

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Exatas
Departamento de Estatística
Programa de Especialização em *Data Science* e *Big Data*

Mariana Millan Fachi

**Metabolômica por UPLC-QTOF-MSE em
plasma de PNH para a busca de potenciais
biomarcadores de toxoplasmose**

**Curitiba
2023**

Mariana Millan Fachi

Metabolômica por UPLC-QTOF-MSE em plasma de PNH para a busca de potenciais biomarcadores de toxoplasmose

Monografia apresentada ao Programa de Especialização em *Data Science* e *Big Data* da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau de especialista.

Orientador: Prof. Paulo Justiniano Ribeiro Junior

Curitiba
2023

Metabolômica por UPLC-QTOF-MSE em plasma de PNH para a busca de potenciais biomarcadores de toxoplasmose

Metabolômica em plasma de PNH para toxoplasmose

Mariana Millan Fachi¹, Paulo Justiniano Ribeiro Junior²

¹Programa de pós-graduação em Data Science Big Data, Departamento de Informática, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil*

²Departamento de Estatística, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil†

A toxoplasmose, causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, é uma importante zoonose de importância médica veterinária mundial. O diagnóstico é crucial para a vigilância, prevenção e controle da doença, contudo as abordagens tradicionais para o diagnóstico (testes imunológicos, genéticos e de imagem) apresentam limitações importantes. Assim, uma melhor compreensão das alterações metabólicas associadas à toxoplasmose em primatas não humanos pode permitir o aprimoramento de novos testes de diagnóstico. Desta forma, o objetivo deste estudo foi investigar as mudanças dinâmicas no perfil metabólico de soros de macaco infectados por *T. gondii*. Para isto, foram realizadas análises metabolômicas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução não direcionadas de soros coletados de PNH infectados e não infectados com o parasita. Estas amostras foram então analisadas por algoritmos de aprendizado de máquina, considerando modelos não supervisionados e supervisionados. Após análise, alguns metabólitos se destacaram diferencialmente em soros de PNH infectados em comparação com o grupo controle (m/z 809,2713; 660,5429; 718,3614; 537,5458; 707,2745; 318,2951). A utilidade potencial desses metabólitos como biomarcadores diagnósticos foi validada por meio da análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic), (AUC=0,78, sensibilidade=0,88). Esses achados fornecem potenciais biomarcadores de metabólitos para estudos futuros e permitem a geração de hipóteses sobre a fisiopatologia da toxoplasmose.

Palavras-chave: Toxoplasmose, primatas não humanos; Machine Learning; Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Toxoplasmosis, caused by the obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*, is an important zoonosis of worldwide veterinary medical importance. Diagnosis is crucial for disease surveillance, prevention and control, however traditional approaches to diagnosis (immunological, genetic and imaging tests) have important limitations. Thus, a better understanding of the metabolic alterations associated with toxoplasmosis in non-human primates may allow the improvement of new diagnostic tests. Thus, the aim of this study was to investigate dynamic changes in the metabolic profile of sera from monkeys infected with *T. gondii*. For this, metabolomic analyzes were carried out by liquid chromatography coupled to non-directed high resolution mass spectrometry of sera collected from infected and non-infected PNH with the parasite. These samples were then analyzed by machine learning algorithms, considering unsupervised and supervised models. After analysis, some metabolites stood out differentially in infected PNH sera compared to the control group (m/z 809.2713; 660.5429; 718.3614; 537.5458; 707.2745; 318.2951). The potential usefulness of these metabolites as diagnostic biomarkers was validated by analyzing the ROC (Receiver Operating Characteristic) curve (AUC=0.78, sensitivity=0.88). These findings provide potential metabolite biomarkers for future studies and allow the generation of hypotheses about the pathophysiology of toxoplasmosis.

