J.; TONKIN, C. J. Toxoplasmosis: A pathway to neuropsychiatric disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 96, p. 72-92, 2019.

UNNO, A.; SUZUKI, K.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. **Parasitol Int**, v. 57, n. 4, p. 515-8, 2008.

VERMA, R.; KHANNA, P. Development of *Toxoplasma gondii* vaccine: A global challenge. **Hum Vaccin Immunother**, v. 9, n. 2, p. 291-3, 2013.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A.; FLECK, D. G.; PERKINS, M.; OLADEHIN, B. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. **J Clin Pathol**, v. 29, n. 2, p. 150-3, 1976.

WATTS, E.; ZHAO, Y.; DHARA, A.; ELLER, B.; PATWARDHAN, A.; SINAI, A. P. Novel Approaches Reveal that *Toxoplasma gondii* Bradyzoites within Tissue Cysts Are Dynamic and Replicating Entities In Vivo. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e01155-15, 2015.

WATTS, E. A.; DHARA, A.; SINAI, A. P. Purification *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts Using Percoll Gradients. **Curr Protoc Microbiol**, v. 45, p. 20C 2 1-20C 2 19, 2017.

WEISS, L. M.; MA, Y. F.; TAKVORIAN, P. M.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. **Infect Immun**, v. 66, n. 7, p. 3295-302, 1998.

WITHFORD, D. **Proteins: Structure and Function**. John Wiley & Sons, 2005. ISBN 978-0471498940.

WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. Human Toxoplasmosis: Occurrence in Infants as an Encephalomyelitis Verification by Transmission to Animals. **Science**, v. 89, n. 2306, p. 226-7, 1939.

WYROSDICK, H. M.; SCHAEFER, J. J. *Toxoplasma gondii*: history and diagnostic test development. **Anim Health Res Rev**, v. 16, n. 2, p. 150-62, 2015.

YU, L.; GASKELL, S. J.; BROOKMAN, J. L. Epitope mapping of monoclonal antibodies by mass spectrometry: identification of protein antigens in complex biological systems. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 9, n. 3, p. 208-15, 1998.

ZAMORA, D. O.; ROSENBAUM, J. T.; SMITH, J. R. Invasion of human retinal vascular endothelial cells by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Br J Ophthalmol**, v. 92, n. 6, p. 852-5, 2008.

ZHANG, Y. W.; HALONEN, S. K.; MA, Y. F.; TANOWTIZ, H. B.; WEISS, L. M. A  
Purification Method for Enrichment of the *Toxoplasma gondii* Cyst Wall. **J  
Neuroparasitology**, v. 1, 2010.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Damer Blake,  
Royal Veterinary College (RVC),  
United Kingdom

## REVIEWED BY

Ifeoma Nancy Nzelu,  
Federal University of Agriculture  
Makurdi (FUAM), Nigeria  
Alice Vismarra,  
University of Parma, Italy

## \*CORRESPONDENCE

Luis F. P. Gondim  
pita@ufba.br

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Parasitology,  
a section of the journal  
Frontiers in Veterinary Science

RECEIVED 31 August 2022

ACCEPTED 22 September 2022

PUBLISHED 13 October 2022

## CITATION

Rezende-Gondim MM, da Silva AV,  
Dubey JP, Schares GRM and  
Gondim LFP (2022) Immunomagnetic  
separation of *Toxoplasma gondii* and  
*Hammondia* spp. tissue cysts  
generated in cell culture.  
*Front. Vet. Sci.* 9:1033380.  
doi: 10.3389/fvets.2022.1033380

## COPYRIGHT

© 2022 Rezende-Gondim, da Silva,  
Dubey, Schares and Gondim. This is an  
open-access article distributed under  
the terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution  
or reproduction is permitted which  
does not comply with these terms.

# Immunomagnetic separation of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia* spp. tissue cysts generated in cell culture

Mariana M. Rezende-Gondim<sup>1</sup>, Aristeu V. da Silva<sup>2</sup>,  
Jitender P. Dubey<sup>3</sup>, Gereon R. M. Schares<sup>4</sup> and  
Luís F. P. Gondim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, <sup>2</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil, <sup>3</sup>United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center, Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville, MD, United States, <sup>4</sup>Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Epidemiology, National Reference Centre for Toxoplasmosis, Greifswald-Insel Riems, Germany

*Toxoplasma gondii* is commonly transmitted among animals and humans by ingestion of infected animal tissues or by consumption of food and water contaminated with environmentally-resistant oocysts excreted by cats. Tissue cysts and oocysts have different walls, whose structures and compositions are poorly known. Herein, we describe an immunomagnetic separation (IMS) method that was successfully used for purification of *T. gondii* tissue cysts generated in cell culture. We used an IgG monoclonal antibody (mAb) that reacts against antigens in tissue cyst walls. Many *in vitro* produced cysts were obtained by this IMS; >2,000 *T. gondii* cysts were isolated from a single culture flask of 25 cm<sup>2</sup>. Tissue cysts from two *Hammondia* spp., *H. hammondi*, and *H. heydorni*, produced in cell culture were also separated using this method. As a reference, purification of tissue cysts by Percoll gradients was used. Percoll was able to separate *T. gondii* tissue cysts produced in mice but was not suitable for purifying *T. gondii* tissue cysts produced *in vitro*. The IMS described here should favor proteomic studies involving tissue cysts of *T. gondii*.

## KEYWORDS

monoclonal antibody, tissue cyst wall, *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, *Hammondia heydorni*, immunomagnetic

## Introduction

*Toxoplasma gondii* is a globally distributed protozoan parasite, which can infect almost all warm-blooded animals, including humans (1). The two parasite stages involved in its oral horizontal transmission are tissue cysts (TC) and oocysts. Tissue cysts are formed in brain, muscles and other organs of mammalian and avian hosts; they may contain thousands of bradyzoites (2). Animals and humans are mainly infected by consuming TC in raw or undercooked animal tissues and oocysts in contaminated food or water. Other ways of transmission include transplacental infection, organ transplantation, blood transfusion, and accidental inoculation using needles, but the infection by ingestion of oocysts and TC are believed to occur more often (3).

Currently, there is no effective way to eliminate TC in live animals. Tissue cysts possess walls, whose composition and structures are poorly known. The TC wall is formed by a combination of molecules from the host cell and by proteins secreted by the parasite, that confers both resistance to the TC, as well as helps the parasite to evade the host immune system (4, 5). Several proteins have been identified in the TC wall, including a 65KDa protein abundant in its matrix (6), the CST1 protein, which is associated to the integrity of *in vivo* produced TC (7), and BCP1, which is also essential to cyst wall formation (8). A study using a promiscuous biotin ligase allowed the identification of previously described cyst wall proteins of *T. gondii*, as well as undescribed ones (9).

A crucial step to better understand the composition of the TC wall of *T. gondii* is to obtain purified TC. A monoclonal antibody (mAb) initially established to bind oocysts and designated K8/15-15 was shown to also bind to TC walls of *T. gondii* (10). In addition, this mAb also binds to cyst walls of related coccidia, including *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi*, and *Hammondia heydorni* (10). In the present study, we describe an immunomagnetic separation (IMS) method to obtain purified TC of *T. gondii*. In addition, the IMS was also qualitatively tested to capture *in vitro* produced TC of *H. hammondi* and *H. heydorni*.

## Materials and methods

### Study design

An IMS method was developed focusing the purification of *T. gondii* cysts produced in cell culture. The method was initially tested using *T. gondii* tissue cysts produced in mice, as well as *in vitro* generated cysts of *Hammondia* spp., which became available from a previous experiment (10). Subsequently, the IMS method was tested in different conditions (direct and indirect capture at two different temperatures) using *T. gondii* cysts generated in cell culture (Figure 1). Parasites were grown as tachyzoites in Monkey Kidney cells (Marc-145) and submitted to stress conditions to induce cyst formation. *In vitro* generated TC were tested by IMS and the captured cysts were quantified. Non-specific binding of host cells was tested with the magnetic beads and mAb. Purification of *in vitro* produced cysts was also attempted by Percoll gradients.

### Cell culture and *in vitro* production of cysts

Monkey kidney cells (Marc-145) (ATCC<sup>®</sup> CRL-12231) were selected for this study, as these cells have been shown to resist to stress conditions during cell culture for *in vitro* production of *N. caninum* cysts (11). Marc-145 cells

were cultured in RPMI medium supplemented with 1% antibiotic/antimycotic solution (100 units/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin and 0.25 µg/mL of amphotericin B) (Gibco<sup>®</sup>, Carlsbad, USA) and 5% of inactivate bovine serum (Invitrogen/Gibco<sup>®</sup>, Auckland, NZ), at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub>.

