

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Peter Silva Rocha

**A NADPH oxidase 2 promove maior susceptibilidade à infecção por *Toxoplasma gondii*
em camundongos**

Belo Horizonte

2019

Peter Silva Rocha

A NADPH oxidase 2 promove maior susceptibilidade à infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Leda Quercia Viera

Co-orientadora: Dra. Grazielle Ribeiro Goes

Belo Horizonte

2019

043

Rocha, Peter Silva.

A NADPH oxidase 2 promove maior susceptibilidade à infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos [manuscrito] / Peter Silva Rocha. – 2019. 95 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Leda Quercia Viera. Co-orientadora: Dra. Grazielle Ribeiro Goes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Toxoplasmose. 3. *Toxoplasma*. 4. Espécies Reativas de Oxigênio. 5. Óxido Nítrico. 6. Estresse Oxidativo. 7. Resposta imune. I. Viera, Leda Quercia. II. Goes, Grazielle Ribeiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

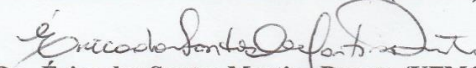


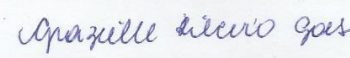
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE PETER SILVA ROCHA. Aos vinte e dois dias do mês de outubro de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "" A NADPH oxidase 2 promove maior susceptibilidade à infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Leda Quercia Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Maria de Fatima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Érica dos Santos Martins Duarte (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Grazielle Ribeiro Goes - Coorientadora (Universidade do Estado de MG), aprovado; Dr. Leda Quercia Vieira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

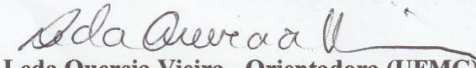
APROVADO
 REPROVADO

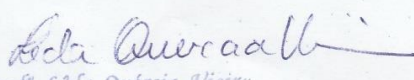
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de outubro de 2019.


 Dr. Maria de Fatima Martins Horta (UFMG)


 Dr. Érica dos Santos Martins Duarte (UFMG)


 Dr. Grazielle Ribeiro Goes - Coorientadora (Universidade do Estado de MG)


 Dr. Leda Quercia Vieira - Orientadora (UFMG)


 Prof. Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

À professora Leda Quercia Vieira pela oportunidade em seu laboratório e pela orientação durante esses 7 anos. Agradeço o incentivo e a boa convivência que foram importantes na construção da minha formação acadêmica, desde os tempos da iniciação científica.

À minha co-orientadora Grazielle Ribeiro Goes, por ter me aceitado como aluno de iniciação científica durante seu doutorado e pela orientação durante meu mestrado. Agradeço pelos ensinamentos, pela paciência, pelos puxões de orelha, pela amizade e também pelos momentos de diversão proporcionados durante esses 7 anos. Muito obrigado por tudo, hoje sou um profissional melhor graças ao seu apoio. Espero que nossa parceria se estenda por muitos anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao longo do meu mestrado.

Aos meus companheiros atuais de laboratório, Ana Clara, Ana Elisa, Diego, Guilherme, Leonardo e Liliane pela boa convivência e pela disposição em ajudar.

Ao Diego Borges pelos bons momentos de convivência e pela disposição em me ajudar ao longo do meu mestrado. Muito obrigado pelo apoio, ele foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos antigos membros do laboratório, Caio, Paula, Débora, Alicia. Obrigado pela ajuda em diversos momentos, pelos bons momentos de convivência, diversão e principalmente pela amizade que permanece até hoje mesmo estando distantes.

Ao Wesley pela essencial ajuda nos meus experimentos. Muito obrigado pela disposição, dedicação e animação durante a realização dos meus experimentos.

Aos meus amigos Aline, Paulo e Emerson pelo apoio, atenção e ajuda em diversos momentos dentro e fora da vida acadêmica. Muito obrigado e me sinto honrado e ter a amizade de vocês.

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão durante toda a minha formação acadêmica.

À minha mãe Neuza por todo o suporte, amor e carinho que proporciona durante toda a minha vida. Obrigado pelo apoio, força, paciência e compreensão durante a minha formação acadêmica e também durante muitas outras situações em que passamos. Seu apoio foi e continua sendo vital para todas as minhas decisões e escolhas.

RESUMO

O *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose, é um parasito intracelular obrigatório com grande capacidade de invadir as células hospedeiras e de evadir suas defesas. Dentro do hospedeiro, o parasito pode estimular a ativação de mecanismos antimicrobianos, como a produção de óxido nítrico (NO[•]) e de espécies reativas de oxigênio (ROS). Muitos trabalhos vêm tentando elucidar o papel das ROS durante à infecção pelo *T. gondii*, porém os dados mostram-se inconclusivos. A fim de entender a importância das ROS na infecção *in vivo* pelo *T. gondii*, acompanhamos durante 15 dias, camundongos nocautes na produção de superóxido via NOX2 (PHOX KO) e camundongos selvagens (C57BL/6 WT) infectados com 10 cistos da cepa Me49 (tipo II) por via intragástrica. Nossos resultados mostraram que os camundongos WT e PHOX KO infectados com 10 cistos da cepa Me49 de *T. gondii* não apresentaram mortalidade durante o período de infecção avaliado. Apesar disso, os camundongos WT apresentaram notáveis características de caquexia a partir do nono dia de infecção, que foram confirmadas através dos elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ), NO[•] e da elevada perda de peso em comparação aos camundongos PHOX KO. Mostramos também que a presença da NOX2 ativa em camundongos WT infectados pelo *T. gondii* promoveu maior dano tecidual e maiores níveis de inflamação no fígado, que foram comprovados através dos níveis elevados de peroxidação lipídica (dano oxidativo) e de enzimas hepáticas (dano hepático) nesses camundongos. Esses dados foram reforçados através da análise histopatológica do fígado, que mostrou dano tecidual nos camundongos WT em todos os tempos de infecção avaliados com a presença de infiltrado de células inflamatórias e focos de necrose. No intestino, principal porta de entrada do parasito a outros órgãos, não observamos diferenças nos níveis de peroxidação lipídica entre os grupos de camundongos infectados devido à ausência do parasito no período de infecção avaliado. Ao associar o dano tecidual (presente em maior intensidade nos camundongos WT) à provável produção de ROS em resposta a infecção, não observamos diferenças entre os grupos de camundongos infectados. Também não observamos diferenças nos níveis de enzimas antioxidantes (SOD e catalase) no fígado e no intestino dos grupos de camundongos infectados que poderiam explicar os baixos níveis de ROS encontrados nesses camundongos. Nossos resultados indicam que as ROS não estão envolvidas na eliminação do parasito durante a infecção pelo *T. gondii*. De maneira surpreendente, o estresse oxidativo contribui no desenvolvimento de diversas consequências negativas para o hospedeiro infectado, já que esse estresse oxidativo não é capaz de eliminar o parasito, conforme mostramos em nossos resultados.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, which causes toxoplasmosis, is an obligate intracellular parasite with great ability to invade host cells and evade their defenses. Within the host, the parasite can stimulate activation of antimicrobial mechanisms, such as production of nitric oxide (NO[•]) and reactive oxygen species (ROS). Many studies have been trying to elucidate the role of ROS during *T. gondii* infection, but the data are inconclusive. In order to understand the importance of ROS in *T. gondii* infection *in vivo*, we monitored for 15 days knockout mice producing NOX2 superoxide (PHOX KO) and wild type mice (C57BL/6 WT) infected with 10 cysts of *T. gondii* Me49 strain. (type II) intragastrically. Our results showed that WT and PHOX KO mice infected with 10 cysts of the *T. gondii* Me49 strain did not show mortality during the evaluated period of infection. Nevertheless, WT mice showed remarkable cachexia characteristics from the ninth day of infection, which were confirmed by high levels of pro-inflammatory cytokines (TNF and IFN- γ), NO[•] and high weight loss compared to PHOX KO mice. We also noted that the presence of active NOX2 in *T. gondii*-infected WT mice promoted greater tissue damage and higher levels of inflammation in liver, which were confirmed by elevated levels of lipid peroxidation (oxidative damage) and liver enzymes (liver damage) in these mice. These data were reinforced by histopathological analysis of the liver, which showed tissue damage in WT mice at all times of infection verified by the presence of inflammatory cell infiltrate and necrosis focus. In the intestine, the parasite's main gateway to other organs, we did not observe differences in lipid peroxidation levels between groups of infected mice due to absence of parasites during the period of infection evaluated. When associating tissue damage (present in higher intensity in WT mice) with the probable production of ROS in response to infection, we did not observe differences between groups of infected mice. We also did not observe differences in the levels of antioxidant enzymes (SOD and catalase) in the liver or the intestine of the infected groups that could explain the low levels of ROS found in these mice. Our results indicate that ROS are not involved in parasite elimination during *T. gondii* infection. Surprisingly, oxidative stress contributes to the development of several negative consequences for the infected host, since this oxidative stress is not able to eliminate the parasite as we show in our results.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do <i>T. gondii</i>	16
Figura 2: Invasão do <i>T. gondii</i> no hospedeiro	22
Figura 3: Resposta imune inata induzida pela infecção por <i>T. gondii</i>	26
Figura 4: Representação esquemática da ativação da enzima NADPH oxidase 2 (NOX2)30	
Figura 5: Sistema antioxidante do <i>T. gondii</i>	32
Figura 6: Camundongos WT e PHOX KO infectados por <i>T. gondii</i> apresentaram níveis similares de mortalidade	45
Figura 7: Camundongos PHOX KO infectados pelo <i>T. gondii</i> apresentaram menor perda de peso e carga parasitária similar aos WT	47
Figura 8: Camundongos PHOX KO apresentaram menores níveis de citocinas pró-inflamatórias e nitrito na circulação sanguínea.	49
Figura 9: Camundongos PHOX KO apresentaram maiores níveis de TNF e IL-10 em órgãos linfoides periféricos	52
Figura 10: Camundongos PHOX KO apresentaram menor dano celular hepático em relação aos camundongos WT	54
Figura 11: Camundongos PHOX KO infectados apresentaram quadro histológico hepático similar ao de camundongos não infectados a partir do décimo quinto dia de infecção .	56
Figura 12: Camundongos PHOX KO apresentaram menor dano oxidativo no fígado quando comparados aos camundongos WT	58
Figura 13: Camundongos infectados e não infectados apresentaram níveis similares de ROS nos tecidos.	60
Figura 14: Camundongos infectados apresentaram níveis similares na atividade de enzimas antioxidantes.....	62
Figura 15: Formação de MDA através da peroxidação lipídica.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: alanina amino transferase
AMA1: proteína adesina do micronema
ARPE-19: células epiteliais pigmentadas da retina humana
AST: aspartato amino transferase
ATG5: proteína autofágica 5
ATP: trifosfato de adenosina
CDPKI: proteína quinase dependente de cálcio I
CEBIO: centro de bioterismo
H₂DCF-DA: 2,7-diclorofluorescina de diacetato
DL: dose letal
Gal-3: Galectina-3
GBPs: proteínas de ligação ao guanilato p65
GPI: glicosilfosfoinositol
Gpx: glutaciona peroxidase
Grx: glutaredoxina
GSH: glutaciona peroxidase
GSSG: glutaciona dissulfeto
GTP: trifosfato de guanosina
HIV: vírus da imunodeficiência humana
IDO: indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ : interferon gama
IgA: imunoglobulina A
IgG: imunoglobulina G
IgM: imunoglobulina M
IL-12: interleucina 12
iNOS: óxido nítrico sintase induzida
IRGs: GTPases relacionadas à imunidade
MAPK: proteína quinase ativada por mitogeno
MDA: malondialdeído
MIC: micronemas
MIF: fator de migração de macrófagos
MTT: brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium

NF-κB: fator nuclear κB

NOX: NADPH oxidase

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PBS: salina tamponada com fosfato

PHOX KO: camundongo nocaute em gp91phox da NOX2

PLP1: proteína semelhante a perforina

PRF: profilinas

PRU: Prugniaud

PV: vacúolo parasitóforo

RON: roptrias de pescoço

ROP: roptrias do bulbo

ROS: espécies reativas de oxigênio

RPMI: meio do Instituto Roswell Park Memorial

SAG: antígenos de superfície

SFB: soro fetal bovino

SOCS: supressor de sinalização de citocinas

SOD: superóxido dismutase

SRS: sequências relacionadas a SAG

STAT: sinal transdutor e ativador da transcrição 1

SUSA: antígenos de superfície não relacionados a SAG

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TLR: receptores do tipo Toll

TNF: fator de necrose tumoral

Trx: tiorredoxina peroxidase

WT: camundongo do tipo selvagem

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.2. Toxoplasmose	18
1.3. Invasão ao hospedeiro.....	20
1.4. Resposta imune associada ao <i>T. gondii</i>	23
1.5. Espécies reativas de oxigênio e maquinaria antioxidante do <i>T. gondii</i>	28
1.5.1. NADPH oxidase e espécies reativas de oxigênio.....	28
1.5.2. Maquinaria antioxidante do <i>T. gondii</i>	31
1.6 O papel das ROS na infecção por <i>T. gondii</i>	33
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
1.3. Hipótese	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Camundongos	37
3.2. Cultivo e obtenção do parasito.....	37
3.3. Infecções	37
3.4. Obtenção e preparo das amostras.....	38
3.4.1. Obtenção do soro	38
3.4.2. Cultura de esplenócitos e linfócitos.....	38
3.4.3. Homogenato de fígado e intestino	38
3.4.4. Histopatologia do fígado	39
3.5. Dosagem de citocinas	39
3.6. Dosagem de Nitrito	39
3.7. Dosagem de ALT e AST	40
3.8. Avaliação do dano oxidativo e da atividade de enzimas antioxidantes	41
3.8.1. Avaliação da Peroxidação Lipídica por TBARS.....	41
3.8.2. Espécies Reativas de Oxigênio.....	41
3.8.3. Atividade da enzima catalase	42
3.8.4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	42
3.9. Análise Estatística.....	43
4. RESULTADOS	44

4.1. Camundongos WT e PHOX KO infectados por <i>T. gondii</i> apresentaram níveis similares de mortalidade	44
4.2. Camundongos PHOX KO infectados pelo <i>T. gondii</i> apresentaram menor perda de peso e carga parasitária similar aos WT	46
4.3. Camundongos PHOX KO apresentaram menores níveis de citocinas pró-inflamatórias e nitrito na circulação sanguínea.....	48
4.4. Camundongos PHOX KO apresentaram maiores níveis de TNF e IL-10 em órgãos linfoides periféricos	50
4.5. Camundongos PHOX KO apresentaram menor dano celular hepático em relação aos camundongos WT	53
4.6. Camundongos PHOX KO infectados apresentaram quadro histológico hepático similar ao de camundongos não infectados a partir do décimo quinto dia de infecção....	55
4.7. Camundongos PHOX KO apresentaram menor dano oxidativo no fígado quando comparados aos camundongos WT	57
4.8. Camundongos infectados e não infectados apresentaram níveis similares de ROS nos tecidos	59
4.9. Camundongos infectados apresentaram níveis similares na atividade de enzimas antioxidantes	61
5. DISCUSSÃO	63
6. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii*, causador da toxoplasmose, é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa que compreende um grande grupo de protozoários parasitos de grande importância médica e veterinária. O parasito foi observado pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Mancaeux no roedor *Ctenodactylus gundi* e pelo Dr. Alfonso Splendore em coelho doméstico, sendo identificado como uma diferente espécie de *Leishmania*. Devido à grande capacidade de invadir as células hospedeiras e de evadir as defesas do hospedeiro, o parasito pode ser encontrado em quase todos os vertebrados, o que inclui animais silvestres e domesticados. Os outros membros mais notáveis deste filo para a saúde humana são *Plasmodium spp.* e *Cryptosporidium spp.* agentes causadores, respectivamente, da malária e criptosporidiose. (Dubey *et al.*, 1998; Weiss e Dubey, 2009).

Os humanos e animais podem se infectar pelas formas existentes no ciclo de vida do *T. gondii*, constituído pelos taquizoítos, bradizoítos (cistos), oocistos e merozoítos. O taquizoíto é a forma de multiplicação rápida encontrada durante a fase aguda da infecção e pode ser encontrado dentro de vacúolos parasitóforos (PV) de diversas células nucleadas do hospedeiro, como células fagocíticas, células hepáticas, pulmonares, nervosas, submucosas e musculares. O bradizoíto, diferente do taquizoíto, se multiplica mais lentamente, possui grande capacidade de encistamento e pode ser encontrado no globo ocular e nos músculos esquelético e cardíaco. O oocisto é a forma encontrada nas células epiteliais intestinais do hospedeiro definitivo (felinos), e que pode apresentar alta resistência às condições ambientais e no seu interior podem-se observar dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (Dubey *et al.*, 1998; Tenter *et al.*, 2000).

A patogenicidade do *T. gondii* está diretamente associada à virulência do parasito. Sendo assim, o parasito possui populações naturais que são de natureza clonal, distribuídos em três linhagens clonais distintas encontradas em humanos e outros animais. A virulência do *T. gondii* é determinada através do inóculo de taquizoítos por via intraperitoneal em modelos murinos. As cepas do tipo I são altamente virulentas, possuem elevadas taxas de multiplicação e podem levar camundongos à morte com inóculos

inferiores a 10 taquizoítos ($DL_{100} \approx 10$). Outra característica que determina a virulência dessa linhagem é o desenvolvimento de uma intensa resposta inflamatória nos hospedeiros, que contribui para a patologia tecidual. Já as cepas pertencentes às linhagens clonais do tipo II e III possuem baixa virulência, grande capacidade de encistamento e não são letais em camundongos com inóculos superiores a 10^3 taquizoítos ($DL_{50} > 10^3$) (Howe e Sibley, 1995; Sibley *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2003; Ferreira Ade *et al.*, 2006; Darde, 2008).