Keywords: Toxoplasmosis, non-human primates; Machine Learning; Liquid chromatography coupled to mass spectrometry

1. Introdução

Toxoplasma gondii consiste em um coccídeo intracelular obrigatório, distribuído a nível mundial e apto a

*marianamfachi@gmail.com

†paulojus@ufpr.br

infecção de células de diferentes hospedeiros [1]. Este parasita apresenta três estágios infecciosos: taquizoíta (de divisão rápida), um bradizoíta (de divisão lenta em cistos teciduais e um estágio ambiental) e o esporozoíta (protegido dentro de um oocisto)[2-4].

Embora comumente a infecção em humanos seja assintomática, há uma alta suscetibilidade ao desenvolvimento de quadros graves em primatas não humanos (PHN), com altas taxas de mortalidade [5]. Os processos que promovem a infecção em PNH são altamente complexos e envolvem a interação das características físicas, biológicas e ecológicas, incluindo características climáticas, suscetibilidade das espécies hospedeiras, o tamanho e o peso da espécie animal, dieta e o comportamento alimentar das espécies hospedeiras [6].

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser realizado pela detecção ou isolamento do parasita, ou pela condução de testes sorológicos. Contudo, ambos os testes apresentam limitações no seu uso, associado tanto a oneração e disponibilidade dos testes quanto a acurácia destes [2]. Considerando a dificuldade de minimizar a transmissão da doença em animais, um procedimento de diagnóstico simples e rotineiramente disponível é necessário para que animais clinicamente doentes, infectados por *T. gondii* possam ser prontamente detectados e tratados adequadamente. Desta forma, destaca-se a metabolômica, uma técnica ômica com foco na detecção de metabólitos em amostras biológicas por meio de técnicas analíticas como a cromatografia líquida associado a espectrometria de massas, permitindo o estudo de informações biológicas no nível bioquímico. Como a metabolômica produz grande volume de dados complexos, a análise desses dados pode ser conduzida por meio da aplicação de machine learning (ML) para a análise dos dados, reconhecimento do padrão, construção de modelos, classificação, regressão ou agrupamento de dados metabolômicos altamente complexos [7].

Considerando, que uma melhor compreensão das alterações moleculares associadas à doença é essencial para identificar testes diagnósticos mais aprimorados, o objetivo deste estudo foi investigar as mudanças dinâmicas no perfil metabólico de soros de PNH durante a infecção por *T. gondii*.

2. Material e métodos

2.1. Coleta das amostras

As amostras de plasma sanguíneo de 147 PNH foram obtidas na região do alto rio Paraná, após parecer favorável para captura e procedimento pelo IBAMA (licença nº 104/04) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (registro nº 34/05). Maiores detalhes da etapa de coleta das amostras de PNH com (grupo teste) e sem toxoplasmose (grupo controle) foram previamente relatados no estudo conduzido por Waldrido. Após a coleta, as amostras foram transportadas para o Centro de Estudos em Biofarmácia da Universidade Federal do Paraná (CEB-UFPR), em caixas de isopor contendo gelopack e foram armazenadas em freezer a -40°C até a análise.

2.2. Preparo das amostras

No dia das análises as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, e em seguida foi aliquoteado 50 μL para tubo do tipo eppendorf e precipitado com 200 μL de acetonitrila (ACN) contendo 0,1% de ácido fórmico. Estas amostras foram agitadas por 3 minutos em Vortex-Genie 2T modelo SI T236, e centrifugadas (Eppendorf modelo 5810R) a 14.000 rpm/ 4°C por 10 minutos. Então, o sobrenadante foi separado e filtrado para um vial para então serem analisadas.