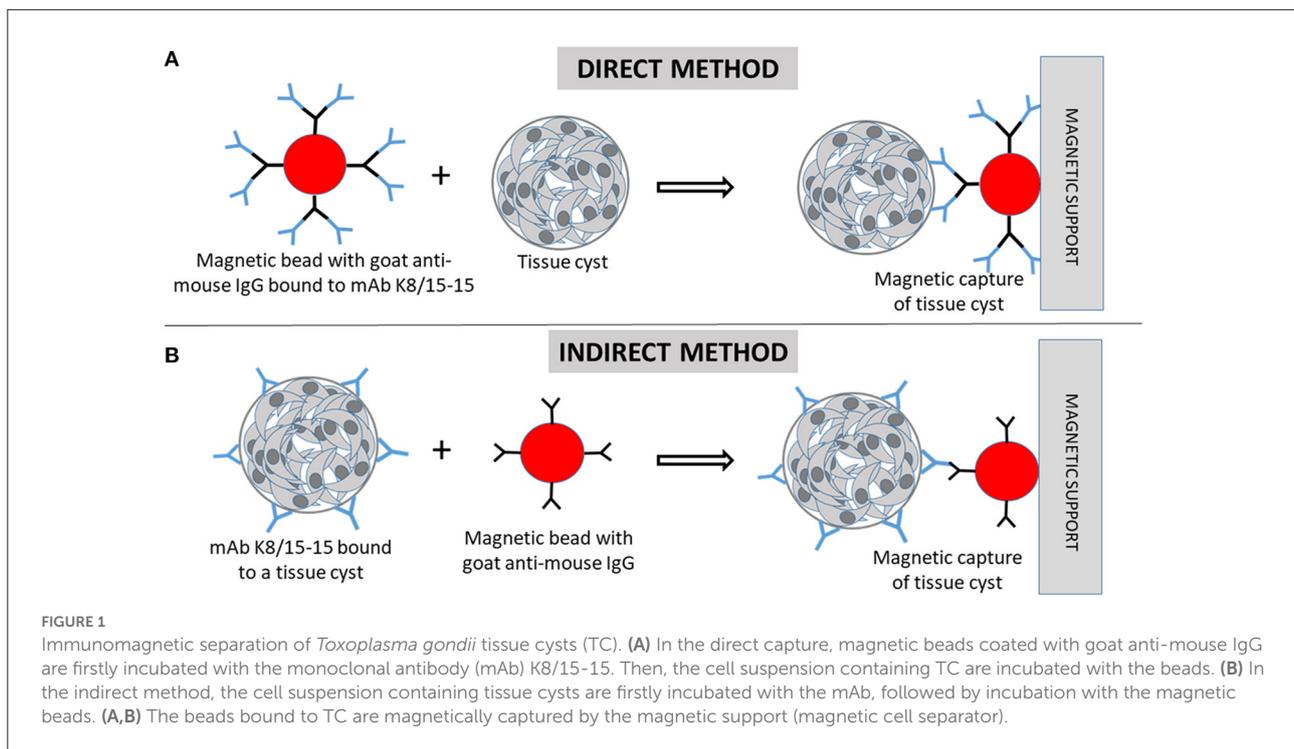
For *T. gondii in vitro* cyst production,  $7 \times 10^5$  Marc-145 cells were placed in 25 cm<sup>2</sup> flasks and after 48 h,  $7 \times 10^6$  tachyzoites of a chicken isolate of the parasite (TgCkBr284) (12, 13) were added to the flask; 24 h after infection, cultures were transferred to an incubator with no CO<sub>2</sub> supply. Culture medium was replaced by alkalized medium (pH 8.1) by adding 1M NaOH (18). Alkalized medium was replaced every 24 h for four consecutive days. Cell monolayers were trypsinized, and after detachment of the cells from the flask surface, trypsin was blocked by adding 2 ml of fresh medium (RPMI with 1% antibiotic/antimycotic and 5% of inactivate bovine serum). The content from each flask was transferred to a 15 ml-tube. Aliquots were collected from each tube and placed on teflon-coated slides for immunofluorescence examination. These *in vitro* produced cyst suspensions were named “pre-capture” samples. The 15 ml-tubes were centrifuged (300 g, at 24°C, no brake), the supernatant discarded and the sediment used for IMS.

### Magnetic beads and magnetic particle separator

Magnetic beads with diameters of 4.5 µm and coated with goat anti-mouse IgG (Dynabeads<sup>®</sup>, Invitrogen by Life Technologies) were used. The antibodies attached to these beads can react with the heavy chain of mouse IgG. The minimal volume of beads per reaction suggested by the manufacturer is 25 µl (~1 × 10<sup>7</sup> beads). However, we used 5 µl (~2 × 10<sup>6</sup> beads) or 10 µl (~4 × 10<sup>6</sup> beads) of the original bead suspension per reaction. In case of the production of 2,500 cysts in a culture flask, using 5 µl of beads would result in 800 of beads for each cyst of *T. gondii*. A magnetic particle separator (MPS) (MPG<sup>®</sup> 3-in-1 MPS<sup>®</sup>, Lincoln Park, USA) which contains inserts for tubes of 1.5, 15, and 50 ml was used to bind beads.

### Washing and coupling magnetic beads to the monoclonal antibody K8/15-15

The method used to couple the mAb to anti-mouse IgG magnetic beads was executed similarly as suggested by the manufacturer but was slightly modified and adapted for 1.5 ml tubes. The original 5-ml vial containing the beads (4 × 10<sup>8</sup> beads/ml) was vortexed for 40 s, and 25 µl (~1 × 10<sup>7</sup> beads) were transferred to a 1.5-ml centrifuge tube. The beads were suspended in 1 ml of an isolation buffer (PBS free of Ca<sup>2+</sup> and



$Mg^{2+}$  with 0.1% BSA and 2 mM EDTA, pH 7.4) and placed on a magnetic particle separator (MPS) for 1 min. The supernatant was discarded using an aspiration pump while the tube was still on the MPS. The tube was removed from the MPS, and the beads resuspended with 25  $\mu$ l of isolation buffer.

Two hundred  $\mu$ l of the mAb K8/15-15 (hybridoma supernatant) at 1:10 or 1:5 dilutions in isolation buffer was homogenized with the beads (25  $\mu$ l) and incubated at 7°C in a mixer with gentle titling of the tubes every 3–4 min. The tube was placed on the MPS for 1 min and the supernatant aspirated and discarded while the tube was on the MPS. The tube was removed from the MPS, and 1.5 ml of isolation buffer was added to wash the excess of unbound antibodies. The supernatant was removed while the tube was attached to the MPS by using a suction device. The washing step was repeated once. The tube was removed from the MPS, and the beads suspended with 1 ml of isolation buffer. This suspension containing the beads coupled to the mAb was stored at 4°C. At the end of the mAb-beads coupling procedure, the volume of beads in 1 ml was  $6.4 \times 10^6$ , which was divided in fractions of 200  $\mu$ l ( $1.26 \times 10^6$  beads per aliquot) for subsequent experiments.

## IMS of tissue cysts produced in mice and cysts of related coccidia

Two C57 mice were each intraperitoneally inoculated with two tissue cysts of the ME-49 strain of *T. gondii*. Four

months later, the mice were euthanized, and their brains aseptically removed. The two mice were used in a previous experiment (10), approved by the Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei of the German Federal State of Mecklenburg-Vorpommern. Each mouse brain was homogenized in 600–800  $\mu$ l of PBS/T (0.05% Tween 20) using a glass tissue grinder and TC quantified by microscopically counting three aliquots of 10  $\mu$ l of the brain suspension on a glass slide with a coverslip at 200  $\times$  magnification. The TC were concentrated by Percoll gradients in 15-ml plastic centrifuge tubes, as previously described (14, 15). In brief, 10 ml of PBS/T (0.05% Tween 20) were added to 1 ml of the brain suspension. Then, 1.5 ml of 30% Percoll in PBS/T and 1.5 ml of 90% Percoll in PBS/T were consecutively underlayered to the bottom of the brain suspension. The tube was centrifuged at 1,500 g at 4°C for 15 min. The entire content of the 30 and 90% Percoll gradients were collected, added to a 50 ml centrifuge tube, and the tube filled with PBS to the top. The tube was centrifuged for 1,200 g for 10 min at 4°C, the supernatant discarded, and the sediment resuspended with 200  $\mu$ l of PBS.