O complexo ciclo do parasito consiste de um ciclo sexuado no hospedeiro definitivo (felinos) e um ciclo assexuado nos hospedeiros intermediários (homem e outros animais domésticos). O homem, como hospedeiro intermediário, pode infectar-se através da ingestão de oocistos contidos nas fezes do hospedeiro primário ou pela ingestão de cistos em carne contaminada de outros hospedeiros intermediários. A transmissão da infecção pode ser de forma vertical, mãe infectada para o feto, ou horizontal, através da ingestão de alimentos infectados (Frenkel *et al.*, 1970; Jones e Dubey, 2010).

O ciclo no hospedeiro definitivo consiste na ingestão de cistos ou oocistos por felinos e o desenvolvimento de uma fase assexuada (merogonia) e outra sexuada (gametogonia) do parasito. Os bradizoítos (oriundos dos cistos), taquizoítos e os esporozoítos (oriundos de oocistos) quando em contato com as células epiteliais do intestino delgado, podem penetrá-las e sofrer um processo de multiplicação assexuada por merogonia no interior do PV dessas células infectadas. Os merozoítos formados são liberados pelo rompimento dessas células, que podem penetrar novas células epiteliais e se diferenciar em formas sexuais masculinas (microgametas) e femininas (macrogametas). O macrogameta pode ser fecundado pelo microgameta (flagelado e móvel), formando a parede do oocisto em torno do macrogameta, que pode originar o oocisto imaturo. Os oocistos imaturos formados podem ser liberados no lúmen intestinal através da ruptura das células epiteliais intestinais e atingir o ambiente através da liberação das fezes. No ambiente, os oocistos sofrem esporulação, com formação dos esporozoítos, que caracterizam a forma final e de resistência dos oocistos. As fezes contendo oocistos esporulados podem contaminar diversos alimentos e água, que podem ser ingeridos pelos hospedeiros intermediários ou pelos hospedeiros definitivos, reiniciando o ciclo (Dubey e Frenkel, 1972; Dubey, 2004; Jones e Dubey, 2010) (Figura 1).

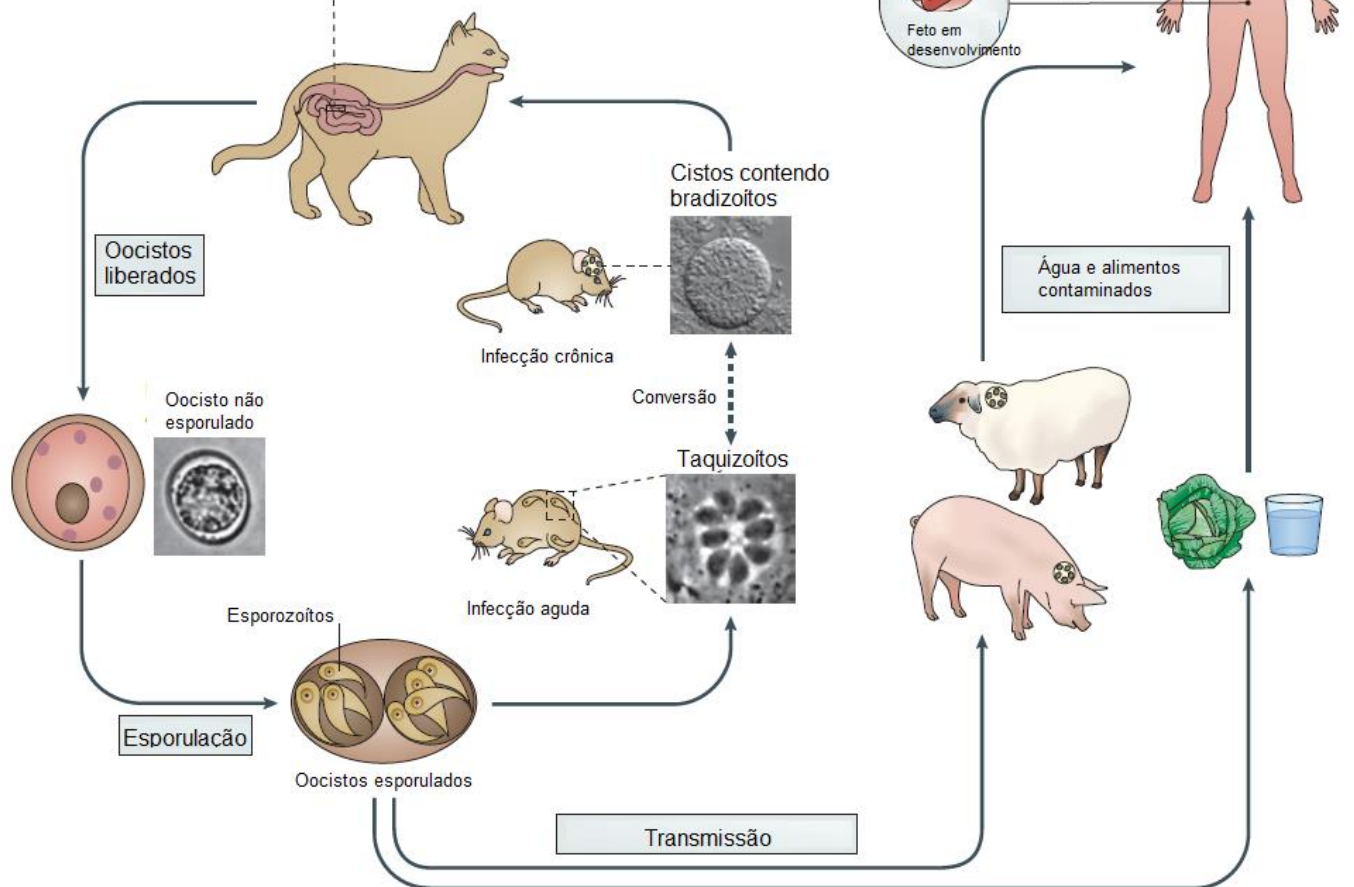
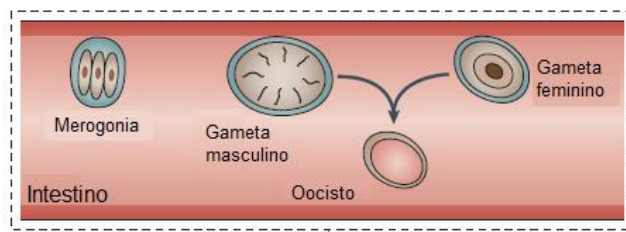


Figura 1: Ciclo biológico do *T. gondii*. O hospedeiro definitivo (felinos) ao ingerir cistos ou oocistos de *T. gondii* podem liberar as formas bradizoítas (cistos) ou esporozoítas (oocistos) pela ação das peptidases gástricas contidas no suco gástrico do estômago. Ao atingir o intestino, os bradizoítas ou esporozoítas podem infectar células epiteliais intestinais do hospedeiro definitivo. Dentro dessas células, os bradizoítas ou esporozoítas podem se diferenciar em merozoítas através do processo de merogonia. Esses merozoítas sofrem processo de diferenciação que pode resultar em gametas masculinos (microgameta) e femininos (macrogametas). A fusão desses gametas pode levar à formação de oocistos imaturos que podem ser eliminados nas fezes. Os oocistos imaturos em contato com o ambiente podem ser maturados através do processo de esporulação, que pode resultar na formação de esporozoítas. Esses oocistos maduros, contidos nas fezes, podem ser capazes de sobreviver no ambiente por longos períodos de tempo e contaminar diversos tipos de alimentos e água. Nos hospedeiros intermediários (camundongos, animais de fazenda e humanos que podem ingerir alimentos contaminados com oocistos ou cistos) Os parasitos podem ser liberados as formas bradizoítas ou esporozoítas no estômago desses hospedeiros. Ao atingir o intestino, essas formas infectam as células epiteliais intestinais e podem se converter a taquizoítas. Esses taquizoítas podem se replicar assexuadamente e se disseminar por todo o corpo. Devido à ação do sistema imunológico dos hospedeiros, muitos taquizoítas podem ser eliminados ou se diferenciar em bradizoítas. Esses bradizoítas formam os cistos, que podem se alojar em diversos órgãos como coração, olhos e cérebro. A ingestão de cistos através de alimentos contaminados pode levar à transmissão para outros hospedeiros intermediários ou para o hospedeiro definitivo, reiniciando a fase sexuada do ciclo. Em humanos, a doença pode causar sintomas graves no cérebro e em outros órgãos em pacientes imunocomprometidos, bem como em fetos em desenvolvimento (Adaptado de Hunter e Sibley, 2012).

No hospedeiro intermediário, infecções causadas por cistos contendo bradizoítos ou oocistos contendo esporozoítos ocorrem principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados. Após serem ingeridos, a parede dos cistos e dos oocistos pode ser digerida no estômago pelas peptidases gástricas, liberando as formas bradizoítas (cistos) e esporozoítas (oocisto) que podem invadir as células epiteliais do intestino delgado. Dentro dessas células epiteliais, eles podem ser convertidos a taquizoítos, forma que possui alta taxa de multiplicação. Estes taquizoítos, ao romperem as células que compõem a barreira epitelial intestinal, podem atingir outros órgãos e infectar uma gama de novas células nucleadas, replicar-se assexuadamente dentro de PV e reiniciar os ciclos de infecção. Devido ao alto grau de infectibilidade, os taquizoítos podem ativar uma potente resposta imune que elimina boa parte dos parasitos. Entretanto, alguns conseguem escapar da eliminação e se convertem em bradizoítos em tecidos periféricos, como músculos e cérebro. Na ausência de uma resposta imune adequada, os taquizoítos podem se multiplicar descontroladamente, causando danos teciduais que podem ocasionar a morte do hospedeiro. Sendo assim, o balanço entre a indução e evasão da resposta imune do hospedeiro torna-se crucial para o estabelecimento da infecção crônica causada pelo *T. gondii* (Dubey e Frenkel, 1972; Dubey *et al.*, 1998; Dubey, 2004; Jones e Dubey, 2010) (Figura1).

1.2. Toxoplasmose

A toxoplasmose humana é uma doença que pode apresentar grande impacto em indivíduos imunocomprometidos, em indivíduos que foram infectados pela via congênita e, raramente, em pacientes transplantados. A maioria dos indivíduos imunocompetentes infectados podem ser assintomáticos ao longo da vida, entretanto, assim como os imunocomprometidos, podem desenvolver a doença (Bowie *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 1997; De Moura *et al.*, 2006; Montoya e Remington, 2008).

A doença é uma das zoonoses mais difundidas no mundo. Estima-se que aproximadamente 25 a 30% da população humana no mundo esteja infectada pelo *T. gondii*. Foram relatadas baixa prevalência (10 a 30%) de anticorpos específicos (IgM e IgG) para a doença na América do Norte, no Sudeste Asiático, no Norte da Europa e em alguns países da África. Moderada prevalência (30 a 50%) foi relatada em países do sul da Europa e alta prevalência (acima de 50%) na América Latina e em países africanos tropicais (Montoya e Liesenfeld, 2004; Pappas *et al.*, 2009).

Alguns fatores podem afetar a prevalência da doença em humanos. Fatores climáticos podem aumentar a taxa de sobrevivência de oocistos no ambiente. A taxa de sobrevivência dos oocistos reflete diretamente nas taxas de infecção em animais produtores de carne. Em países de clima úmido e quente, pode-se encontrar alta prevalência da doença, enquanto países áridos e países mais frios podem apresentar baixa prevalência da doença. Associado a isso, os hábitos alimentares (não lavar as mãos; consumo e preparo de carnes contaminadas (cruas ou malpassadas); má limpeza de vegetais), hábitos econômicos, sociais ou culturais (ausência de saneamento básico e de programas sociais em combate a doença) podem ajudar a explicar grande parte das variações da prevalência dos anticorpos específicos da doença nas diferentes regiões (Jones e Dubey, 2010; Robert-Gangneux e Darde, 2012).

A gravidade da doença e a forma clínica pode depender do estado imunológico do hospedeiro, da agressividade das linhagens do *T. gondii* e de seu estágio evolutivo. A toxoplasmose pode apresentar três formas: toxoplasmose aguda adquirida em indivíduos imunocompetentes, toxoplasmose cerebral (em indivíduos imunocomprometidos) e toxoplasmose congênita (Robert-Gangneux e Darde, 2012).

Em imunocompetentes, o quadro clínico da doença sintomática seria um quadro autolimitado, benigno e inespecífico de uma doença infecciosa que raramente necessita de tratamento. A manifestação clínica mais comum é a forma ganglionar, caracterizada por linfadenopatia indolor, que regride em algumas semanas, em que os gânglios podem permanecer aumentados por quatro a seis semanas. Indivíduos infectados podem apresentar alguns outros sintomas, como cefaleia, dor de garganta, febre, mal-estar, suores noturnos, mialgias. A partir desses sintomas, podem ser apresentados, erroneamente, diagnósticos de linfomas, mononucleose infecciosa, tuberculose, carcinoma metastático e leucemia (Masur *et al.*, 1978; Luft e Remington, 1992; Montoya e Liesenfeld, 2004; Halonen e Weiss, 2013).

Pacientes imunocomprometidos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), quando infectados pelo *T. gondii*, podem desenvolver encefalite, causada pela reativação de uma infecção latente, resultando na morte do paciente. Os principais sintomas como demência, letargia e convulsões são inespecíficos, dificultando o diagnóstico clínico. Entretanto, em países subdesenvolvidos o tratamento de pacientes com a terapia antirretroviral tem reduzido a incidência da toxoplasmose cerebral em pacientes portadores da infecção por HIV (Luft e Chua, 2000; Contini, 2008; Osunkalu *et al.*, 2011).

A toxoplasmose congênita, oriunda da prima infecção mãe-feto, pode ocorrer mesmo em situações nas quais a gestante esteja assintomática e pode levar a graves consequências para o feto, como lesões neurológicas, oftalmológicas, hidrocefalia, coriorretinite e calcificações intracranianas, além de poder resultar em aborto. O parasito pode infectar o feto através da via transplacentária, causando danos de diferentes graus, que podem depender diretamente da virulência da linhagem do parasito e da resposta imune da gestante. O risco de transmissão vertical pode ser maior em fases posteriores da gravidez, mas a infecção é geralmente mais grave se ocorre no início do período de gestação (Lopez *et al.*, 2000; Kravetz e Federman, 2005; Montoya e Remington, 2008; Vasconcelos-Santos *et al.*, 2009).

O tratamento da toxoplasmose envolve o uso de medicamentos em indivíduos portadores do HIV e gestantes. Os medicamentos usados podem ser a pirimetamina, a sulfadiazina e o ácido folínico. Medidas higiênicas podem reduzir a transmissão do parasito, como a lavagem de frutas e verduras e evitar o consumo de carne crua e malpassada. Em relação à toxoplasmose congênita, campanhas educativas por parte do

governo devem ser planejadas para ajudar a prevenir o aumento de casos (Lopez *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2010).

1.3. Interação parasito – célula hospedeira

A invasão das células hospedeiras pelo *T. gondii* é um processo complexo. Devido à grande capacidade de infectar qualquer tipo de célula nucleada e tecido, a forma taquizoíta do parasito é comumente utilizada em estudos de invasão ao hospedeiro. Primeiro, os taquizoítos de *T. gondii* podem reconhecer e se ligar fracamente à célula alvo através de proteínas de superfície chamadas SAGs (antígenos de superfície), SRSs (sequências relacionadas a SAG) e SUSAs (antígenos de superfície não relacionados a SAG). Após o reconhecimento da célula alvo, o parasito pode iniciar seu processo de invasão através da secreção de proteínas pelas organelas secretoras chamadas micronemas (MIC). Essas proteínas podem ser secretadas em resposta ao elevado cálcio citoplasmático do parasito pela ação da proteína quinase dependente de cálcio I (CDPKI). Os mecanismos que desencadeiam a liberação de cálcio citoplasmático pelo parasito ainda não são conhecidos. Essas proteínas do micronema podem conter uma variedade de domínios adesivos incluindo repetições de trombospondina do tipo I, domínios de integrina A e de fibronectinas dos tipos II e III, e se ligam à célula hospedeira através de moléculas de superfície genéricas, como glicosaminoglicanos e ácido siálico (Carruthers e Sibley, 1997; Boothroyd *et al.*, 1998; Pollard *et al.*, 2008; Tait e Hunter, 2009; Lourido *et al.*, 2010).

A segunda parte da invasão resulta na secreção de proteínas pelas organelas chamadas roptrias, que podem injetar proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células hospedeiras, através de pequenas quebras na membrana plasmática que podem se fechar novamente. A formação de uma junção da superfície do parasito até a membrana plasmática da célula hospedeira pela ação das proteínas roptrias de pescoço (RONs) que interagem com proteína adesina do micronema (AMA1) pode permitir o acesso do parasito ao interior das células hospedeiras formando o vacúolo parasitóforo (PV) (Hakansson *et al.*, 2001; Alexander *et al.*, 2005; Mital *et al.*, 2005; Besteiro *et al.*, 2009) (Figura 2).

Durante o processo de invasão e formação do PV, pode ocorrer o recrutamento de organelas intracelulares do hospedeiro, como lisossomos, mitocôndrias e retículo

endoplasmático e complexo de Golgi. Entretanto, o parasito pode modular a composição do vacúolo parasitóforo, podendo impedir o acoplamento das proteínas membranares dessas organelas, e o que pode ajudar na aquisição de nutrientes pelo parasito (Suss-Toby *et al.*, 1996; Mordue *et al.*, 1999; Charron e Sibley, 2004).

No decorrer do ciclo lítico, que dura entre 24 e 48 horas, os taquizoítos dentro do PV podem se dividir rapidamente por endogiogenia e formar pares sequenciais de células filhas. Um único parasito pode gerar entre dezesseis e cento e vinte e oito cópias. Após a divisão, o *T. gondii* pode romper o PV através da secreção de proteínas da MIC, mais especificamente pela ação da proteína semelhante a perforina (TgPLP1) através do aumento de cálcio intracelular do parasito. O parasito pode romper a célula hospedeira e se tornar disponível para encontrar novas células e reiniciar o ciclo de invasão (Nagamune *et al.*, 2008; Kafsack *et al.*, 2009).