2.3. UPLC-QTOF-MSE design and databases

As amostras foram analisadas em triplicata em um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (UPLC) Acquity H-Class da Waters Corporation (Milford, EUA), acoplado ao espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo, Xevo G2-S, Waters (Milford, EUA) com fonte de ionização Electrospray (ESI). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando como fase estacionária uma coluna Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100x2,1 mm, 1,7 μm) a 40°C . A fase móvel consistia em água ultrapura (sistema Milli-Q, Milipore) (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram analisadas em modo de eluição gradiente, conforme segue: t0-1: 95% de fase A, t1-9: 95-5% de fase A, t9-11: 5% de A, t11-12: 5-95% de A, t12-15: 95% de A. O volume de injeção foi de 5 μL e o fluxo da fase móvel foi de 300 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Para a análise espectrométrica, utilizou-se nitrogênio de alta pureza como gás do cone e de dessolvatação (gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments, Chicago, EUA) e argônio como gás de colisão (pureza >99,998% da

White Martins Praxair Inc, Curitiba, Brasil). As amostras foram analisadas no modo positivo de ionização e foram definidas as seguintes condições para os parâmetros da fonte de ionização: +400 V voltagem do capilar, 40 V voltagem do cone 80 V source offset, 150 °C para a temperatura da fonte, 400 °C para a temperatura de dessolvatação, 50 L/h para o fluxo do gás do cone, 600 L/h para o fluxo do gás de dessolvatação, 4 V para a energia de colisão em baixa energia e 20-40 V para a energia de colisão em alta energia. No decorrer da corrida analítica, as massas adquiridas foram corrigidas por meio do Lockspray, composto por leucina encefalina na concentração de 1000 ng.mL⁻¹ e com fluxo de 20 L.min⁻¹, permitindo obter erros de massas inferior a 5 ppm. Ainda, nos dias de análise, foi realizada diariamente a checagem da calibração, utilizando como calibrante formiato de sódio 0,05 mmol.L⁻¹, sendo que todos os dados foram obtidos no modo centroide em MSE e processados por meio dos softwares MassLynx V 4.1 (Waters Corporation, Milford, EUA).

2.4. Processamento dos dados

Nesta etapa foi realizado a preparação das amostras, visando a tornar os dados brutos adequados (ou seja, legíveis) para a construção e treinamento dos modelos baseados em ML. Para isso, todas as amostras passaram pelos seguintes métodos de pré-processamento: imputação, transformações, filtragem, normalização, escala e centralização. Além disso, para o processamento dos dados, foram estabelecidos os seguintes parâmetros: (i) tempo de retenção: de 0,5 a 12 minutos, removendo o tempo referente ao reequilíbrio da coluna, intervalo de massas: de 50 a 900 Da, (iii) XIC Window(Da): exatidão de massa (Da) dos dados adquiridos tolerada foi de 0,02 Da, (iv) Peak-to-Peak Baseline Noise: o ruído da linha de base entre os picos foi automaticamente estimado pelo software; (v) Marker intensity threshold (counts): o nível mínimo de intensidade para um pico espectral ser considerado como um marcador foi de 100; (vi) mass window: tolerância de massa de 0,02 Da; (vii) retention time window: janela de 0,2 minutos foi utilizada para todas as análises. Todos os cromatogramas obtidos pelo software MassLynx™ (Waters Corporation) foram tratados por meio do software MarkerLynx™ XS Application Manager (Waters Corporation). Para a análise dos dados no Python, para cada amostra os dados foram organizados correlacionando os valores de m/z adquiridos com a intensidade máxima do sinal detectado (%) e com o tempo de retenção obtido. Ainda, foi avaliado a

estabilidade e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico e espectrométrico, analisando amostras de QC durante todos os intervalos da análise.