The TC, which had been purified by Percoll gradients, were mixed with 200  $\mu$ l of isolation buffer. Each fraction of tissue cysts was added to a 1.5-ml tube containing 200  $\mu$ l of the magnetic beads coupled with the mAb K8/15-15. The tube was incubated for 20 min at 7°C in an automated mixer. Each tube was placed in the MPS for 2 min and while it was there, the supernatant was discarded by aspiration. The tube was removed from the MPS, and 1 ml of isolation buffer was added. The solution was

pipetted 2–3 times and the tube placed in the MPS for 2 min. The supernatant was aspirated and discarded. This washing step was repeated twice. The tube was removed from the MPS, and the beads suspended with 100  $\mu$ l of PBS. An aliquot of 10  $\mu$ l was observed at a Nikon Eclipse-Ti microscope at 200, 400, and 600 $\times$  magnifications. The images were evaluated using phase contrast microscopy.

Cysts of *H. hammondi* and *H. heydorni* were generated in a finite bovine embryo heart cell line (KH-R; Friedrich-Loeffler-Institut, cell line No. RIE 090), as previously described (10). In brief, supernatants of the 25 cm<sup>2</sup>-flasks containing *H. hammondi* and *H. heydorni* cultures were individually aspirated and centrifuged at 200 g for 10 min. The sediment was suspended with 200  $\mu$ l of isolation buffer and added to 400  $\mu$ l of magnetic beads coupled to the mAb K8/15-15. The material was incubated at room temperature for 30 min in continuous agitation, and after this step, placed on the MPS. The supernatant was discarded, and the beads were re-suspended in 100  $\mu$ l of isolation buffer. Two aliquots of 10  $\mu$ l each were observed at the microscope. A sample of *H. heydorni* cysts was examined by immunofluorescence, but instead of a FITC anti-mouse IgG conjugate, an anti-mouse IgG coupled with a red fluorochrome was employed (Alexa fluor 555, Invitrogen).

## IMS of *in vitro* produced cysts

IMS for *in vitro* produced cysts of *T. gondii* was tested by direct and indirect methods, each one evaluated in two reaction temperatures (4 and 24°C), in total four tests. These tests were also examined using non-infected host cells (prior and post-immunomagnetic capture) to test the specificity of the method. The cells were counted in a Neubauer chamber.

## Direct capture of *in vitro* produced cysts (tests 1 and 2)

The mAb K8/15-15 was diluted 1:10 in isolation buffer (200  $\mu$ l) and was incubated with 20  $\mu$ l of washed magnetic beads in a tube of 1.5 ml. The tube was agitated at 4°C (test 1) or 24°C (test 2) for 40 min using an automated mixer, followed by placement of the tube on the MPS for 1 min. Then, the supernatant was collected and discarded, and the tube removed from the MPS. Isolation buffer (1.5 ml) was added to the tube, which was placed again for 1 min on the MSP. The supernatant was collected and discarded. This step of addition and removal of isolation buffer was repeated as above, and the beads were finally suspended in 1 ml of isolation buffer and stored in a sterile 1.5 ml tube at 4°C.

Pellets containing non-infected Marc-145 cells and *in vitro* produced cysts of *T. gondii* were each mixed with 250  $\mu$ l of isolation buffer and 250  $\mu$ l of magnetic beads coupled to mAb K8/15-15. Each suspension was placed in a 1.5 ml tube. The

tubes were agitated at 4°C (test 1) or 24°C (test 2) for 20 min using an automated mixer, then, placed on MPS for 2 min. The supernatant was collected and discarded, and the magnetically attached content was saved. The tubes were removed from the MPS, and 1 ml of isolation buffer was gently added to the tube. The content was homogenized by gently pipetting the solution for three times. The tubes were placed again on the MPS for 1 min, then, the supernatant with non-attached content was collected and discarded. The tubes were submitted for an additional round of washing by adding and removing isolation buffer and using the MPS. After washing, the attached structures were homogenized with 100  $\mu$ l of PBS and 30  $\mu$ l from each tube were placed on three wells of teflon-coated slides for immunofluorescence evaluation.

## Indirect capture of *in vitro* produced cysts (tests 3 and 4)

Pellets containing non-infected Marc-145 cells and *in vitro* produced cysts of *T. gondii* were each vortexed with 500  $\mu$ l of isolation buffer and 5  $\mu$ l of mAb K8/15-15. Each tube was agitated at 4°C (test 3) or 24°C (test 4) for 10 min using an automated mixer, then, 1 ml of isolation buffer was added to each tube, followed by centrifugation (400 g, 4 or 24°C, no brake) for 10 min. After centrifugation, the supernatant was discarded, and each pellet was suspended with 200  $\mu$ l of isolation buffer and 5  $\mu$ l of washed beads. The tubes were agitated using an automated mixer at 4°C (test 3) or 24°C (test 4) for 20 min. Then, 1 ml of isolation buffer was added to each tube, followed by placement of the tubes on the MPS for 2 min. The tubes were removed from the MPS, and 1 ml of isolation buffer was gently added to the tube. The content was re-suspended by gently pipetting the solution for three times. The tubes were placed again on the MPS for 1 min, then, the supernatant with non-attached content was collected and discarded. The tubes were submitted for an additional round of washing by adding and removing isolation buffer and using the MPS. After washing, the remaining material was homogenized with 100  $\mu$ l of PBS and 30  $\mu$ l of the content from each tube were placed on three wells of teflon-coated slides for immunofluorescence evaluation.

## Separation attempt of *in vitro* produced cysts using percoll gradients

TC of *T. gondii* were generated *in vitro* as described elsewhere in this study. Host cells containing cysts of the parasite grown on a 25-cm<sup>2</sup> culture flask were trypsinized, blocked by adding 2 ml of fresh medium and the washed content (1 ml) transferred to a 15-ml tube. The 1 ml solution containing cysts in host cells was homogenized with 10 ml of PBS-Tween (0.05% of

Tween). Separation of cysts by Percoll gradients were conducted identically as the use of Percoll for separation of cysts produced *in vivo*. The final target fraction was resuspended with 200  $\mu$ l of PBS and observed by light microscopy.

## Immunofluorescence

Teflon-coated slides containing 12 wells of 5 mm diameter each were used in immunofluorescence reactions. Wells were filled with suspensions of 10  $\mu$ l of host cells containing *T. gondii* cysts before capture using antibody-coated glass beads (pre-capture) and after IMS (post-capture). The slide was dried for 15 min at 37°C and stored at -20°C until analysis. For immunofluorescence reaction, the slide was fixed in cold acetone for 5 min, immersed in PBS for 10 min and dried at room temperature. The primary antibody (mAb K8/15-15), diluted at 1:2 in PBS, was added to each well and the slide was incubated in a humid chamber at 37°C for 30 min. After incubation, the slide was immersed in a washing buffer (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 100 mM and NaCl 35 mM, pH 9.0) for 10 min, followed by a washing in PBS for 10 min. The slide was dried at room temperature and the secondary antibody (FITC anti-mouse IgG, Sigma Aldrich, USA) was applied at 1:50 dilution and 0.05% of Evans blue. Cysts generated in cell culture of *T. gondii* and *Hammondia heydorni* were also tested as described above, but using a rabbit anti-BAG1 (16) as a primary antibody, and Alexafluor (Alexa 488) donkey anti-rabbit-IgG (1:500) as a secondary antibody. Slides were incubated in a dark and humid chamber for 30 min and washed as described for the primary antibody. Slides were dried at room temperature and mounted with glycerin (90% glycerol and 10% of PBS) and coverglass. Reactions were analyzed at a Nikon microscope and Nikon NIS-Elements software.

## Statistical analysis

Immunomagnetic capture for *in vitro* produced cysts was performed in quadruplicates, resulting in a total of 16 culture flasks for tests 1, 2, 3, and 4. The number of fluorescent cysts in three wells (total of 30  $\mu$ l) was counted for each flask, and the total number of cysts per flask was extrapolated for the 100  $\mu$ l solution. The cyst/host cells ratio was determined by counting the labeled cysts and host cells in five microscopic fields (600  $\times$  magnification) of each well. Pre-capture and post-capture samples was evaluated in triplicate, resulting in a total of 96 samples. The cyst/host cells ratio was determined for the pre-capture samples. The Kruskal-Wallis test was employed to compare tests 1, 2, 3, and 4 in each pre- and post-capture samples. Differences were considered statistically significant if  $p < 0.05$ .