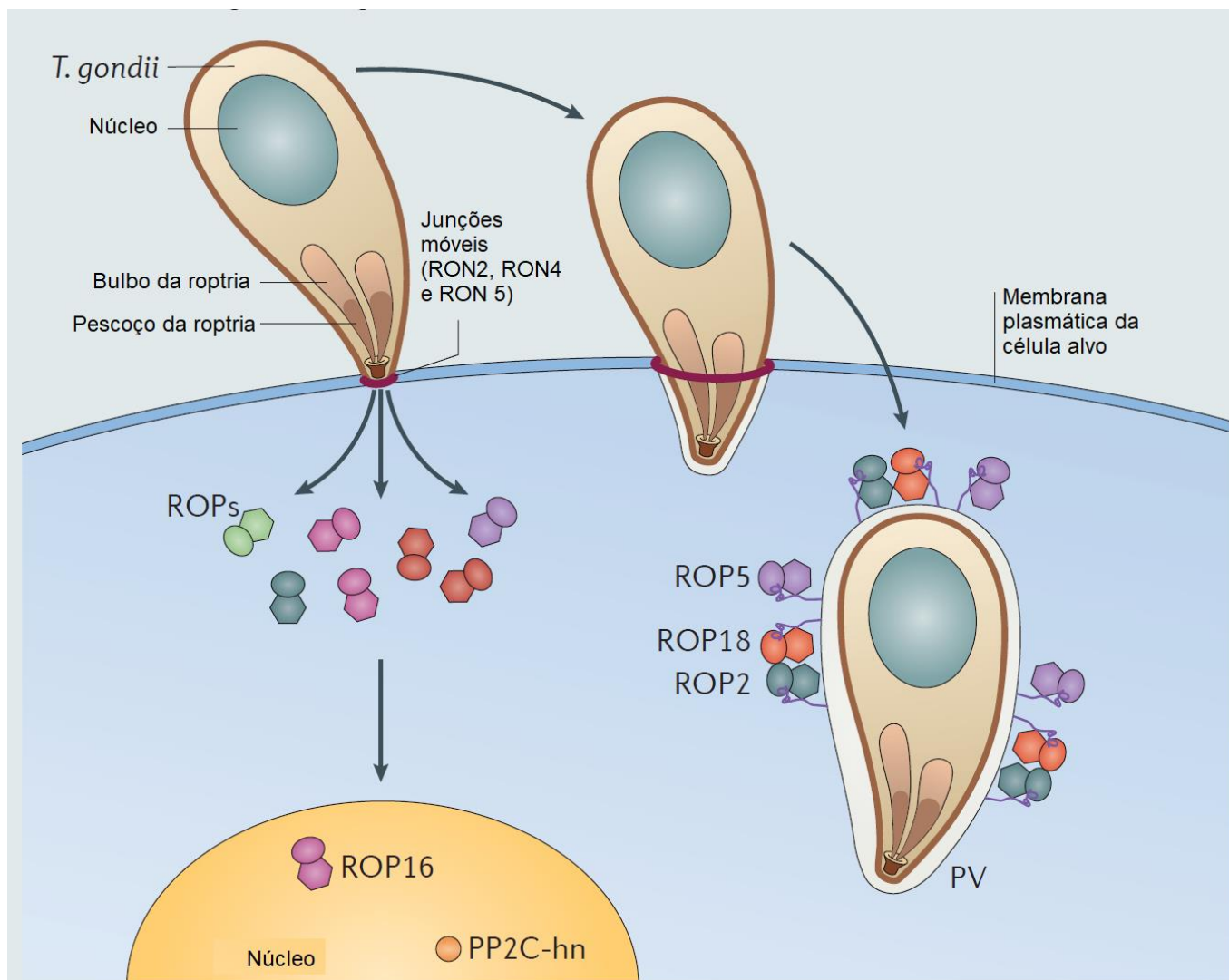


Figura 2: Invasão do *T. gondii* no hospedeiro. A invasão do parasito em células hospedeiras envolve a ação combinada de proteínas. A formação do vacúolo parasitóforo (PV) pode ser iniciada pela secreção de proteínas do bulbo (ROPs) e de pescoço (RONs) da organela chamada roptria. As RONs podem ser inicialmente secretadas na membrana da célula hospedeira para ajudar na formação de uma junção móvel composta por RON2, RON4 e RON5 junto com a proteína micronemal AMA1. As proteínas ROP podem ser liberadas no citoplasma da célula hospedeira ou na superfície do PV (ROP2, ROP 5 e ROP 18). Essas proteínas ao envolver o PV, ajudam no estabelecimento do parasito na célula alvo, além de possuir a capacidade de inibir os mecanismos celulares da célula hospedeira que poderiam levar à eliminação do parasito. A ROP 16, liberada no núcleo da célula hospedeira, junto com a proteína fosfatase 2C (PP2C-hn) podem agir na inibição dos fatores de transcrição STAT3 e STAT6. O parasito pode modular a composição do PV para a aquisição de nutrientes e para o sucesso no estabelecimento na célula hospedeira (Adaptado de Hunter e Sibley, 2012).

1.4. Resposta imune associada ao *T. gondii*

A sobrevivência do parasito depende do seu sucesso ao invadir o hospedeiro vertebrado. Células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, constituem uma das primeiras linhas de defesa contra a invasão de patógenos intracelulares devido à sua capacidade de reconhecer, fagocitar e destruir microrganismos (Weiss e Schaible, 2015). Ao invadir o hospedeiro vertebrado, o *T. gondii* infecta essas células que, por sua vez, respondem através de diferentes mecanismos que serão descritos nesse tópico.

Durante os estágios iniciais da infecção, os hospedeiros infectados pelo *T. gondii* precisam detectar e responder rapidamente à invasão do parasito para evitar sua disseminação. O principal mecanismo utilizado pelos hospedeiros para o reconhecimento de patógenos são os receptores do tipo Toll (TLRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e são cruciais na eliminação do parasito, através do recrutamento de fagócitos para o tecido infectado. As principais células envolvidas no reconhecimento inicial de PAMPs são os monócitos, macrófagos e células dendríticas (Gazzinelli e Denkers, 2006; Hunter e Sibley, 2012; Yarovinsky, 2014; Sasai *et al.*, 2018).

As células hospedeiras podem reconhecer diferentes tipos de PAMPs expressos pelo *T. gondii*, como por exemplo as profilinas e o glicosilfosfoinositol (GPI). As profilinas de *T. gondii* (TgPRF) são proteínas envolvidas na polimerização de filamentos de actina responsáveis pela motilidade do parasito e invasão de células hospedeiras. As TgPRF têm importante papel de agonista do sistema imune inato através do seu reconhecimento pelo TLR11 em células dendríticas de camundongos. O GPI, molécula proveniente do parasito, também pode ser reconhecido pelos receptores TLR2 e TLR4 em monócitos e macrófagos (Campos *et al.*, 2001; Plattner *et al.*, 2008; Niehus *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2013).

As cascatas de sinalização provenientes da ativação dos TLRs junto com a ação da proteína adaptadora mieloide (MyD88) podem ativar fatores de transcrição, como fator nuclear κ B (NF- κ B) e o fator regulador de interferon 8 (IRF8), importantes na transcrição de interleucina 12 (IL-12), uma das principais citocinas envolvidas na resposta inicial contra o *T. gondii* (Scanga *et al.*, 2002).

A produção de IL-12 por monócitos, macrófagos e células dendríticas ativa as células NK, células T CD4⁺ e CD8⁺ que, por sua vez, respondem produzindo interferon

gama (IFN- γ), citocina mediadora das respostas contra o *T. gondii*. O IFN- γ , junto com o sinal proveniente do fator de necrose tumoral (TNF), vindos de monócitos, macrófagos e células dendríticas, estimulam a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que, ao promover a oxidação da L-arginina, produzindo o óxido nítrico (\bullet NO), que age na eliminação de patógenos dentro de PVs. Além da indução da iNOS, o IFN- γ também estimula os complexos da enzima NADPH oxidase que atuam na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que também agem na eliminação de patógenos (Adams *et al.*, 1990; Scharton-Kersten *et al.*, 1997; Yap e Sher, 1999) (Figura 3). O papel de ROS durante a infecção por *T. gondii* serão descritos adiante.

Além de estimular a expressão de enzimas que estimulam a produção de \bullet NO e ROS, o IFN- γ atua na ativação de outros mecanismos de combate à infecção pelo *T. gondii*. A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) atua na inibição do crescimento do parasito em diversos tipos celulares, como fibroblastos, células epiteliais e fagocíticas. Essa enzima tem a capacidade de reduzir os níveis do aminoácido triptofano dentro dos PVs, que é essencial para o crescimento do parasito durante seu estabelecimento na célula hospedeira. Esse mecanismo resulta na eliminação do parasito dentro dos PVs. Outros mecanismos de defesa como as GTPases relacionadas à imunidade p47 (IRGs) e as proteínas de ligação ao guanilato p65 (GBPs) também exercem importante papel na ruptura do vacúolo parasitóforo. A exposição do parasito diretamente ao citoplasma resulta na sua eliminação. Os mecanismos de atuação de IRGs e GBPs ainda não são bem compreendidos (Murray *et al.*, 1989; Bekpen *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de resposta pró-inflamatória exacerbada promove, além da eliminação do parasito, graves danos teciduais no organismo hospedeiro. A citocina reguladora IL-10, produzida por linfócitos T reguladores, atua na regulação das respostas pró-inflamatórias induzidas por IL-12, principalmente na diminuição da produção de IFN- γ . Durante a infecção por *T. gondii* por cepas não virulentas, camundongos deficientes em IL-10 têm alta mortalidade devido à hiperprodução de citocinas pró-inflamatórias (Gazzinelli *et al.*, 1992; Gazzinelli *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 2000).

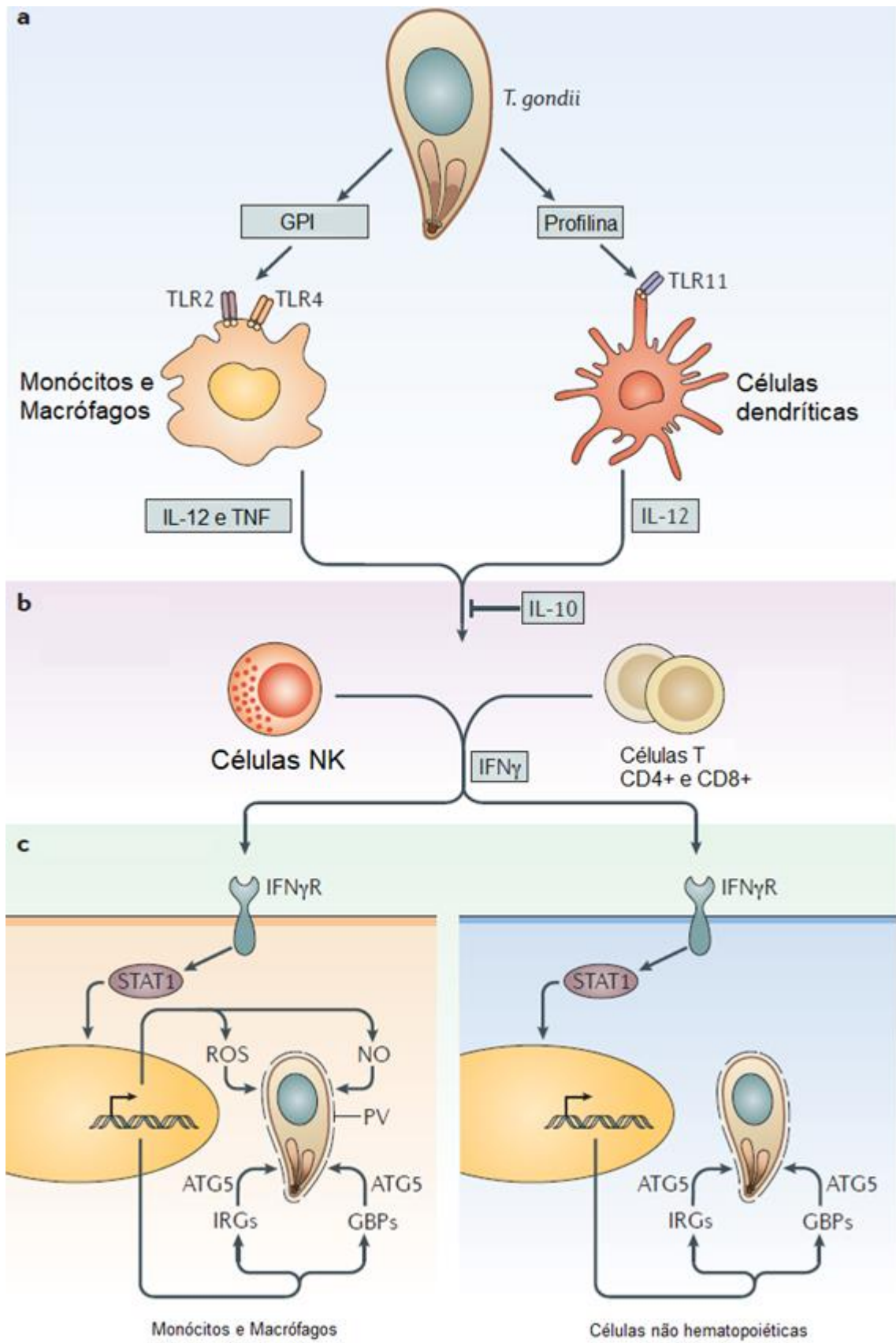


Figura 3: Resposta imune inata induzida pela infecção por *T. gondii*. **a-** Monócitos, macrófagos e células dendríticas podem ser as primeiras células a responderem à infecção pelo *T. gondii*. O receptor TLR11 de células dendríticas em camundongos pode reconhecer as profilinas do *T. gondii* e responder com a produção de IL-12. Monócitos e macrófagos podem produzir IL-12 e TNF pela ligação dos TLR 2 e 4 às proteínas ancoradas ao GPI do parasito. **b-** A ação mediada pela IL-12 em células NK na resposta inata e nas células T CD4⁺ e CD8⁺ pode resultar na produção de IFN- γ . A citocina reguladora IL-10 é essencial para a modulação das respostas Th1, uma vez que evita a superprodução de citocinas pró-inflamatórias. **c-** A produção de IFN- γ durante a resposta imune inata e adaptativa pode ativar as células hospedeiras para o controle da replicação parasitária. O IFN- γ , através de seu receptor específico, induz um sinal que ativa o fator de transcrição STAT1 que controla a expressão de diversos genes. Monócitos e macrófagos, em resposta ao sinal de STAT1, regulam positivamente a produção de NO e ROS, moléculas que medeiam o controle de parasitos intracelulares. Células hematopoiéticas e não hematopoiéticas podem mediar outros mecanismos de defesa. Proteínas de defesa como IRGs e GBPs, dependentes da proteína autofágica 5 (ATG5), podem ser recrutadas para o vacúolo parasitóforo e estão envolvidas na eliminação do parasito (Adaptado de Hunter e Sibley, 2012).

A resposta imune humoral pode exercer importante papel no controle da infecção por *T. gondii* através da produção de anticorpos específicos contra o parasito. Esses anticorpos específicos possuem a capacidade de impedir que os taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos se liguem e invadam células do hospedeiro através da opsonização da superfície dessas formas evolutivas do parasito. Com isso, pode ser possível a eliminação do parasito através da fagocitose por células fagocíticas e lise celular, através da ativação da via clássica do sistema complemento (Montoya, 2002; Correa *et al.*, 2007; Santana *et al.*, 2012).

Os anticorpos envolvidos na resposta contra o *T. gondii* são pertencentes às classes IgM, IgA e IgG (e suas subclasses). O anticorpo do tipo IgM é o primeiro a ser detectado no soro durante a infecção. Seus níveis podem ser detectados com 3 a 10 dias pós infecção e ter um pico no período de 30 a 60 dias pós infecção. A produção de IgM é regulada positivamente pela presença de IL-2, como consequência da estimulação de células T e B (Remington *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2007).

O anticorpo IgA, comumente presente em mucosas, também pode ser encontrado no soro de indivíduos infectados. Considerado um anticorpo típico de fase aguda, a IgA é produzida nos primeiros 7 a 8 dias de infecção, e pode ter um pico de produção um mês após a infecção. Sua produção pode ser regulada positivamente pela presença das citocinas IL-37 e TGF- β . A presença de baixos níveis de IgA junto com IgM e aumento dos níveis de IgG indicam progressão da fase aguda para a fase crônica da doença (Hegab e Al-Mutawa, 2003; Remington *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2007).

Considerada a principal imunoglobulina em resposta à infecção por *T. gondii*, o anticorpo IgG começa a ser produzido entre 7 e 21 dias de infecção, após o aparecimento de IgM na circulação, e atinge seu pico a partir de 4 a 6 meses de infecção. A produção de IgG é induzida por IFN- γ e é o mais utilizado em testes diagnósticos para a detecção de exposição ao *T. gondii*. As subclasses IgG1 e IgG3 são induzidas por IFN- γ e seus níveis na circulação podem ser aumentados na presença de IL-6. Além disso, esses subtipos são capazes de ativar a via alternativa do sistema complemento. (Darcy *et al.*, 1988; Ee *et al.*, 1989; Huskinson *et al.*, 1989; Hegab e Al-Mutawa, 2003; Bela *et al.*, 2008).