2.5. Desenvolvimento de um modelo de ML

Primeiramente um modelo baseado em ML não supervisionado (análise de componentes principais - PCA) foi conduzido para identificar a estrutura dos dados e detectar possíveis amostras anômalas. Em seguida, para a previsão de diagnóstico de toxoplasmose, foram utilizados vários modelos supervisionados baseados em ML: Random Forest Classifier, Extra trees classifier, Ada Boost Classifier, Naive Bayes, Dummy Classifier, Gradient Boosting Classifier, Light Gradient Boosting Machine, K Neighbors Classifier (KNN), Logistic regression, support vector machine (SVM)-Linear Kernel, Linear Discriminant Analysis (ANLDA), Extreme Gradient Boosting, Quadratic Discriminant Analysis, Ridge Classifier e Decision Tree Classifier. Para isso, 70% dos dados foram selecionados aleatoriamente e utilizados como o conjunto de treinamento (calibração) e os 30% restantes como conjunto de teste. A seleção da amostra para os conjuntos de treinamento e teste foi realizada aleatoriamente. Além disso, foi conduzida a validação cruzada, para selecionar o número de variáveis latentes (VLs) dos modelos baseados em ML. Foram selecionados VLs com valores mais baixos de erro de validação cruzada, raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (RMSECV) e raiz quadrada média do erro de calibração (RMSEC). A raiz do erro médio de predição (RMSEP) foi a métrica utilizada para avaliar a capacidade preditiva dos modelos baseados em ML; modelos com menor RMSEP tiveram melhor desempenho. O desempenho do modelo foi avaliado considerando as métricas de precisão, sensibilidade e especificidade. Essas métricas foram calculadas com base nas seguintes figuras de mérito: falso positivo (FP), falso negativo (FN), verdadeiro positivo (TP) e verdadeiro negativo (TN). A precisão dos modelos também foi avaliada considerando a área sob a curva ROC (Receiver Operating Characteristic) (AUC), estabelecido com base nas amostras de treinamento e teste. Após a seleção do melhor modelo, foi criado um feature importance plot para identificar os 10 sinais de massas moleculares (metabólitos) mais importantes que mais contribuíram para a discriminação de toxoplasmose em PNH. Cabe destacar que variáveis com pontuação superior a 1 foram consideradas estatisticamente significativa para classificar grupos. A identificação dos

potenciais metabólitos foi realizado em bases de dados como lipidmaps, <https://hmdb.ca/spectra/ms/search>

3. Resultados

Na Figura 1 é apresentado o cromatograma de íons totais de soros de PNH. Correção de linha de base, deconvolução de pico, alinhamento, normalização e centralização mediana foram aplicados para processar os dados, e foram encontrados aproximadamente 1025 massas em cada perfil de amostra analisado no modo de íon positivo.

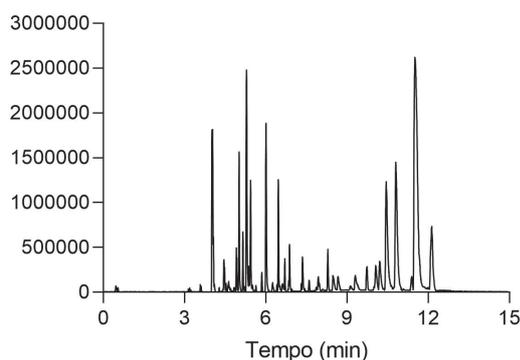


Figura 1: Cromatograma obtido de amostra de plasma de primata não humano com toxoplasmose

3.1. Modelo não supervisionado

Nota-se por meio do modelo PCA que o modelo foi capaz de discriminar todas as classes de amostras (Figura 2). Nenhuma amostra outlier foi identificada. Além disso, observou-se que, entre as amostras do grupo doente, há a separação destes em clusters (dado não explorado devido a limitação dos dados basais das amostras). Os métodos de pré-processamento utilizados foram uma combinação de imputação usando valores medianos e autoescala.

3.2. Modelo supervisionado

A tabela 1 apresenta o desempenho dos modelos baseados em ML construídos. O modelo Ada Boost Classifier apresentou os resultados mais promissores para prever o diagnóstico de toxoplasmose, obtendo os melhores valores para acurácia (0,78), AUC (0,73), sensibilidade (0,88) e precisão (0,83). Na figura 3 é apresentada a curva ROC obtida para este modelo.