## Results

### IMS of *in vitro* produced cysts of *T. gondii*

The post-capture samples were examined by microscopic evaluation of all fields on the entire well of the slide (Table 1). The cyst/host cell ratio for pre-capture samples were obtained after evaluation by immunofluorescence of five microscopic fields using 600  $\times$  magnification. The captured cysts exhibited fluorescence in their cyst walls and magnetic beads were attached to them. Reactions were also tested using rabbit serum to BAG1 which label bradyzoites inside the cyst (Figure 2).

### IMS of *T. gondii* tissue cysts produced in mice

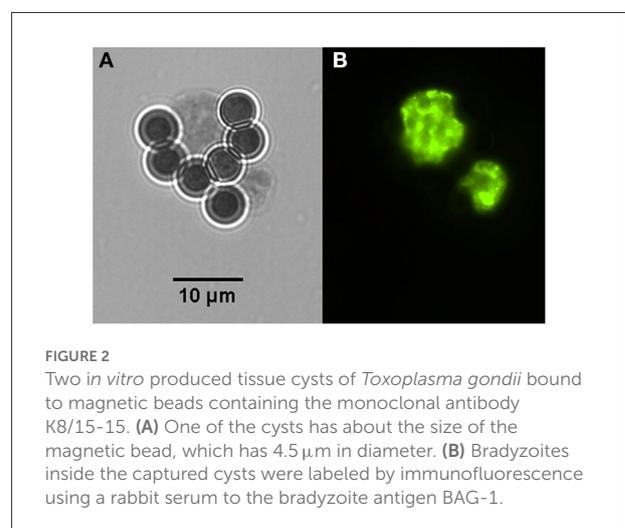
Tissue cysts ( $n = 1,160$ ) were obtained from two chronically infected mice. About 50% of the tissue cysts were recovered after purification using Percoll gradients. The resultant suspension

TABLE 1 Immunomagnetic separation of *in vitro* produced cysts of *Toxoplasma gondii* by the direct and indirect methods using two reaction temperatures.

	Number of cysts captured per flask			
	Direct at 4°C	Direct at 24°C	Indirect at 4°C	Indirect at 24°C
	320	620	584	2,481
	330	834	396	1,590
	161	557	541	1,775
	518	570	396	2,762
Mean	332.25*	645.25	479.25	2,152*

Direct = magnetic beads anti-mouse IgG are coupled to the murine monoclonal antibody K8/15-15, and then, incubated with cyst-host cell suspension; Indirect = cyst-host cell suspension was incubated with the murine monoclonal antibody K8/15-15, and then, incubated with the magnetic beads anti-mouse IgG.

\*To indicate statistically significant differences.



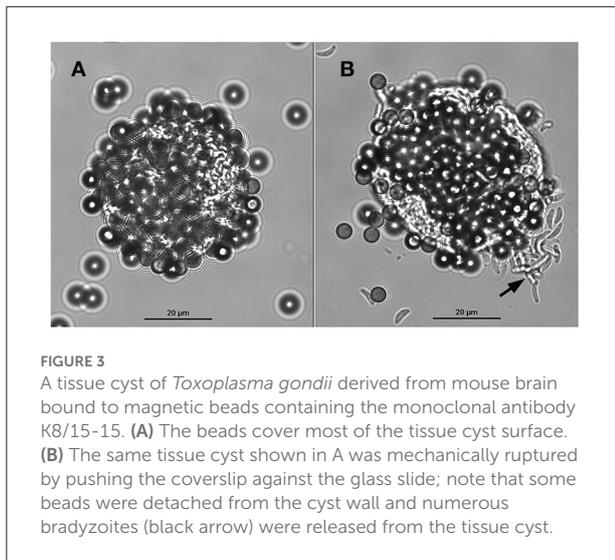


FIGURE 3

A tissue cyst of *Toxoplasma gondii* derived from mouse brain bound to magnetic beads containing the monoclonal antibody K8/15-15. (A) The beads cover most of the tissue cyst surface. (B) The same tissue cyst shown in A was mechanically ruptured by pushing the coverslip against the glass slide; note that some beads were detached from the cyst wall and numerous bradyzoites (black arrow) were released from the tissue cyst.

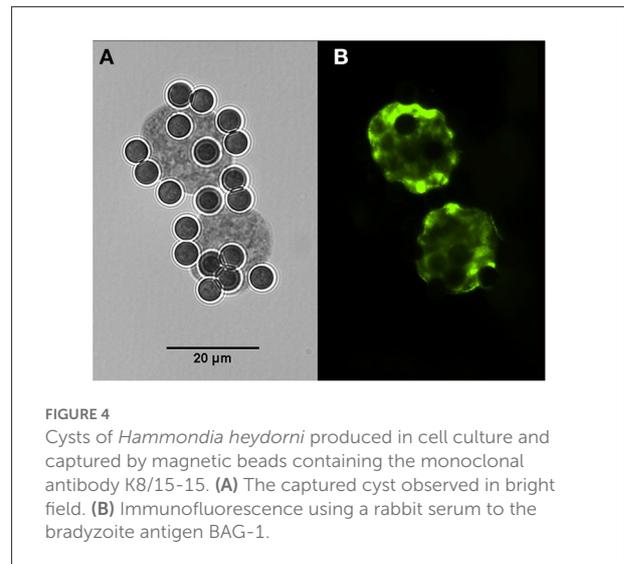


FIGURE 4

Cysts of *Hammondia heydorni* produced in cell culture and captured by magnetic beads containing the monoclonal antibody K8/15-15. (A) The captured cyst observed in bright field. (B) Immunofluorescence using a rabbit serum to the bradyzoite antigen BAG-1.

with purified tissue cysts ( $n = 500\text{--}600$ ) contained  $\sim 9$  mouse erythrocytes per tissue cyst. After incubation with the mAb-coupled beads, the final bead suspension was resuspended with 100 or 200  $\mu\text{l}$  of PBS to facilitate the microscopical visualization of cyst-beads complexes. The surfaces of the tissue cysts were completely covered by the magnetic beads. To better visualize the tissue cysts which were covered by magnetic beads, and to ensure that they were indeed tissue cysts and not artifacts, the coverslip was mechanically pressed against the glass slide. The pressure on the coverslip caused the removal of part of the beads from the cyst wall and rupture the cyst, inducing the release of bradyzoites (Figure 3). No mouse erythrocytes were observed among the suspension. No further treatment was performed to separate tissue cysts from magnetic beads. For this reason, captured tissue cysts were not quantified.

### IMS of *H. hammondi* and *H. heydorni* cysts

Cysts of *H. hammondi* and *H. heydorni* were obtained from supernatants of bovine heart cells (KH-R) infected with sporozoites of the parasites. After IMS, magnetic beads attached to cysts of both parasites were suspended in 100  $\mu\text{l}$  solutions. Aliquots of 10  $\mu\text{l}$  contained  $\sim 7\text{--}10$  cysts, which varied in dimensions. Immunofluorescence was performed using captured cysts of *H. heydorni* (Figure 4).

All IMS methods (tests 1, 2, 3, and 4) employed in the current study showed significant increases of the cyst/host cell ratio, reaching a maximum increase of 3.78 times using test 4 (Figure 5A). Statistical difference was observed between test 4 and test 1; however, there was no statistical difference among tests 2, 3, and 4. The median of cysts isolated in each test (4