Apesar dos diversos mecanismos efetores de resistência celular em combate ao *T. gondii* citados nesse trabalho, o parasito desenvolveu estratégias para lidar contra esses

mecanismos, regulados através da ação de fatores de transcrição. Sendo assim, o parasito promove alterações na transcrição de genes da célula hospedeira, que estão envolvidos nas respostas imunes, no metabolismo energético e na sinalização celular. O parasito inibe os fatores de transcrição sinal transdutor e ativador da transcrição 1 (STAT1) e NF- κ B, que resulta na inibição da ação do IFN- γ . Um estudo mostrou, por exemplo, que fibroblastos infectados por *T. gondii* não respondem eficientemente aos efeitos antimicrobianos do IFN- γ , devido à sinalização ineficiente do STAT1. Além disso, o parasito também inibe a ação dos supressores de sinalização de citocinas (SOCS1 e SOCS3) e STAT3, que promovem o aumento das vias anti-inflamatórias, que pode comprometer os mecanismos de controle parasitário do hospedeiro (Luder *et al.*, 2001; Shapira *et al.*, 2005; Whitmarsh *et al.*, 2011; Stutz *et al.*, 2012).

Nesse trabalho, detalharemos o mecanismo de produção de ROS via NOX2 e sua contribuição no controle do *T. gondii*. Os aspectos gerais sobre ROS e seu papel durante à infecção serão descritos a seguir.

1.5. Espécies reativas de oxigênio e maquinaria antioxidante do *T. gondii*

1.5.1. NADPH oxidase e espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio são moléculas derivadas do oxigênio que incluem radicais de oxigênio, como superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}). O estresse mediado por ROS tem sido implicado em várias disfunções e doenças, incluindo doenças cardiovasculares, imunodeficiências e doenças pulmonares. Entretanto, a liberação de ROS mediada por NADPH oxidase (NOX), chamada de explosão respiratória, leva à eliminação de microrganismos invasores por células fagocíticas, tendo assim um importante papel como mediador inflamatório (Franchini *et al.*, 2013; Panday *et al.*, 2015).

Por muito tempo, acreditava-se que a produção de superóxido através das NOX ocorria apenas em células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos. No entanto, várias enzimas responsáveis pela produção de ROS foram identificadas em outros tipos celulares de alguns tecidos, como células do epitélio intestinal e fibroblastos gengivais, cardíacos e pulmonares. Estas enzimas são semelhantes à NOX fagocítica, denominada

NOX2, e são parte da família das NOX. Os genes *nox* produzem as proteínas transmembrana responsáveis pelo transporte de elétrons através de membranas biológicas, utilizando o NADPH como principal substrato, que leva à redução de oxigênio em superóxido (Cross e Segal, 2004; Smeyne e Smeyne, 2013; Aliev *et al.*, 2014; De Deken *et al.*, 2014; Robert e Robert, 2014).

A família das NOX consiste de seis homólogos da NOX2 distribuídos em diversos tipos celulares: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX 2. Estes homólogos diferem em relação ao tipo celular no qual se encontram, além das subunidades estruturais. A NOX2 é composta de duas proteínas de membrana que juntas formam o grande flavocitocromo b558, que são a gp91^{phox} (subunidade b) e p22^{phox} (subunidade a). Sob condições não estimulantes, as subunidades reguladoras, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e Rac2 existem no citoplasma como um complexo inativo (Babior, 1999; Diebold e Bokoch, 2001; Touyz *et al.*, 2002).

Na presença de um estímulo apropriado, como a fagocitose ou a ligação de PAMPs com receptores do tipo Toll, a cinase p38 MAPK é ativada, via Myd88. Em seguida, p47^{phox} sofre fosforilação e Rac2, já ligada à proteína G, se liga ao trifosfato de guanosina (GTP). A proteína G se transloca junto com as demais subunidades reguladoras para a membrana e se associa com o flavocitocromo b558 para formar a oxidase ativa (Leto *et al.*, 1994; Laroux *et al.*, 2005; Mizrahi *et al.*, 2006; Bedard e Krause, 2007) (Figura 4).

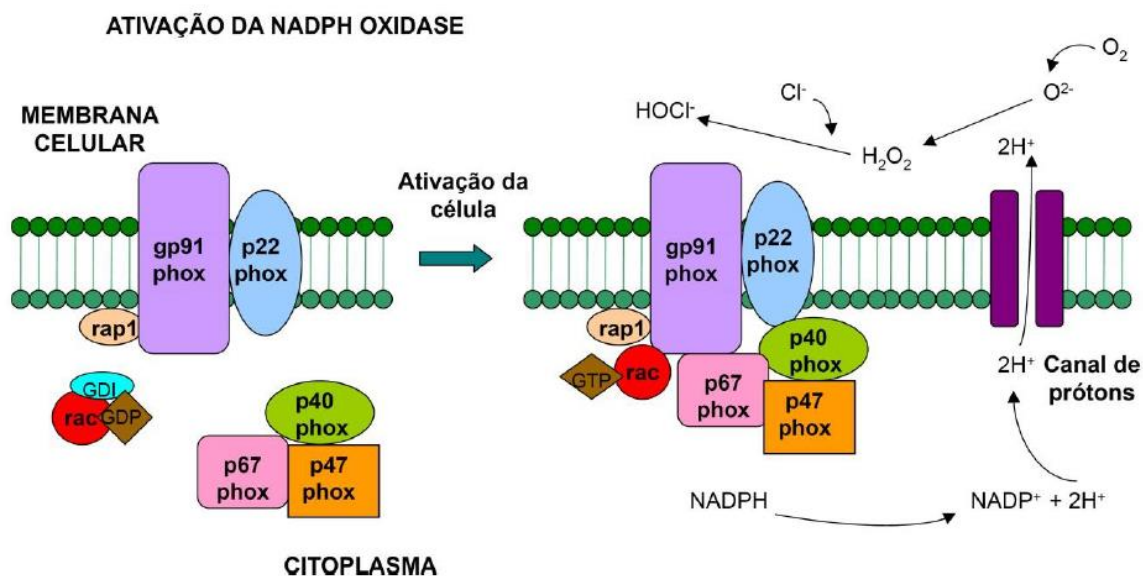


Figura 4: Representação esquemática da ativação da enzima NADPH oxidase 2 (NOX2). O flavocitocromo b558, composto por p22^{phox} e gp91^{phox}, é a parte catalítica da enzima conectada à membrana plasmática. As subunidades reguladoras citoplasmáticas (p67^{phox}, p47^{phox} e p40^{phox}) e a proteína Rac ligada à proteína G pode se deslocar para a membrana após a ativação do complexo NADPH oxidase, responsável pela explosão respiratória. O superóxido pode originar diversas outras espécies reativas de oxigênio, que juntas, atingem o alvo internalizado (Adaptado de Assari, 2006).

A subunidade gp91^{phox} da NOX2 é essencial para a redução do oxigênio molecular por elétrons doados pelo NADPH. Indivíduos que possuem mutações no gene *nox*, que refletem em defeitos na NOX2, tornando-a inativa, podem apresentar a doença granulomatosa crônica. A doença granulomatosa crônica promove a hipersensibilidade a infecções bacterianas e fúngicas e o acúmulo de células fagocíticas contendo bactérias leva ao desenvolvimento de granulomas, refletindo a incapacidade dessas células de eliminarem patógenos internalizados ou de sofrerem apoptose (Cross e Curnutte, 1995; Assari, 2006).

A ação do superóxido produzido pela atividade da NOX2 é restrita ao local onde ele foi formado e liberado, devido à sua natureza aniônica. O radical superóxido pode espontaneamente ou enzimaticamente ser dismutado em peróxido de hidrogênio que, por sua vez, possui alta capacidade de difusão entre membranas. Outra forma de reação do superóxido é com o $\bullet\text{NO}$ proveniente da indução da expressão da enzima iNOS, produzindo peroxinitrito, um potente oxidante e agente citotóxico para diversos microrganismos. A reação entre $\bullet\text{NO}$ e $\text{O}_2\bullet^-$ em pH fisiológico e alta concentração de CO_2 , condições encontradas nos tecidos, pode formar os radicais $\bullet\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3\bullet^-$, nitrato e carbonato, respectivamente, que causam danos tanto no microrganismo alvo, quanto na célula hospedeira (Babior, 1984; Groemping e Rittinger, 2005).

1.5.2. Maquinaria antioxidante do *T. gondii*

O sucesso da invasão e multiplicação do *T. gondii* depende da sua capacidade de sobreviver dentro das células hospedeiras e está relacionado ao seu repertório de enzimas antioxidantes. Assim, o *T. gondii* é capaz de se proteger das ROS liberadas por células imunes efectoras do hospedeiro (Callahan *et al.*, 1988; Mcgonigle *et al.*, 1998).

O parasito utiliza diversas enzimas antioxidantes próprias, que incluem a superóxido dismutase (SOD) para decompor ânions superóxido, e catalase, glutathione peroxidase (GSH) e tiorredoxina peroxidase (Trx), para decompor moléculas de peróxido de hidrogênio. Para a proteção contra os danos oxidativos, o *T. gondii* utiliza um eficiente sistema de redução de tiol, que é composto de Trx, GSH e glutaredoxina (Grx). A GSH oxidada e a Trx oxidada podem ser reduzidas pela catalase da GSH redutase e Trx redutase (TR), respectivamente, enquanto que a Grx pode ser reduzida pela GSH (Ding *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2017) (Figura 5).

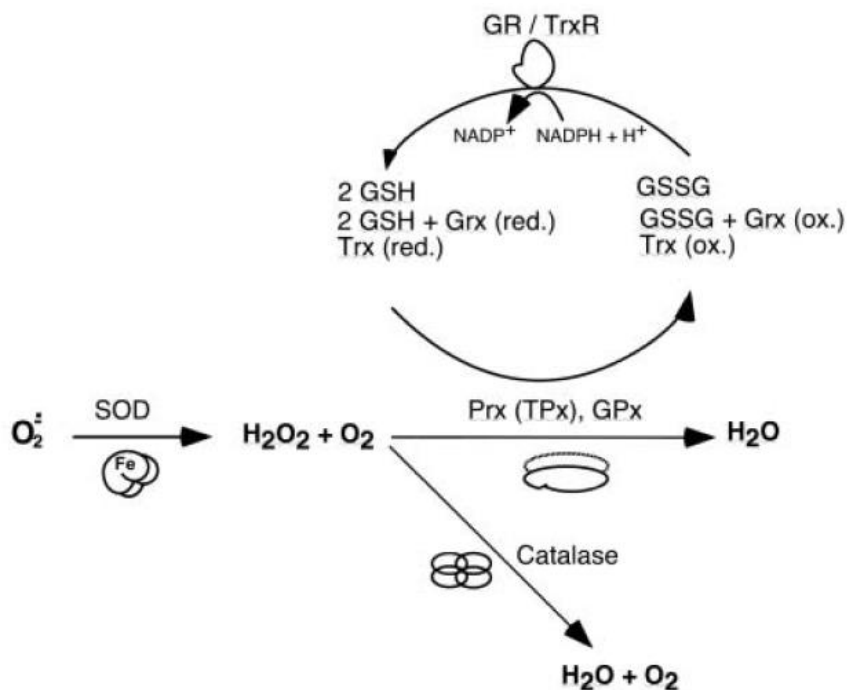


Figura 5: Sistema antioxidante do *T. gondii*. Vias de metabolização de espécies reativas de oxigênio: Os superóxidos gerados podem ser dismutados pela ação da SOD, obtendo-se como produto peróxido de hidrogênio e O₂^{•-}. O peróxido de hidrogênio gerado pode ser metabolizado pela catalase, gerando H₂O e O₂^{•-}, ou pelas peroxidases glutatona peroxidase (GPx) e tioredoxina peroxidase (TPx). Essas enzimas podem estar acopladas a sistemas redutores sulfidrílicos, como a tioredoxina (Trx) ou glutatona (GSH) com ou sem glutaredoxina (Grx). Assim, a glutatona dissulfeto (GSSG) e a tioredoxina oxidada podem ser reduzidas pela glutatona redutase (GR) e pela tioredoxina redutase (TrxR) respectivamente, às custas dos elétrons provenientes da oxidação do NADPH (Adaptado de Ding et al., 2004).

A ausência ou a inibição das enzimas associadas ao sistema antioxidante compromete a sobrevivência e a infecção do parasito. A tioredoxina de *T. gondii* (TgTR) desempenha um importante papel na resistência ao dano oxidativo e é considerada um fator de virulência associado à infecção pelo parasito. Um estudo *in vitro* utilizando parasito nocaute para a enzima tioredoxina (TgTR-KO) mostrou que o parasito apresenta menor capacidade antioxidante, menor eficiência na invasão e proliferação. Quando se analisou a capacidade do parasito nocaute de infectar camundongos, observou-se que os camundongos infectados com essa cepa apresentaram tempo mais prolongado de sobrevivência em relação aos camundongos infectados com a cepa do tipo selvagem (Xue *et al.*, 2017).

Outro trabalho demonstrou a importância da enzima catalase na virulência do parasito na cepa PRU (Prugniaud). Os autores observaram que camundongos infectados com essa cepa sem os genes da catalase apresentaram maior sobrevivência do que os camundongos infectados com a cepa do tipo selvagem (Ding *et al.*, 2004).

As formas taquizoítas de *T. gondii* são resistentes ao estresse oxidativo, devido à capacidade da Prx de neutralizar o efeito tóxico do peróxido de hidrogênio (Akerman e Muller, 2005). Já outro estudo mostrou que o tratamento com Prx recombinante em macrófagos infectados com *T. gondii* pode aumentar a replicação do parasito (Marshall *et al.*, 2011).

Dessa forma, vários trabalhos descrevem a importância das enzimas antioxidantes do parasito no estabelecimento da infecção. Entretanto, a ausência dessas enzimas pode tornar o parasito susceptível à ação danosa das ROS, conforme será descrito a seguir.

1.6 O papel das ROS na infecção por *T. gondii*

As ROS podem exercer importante papel na mediação do controle da infecção por patógenos intracelulares. Entretanto, o balanço dos níveis de produção torna-se essencial para a manutenção da homeostase redox do organismo (Zorov *et al.*, 2014). Apesar da escassez de trabalhos envolvendo ROS e *T. gondii* na literatura, alguns trabalhos publicados com experimentos *in vitro* destacam a importância de ROS na eliminação do parasito.

Um estudo envolvendo a ativação do receptor P2X7 com trifosfato de adenosina (ATP) em macrófagos mostrou uma diminuição da carga parasitária do *T. gondii* através

da ativação da sinalização de mediadores inflamatórios. Os ensaios de ROS e \bullet NO mostraram que apenas a produção de ROS está envolvida com os efeitos do tratamento com ATP (Correa *et al.*, 2010). Outro estudo também mostrou que a inibição da via PI3K/Akt (via utilizada na regulação de diversos processos de crescimento celular) através de inibidores específicos promoveu a redução da proliferação do *T. gondii* em células epiteliais pigmentadas da retina humana (ARPE-19) devido à presença de altos níveis de ROS. Esse mesmo estudo mostrou que o *T. gondii* necessita da via PI3K/Akt para regular negativamente a expressão da NOX4, comumente expressa em células ARPE-19, para promover a diminuição da produção de ROS nessas células (Zhou *et al.*, 2013). Além disso, foi demonstrado que o *T. gondii*, quando inoculado por via intraperitoneal em camundongos, teria a capacidade de reduzir os níveis de ROS produzidos por macrófagos inflamatórios. Esses resultados podem sugerir que o *T. gondii* teria a capacidade de se manter nesses macrófagos através dos mecanismos de supressão da explosão respiratória, como por exemplo pela utilização de seu sistema antioxidante (Shrestha *et al.*, 2006).

A galectina-3 (Gal-3) é uma lectina que se liga a glicoconjugados contendo β -galactose (Barondes *et al.*, 1994). Essa lectina pode ser expressa em diferentes tipos celulares auxiliando em processos inflamatórios (Liu, 2005; Kim *et al.*, 2007). Sabendo-se que as GPI de *T. gondii* ligam-se com forte afinidade a Gal-3 (Debierre-Grockiego *et al.*, 2010), pesquisadores investigaram o papel dessa lectina no recrutamento de leucócitos inflamatórios peritoneais e na ativação de neutrófilos durante a infecção pelo parasito em camundongos tanto *in vitro* quanto *ex vivo*. Foi demonstrado que Gal-3 aumenta o recrutamento de linfócitos e neutrófilos no peritônio de camundongos quando infectados com a cepa RH do *T. gondii*, além de elevar a produção de ROS em neutrófilos peritoneais. Esses resultados demonstraram a importância da geração de ROS por neutrófilos na fase aguda da infecção e o fenômeno constitui uma tentativa de controle do crescimento do parasito (Alves *et al.*, 2013).

Outro trabalho investigou o papel da infecção pelo *T. gondii*, no contexto da toxoplasmose ocular, no fenômeno de apoptose induzida pelo H_2O_2 em células ARPE-19 através do monitoramento das moléculas reguladoras de apoptose e proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) como a p38 MAPK. Nesse trabalho, observou-se que o *T. gondii* inibiu os efeitos tóxicos do H_2O_2 nas células. Houve ainda uma diminuição da produção de ROS, além do aumento do parasitismo. Além disso, a infecção pelo *T.*

gondii inibiu a expressão de fatores pró-apoptóticos nas células ARPE-19, como a fosforilação da p38 MAPK (Choi *et al.*, 2011).

Outras isoformas da enzima NOX também estão relacionadas com a mediação de infecções parasitárias, além da NOX2, mais comumente estudada. Por exemplo, o papel de NOX4 na expressão do fator inibidor de migração (MIF) foi avaliado durante a infecção pelo *T. gondii* em macrófagos derivados de medula óssea. Os resultados mostraram que a produção de ROS induzida pela infecção do *T. gondii* aumentou a expressão de MIF e que camundongos nocautes para MIF infectados com *T. gondii* apresentaram aumento significativo na sobrevivência do parasito em macrófagos. Além disso, a ausência de NOX4, mas não a de NOX2 *in vitro*, resultou em maior carga parasitária e diminuição da expressão de MIF mediadas pela infecção pelo parasito. *In vivo*, camundongos deficientes em NOX4 tiveram maior susceptibilidade à infecção, aumento da carga parasitária (cistos) nos tecidos cerebrais e baixos níveis de expressão de MIF (Kim *et al.*, 2017).