Na figura 4 são apresentadas as massas dos biomarcadores mais promissores para prever o diagnóstico de

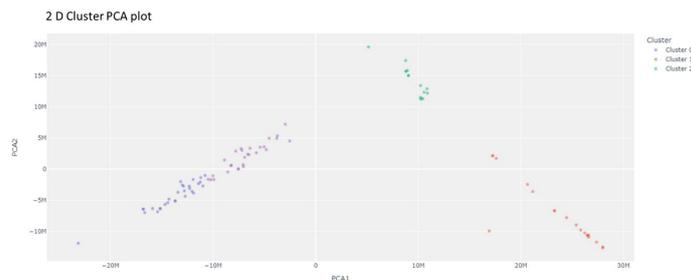


Figura 2: Análise exploratória de dados de amostras de sangue dos pacientes com toxoplasmose (representadas pelas cores vermelha e verde) e amostras de sangue de pacientes do grupo controle (representadas pela cor azulada).

toxoplasmose. Nota-se que os biomarcadores mais importantes para prever o diagnóstico de toxoplasmose foram 80,92713 (tr = 7,50 mins), 660,5429 (tr = 4,51 mins), 718, 3614 (tr = 8,28 mins) e 537,5458 (tr = 3,93 mins).

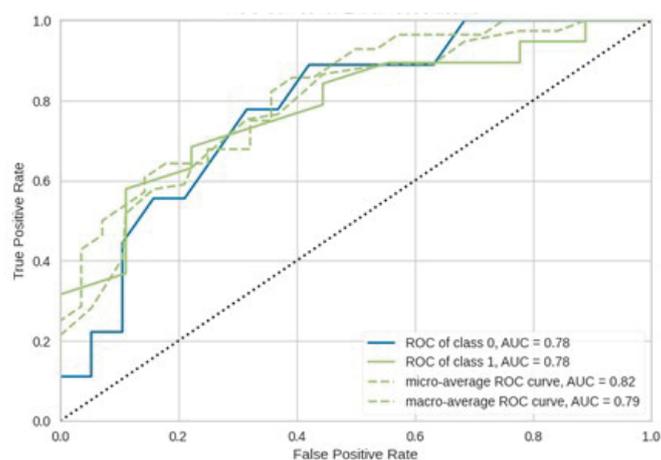


Figura 3: Área sob as curvas (AUC) da precisão do modelo desenvolvido na previsão de diagnóstico de toxoplasmose, considerando amostras de pacientes com toxoplasmose e grupo controle.

4. Discussão

O conhecimento sobre a fisiopatologia da toxoplasmose induzida por oocistos ainda é escasso, principalmente ao considerar como pacientes PNH. Há uma necessidade de novos biomarcadores que possam detectar infecções de forma confiável e estratificar pacientes infectados com oocistos de *T. gondii*. Considerando que há uma forte necessidade de identificação de novos biomarcadores que possam detectar infecções de toxoplasmose de forma confiável, a metabolômica oferece um meio poderoso para investigar as interações