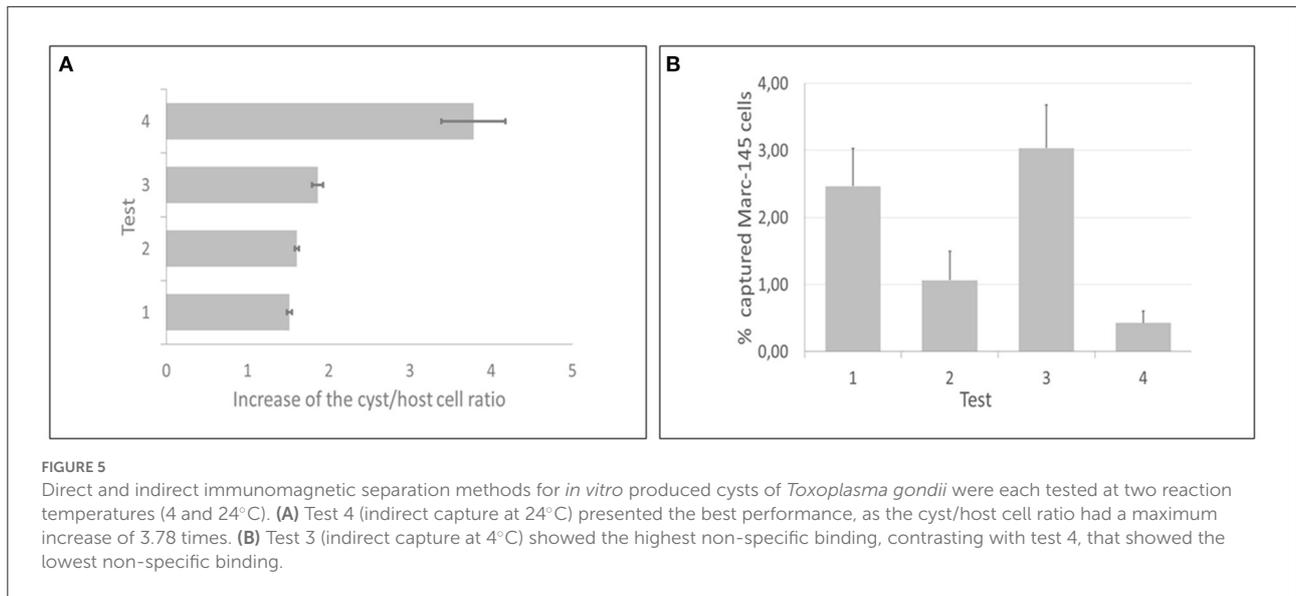
flasks per test) corresponded to 305 (test 1), 610 (test 2), 480 (test 3), and 2,170 (test 4). Non-specific capture was also examined and was based on the binding of magnetic beads to non-infected host cells (Marc-145). In all tests some degree of non-specific binding was observed. In test 3, a higher number of host cells was captured in comparison with test 4 (Figure 5B). The duration of the test for the indirect and direct method were 1 h and 1 h 10 min, respectively.

### Percoll separation of *in vitro* produced cysts of *T. gondii*

The final 200  $\mu\text{l}$  suspension obtained between after Percoll separation was observed by light microscopy and contained rare cells with cyst-like structures. The cysts did not migrate to the expected fractions (30 and 90% Percoll). Microscopic examination of aliquots of the top layer, which is expected to contain cell debris, revealed host cells with cyst-like structures (parasitophorous vacuoles filled with zoites); it shows that cysts produced in cell culture presented similar densities (low density) as non-infected cells (Marc-145), and for this reason, did not migrate to 30 and 90% Percoll gradients.

### Discussion

We reported here an IMS method for isolation of tissue cysts of *T. gondii* using a murine IgG-mAb. The mAb-attached magnetic beads were demonstrated to bind to cyst walls of the parasite. To our knowledge, this is the first IMS method targeted for intact tissue cysts of *T. gondii*. The same mAb-attached beads also successfully captured cysts of *H. hammondi* and *H. heydorni* produced in cell culture.



A previous IMS method was developed for purification of *T. gondii* cyst wall using lysed tissue cysts from *in vivo* or *in vitro* produced cysts (17); the authors used magnetic beads coupled to *Dolichos biflorans* lectin (DBA), as DBA had been shown to bind to a cyst wall protein called CST1 (18). Three IMS methods have been developed, so far, to detect *T. gondii* oocysts or sporocysts in contaminated samples. In the first method, the authors conducted an indirect binding using an IgM mAb targeted to the oocyst wall of *T. gondii* (19); however, when this method was tested with turbid water containing debris, non-specific binding of debris to the coupled magnetic beads was observed. Another IMS was attempted with a different mAb-IgM directed to the sporocyst wall of *T. gondii* (20); in this method a direct binding was employed, i.e., the magnetic beads were firstly coupled to the mAb, followed by addition of the test sample. For this test, sonication of the test sample is needed, as sporocysts must be released from oocysts before adding the magnetic beads (20); sporocysts of related coccidia, such as *N. caninum* and *Hammondia* sp., are bound by the mAb, what required additional analysis of the samples by PCR (20). The third IMS consisted of an improvement of the previous methods and was based on the use of an IgM-mAb covalently bound to magnetic beads coupled to qPCR (21). This method showed promising results for detection of oocysts in contaminated fruits.

To our knowledge, no reported IMS method has been applied for intact tissue cysts of *T. gondii*. The IMS developed here, based on a murine IgG-mAb, can capture significant numbers of *T. gondii* cysts using a single culture flask of 25 cm<sup>2</sup>. Moreover, this IMS is also applicable to separate cysts of related coccidia, such as *H. hammondi* and *H. heydorni*, which have been used in comparative proteomic/genomic studies with *T. gondii* (22, 23). In the present work, the IMS was qualitatively tested with *T. gondii* tissue cysts produced in mice, as these cysts became available from a previous experiment (10). The major

focus of this study was IMS using *T. gondii* cysts generated in cell culture. The method resulted in expressive numbers of separated cysts (>2,000) produced in cell culture and represents a promising technique for studies involving tissue cysts.

Tissue cysts of *T. gondii* have been separated for decades using Percoll gradients (24). A great recovery of tissue cysts was achieved with this method, which has been performed in different versions and applied to isolate tissue cysts from other animal species, besides mice (14, 15). The isolated cysts obtained by Percoll gradients are quite pure, with some contamination with red blood cells. An improved Percoll separation method resulted in a pure fraction of tissue cysts with no erythrocyte contamination (25). In the present work, we used Percoll gradients, which successfully allowed the separation of tissue cysts produced in mice. When we applied the same method for *in vitro* generated tissue cysts, the cysts did not migrate to the expected gradient. The density of these cysts derived from cell culture was probably lower than those produced in mice. A similar finding was reported by others (25), who observed that the use of Percoll gradients is not indicated for separation of cysts from mutant strains; these cysts are more fragile than typical ones, so they may not resist to the separation protocol or are not able to reach the expected gradient. We have not tested the density of cyst derived from cell culture, but as these cysts are produced in 4 days, they should be more fragile and present a lower density than those developed in mice.

The IMS for *T. gondii* tissue cyst in the current work was tested using direct and indirect methods, each one evaluated at two temperatures. The indirect method, which consisted of the addition of the mAb to the cell suspension, followed by inclusion of the magnetic beads to the reaction, showed the best performance. The cyst/host cell ratio was significantly increased by using the indirect method at a reaction temperature of 24°C. Although the indirect method at 24°C (test 4) did not

statistically differed from the indirect method at 4°C (test 3), the latter one (test 3) showed a significant non-specific binding to Marc-145 cells. The direct method requires a longer initial incubation time (antibody plus magnetic beads) when compared with the incubation time (antibody plus target cell) of the indirect method. Therefore, the duration to perform the direct method was longer than the indirect one.

The mAb used here is of IgG class, what seems to minimize non-specific binding of the mAb to host cells or cell debris. Some additional experimental controls that were not included in our study, such as the use of magnetic beads uncoupled to mAb K8/15-15 to test non-specific binding of the beads to tissue cysts would certainly enrich the results obtained here. During the IMS for tissue cysts, caution should be taken to wash the complex bead-tissue cysts, as tissue cysts generated in cell culture are more fragile than those generated in mice. Instead of vortexing, the complexes should be washed by pipetting the sample using 1 ml-automatic pipettes.

In conclusion, we developed an IMS method based on the use of an IgG mAb targeted to tissue cyst walls of *T. gondii*. We could isolate significant numbers of cysts produced in cell culture. The method reported here should facilitate identification of molecules on the walls of *T. gondii* and related parasites. Moreover, it represents a promising alternative for using *in vivo* generated cysts, reducing the need of animal experiments.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei of the German Federal State of Mecklenburg-Vorpommern.

## References

- Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev.* (2005) 6:41–61. doi: 10.1079/AHR2005100
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* (1998) 11:267–99. doi: 10.1128/CMR.11.2.267
- Robert-Gangneux F, Darde ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* (2012) 25:264–96. doi: 10.1128/CMR.05013-11
- Tu V, Yakubu R, Weiss LM. Observations on bradyzoite biology. *Microbes Infect.* (2018) 20:466–76. doi: 10.1016/j.micinf.2017.12.003
- Tomita T, Sugi T, Yakubu R, Tu V, Ma Y, Weiss LM. Making home sweet and sturdy: *Toxoplasma gondii* Ppgalnac-ts glycosylate in hierarchical order and confer cyst wall rigidity. *Mbio.* (2017) 8:e02048–16. doi: 10.1128/mBio.02048-16
- Parmley SF, Yang S, Harth G, Sibley LD, Sucharczuk A, Remington JS. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol Biochem Parasitol.* (1994) 66:283–96. doi: 10.1016/0166-6851(94)90155-4
- Tomita T, Bzik DJ, Ma YF, Fox BA, Markillie LM, Taylor RC, et al. The *Toxoplasma gondii* cyst wall protein Cst1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence. *PLoS Pathog.* (2013) 9:e1003823. doi: 10.1371/journal.ppat.1003823

## Author contributions

MR-G: conducted the experiments, analyzed the results, and wrote of the manuscript. AS: performed the statistics and revised the manuscript. JD: provided samples and revised the manuscript. GS and LG: designed the experiment, provided financial support, and revised the manuscript. All authors approved the final version of the submitted manuscript.