Várias questões referentes ao papel de ROS na infecção pelo *T. gondii* permanecem inconclusivas. Alguns autores destacam que apesar de ROS ter importante papel de mediação do controle parasitário em modelos de cultura celular, esse mecanismo parece não ser essencial em infecções *in vivo*. Em camundongos infectados com cepa virulenta de *T. gondii*, o macrófago inflamatório serve como um importante reservatório para o parasito e na sua invasão, o parasito pode lidar com a produção de ROS pela célula, devido à presença de mecanismos antioxidantes eficientes (Wilson *et al.*, 1980; Orlofsky *et al.*, 1999; Brydges e Carruthers, 2003). A importância desse fenômeno no contexto fisiológico geral, assim como a ausência de ROS em células fagocíticas em infecções *in vivo* ainda não é bem compreendida.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a importância das ROS provenientes de células fagocíticas na infecção experimental por *T. gondii in vivo* durante a fase aguda da infecção utilizando camundongos nocautes na produção de superóxido pela NOX2 (PHOX KO).

2.2 Objetivos específicos

- Verificar se camundongos WT e PHOX KO apresentam diferenças em relação à letalidade quando infectados com diferentes inóculos de cistos de *T. gondii*;
- Determinar se a infecção com cistos de *T. gondii* leva a alterações de peso nos camundongos infectados;
- Determinar se há diferenças nos níveis de $\bullet\text{NO}$ e citocinas pró-inflamatórias no sangue das linhagens de camundongos infectados;
- Determinar se há diferenças na produção de citocinas pró-inflamatórias em órgãos linfoides periféricos das linhagens de camundongos infectados;
- Verificar se a infecção causa dano hepático nas linhagens de camundongos infectados;
- Avaliar a possível ocorrência de dano oxidativo no fígado e intestino dos camundongos infectados;
- Avaliar a possível atividade de enzimas antioxidantes no fígado e intestino dos camundongos infectados.

1.3. Hipótese

Pelo fato das ROS estarem envolvidas na inibição da replicação do parasito, nossa hipótese é que os camundongos PHOX KO serão mais permissivos à infecção por *T. gondii*, com altos níveis de parasitismo e elevada mortalidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Camundongos

Camundongos WT (C57BL/6 WT) fêmeas ou machos, entre 6 e 10 semanas de idade, foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brasil). Camundongos PHOX KO (Pollock *et al.*, 1995) foram adquiridos do “The Jackson Laboratory” (Glesnsville, NJ, EUA, C57BL/6.129S6-Cybb^{tm1Din}/J) e as colônias de criação foram mantidas em micro isoladores dotados de filtro e ventilação no biotério de criação do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, UFMG. Os camundongos foram mantidos em estantes ventiladas com barreiras, sem restrição de água e comida, tendo ciclos controlados de claro-escuro com intervalos de 12 horas. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 362 / 2018.

3.2. Cultivo e obtenção do parasito

Cistos da cepa Me49 de *T. gondii* foram isolados de cérebros de camundongos WT infectados durante 40 dias. Os cérebros foram removidos da cavidade e macerados com 1 mL de PBS (salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,3). O número de cistos foi determinado pela contagem, em duplicata, de 10 µL de cérebro macerado em microscópio ótico no aumento de 100x. A concentração de cistos foi determinada pela quantidade de cistos encontrados em 10 µL, ajustado para 1 mL de cada cérebro macerado.

3.3. Infecções

A infecção experimental foi realizada em camundongos WT e PHOX KO através do inóculo de 10 cistos por via intragástrica. Dois grupos de camundongos de cada linhagem (infectados e não infectados) foram pesados a cada três dias durante 15 dias. Após 7, 12 e 15 de infecção, os camundongos foram anestesiados com 100 µL de solução anestésica contendo cloridrato de ketamina (Vertbrands, Jacareí, SP, Brasil) a 15 mg/ml e cloridrato de xilazina (Vertbrands) a 5 mg/ml para a coleta de sangue. Em seguida, os

camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical para a coleta de baço, linfonodos mesentéricos, intestino delgado (duodeno) e fígado.

Para o ensaio de mortalidade, camundongos WT e PHOX KO foram infectados por via intragástrica com 10 cistos ou 20 cistos. Os grupos foram acompanhados durante 15 dias de infecção.

3.4. Obtenção e preparo das amostras

3.4.1. Obtenção do soro

Para a obtenção do soro, o sangue foi coletado através de punção cardíaca. Após duas horas de repouso para coagulação, as amostras foram centrifugadas (1.800 g por 10 minutos) e o soro coletado em novos tubos.

3.4.2. Cultura de esplenócitos e linfócitos

Baço e linfonodos mesentéricos foram coletados e macerados em RPMI contendo 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco BLR Life Technologies). Em seguida foram centrifugados (300 g, 4 °C por 10 minutos), as células contadas, ajustadas para a concentração de $2,5 \times 10^6$ células por poço e cultivadas em placas de 48 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), em um volume total de 500 mL. Após 24 ou 72 horas, os sobrenadantes foram coletados e congelados em freezer -80°C para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

3.4.3. Homogenato de fígado e intestino

Amostras de fígado e intestino (duodeno) coletadas dos grupos experimentais, foram pesadas (25 mg) e homogeneizadas em PBS a 4°C com auxílio de um homogeneizador (Euro Turraz T20b, IKA Labortechnik, Staufen, Alemanha) e mantidas no gelo. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado (10.500 g, 4 °C por 20 minutos). O sobrenadante foi utilizado para realização dos experimentos de estresse oxidativo. Todos os resultados foram corrigidos pelos valores de proteína total do homogenato, determinado pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

3.4.4. Histopatologia do fígado

Para a análise histopatológica, fragmentos do fígado dos grupos experimentais de camundongos WT e PHOX KO foram coletados, avaliados macroscopicamente e fixados em solução de formol 10% (v/v) por 24 horas. Em seguida, os órgãos foram submetidos ao processamento histológico sendo embebidos em parafina, cortados ortogonalmente ao eixo (cortes de 4 μ m) e corados com hematoxilina e eosina.

A arquitetura dos tecidos e as principais lesões que acometem o órgão foram avaliadas por dois patologistas separadamente. As avaliações histopatológicas foram realizadas de maneira semi quantitativa em microscopia óptica e o registro fotográfico realizado através da digitalização de imagens no microscópio óptico Olympus B \times 51 (Olympus, Shinjuku, Tóquio, Japão) equipado com câmera SNAP-Proof Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) através do software Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics).

3.5. Dosagem de citocinas

As dosagens de IFN- γ , TNF e IL-10 a partir do soro e dos sobrenadantes das culturas de esplenócitos e linfócitos foram feitas com a utilização de kits comerciais exclusivos para a detecção dessas citocinas e o procedimento executado de acordo com as recomendações do fabricante (BD Pharmingen, São Diego, CA, EUA). Os limites de detecção foram de 7,6 pg/mL para IFN- γ , 9,9 pg/mL para TNF e 16,5 pg/mL para IL-10.

3.6. Dosagem de Nitrito

A determinação de \bullet NO foi realizada pela reação de Griess (Ding *et al.*, 1988). Para a dosagem, foi feita previamente a redução do nitrato a nitrito pela ação da nitrato redutase, utilizando-se uma solução coquetel contendo 500 μ L sal de tetrazolium de NADPH a 5mg/mL (EMD Milipore Corp. Darmstadt, Alemanha), 500 μ L de KH₂PO₄ (0,5M pH 7,5), 950 μ L de H₂O miliQ e 50 μ L de nitrato redutase 10U/500 μ L (Sigma Aldrich). O padrão de nitrato contendo 50 μ L de NaNO₃ 1mM (p/v) (Sigma Aldrich) foi adicionado em placa de 96 poços nos poços correspondentes e feitas as sucessivas diluições na proporção de 1:2. Posteriormente, foram adicionados 25 μ L da amostra de soro e 25 μ L da solução coquetel. A placa contendo as amostras e o padrão foi incubada

por uma noite. Após a incubação, o padrão de nitrito contendo 50µL de NaNO₂ 1mM (p/v) (Sigma Aldrich) foi adicionado a poços vazios e foram feitas as sucessivas diluições também na proporção 1:2. Em seguida, foram adicionados em todos os poços 50 µl do reagente de Griess contendo 25 µL de solução de sulfanilamida 1% (p/v) (Sigma Aldrich) e 25 µL de solução de naftiletileno-diamina 1% (Sigma Aldrich) e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos no escuro. A leitura da placa foi realizada utilizando leitor de microplacas a 540nm (Microplate Spectrophotometer System, modelo SPECTRAMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) e o resultado expresso em concentração de nitrito.

3.7. Dosagem de ALT e AST

Os ensaios para as dosagens das enzimas hepáticas alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) foram realizados de acordo com as instruções do fabricante Bioclin (Bioclin/Quibasa transaminase ALT (TGP) e AST (TGO) Cinética, Belo Horizonte, MG, Brasil) adaptado para ensaios em placa de 96 poços (Kasvi). Foram adicionados previamente 20 µL do substrato da enzima nos poços que receberiam as amostras de soro e incubados por 3 minutos a 37°C. Após a incubação, 8 µL de amostra de soro foram adicionados e incubados por 30 minutos a 37°C. Durante o período, o padrão foi preparado seguindo exatamente os passos do kit, contendo a solução substrato em diferentes concentrações e água destilada. Logo após, foram adicionados em todos os poços, incluindo o padrão, 20 µL do reagente de cor e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. O volume de 200 µL de hidróxido de sódio 4N foi adicionado aos poços e a leitura da placa foi realizada após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente, utilizando leitor de microplacas a 540nm (Microplate Spectrophotometer System) e o resultado expresso em unidades por mililitro (U/mL) de cada enzima.

3.8. Avaliação do dano oxidativo e da atividade de enzimas antioxidantes

3.8.1. Avaliação da Peroxidação Lipídica por TBARS

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados (Buege e Aust, 1978). A mensuração dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico foi realizada em microplacas de 96 poços. O volume de 250µL do homogenato obtido das amostras de fígado e duodeno dos grupos infectados e não infectados foi colocados em tubos de ensaio de 2 mL, onde foram adicionados 500 µL de solução contendo ácido tricloroacético a 15% (p/v) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), ácido tiobarbitúrico 0,0375% (p/v) (Sigma Aldrich) e ácido clorídrico 0,25M (Labsynth). As amostras foram mantidas em banho maria fervente (95 °C) por 15 minutos e, em seguida, colocadas em um banho de gelo até esfriarem. Foram adicionados 750 µL de álcool butílico (Labsynth) aos tubos, que foram, então, vigorosamente agitados. O precipitado foi removido por centrifugação a 1500 g por 10 minutos em centrífuga de mesa (Fanem Excelsa Baby, mod. 205N, São Paulo, São Paulo, Brasil). Os sobrenadantes foram recolhidos, plaqueados e a absorbância determinada a 535 nm. Uma curva padrão foi construída com um análogo de malondialdeído (1,1,3,3-tetrametoxi propano; Sigma Aldrich) e a água destilada foi utilizada como branco. Todos os resultados foram corrigidos pelos valores de proteína total do homogenato, determinado pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) e expressos em nmol de MDA por grama de proteína.

3.8.2. Espécies Reativas de Oxigênio

O teor de radicais livres no homogenato de fígado e duodeno dos grupos infectados e não infectados foi determinado através da sonda fluorescente H₂DCFDA (2,7-diclorofluorescina de diacetato; Sigma Aldrich) com base no método de Driver (Driver *et al.*, 2000) com algumas modificações. Foram pipetados 20 µL de homogenato em cada poço de uma placa de 96 poços e deixados aquecer até a temperatura ambiente durante 5 minutos. Nesse momento, 80 µL de PBS contendo H₂DCFDA (na concentração final de 10 µM) foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada a 37°C durante 30 min. A conversão de H₂DCF-DA em DCF do produto fluorescente foi medida utilizando

um fluorímetro de leitor de placas múltiplas com excitação e emissão a 485/530 nm (Synergy 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EUA). O teor de radicais livres foi quantificado usando uma curva padrão de DCF e os resultados foram expressos como pmol de DCF formado por miligrama de proteína por minuto. Todos os procedimentos foram realizados no escuro e os brancos contendo apenas H₂DCFDA (sem homogenato) foram processados para a medição da autofluorescência. Os resultados foram corrigidos pelos valores de proteína total do homogenato, determinado pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

3.8.3. Atividade da enzima catalase

A atividade da catalase foi mensurada de acordo com o método espectrofotométrico adaptado e descrito por Aebi (Aebi, 1984) com pequenas modificações. Foram misturados 20 µL de homogenato das amostras de fígado e duodeno previamente preparados com 980 µL de peróxido de hidrogênio a 0,030% (v/v) (Sigma Aldrich) em uma cubeta de quartzo e medida a absorbância em 240 nm a cada 15 segundos durante 1 minuto, utilizando o espectrofotômetro Shimadzu UV-160, Quioto, Japão. A mudança na absorbância por minuto (ΔA_{240}) foi calculada e a taxa de reação foi determinada usando um coeficiente de extinção de H₂O₂ de 43,6 M⁻¹ cm⁻¹. Todos os resultados foram corrigidos pelos valores de proteína total do homogenato, determinado pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). A atividade específica é expressa como unidades por miligrama de proteína (uma unidade é definida como 1 pmol de H₂O₂ consumido por minuto).

3.8.4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada com base na inibição da auto oxidação do pirogalol (1,2,3- trihidroxibenzeno). (Dieterich *et al.*, 2000). O pirogalol sofre auto oxidação rápida em soluções alcalinas, que pode ser inibida pela ação da enzima SOD em presença do radical superóxido. Trinta microlitros de homogenato das amostras de fígado e duodeno foram adicionados a placa de 96 poços. Acrescentou-se 99 µL de PBS, 6 µL de MTT 1,25 mM (brometo de dimetiltiazol-

difeniltetrazolium; Sigma Aldrich) e 15 μ L de pirogalol 15 mM (Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha). Para os poços contendo o branco, foram adicionados 6 μ L de MTT e 114 μ L de PBS. O pirogalol não foi adicionado nos poços contendo o branco. Após 5 minutos de incubação a 37°C, a reação foi interrompida com 150 μ L de dimetil sulfóxido (Labsynth) e a absorbância foi lida em 570 nm em leitor de microplacas (Synergy 2). Para o cálculo do resultado foi considerado que uma unidade de SOD é capaz de evitar a oxidação de 50% de pirogalol. Todos os resultados foram corrigidos pelos valores de proteína total do homogenato, determinado pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), e os resultados foram expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína.

3.9. Análise Estatística

Os experimentos de infecção *in vivo* foram analisados pelo teste one-way ANOVA, ou avaliados pelo two-way ANOVA com o teste de comparação múltipla de Tukey, para comparação individual entre os grupos. Diferenças entre dois grupos foram comparadas por teste *t* de Student para amostras não pareadas. Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Camundongos WT e PHOX KO infectados por *T. gondii* apresentaram níveis similares de mortalidade

Para determinar o inóculo ideal para as infecções experimentais utilizamos a cepa Me49, cepa do tipo II com características de baixa virulência. Foram utilizados inóculos de 10 cistos e 20 cistos por via intragástrica, que mimetiza a rota natural de infecção do pelo parasito. Os camundongos foram observados durante 15 dias após a infecção.

Camundongos WT e PHOX KO apresentaram 50% de mortalidade por volta do décimo dia de infecção com o inóculo de 20 cistos. Já com o inóculo de 10 cistos, nenhum camundongo sucumbiu à infecção (**Figura 6**). Como pretendíamos avaliar a resposta do hospedeiro à infecção nos estágios iniciais (15 dias) decidimos utilizar o inóculo de 10 cistos injetados por via intragástrica para os demais experimentos, uma vez que este inóculo não induziu mortalidade nos camundongos infectados com *T. gondii*.

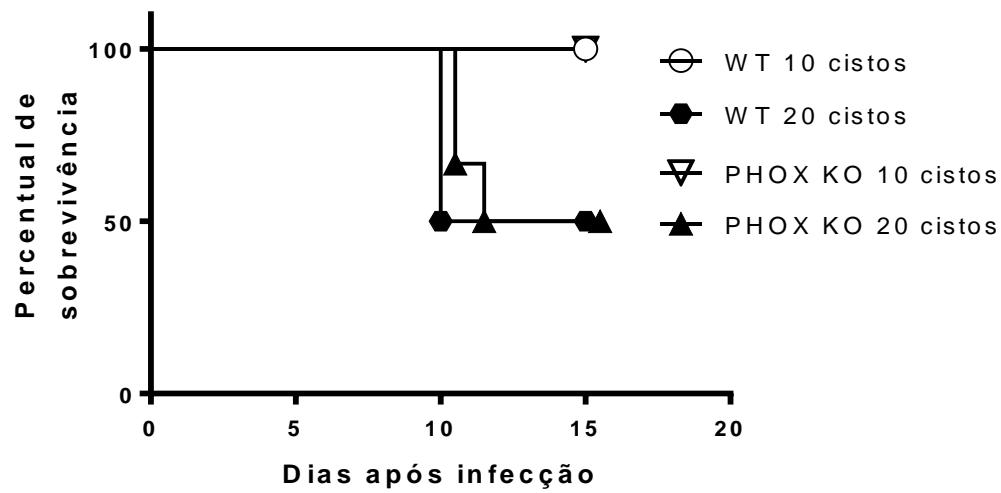


Figura 6: Camundongos WT e PHOX KO infectados por *T. gondii* apresentaram níveis similares de mortalidade. Camundongos foram infectados com 10 cistos (n=6) e 20 cistos (n=6) de *T. gondii* Me49 por via intragástrica e acompanhados durante 15 dias. O experimento foi realizado três vezes com resultados similares.