Model	Accuracy	AUC	Recall	Prec.	F1	Kappa	MCC	TT (Sec)
Ada Boost Classifier	0.7786	0.7317	0.8800	0.8264	0.8431	0.4436	0.4643	1.1540
Extreme Gradient Boosting	0.7619	0.6833	0.9050	0.7900	0.8382	0.3787	0.4035	1.4850
Random Forest Classifier	0.7524	0.6875	0.9800	0.7486	0.8443	0.3050	0.3272	1.3570
Extra Trees Classifier	0.7524	0.6992	0.9800	0.7486	0.8443	0.3050	0.3272	1.2070
Light Gradient Boosting Machine	0.7476	0.7133	0.9250	0.7595	0.8300	0.3095	0.3248	0.9140
Naive Bayes	0.7357	0.6525	0.9050	0.7686	0.8183	0.3146	0.3346	0.6310
K Neighbors Classifier	0.6667	0.5742	0.7650	0.7700	0.7494	0.2320	0.2571	0.5140
Quadratic Discriminant Analysis	0.6667	0.5000	1.0000	0.6667	0.7994	0.0000	0.0000	0.4580
Dummy Classifier	0.6667	0.5000	1.0000	0.6667	0.7994	0.0000	0.0000	0.4380
Linear Discriminant Analysis	0.6500	0.6092	0.8300	0.6833	0.7427	0.1488	0.1669	0.4730
Logistic Regression	0.6381	0.6750	0.7250	0.7433	0.7251	0.1814	0.1814	1.0500
Gradient Boosting Classifier	0.6381	0.6017	0.7350	0.7233	0.7193	0.1570	0.1755	1.6260
Ridge Classifier	0.6071	0.0000	0.6550	0.6467	0.6449	0.1803	0.1791	0.4690
SVM – Linear Kernel	0.5881	0.0000	0.5500	0.8367	0.6127	0.1562	0.1981	0.5770
Decision Tree Classifier	0.5738	0.5558	0.5950	0.7217	0.6366	0.1036	0.1157	0.4600

parasita-hospedeiro no nível bioquímico e descobrir novos biomarcadores de infecção. Já existem alguns estudos da literatura, que identificaram alguns metabólitos relacionados a toxoplasmose em outras espécies, como ratos, camundongos [9] e humanos [10]. Para o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo conduzido utilizando um método baseado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, não direcionado para explorar diferentes metabólitos de soro de PNH com toxoplasmose em comparação com controles não infectados e para identificar metabólitos que se tornam desregulado durante a infecção por *T. gondii*. Conforme apresentado pelo modelo não supervisionado, observa-se uma clara separação entre os diferentes grupos de PNH. Esses resultados indicam que a infecção por *T. gondii* pode induzir perturbações metabólicas sistêmicas no metabolismo de várias classes químicas de macromoléculas. Além disso, nas análises utilizando algoritmos supervisionados foram encontrados dez metabólitos detectados no modo ESI+ que estavam relacionados a separação das amostras do grupo positivo e negativo para toxoplasmose. Destes metabólitos encontrados, destaca-se a massa m/z 318.2951, possivelmente relacionada ao composto fitosfingosina (C₁₈H₃₉NO₃) (esfingolípido). Este metabólito foi previamente relatado no estudo conduzido por Chen et al [11]), em amostras de ratos. Os esfingolípídios desempenham papéis críticos na mediação da interação entre células, modulando o comportamento de proteínas e receptores celulares e participando da transdução de sinal [12]. Já existem estudos prévios da literatura, comprovando

que a infecção com *T. gondii* interfere no metabolismo de ácidos graxos e lipídios por meio da modulação da via de sinalização do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) do hospedeiro. Mais especificamente, há relatos de haver a regulação positiva de metabólitos envolvidos no metabolismo dos esfingolípídios em ambas as fases da infecção (aguda e crônica) [11, 13]. Ainda, foi identificado a massa m/z 774,5705, correspondente ao composto C₄₂H₈₀NO₉P. Este composto é uma fosfatidilcolina oxidada, que corresponde a um glicerofosfolípido no qual uma porção de fosforilcolina ocupa um sítio de substituição de glicerol. Pelo menos uma das cadeias de ácidos graxos sofreu oxidação. Como todos os lipídios oxidados, as fosfatidilcolinas oxidadas pertencem a um grupo de biomoléculas que desempenham um papel de moléculas sinalizadoras [11, 14, 15]. Níveis elevados de fosfatidilcolina são comumente encontrados em pacientes com toxoplasmose, tendo papel importante no crescimento do agente etiológico (Welti et al., 2007), sendo justificado o aparecimento deste biomarcador. Nosso estudo não é isento de limitações, no modelo não supervisionado houve uma clara separação das amostras do grupo positivo, possivelmente relacionado a alguns aspectos da doença como a fase da patologia. Estudos prévios [9, 10, 13, 16] relataram diferentes metabólitos na fase aguda e na fase crônica da doença, desta forma, estudos futuros devem ser conduzidos considerando este aspecto. Além disso, alguns compostos que permitiram a separação das amostras no presente estudo, não foram totalmente elucidadas, sendo necessário novas abordagens para a identificação destas. Portanto,

uma investigação futura mais aprofundada deste composto, compreendendo a suas funções, pode fornecer um componente chave para nossa compreensão da resposta do organismo ao *T. gondii*.