## Funding

MR-G was recipient of a fellowship by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This work was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) under the Grant Number APP0053/2016. LG and AS are recipients of research productivity fellowships by Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The generation of the mAb was partially funded by the German Federal Ministry of Education and Research (Toxonet01 and Toxonet02; funds to GS; 01KI0765 and 01KI1002F).

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

8. Milligan-Myhre K, Wilson SK, Knoll LJ. Developmental change in translation initiation alters the localization of a common microbial protein necessary for *Toxoplasma* chronic infection. *Mol Microbiol.* (2016) 102:1086–98. doi: 10.1111/mmi.13538
9. Tu V, Tomita T, Sugi T, Mayoral J, Han B, Yakubu RR, et al. The *Toxoplasma gondii* cyst wall interactome. *mBio.* (2020) 11:e02699–19. doi: 10.1128/mBio.02699-19
10. Gondim LF, Wolf A, Vrhovec MG, Pantchev N, Bauer C, Langenmayer MC, et al. Characterization of an IgG monoclonal antibody targeted to both tissue cyst and sporocyst walls of *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol.* (2016) 163:46–56. doi: 10.1016/j.exppara.2016.01.014
11. Risco-Castillo V, Fernandez-Garcia A, Ortega-Mora LM. Comparative analysis of stress agents in a simplified *in vitro* system of *Neospora caninum* bradyzoite production. *J Parasitol.* (2004) 90:466–70. doi: 10.1645/GE-3298
12. Gonçalves IN, Uzêda RS, Lacerda GA, Moreira RR, Araujo FR, Oliveira RH, et al. Molecular frequency and isolation of cyst-forming coccidia from free ranging chickens in Bahia state, Brazil. *Vet Parasitol.* (2012) 190:74–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.05.007
13. Rocha DS, Nilsson MG, Maciel BM, Pena HFJ, Alves BF, Silva AV, et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens in Bahia, Brazil. *J Parasitol.* (2018) 104:377–82. doi: 10.1645/18-9
14. Blewett DA, Miller JK, Harding J. Simple technique for the direct isolation of *Toxoplasma* tissue cysts from fetal ovine brain. *Vet Rec.* (1983) 112:98–100. doi: 10.1136/vr.112.5.98
15. Buchholz KR, Fritz HM, Chen X, Durbin-Johnson B, Rocke DM, Ferguson DJ, et al. Identification of tissue cyst wall components by transcriptome analysis of *in vivo* and *in vitro* *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *Eukaryot Cell.* (2011) 10:1637–47. doi: 10.1128/EC.05182-11
16. McAllister MM, Parmley SF, Weiss LM, Welch VJ, McGuire AM. An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (Bag5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. *J Parasitol.* (1996) 82:354–5. doi: 10.2307/3284181
17. Zhang YW, Halonen SK, Ma YF, Tanowitz HB, Weiss LM. A purification method for enrichment of the *Toxoplasma gondii* cyst wall. *J Neuroparasitol.* (2010) 1:N101001. doi: 10.4303/jnp/N101001
18. Zhang YW, Halonen SK, Ma YF, Wittner M, Weiss LM. Initial characterization of Cst1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect Immun.* (2001) 69:501–7. doi: 10.1128/IAI.69.1.501-507.2001
19. Dumetre A, Darde ML. Immunomagnetic Separation of *Toxoplasma gondii* Oocysts using a monoclonal antibody directed against the oocyst wall. *J Microbiol Methods.* (2005) 61:209–17. doi: 10.1016/j.mimet.2004.11.024
20. Dumetre A, Darde ML. Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. *Parasitol Res.* (2007) 101:989–96. doi: 10.1007/s00436-007-0573-0
21. Hohweyer J, Cazeaux C, Travaille E, Languet E, Dumetre A, Aubert D, et al. Simultaneous detection of the protozoan parasites *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food Microbiol.* (2016) 57:36–44. doi: 10.1016/j.fm.2016.01.002
22. Walzer KA, Wier GM, Dam RA, Srinivasan AR, Borges AL, English ED, et al. *Hammondia hammondi* harbors functional orthologs of the host-modulating effectors Gra15 and Rop16 but is distinguished from *Toxoplasma gondii* by a unique transcriptional profile. *Eukaryot Cell.* (2014) 13:1507–18. doi: 10.1128/EC.00215-14
23. Sokol SL, Primack AS, Nair SC, Wong ZS, Tembo M, Verma SK, et al. Dissection of the *in vitro* developmental program of *Hammondia hammondi* reveals a link between stress sensitivity and life cycle flexibility in *Toxoplasma gondii*. *eLife.* (2018) 7:36491. doi: 10.7554/eLife.36491
24. Cornelissen AW, Overdulve JP, Hoenderboom JM. Separation of *Isospora (Toxoplasma) gondii* cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. *Parasitology.* (1981) 83:103–8. doi: 10.1017/S0031182000050071
25. Watts EA, Dhara A, Sinai AP. Purification *Toxoplasma gondii* tissue cysts using Percoll gradients. *Curr Protoc Microbiol.* (2017) 45:20C 2 1–C 2 19. doi: 10.1002/cpmc.30

# Cytologic detection of *Toxoplasma gondii* in the cerebrospinal fluid of a dog and in vitro isolation of a unique mouse-virulent recombinant strain

Waléria Borges-Silva, Mariana M. Rezende-Gondim, Gideão S. Galvão,<sup>id</sup>  
Daniele S. Rocha, George R. Albuquerque, Luís P. Gondim<sup>1</sup><sup>id</sup>

**Abstract.** Parasites resembling *Neospora caninum* or *Toxoplasma gondii* were detected by cytologic examination of cerebrospinal fluid (CSF) from a dog with neurologic disease. The dog became severely ill and was euthanized. Canine tissue homogenates were used for direct parasite isolation in cell culture, bioassay in 2 mouse lineages, and PCR. *T. gondii* was isolated in monkey kidney cells, and species identity was confirmed by PCR. Inoculated parasites were highly virulent for mice, which developed clinical signs and were euthanized immediately. PCR-RFLP for *T. gondii* using the cultured isolate (TgDgBA22) was conducted with 12 genetic markers, and a unique recombinant strain was identified. Detection of *T. gondii* by CSF cytology, although described in humans, had not been reported previously in dogs, to our knowledge, and was crucial for the diagnosis of toxoplasmosis in the examined dog.

**Key words:** canine; cerebrospinal fluid; genotype; toxoplasmosis; virulence.

*Toxoplasma gondii*, which is one of the most successful protozoan parasites, uses a great variety of animals as hosts, is vertically and horizontally transmitted, possesses opportunistic behavior, and is distributed globally.<sup>2</sup> Since ~2000, outbreaks of human toxoplasmosis in Brazil have affected hundreds of people.<sup>12,14</sup>

Companion animals, such as dogs, usually share with their owners some means of parasite transmission and may also be affected clinically by toxoplasmosis. Scarce data are available on the isolation of viable *T. gondii* from clinical cases of canine toxoplasmosis.<sup>3</sup> Serology is the major tool used to assess clinical toxoplasmosis; however, analysis of cerebrospinal fluid (CSF) is an alternative method for patients with central nervous system infection.<sup>5</sup> Despite the importance of CSF analysis in veterinary medicine, we found no published report on *T. gondii* detection by CSF cytology in dogs. We describe here *T. gondii* identification based on CSF cytology, bioassay in 2 mouse lineages, in vitro isolation of the parasite, and analysis by PCR–restriction-fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The use of animals in our study was approved by the Ethical Committee of the Federal University of Bahia, under license 32/2014.

In 2015, a stray 1-y-old female mixed-breed dog (body score: 4 of 9) was presented to the Animal Teaching Hospital at the Federal University of Bahia, Brazil, because of a fracture of the right femur. The animal had been rescued from the street, in Salvador, Bahia, after being hit by a car.