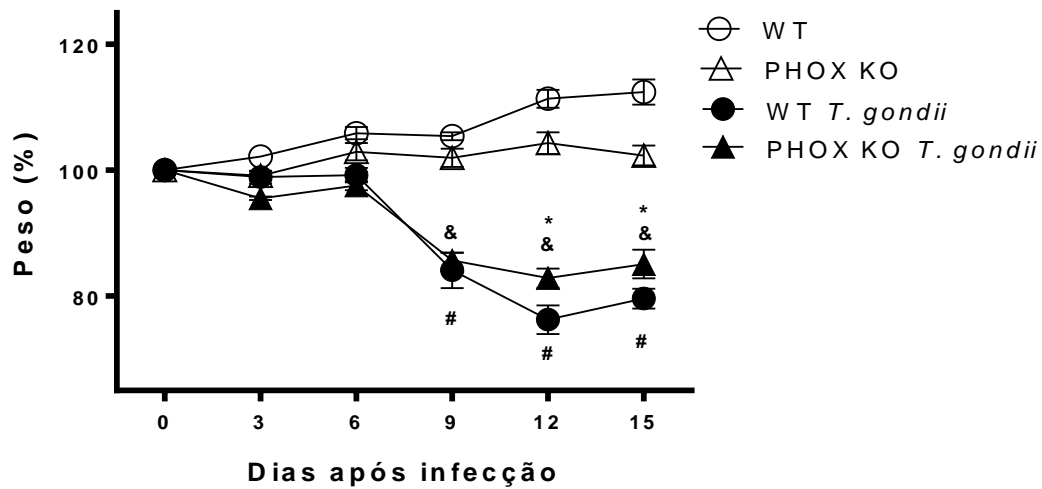
4.2. Camundongos PHOX KO infectados pelo *T. gondii* apresentaram menor perda de peso e carga parasitária similar aos WT

Para avaliar o perfil de infecção e a progressão da doença nos camundongos WT e PHOX KO, foram realizadas infecções por via intragástrica com 10 cistos de *T. gondii* da cepa Me49. Os camundongos foram acompanhados durante 15 dias e tiveram seu peso e sua carga parasitária cerebral avaliados.

Observamos que, após o sexto dia de infecção, os grupos infectados de camundongos WT e PHOX KO apresentaram acentuada perda de peso, chegando ao nono dia de infecção com perda média de 16% do peso inicial (tempo 0). No décimo segundo dia, os camundongos WT continuaram a perder peso, com redução de aproximadamente 24% do peso corporal em relação ao tempo 0. Os camundongos PHOX KO, por sua vez, perderam apenas 18% do peso inicial nesse mesmo período. No décimo quinto dia, os grupos infectados apresentaram tendência de melhora, ganhando cerca de 3% de peso em comparação ao décimo segundo dia de infecção (**Figura 7A**).

Avaliamos em seguida a carga parasitária no cérebro de camundongos WT e PHOX KO infectados nos períodos de 7, 12 e 15 dias. Nosso resultado mostrou que houve um crescente aumento no número de cistos no período de 12 a 15 dias, mas não houve diferença entre os grupos infectados (**Figura 7B**).

A



B

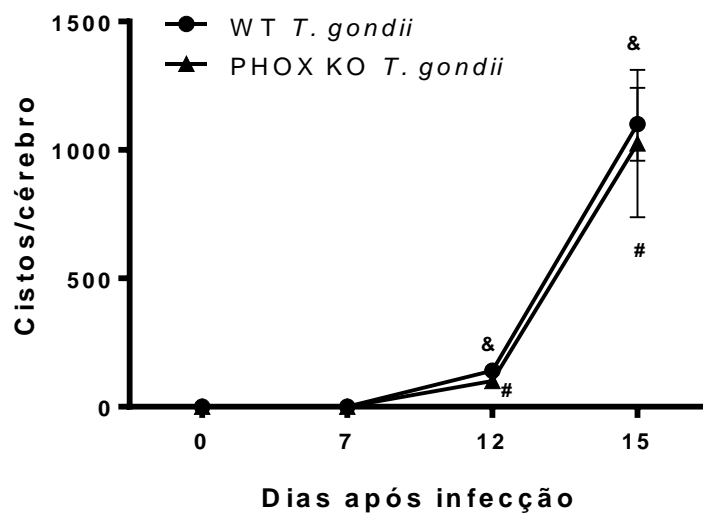


Figura 7: Camundongos PHOX KO infectados pelo *T. gondii* apresentaram menor perda de peso e carga parasitária similar aos WT. Camundongos WT (n=5) e PHOX KO (n=5) foram infectados com 10 cistos de *T. gondii* Me49 por via intragástrica, acompanhados e pesados a cada três dias. A carga parasitária de cistos no cérebro foi quantificada nos dias 7, 12 e 15. **A.** Peso dos camundongos infectados com 10 cistos do parasito. **B.** Carga parasitária de cistos por cérebro macerado nos dias 7, 12 e 15 de infecção. As diferenças estatísticas entre os camundongos WT e PHOX KO estão representadas pelo símbolo * se $p < 0,05$. Os símbolos & e # representam diferenças estatísticas em relação aos não infectados (tempo 0) nos camundongos WT e PHOX KO, respectivamente. O experimento foi realizado três vezes com resultados similares.

4.3. Camundongos PHOX KO apresentaram menores níveis de citocinas pró-inflamatórias e nitrito na circulação sanguínea

Tendo em vista as diferenças observadas em relação à perda de peso dos grupos de camundongos diante da infecção, decidimos avaliar a resposta inflamatória apresentada por eles. Para isso, a produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na resposta à infecção pelo *T. gondii* foi avaliada. Os camundongos WT e PHOX KO foram infectados com 10 cistos de *T. gondii* Me49 e após 7, 12 e 15 dias de infecção coletamos o soro e dosamos IFN- γ , TNF e nitrito dos grupos infectados e não infectados.

Nossos resultados mostraram que, após 7 dias de infecção, tanto os camundongos WT quanto os PHOX KO apresentaram níveis elevados de IFN- γ no soro em relação aos grupos não infectados (tempo 0). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos infectados nesse tempo. Após 12 dias de infecção, os níveis de IFN- γ diminuíram em relação aos valores observados aos 7 dias, mas ainda assim não foram observadas diferenças significativas entre os grupos infectados. Após 15 dias de infecção, os níveis de IFN- γ continuaram a cair em ambos os grupos, sendo que os camundongos PHOX KO apresentaram menor quantidade dessa citocina no soro em relação aos camundongos WT (**Figura 8A**). Observamos elevada produção de TNF nos grupos infectados em todos os tempos de infecção, sendo mais acentuada nos camundongos WT do que nos camundongos PHOX KO com 7 dias de infecção (**Figura 8B**). Os camundongos WT apresentaram altos níveis de nitrito em todos os tempos de infecção em comparação aos não infectados. Já nos camundongos PHOX KO observamos aumento dos níveis de nitrito com 7 e 12 dias em comparação ao grupo não infectado, mas menores níveis de nitrito aos 12 e 15 dias de infecção, quando comparados com os camundongos WT (**Figura 8C**).

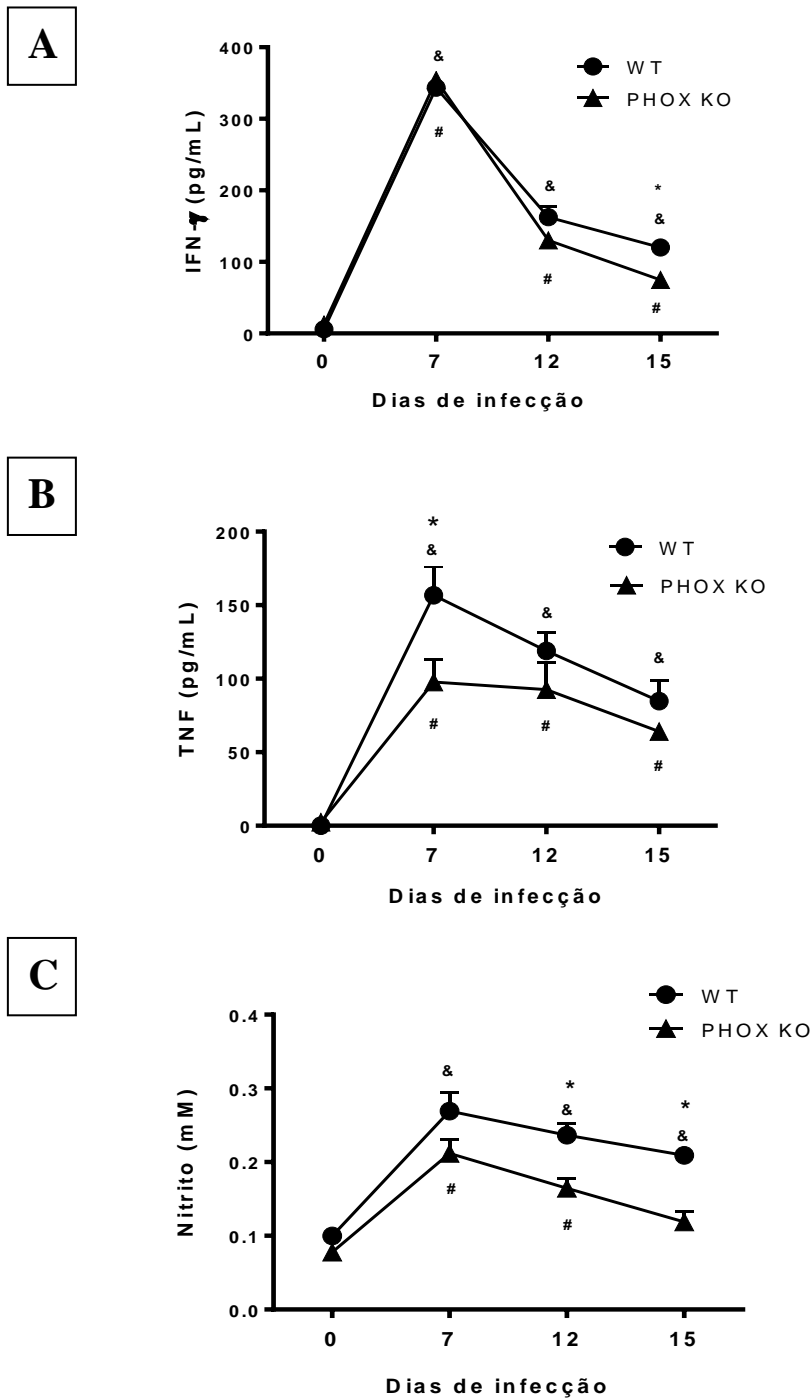


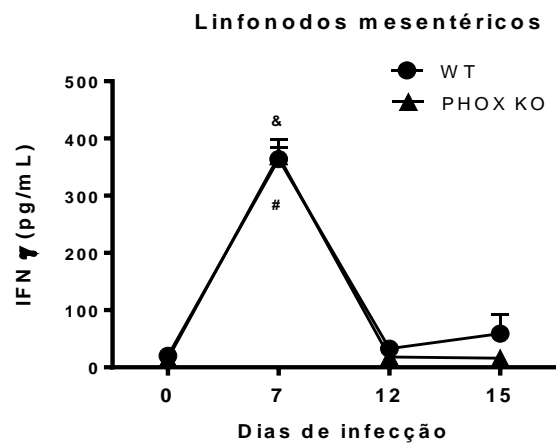
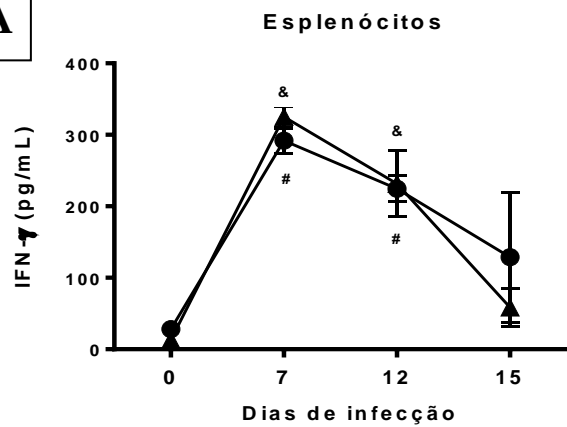
Figura 8: Camundongos PHOX KO apresentaram menores níveis de citocinas pró-inflamatórias e nitrito na circulação sanguínea. O sangue de camundongos WT (n=5) e PHOX KO (n=5) infectados e não infectados (tempo 0) com 10 cistos de *T. gondii* Me49 durante 7, 12 e 15 dias de infecção foi coletado, centrifugado e o soro obtido para as dosagens dos níveis de citocinas e de nitrito. IFN- γ e TNF foram dosados através do método de ELISA e o nitrito foi dosado pelo método de Griess. **A.** Níveis de IFN- γ no soro. **B.** Níveis de TNF no soro. **C.** Níveis de nitrito e nitrato no soro. As diferenças estatísticas entre os camundongos WT e PHOX KO estão representadas pelo símbolo * se $p < 0,05$. Os símbolos & e # representam diferenças estatísticas em relação aos não infectados (tempo 0) nos camundongos WT e PHOX KO, respectivamente. O experimento foi realizado três vezes com resultados similares.

4.4. Camundongos PHOX KO apresentaram maiores níveis de TNF e IL-10 em órgãos linfoides periféricos

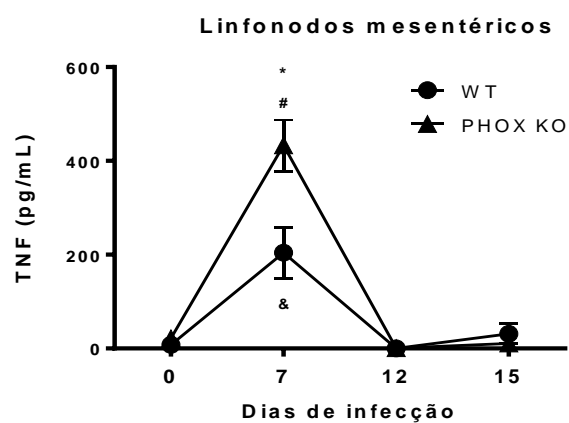
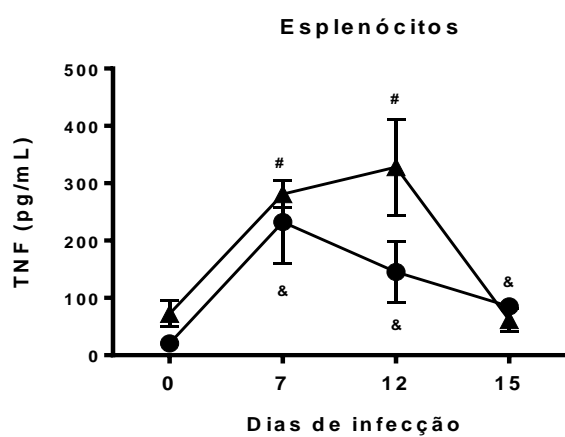
Para melhor avaliarmos a resposta inflamatória dos camundongos na infecção, avaliamos a produção de citocinas nos órgãos linfoides periféricos envolvidos na resposta contra o *T. gondii*. Para isso dosamos, nos sobrenadantes das culturas celulares de esplenócitos e de células dos linfonodos mesentéricos, as citocinas IFN- γ , TNF e IL-10 após 7, 12 e 15 dias de infecção.

Observamos elevados níveis de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos com 7 e 12 dias de infecção nos grupos infectados de WT e PHOX KO, que diminuem no tempo de 15 dias de infecção, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas significativas entre si. Na cultura de linfonodos mesentéricos, encontramos níveis elevados dessa citocina em ambos os grupos após 7 dias de infecção. Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos infectados (**Figura 9A**). Foram encontrados níveis elevados de TNF na cultura de esplenócitos em todos os tempos de infecção nos camundongos WT e com 7 e 12 dias de infecção nos camundongos PHOX KO, mas sem diferenças estatísticas entre os grupos infectados. Na cultura de linfonodos mesentéricos, observamos elevada produção de TNF nos grupos infectados com 7 dias de infecção, com maiores níveis observados nos camundongos PHOX KO (**Figura 9B**). Os camundongos WT apresentaram níveis elevados de IL-10 na cultura de esplenócitos no tempo de 7 dias de infecção, diferente dos camundongos PHOX KO que apresentaram níveis elevados da citocina em todos os tempos de infecção. Na cultura de linfonodos mesentéricos, assim como na de esplenócitos, foi observado maior produção de IL-10 nos camundongos PHOX KO com 7 dias de infecção em comparação com os camundongos WT. Não observamos diferenças entre os grupos infectados nos tempos de 12 e 15 dias (**Figura 9C**).