5. Conclusão

Em conclusão, este estudo demonstrou que a infecção por *T. gondii* causa mudanças dinâmicas significativas no balanço metabólico do plasma de PNH infectados com *T. gondii* e a capacidade da metabolômica baseada em UPLC-QToF-MS para detectar potenciais metabólitos diferenciais no plasma de PNH. Apesar disso, mais estudos são necessários para compreender completamente as alterações metabólicas em amostras infectadas por *T. gondii*. Espera-se que nossas descobertas contribuam para o crescente corpo de literatura que descreve a aplicação de métodos “ômicos” para toxoplasmose.

6. Referências

[1] Andrade MCR, Coelho JMC de O, Amendoeira MRR, et al. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. *Ciência Rural* 2007; 37: 1724–1727.

[2] Florence R-G, Marie-Laure D. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 264–296.

[3] Rita DI, Kiran G, Reshika D, et al. Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. *Clin Microbiol Rev* 2018; 31: 10.1128/cmr.00057-17.

[4] Webster JP, Dubey, J.P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. *Parasit Vectors* 2010; 3: 112.

[5] Nishimura M, Goyama T, Tomikawa S, et al. Outbreak of toxoplasmosis in four squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Japan. *Parasitol Int* 2019; 68: 79–86.

[6] Niehaus C, Spínola M, Su C, et al. Environmental factors associated With *Toxoplasma gondii* Exposure in Neotropical Primates of Costa Rica. *Front Vet Sci*; 7, (2020).

[7] Le AT, Wu M, Khan A, et al. Targeted plasma metabolomics combined with machine learning for the diagnosis of severe acute respiratory syndrome virus type 2. *Front Microbiol*; 13.

[8] Svoboda WK. Vigilância de epizootias em primatas não-humanos (PNH) como instrumento de monitoramento de arbovirose e outras viroses de interesse

em saúde pública. Diss. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Londrina, 2007.

[9] Zhou C-X, Zhou D-H, Elsheikha HM, et al. Metabolomic Profiling of Mice Serum during Toxoplasmosis Progression Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Sci Rep* 2016; 6: 19557.

[10] King EFB, Cobbold SA, Uboldi AD, et al. Metabolomic analysis of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Toxoplasma gondii: Methods and Protocols* 2020; 435–452.

[11] Chen X-Q, Elsheikha HM, Hu R-S, et al. Hepatic metabolomics investigation in acute and chronic murine toxoplasmosis. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8: 189.

[12] Merrill AH. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 25843–25846.

[13] Ma J, He J-J, Hou J-L, et al. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based metabolomics reveals metabolic alterations in the mouse cerebellum during *Toxoplasma gondii* infection. *Front Microbiol* 2020; 11: 1555.

[14] Ricard J, Pelloux H, Favier A-L, et al. *Toxoplasma gondii*: role of the phosphatidylcholine-specific phospholipase C during cell invasion and intracellular development. *Exp Parasitol* 1999; 91: 231–237.

[15] Welti R, Mui E, Sparks A, et al. Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* reveals unusual polar lipids. *Biochemistry* 2007; 46: 13882–13890.

[16] Zhou C-X, Cong W, Chen X-Q, et al. Serum Metabolic Profiling of Oocyst-Induced *Toxoplasma gondii* Acute and Chronic Infections in Mice Using Mass Spectrometry. *Front Microbiol*; 8, (2018).