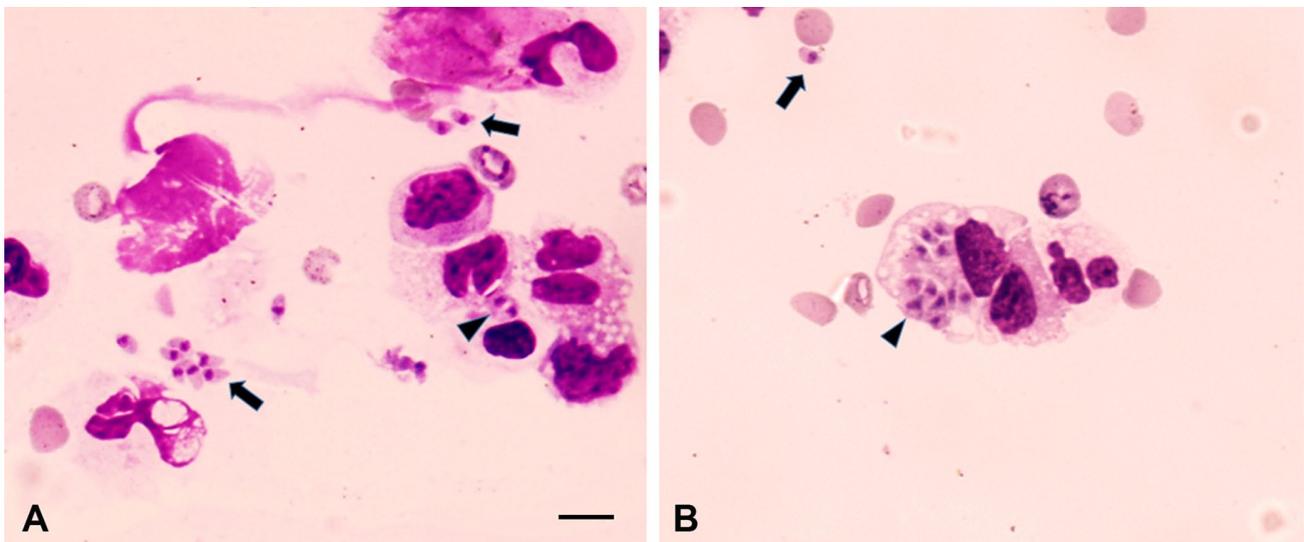
Three days after surgical femur fracture repair, the dog had hyporexia and rigidity in the neck and mandible. Prescribed treatment for the dog included dipyrone (25 mg/kg, PO, q8h, for 5 d), tramadol (4mg/kg, PO, q8h, for 5 d), diazepam (0.5 mg/kg, PO, q12h, for 4 d), and metronidazole (15 mg/kg, PO, q12h, for 8 d). On day 4 after surgery, the clinical condition of the dog had worsened; the dog was in lateral recumbency with hyperextension of the fore- and hindlimbs. On day 5, physical examination findings included rectal temperature of 40.1°C, heart rate of 140/min, respiratory rate of 36/min, opisthotonus, bilateral miosis, dehydration, pale mucous membranes, prostration, semicomatose state, and intense edema, hematoma, and erythema in the right hindlimb.

A blood sample from the dog was characterized by hypochromic normocytic anemia, leukopenia with left shift, and thrombocytopenia. Blood cytology revealed moderate

---

Department of Veterinary Anatomy, Pathology and Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Bahia, Bahia, Brazil (Borges-Silva, Rezende-Gondim, Galvão, Gondim); Department of Agricultural and Environmental Sciences, State University of Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Bahia, Brazil (Rocha, Albuquerque).

<sup>1</sup>Corresponding author: Luís P. Gondim, Department of Veterinary Anatomy, Pathology and Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Bahia, Av. Adhemar de Barros 500, Salvador, Bahia 40170-110, Brazil. pita@ufba.br



**Figure 1.** Tachyzoites resembling *Neospora caninum* or *Toxoplasma gondii* in the cerebrospinal fluid from a dog with neurologic disease. **A.** Extracellular parasites (arrows); 2 intracellular tachyzoites (arrowhead) multiplying by endodyogeny. **B.** An extracellular tachyzoite (arrow), and several intracellular tachyzoites (arrowhead) in the cytoplasm of a macrophage. Quick hematologic stain (Instant Prov; Newprov). Bar = 10  $\mu$ m.

**Table 1.** Isolation of parasite in cell culture and by mouse bioassay using tissues from a Brazilian dog with neurologic disease.

	Brain	Spinal cord	Heart	Lungs
Culture flasks	2	2	1	1
Y-IFN-KO	1 (0.5 mL IP)	1 (0.5 mL IP/0.5 mL SC)	ND	ND
Swiss	1 (0.5 mL IP)	1 (0.5 mL IP/0.5 mL SC)	1 (0.5 mL IP)	1 (0.5 mL IP)

IP = intraperitoneally; ND = not done; SC = subcutaneously; Y-IFN-KO = C57 gamma interferon knockout mouse.

anisocytosis and polychromasia, activated monocytes, Lentz inclusions in leukocytes and erythrocytes, and toxic granules in the cytoplasm of segmented neutrophils. A CSF sample collected from the cisterna magna under general anesthesia showed pleocytosis with mixed populations of neutrophils and macrophages; numerous structures resembling protozoal zoites were observed in the cytoplasm of macrophages and outside the cells (Fig. 1). As the clinical condition of the dog deteriorated and it was comatose, euthanasia was elected.

Samples of brain, heart, lungs, and spinal cord were collected 12 h after euthanasia and placed in separate bottles containing a 2% solution of antibiotic-antimycotic (200 units/mL of penicillin, 200  $\mu$ g/mL of streptomycin, 0.50  $\mu$ g/mL of amphotericin B; Gibco by Thermo Fisher). During collection of tissue samples, tissue imprints were prepared on glass slides and stained using a Romanovsky-based commercial hematologic staining kit (Instant Prov; Newprov); tachyzoites were found in all examined organs of the dog (brain, spinal cord, heart, lungs), indicating systemic infection by the parasite.

The zoites observed in tissue imprints were morphologically compatible with *T. gondii* or *Neospora caninum*, given that some parasitophorous vacuoles contained organisms in pairs, suggestive of multiplication by endodyogeny. Tissue

samples were processed for cell culture and bioassay. In brief, samples from brain, spinal cord, lungs, and heart were ground with PBS containing 2% antibiotic-antimycotic (Thermo Fisher), filtered through sterile gauze, and then centrifuged; 1 mL of sediment from each tissue was added into six 25-cm<sup>2</sup> flasks containing monolayers of Vero cells (Table 1). For bioassays, 4 Swiss mice and 2 C57 gamma interferon knockout mice (Y-IFN-KO) were employed to isolate *T. gondii* or *N. caninum*. The Y-IFN-KO mice were included in the bioassay because this mouse model is more appropriate than Swiss mice for *N. caninum* isolation.<sup>6</sup> Tissue suspensions were administered to mice intraperitoneally and/or subcutaneously (Table 1).

Three days after direct inoculation of cell monolayers with homogenates of canine tissue samples, tachyzoites were visualized in 1 of 2 culture flasks inoculated with canine brain homogenate. The remaining flasks inoculated with tissue macerates of spinal cord, heart, and lungs had bacterial contamination and were discarded.

Six days after bioassay in mice with brain homogenate, one Y-IFN-KO mouse had a head tilt and ascites and was euthanized immediately. Tachyzoites were detected in the peritoneal fluid of the mouse and were used to inoculate 4

**Table 2.** Multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* from a dog with neurologic disease.

Isolate	SAG1	5'+3' SAG2	Alt. SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	APICO	CS3
TgDgBA22	I	III	III	I	I	III	I	II	NA	I	III	II

NA = no amplification.

culture flasks containing Vero cell monolayers. Tachyzoites were seen in one culture flask 24 h after inoculation. Of the 6 mice used in the experiment, 5 had clinical signs (ruffled hair coat, ascites, or head tilt) and were euthanized immediately. One of the mice was found dead. The clinical signs and death were observed 3–12 d post-inoculation of tissue homogenates.