A



B



C

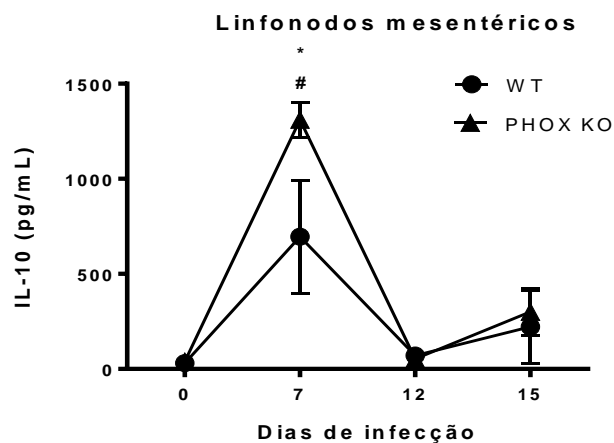
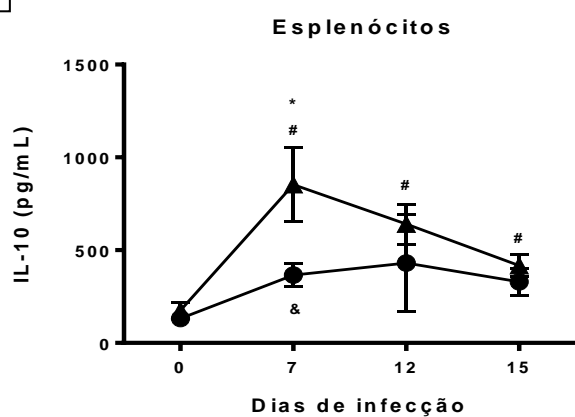


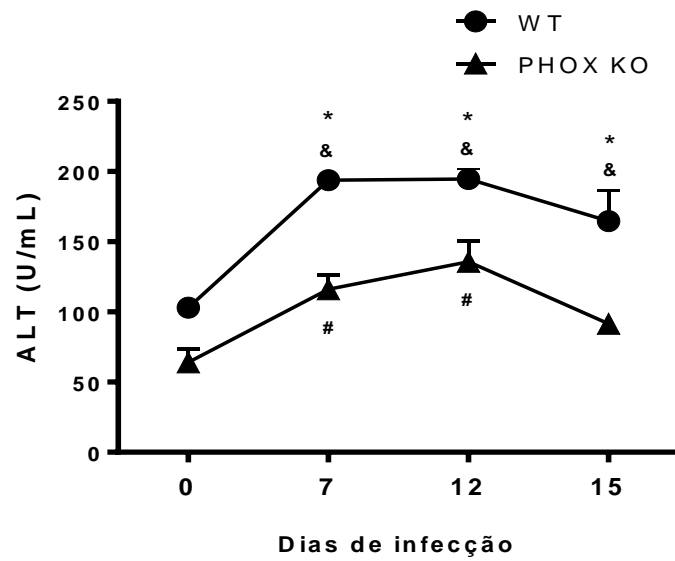
Figura 9: Camundongos PHOX KO apresentaram maiores níveis de TNF e IL-10 em órgãos linfoides periféricos. Foram extraídos dos camundongos infectados (n=5) e não infectados (n=5) (tempo 0) o baço e linfonodo mesentérico após 7,12 e 15 dias de infecção. Os órgãos foram macerados e as células cultivadas por 24 (para dosagem de TNF) e 72 horas (para dosagem de IFN- γ e IL-10). Os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem de citocinas pelo método de ELISA. **A.** Níveis de IFN- γ nas culturas de esplenócitos e linfonodos mesentéricos. **B.** Níveis de TNF nas culturas de esplenócitos e linfonodos mesentéricos. **C.** Níveis de IL-10 nas culturas de esplenócitos e linfonodos mesentéricos. As diferenças estatísticas entre os camundongos WT e PHOX KO estão representadas pelo símbolo * se $p < 0,05$. Os símbolos & e # representam diferenças estatísticas em relação aos não infectados (tempo 0) nos camundongos WT e PHOX KO, respectivamente. O experimento foi realizado três vezes com resultados similares.

4.5. Camundongos PHOX KO apresentaram menor dano celular hepático em relação aos camundongos WT

Ao atingir o fígado, o *T. gondii* pode se proliferar e romper células hepáticas causando extravasamento do conteúdo celular para a circulação sanguínea. Algumas enzimas, como a alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) são utilizadas como indicadores de dano celular hepático, já que são comumente presentes no fígado.

Para avaliar o dano celular hepático ocasionado pela infecção por *T. gondii*, dosamos os níveis de ALT e AST no soro dos camundongos WT e PHOX KO infectados ou não. Nossos resultados mostram maiores níveis de ALT nos camundongos WT com 7, 12 e 15 dias de infecção em relação aos camundongos PHOX KO. Nos camundongos PHOX KO, observamos aumento dos níveis dessa enzima com 7 e 12 dias de infecção, mas com níveis menores quando comparado aos camundongos WT. Após 15 dias de infecção, os níveis encontrados foram similares aos de camundongos não infectados (tempo 0) (**Figura 10A**). Em relação aos níveis de AST, observamos altos níveis em todos os tempos de infecção nos camundongos WT. Já nos camundongos PHOX KO não observamos aumento dos níveis com 7 e 15 dias de infecção, mas apenas com 12 dias de infecção em relação ao tempo 0 (**Figura 10B**).

A



B

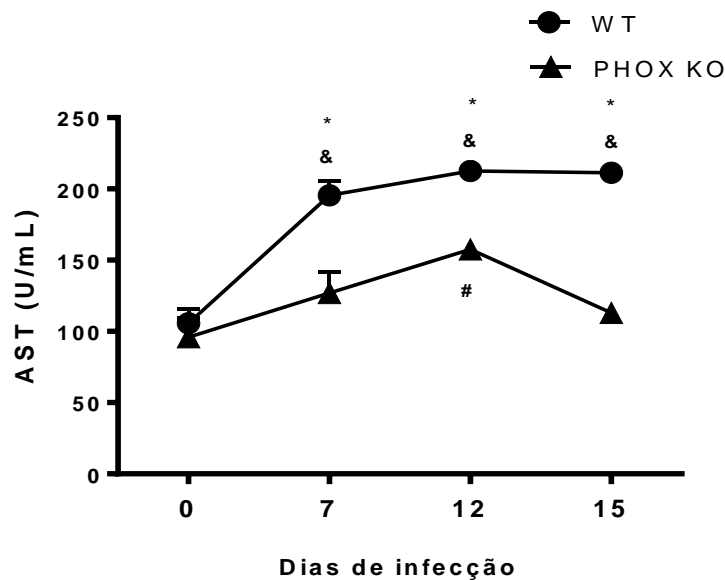


Figura 10: Camundongos PHOX KO apresentaram menor dano celular hepático em relação aos camundongos WT. O sangue de camundongos WT (n=5) e PHOX KO (n=5) infectados ou não com 10 cistos de *T. gondii* Me49 durante 7, 12 e 15 dias de infecção foram coletados, centrifugados e o soro obtido para as dosagens das enzimas relacionadas ao dano hepático, alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST). **A.** Níveis de ALT. **B.** Níveis de AST. As diferenças estatísticas estão representadas pelo símbolo * se $p < 0,05$. Os símbolos & e # representam diferenças estatísticas em relação aos não infectados (tempo 0) nos camundongos WT e PHOX KO, respectivamente. O experimento foi realizado três vezes com resultados similares.

4.6. Camundongos PHOX KO infectados apresentaram quadro histológico hepático similar ao de camundongos não infectados a partir do décimo quinto dia de infecção

Diante dos altos níveis de ALT e AST encontrados na circulação sanguínea de camundongos WT e menores níveis em camundongos PHOX KO em todos os tempos de infecção avaliados, avaliamos a condição histopatológica do fígado desses camundongos durante à infecção pelo *T. gondii*.

Os camundongos WT e PHOX KO não infectados apresentaram quadro histológico hepático compatível com a normalidade, sem diferenças entre os grupos (**Figura 11A**). Aos 7 dias de infecção, foi observada em camundongos WT a presença de infiltrado inflamatório com o predomínio de células mononucleares (marcado com asterisco na figura) e pequenos focos de necrose (seta preta). Já nos camundongos PHOX KO observou-se apenas a presença de infiltrado celular sem a presença de focos de necrose (**Figura 11B**). Com 12 dias de infecção, tanto os camundongos WT quanto PHOX KO apresentaram infiltrado celular e pequenos focos de necrose (**Figura 11C**). No tempo de 15 dias de infecção os camundongos WT não apresentaram focos de necrose, mas tiveram maior predominância do infiltrado inflamatório observado nos tempos de infecção anteriores. Os camundongos PHOX KO, nesse mesmo tempo de infecção, não apresentaram infiltrado inflamatório ou focos de necrose (**Figura 11D**).

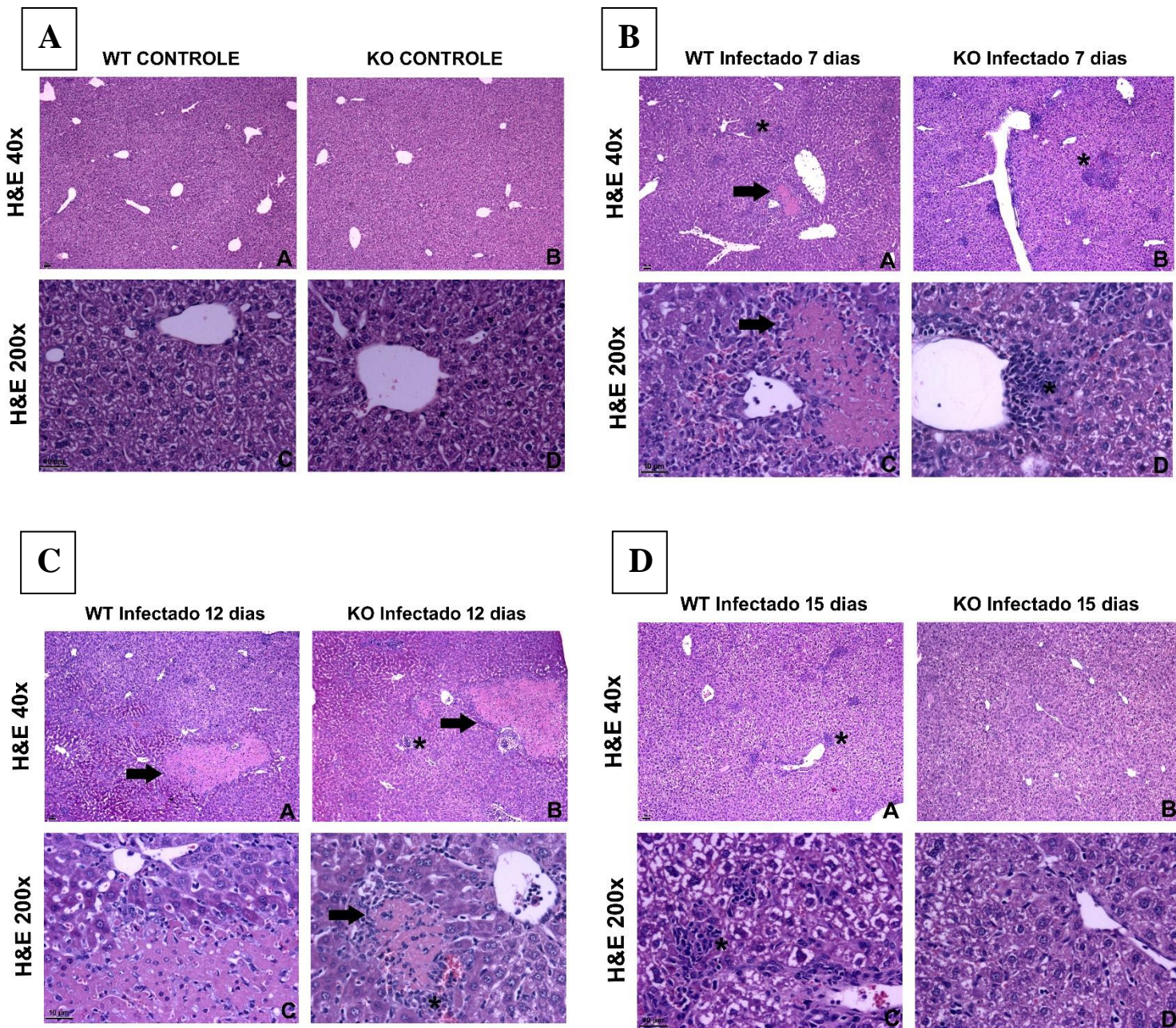


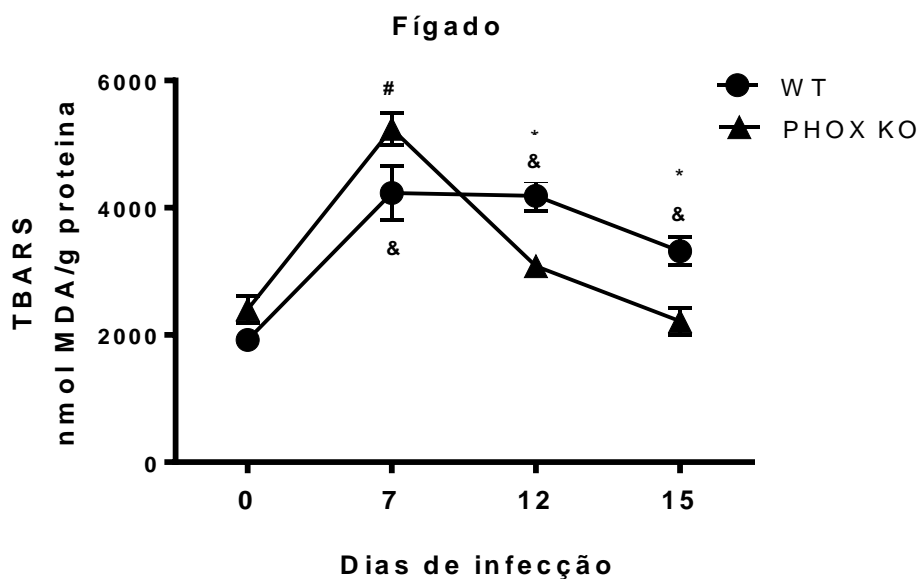
Figura 11: Camundongos PHOX KO infectados apresentaram quadro histológico hepático similar ao de camundongos não infectados a partir do décimo quinto dia de infecção. Fragmentos do fígado de camundongos WT e PHOX KO infectados ou não com 10 cistos de *T. gondii* Me49 foram coletados após eutanásia, fixados em formol tamponado 10% por 24 horas e processados para inclusão em parafina. Os cortes histológicos de aproximadamente quatro micrômetros foram corados com hematoxilina e eosina para análise histopatológica. **A.** Grupos não infectados. **B.** Grupos infectados por 7 dias. **C.** Grupos infectados por 12 dias. **D.** Grupos infectados por 15 dias. Infiltrados inflamatórios estão marcados com asterisco e regiões de necrose com seta preta. Barra=10 μ m.

4.7. Camundongos PHOX KO apresentaram menor dano oxidativo no fígado quando comparados aos camundongos WT

Avaliamos os efeitos da infecção do *T. gondii* em tecidos que fazem parte da sua rota de disseminação. Para isso, dosamos a presença de malondialdeído (MDA) nos homogenatos dos fígados e duodenos. O MDA é um produto da oxidação de lipídeos de membrana que é usado como indicador de dano oxidativo, através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Nossos resultados mostraram que, em relação aos grupos não infectados (tempo 0), camundongos WT apresentaram elevados níveis de MDA no fígado em todos os tempos analisados, diferentemente dos camundongos PHOX KO, que apresentaram níveis elevados somente no sétimo dia de infecção. Os grupos infectados apresentaram diferenças estatísticas significativas apenas com 12 e 15 dias de infecção (**Figura 12A**). Quando avaliamos os níveis de MDA no duodeno, não observamos diferenças em nenhum dos tempos de infecção avaliados (**Figura 12B**).

A



B

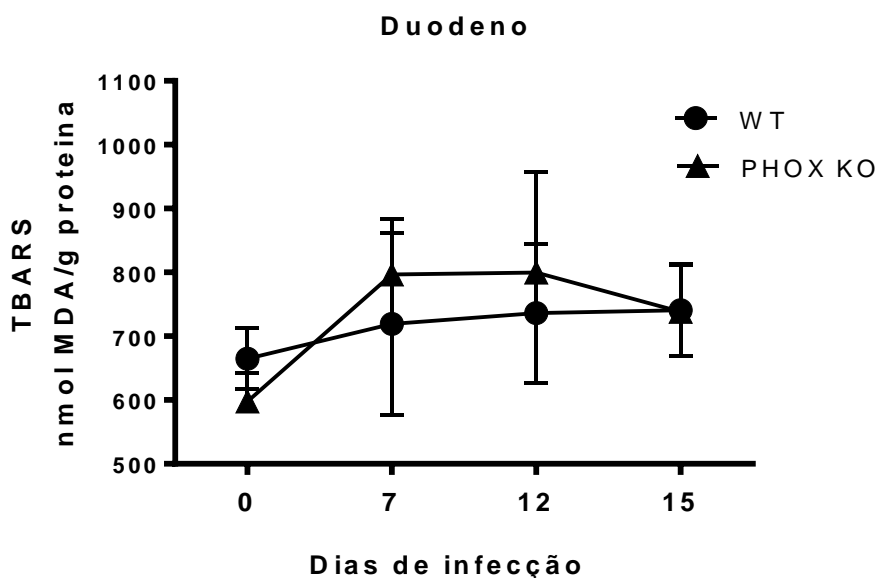


Figura 12: Camundongos PHOX KO apresentaram menor dano oxidativo no fígado quando comparados aos camundongos WT. Fígado e intestino delgado (duodeno) de camundongos WT (n=5) e PHOX KO (n=5) infectados ou não com 10 cistos de *T. gondii* Me49 foram extraídos e homogeneizados. A porção sobrenadante foi coletada para a dosagem de malondialdeído (MDA) através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). **A.** Níveis de MDA no fígado após 7, 12 e 15 dias de infecção. **B.** Níveis de MDA no duodeno após 7, 12 e 15 dias de infecção. Os valores foram corrigidos pela quantidade de proteína total de cada amostra dosada pelo método de Lowry. As diferenças estatísticas entre os camundongos WT e PHOX KO estão representadas pelo símbolo * se $p < 0,05$. Os símbolos & e # representam diferenças estatísticas em relação aos não infectados (tempo 0) nos camundongos WT e PHOX KO, respectivamente. O experimento foi realizado três vezes com resultados similares.

4.8. Camundongos infectados e não infectados apresentaram níveis similares de ROS nos tecidos

Na **Figura 12** mostramos que camundongos WT apresentaram altos níveis de MDA no fígado e não observamos diferenças deste marcador no duodeno. Assim, procuramos avaliar se a produção de ROS em resposta a infecção pelo *T. gondii* estaria diretamente relacionada aos altos níveis de dano oxidativo no fígado. Para isso utilizamos a sonda DCFH₂-DA e quantificamos as ROS produzidas através do homogenato de fígado e duodeno após 7, 12 e 15 dias de infecção pelo *T. gondii*.