PCR assays for *T. gondii* and *N. caninum* were performed using cultured parasites from the dog. Cells from each culture flask were scraped, and DNA was extracted (Invitrogen Easy-DNA; Thermo Fisher), according to the manufacturer's instructions. PCR for *N. caninum* was conducted using the primer pair Np6/Np21, which targets the NC-5 gene of the parasite, with an expected product of 328 bp.<sup>22</sup> The reactions were performed in 25- $\mu$ L volumes (PCR master mix, 50 units/mL *Taq* DNA polymerase in a proprietary reaction buffer, pH 8.5, 400  $\mu$ M each of dATP, dGTP, dCTP, dTTP and 3 mM MgCl<sub>2</sub>; Promega). DNA from *N. caninum* tachyzoites (NC-Bahia strain) and sterile double-distilled H<sub>2</sub>O were used as positive and negative controls, respectively. Reaction conditions were 1 cycle at 94°C for 2 min; 40 cycles of 94°C for 30 s, 53°C for 30 s, 72°C for 30 s; and a final 72°C for 5 min. PCR for *T. gondii* was conducted in similar conditions, except by using the primer pair TOX4/TOX5,<sup>10</sup> an annealing temperature of 55°C, and *T. gondii* tachyzoite DNA (RH strain) as positive control. The expected size of the amplicon is 529 bp. PCR products were stained (Invitrogen SYBR Gold; Thermo Fisher) and analyzed on 1.5% agarose gels under UV light.

DNA extracted from parasites derived from the dog and grown in cell culture resulted in positive reactions in the PCR assay for *T. gondii*. No amplification was observed in the PCR assay for *N. caninum*. The *T. gondii* isolate, referred to here as TgDgBA22, was multiplied in cell culture and stored in liquid nitrogen.

The PCR and nested PCR were conducted as reported previously.<sup>18</sup> The nested PCR products were treated with restriction enzymes to reveal the PCR-RFLP patterns of the isolates, using 12 genetic markers (SAG1, 5'3'SAG2, Alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico, CS3).<sup>16,21</sup> Negative controls (water and human foreskin fibroblast strain) and positive controls for *T. gondii* genotypes I (RH strain), II (PTG strain), III (CTG strain), and reference strains (TgCgCa 1, MAS, TgCatBr 5) were used in the reactions. No amplification was observed for the marker L358 (Table 2). The obtained pattern of DNA bands was compared with genotypes deposited in ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). The TgDgBA22 strain represents a unique

genotype based on the employed genetic markers (ToxoDB, accessed on June 21, 2020).

Given the observation of Lentz inclusions in leukocytes and erythrocytes, which are indicative of morbillivirus (canine distemper virus [CDV]; *Canine morbillivirus*) infection, a commercial test for morbillivirus antigen (Rapid CDV Ag test kit; Bionote) was employed; serum from the dog tested positive. Morbillivirus induces immunosuppression in dogs, which predisposes these animals to opportunistic agents such as *T. gondii*.<sup>15,19</sup> It is possible that morbillivirus infection contributed to immunosuppression of the dog in our case and reactivated a latent infection by *T. gondii*.

The newly isolated *T. gondii* strain TgDgBA22 was grown through direct inoculation of processed canine tissues in cell culture, as well as after bioassay in Y-IFN-KO and Swiss mice. Positive PCR results for *T. gondii* and negative DNA amplification using primers for *N. caninum* were conclusive for the diagnosis of toxoplasmosis. Coinfection with CDV was detected by blood cytology and confirmed by a commercial test for the virus antigen.

PCR-RFLP of TgDgBA22 using 12 genetic markers revealed a novel *T. gondii* genotype, which differed from previous isolates from dogs and other animal species in Brazil (ToxoDB). The genetic diversity of Brazilian strains of *T. gondii* has been reported in several studies and is characterized by high genetic recombination of the parasite.<sup>4,15,20</sup> The virulence of the Brazilian strains of the parasite is of particular relevance, given that they have been associated with severe lesions in animals and humans.<sup>7,8</sup>

We observed intra- and extra-cellular tachyzoites during cytologic examination of CSF from the dog, which is a rare finding in canine toxoplasmosis. The bone injury and surgery might have immunosuppressed the dog and favored *T. gondii* and CDV growth. In a short time, from the bone fracture repair until the onset of clinical signs (3 d), rapid multiplication of *T. gondii* might have occurred, given that systemic toxoplasmosis was confirmed by detection of parasites in several organs of the dog. The strain TgDgBA22 was highly virulent for mice, which died or developed neurologic signs of toxoplasmosis 3–12 d post-inoculation.

Despite the detection of toxoplasmosis in dogs worldwide, isolation and genetic characterization of clinical cases in dogs are rare.<sup>3</sup> In studies performed outside South America, the most common *T. gondii* isolates, characterized by PCR-RFLP or by microsatellite analysis, were classified as type II<sup>1,9</sup>; however, a *T. gondii* strain characterized as type I has been detected in a dog from Italy.<sup>13</sup> In Brazil, genetic characterization of *T. gondii* in dogs has been conducted

mostly after postmortem examination.<sup>9,11</sup> In one case, toxoplasmosis was detected in a Brazilian dog with cutaneous toxoplasmosis.<sup>17</sup> A common finding in canine toxoplasmosis cases in Brazil is the high level of genetic recombination of the detected parasites. The only study on canine toxoplasmosis conducted in the state of Bahia, northeastern Brazil, resulted in the isolation of 4 *T. gondii* strains from 7 seropositive dogs<sup>4</sup>; no information was provided about neurologic impairment of the tested animals. These 4 isolates were virulent for mice and had a high degree of genetic recombination.

To our knowledge, *T. gondii* has not been previously reported cytologically from the CSF from a dog. The isolated strain was highly virulent for mice and represents a unique genotype of the parasite, based on PCR-RFLP analysis. Research samples are available from the corresponding author on reasonable request. Given that the studied animal was a stray dog that had been rescued from the street, limitations of our study include the unknown vaccination status, nutrition, environment (rural or urban) of the dog, as well as contact with cats.

#### Acknowledgments

We thank the veterinary residents from the Veterinary Teaching Hospital at Federal University of Bahia, Brazil, for their excellent assistance.

#### Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### Funding

Our work was financed by Bahia Research Foundation (FAPESB) under grant PNE0003/2011. Waléria B. Silva, Mariana M. Rezende-Gondim, and Gideão S. Galvão were recipients of fellowships from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). George R. Albuquerque and Luís F.P. Gondim are recipients of productivity fellowships from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

#### ORCID iDs

Gideão S. Galvão  <https://orcid.org/0000-0002-6235-7449>

Luís P. Gondim  <https://orcid.org/0000-0003-3741-121X>

#### References

- Al-Qassab S, et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the brain of a dog in Australia and its biological and molecular characterization. *Vet Parasitol* 2009;164:335–339.
- Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *Int J Parasitol* 2009;39:935–946.
- Calero-Bernal R, et al. Clinical toxoplasmosis in dogs and cats: an update. *Front Vet Sci* 2019;6:54.
- da Silva JR, et al. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in Brazilian dogs. *Korean J Parasitol* 2017;55:239–246.
- Doskaya M, et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* strains similar to Africa 1 genotype in Turkey. *Parasitol Int* 2013;62:471–474.
- Dubey JP, et al. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int J Parasitol* 1998;28:1293–1304.
- Dubey JP, et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 2012;139:1375–1424.
- Grigg ME, et al. Ocular toxoplasmosis: lessons from Brazil. *Am J Ophthalmol* 2015;159:999–1001.
- Headley SA, et al. Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. *J Vet Diagn Invest* 2013;25:129–135.
- Homan WL, et al. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 2000;30:69–75.
- Langoni H, et al. Detection and molecular analysis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* from dogs with neurological disorders. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45:365–368.
- Meireles LR, et al. Human toxoplasmosis outbreaks and the agent infecting form. Findings from a systematic review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2015;57:369–376.
- Migliore S, et al. A rare case of acute toxoplasmosis in a stray dog due to infection of *T. gondii* clonal type I: public health concern in urban settings with stray animals? *BMC Vet Res* 2017;13:249.
- Minuzzi CE, et al. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from placental tissues of pregnant women who received toxoplasmosis treatment during an outbreak in southern Brazil. *PLoS One* 2020;15:e0228442.
- Moretti L, et al. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48:359–363.
- Pena HF, et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol* 2008;38:561–569.
- Pena HF, et al. Isolation and biological and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from canine cutaneous toxoplasmosis in Brazil. *J Clin Microbiol* 2014;52:4419–4420.
- Pena HF, et al. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: new genotypes and a new SAG3 marker allele. *Vet Parasitol* 2013;192:111–117.
- Portilho FVR, et al. *Rhodococcus equi* pVAPN type causing pneumonia in a dog coinfecting with canine morbillivirus (distemper virus) and *Toxoplasma gondii*. *Microb Pathog* 2019;129:112–117.
- Rocha DS, et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens in Bahia, Brazil. *J Parasitol* 2018;104:377–382.
- Su C, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 2006;36:841–848.
- Yamaga M, et al. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J Parasitol* 1996;82:272–279.