Observamos que, tanto no fígado quanto no duodeno dos camundongos WT e PHOX KO, não houve detecção de aumento significativo na produção de ROS pela sonda utilizada (**Figura 13A e 13B**).

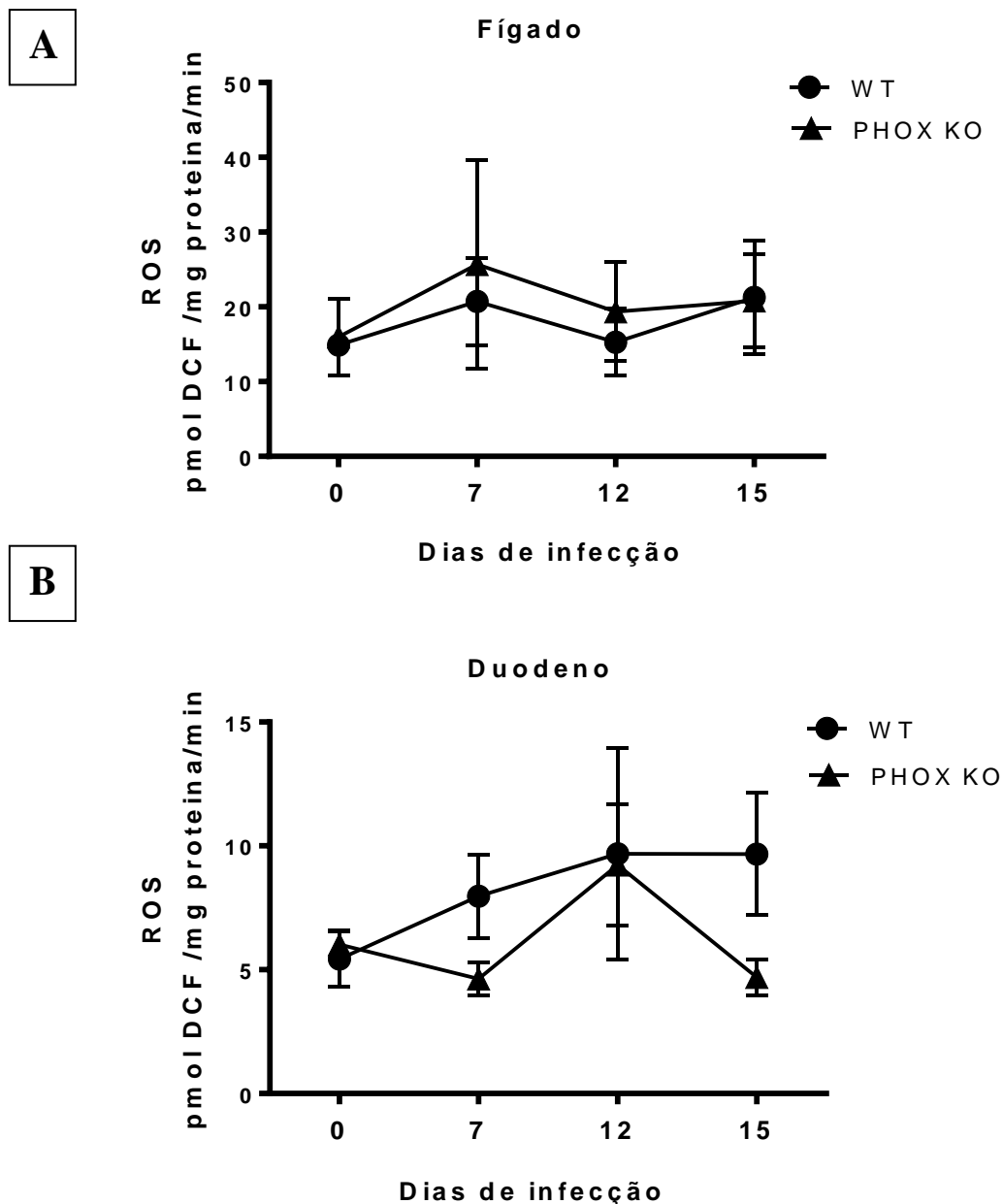


Figura 13: Camundongos infectados e não infectados apresentaram níveis similares de ROS nos tecidos. Fígado e duodeno de camundongos WT (n=5) e PHOX KO (n=5) infectados ou não com 10 cistos de *T. gondii* Me49 foram extraídos e homogeneizados. A porção sobrenadante foi coletada para a dosagem de ROS através da sonda H₂DCFDA. **A.** Níveis de ROS no fígado com 7, 12 e 15 dias de infecção. **B.** Níveis de ROS no duodeno com 7, 12 e 15 dias de infecção. Os valores foram corrigidos pela quantidade de proteína total de cada amostra através do método de Lowry. O experimento foi realizado três vezes com resultados similares.

4.9. Camundongos infectados apresentaram níveis similares na atividade de enzimas antioxidantes

Na **Figura 13** não observamos aumento de ROS nem no fígado nem no duodeno, apesar de observarmos dano oxidativo nesses tecidos na infecção pelo *T. gondii* (**Figura 12**). Avaliamos a atividade das enzimas antioxidantes nos tecidos e se essa atividade estaria relacionada com os baixos níveis de ROS encontrados nos tecidos analisados. Medimos a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase utilizando homogenato de fígado e duodeno de camundongos WT e PHOX KO infectados ou não com *T. gondii* durante 7, 12 e 15 dias.

Ao medir a atividade da enzima SOD no homogenato de fígado e duodeno após 7, 12 e 15 dias de infecção, não observamos aumento nos níveis de SOD no fígado nos grupos infectados durante os tempos de infecção. (**Figura 14A**). No duodeno, observamos um aumento da atividade da enzima SOD nos camundongos WT no tempo de 7 dias de infecção e nos camundongos PHOX KO no tempo de 7 e 12 dias de infecção, todos em relação ao tempo 0 (**Figura 14B**).

Na medição da presença da atividade da enzima catalase no homogenato de fígado e duodeno após 7, 12 e 15 dias de infecção, observamos níveis basais entre os grupos não infectados e diferenças entre os grupos infectados no tempo de 15 dias de infecção. Nos camundongos WT, foi observado diminuição da atividade da enzima quando comparada aos não infectados do mesmo grupo nos tempos de 7 e 12 dias de infecção. Nos camundongos PHOX KO não foram observadas diferenças na atividade da enzima durante os tempos de infecção em relação aos não infectados. (**Figura 14C**). No duodeno, observamos diferença nos níveis basais entre os grupos não infectados. Nos camundongos WT, observamos um aumento na atividade da enzima no tempo de 15 dias de infecção e uma diminuição dos níveis na atividade da enzima nos camundongos PHOX KO no tempo de 12 dias de infecção. (**Figura 14D**).

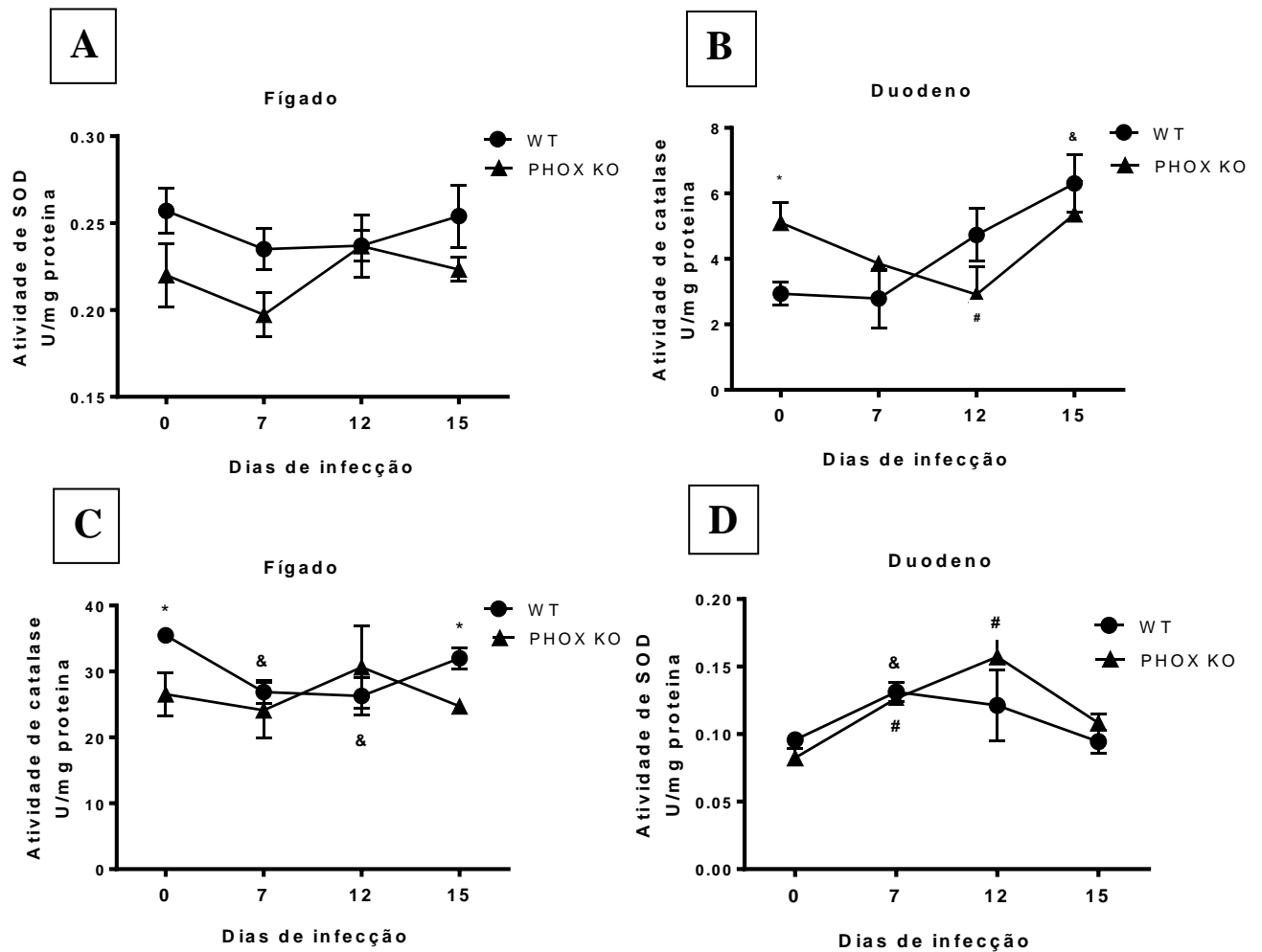


Figura 14: Camundongos infectados apresentaram níveis similares na atividade de enzimas antioxidantes. Fígado e duodeno de camundongos WT (n=5) e PHOX KO (n=5) infectados ou não com 10 cistos de *T. gondii* Me49 foram extraídos e homogeneizados. A porção sobrenadante foi coletada para dosagem da atividade das enzimas SOD e catalase. **A.** Níveis de atividade de SOD no fígado com 7, 12 e 15 dias de infecção. **B.** Níveis de atividade de SOD no duodeno com 7, 12 e 15 dias de infecção. **C.** Níveis de atividade de catalase no fígado com 7, 12 e 15 dias de infecção. **D.** Níveis de atividade de catalase no duodeno com 7, 12 e 15 dias de infecção. Os valores foram corrigidos pela quantidade de proteína total de cada amostra através do método de Lowry. As diferenças estatísticas entre camundongos WT e PHOX KO estão representadas pelo símbolo * se $p < 0,05$. Os símbolos & e # representam diferenças estatísticas em relação aos não infectados (tempo 0) nos camundongos WT e PHOX KO, respectivamente. O experimento foi realizado três vezes com resultados similares.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos a importância das ROS durante a infecção por *T. gondii*. Mostramos que a mortalidade de camundongos WT e PHOX KO é semelhante quando os camundongos são infectados com 20 cistos. Também mostramos que o número de cistos no cérebro de camundongos WT e PHOX KO infectados com 10 cistos é semelhante durante 12 e 15 dias de infecção. Esse dado pode indicar semelhanças na invasão e replicação do parasito nas duas linhagens de camundongos analisadas, além de nos permitir especular que as ROS não exercem papel na resistência contra o parasito. Entretanto, a perda de peso observada pode indicar que a doença nesta fase inicial é menos grave nos camundongos PHOX KO. Isso nos sugeriu que o quadro inflamatório poderia diferir nas duas linhagens de camundongos. Para elucidar essa questão, nós utilizamos três abordagens: investigamos o perfil de citocinas produzidas em resposta à infecção, avaliamos a presença de danos hepáticos uma vez que podem ser indicativos da gravidade da infecção e procuramos sinais de estresse oxidativo, uma vez que esperávamos que esses fossem menores nos camundongos PHOX KO. A seguir, discutiremos cada um dos dados obtidos relacionando-os à literatura da área.

Para a realização dos experimentos, utilizamos a cepa Me49 de *T. gondii*, considerada de baixa virulência e com grande capacidade de encistamento na musculatura esquelética e cardíaca, na retina e no cérebro (Jacobs *et al.*, 1960; Israelski *et al.*, 1989). Como modelo experimental, utilizamos camundongos WT que são susceptíveis à infecção pelo parasito por via oral (Johnson, 1984; Subauste, 2012) e camundongos PHOX KO, que não produzem superóxido via NOX2. Essas duas características do parasito nos permitiram avaliar o curso da infecção aguda sem mortalidade e o efeito clínico dessa infecção. Além disso, a capacidade de encistamento no cérebro permitiu que quantificássemos os parasitos que invadiram e chegaram até esse órgão.

Dois inóculos diferentes foram avaliados (10 e 20 cistos) por via intragástrica para determinar o melhor inóculo para o acompanhamento da fase aguda da infecção. O inóculo de 20 cistos provocou mortalidade de 50% dos camundongos de ambos os grupos. O inóculo de 10 cistos, por sua vez, possibilitou a sobrevivência dos camundongos em até 15 dias, permitindo o estudo da fase aguda da doença no nosso modelo (Figura 6).

Vários trabalhos utilizaram a cepa Me49 administrada por via oral em camundongos. As taxas de mortalidade observadas variaram bastante, de acordo com os dados da literatura. Bonfa *et al.* utilizaram inóculos de 5 cistos da cepa Me49 e observaram uma taxa de 30% de mortalidade nos camundongos WT durante 30 dias de infecção (Bonfa *et al.*, 2014). Gigley *et al.* observaram que camundongos WT infectados com 10 cistos da cepa Me49 não apresentaram mortalidade durante 32 dias de infecção (Gigley *et al.*, 2009). Kang *et al.* mostraram que a infecção de camundongos WT com 10 cistos da cepa Me49 provocou mortalidade de todos os camundongos após 85 dias de infecção (Kang *et al.*, 2000). Alexander *et al.* observaram que a infecção com 20 cistos da cepa Me49 provocou mortalidade de cerca de 20% dos camundongos WT durante 28 dias de infecção (Alexander *et al.*, 1998). Por sua vez, o trabalho de Furuta *et al.* mostrou que camundongos WT infectados com 20 cistos da cepa Me49 não sucumbiram à infecção durante todo o período experimental, que foi de 45 dias. Já a infecção com 200 cistos, provocou a mortalidade de 100% dos camundongos após 10 dias de infecção (Furuta *et al.*, 2006). Em outro trabalho, Cavalcanti *et al.* mostraram que camundongos WT infectados com 20 e 100 cistos da cepa Me49 apresentaram, respectivamente, mortalidade de 20% após 175 dias de infecção e 100% após 13 dias de infecção (Cavalcanti *et al.*, 2011).

Conforme mostrado em diferentes trabalhos, a mortalidade dos camundongos infectados varia de acordo com o inóculo de cistos utilizado ou até mesmo com inóculos similares. Quando comparamos nossos dados com aqueles encontrados na literatura, verificamos uma grande variação da virulência de uma mesma cepa. Isso pode ocorrer devido a vários fatores como pequenas variações na manutenção de camundongos; variações nos métodos de obtenção e manutenção dos parasitos; variação no método de inoculação. Assim, é sempre importante que a quantidade de parasitos utilizada no inóculo experimental seja determinada por cada pesquisador nas suas condições de trabalho.

Após o estabelecimento do inóculo, avaliamos durante 15 dias a progressão da doença através da pesagem dos camundongos. Observamos que, a partir do nono dia de infecção, os camundongos de ambos os grupos infectados perderam peso. Entretanto, entre o décimo segundo e o décimo quinto dia de infecção, notamos uma melhora física e ganho de peso nos camundongos PHOX KO. Em relação aos camundongos WT, observamos uma pequena melhora física e ganho de peso somente no décimo quinto dia

de infecção. De alguma forma, a ausência das ROS proporciona uma menor debilitação física nos camundongos. Embora a presença de ROS pareça estar relacionada a uma maior perda de peso dos camundongos, nosso grupo não encontrou evidências de que estas moléculas estejam envolvidas na eliminação do parasito, visto que ambos os grupos analisados apresentaram a mesma quantidade de cistos cerebrais. Isso pode ser um forte indicativo de que o parasito não é susceptível às defesas mediadas pela oxidase dependente de NADPH de células fagocíticas (NOX2) (Figura 7).

Assim, acreditamos que as células fagocíticas não conseguem eliminar os parasitos através da explosão respiratória. Após uma hora de infecção, quando os cistos de *T. gondii* entram no hospedeiro intermediário por via oral, os bradizoítos são liberados no estômago e podem ser encontrados nas células epiteliais e na lâmina própria do intestino delgado onde se diferenciam em taquizoítos. Em seguida, esses taquizoítos ganham a circulação sanguínea e linfática, a partir das quais atingem outros tecidos. A partir do quarto dia de infecção, os taquizoítos já podem ser encontrados no fígado, cérebro e nos pulmões. No sexto dia de infecção, ocorre replicação dos taquizoítos, diferenciação em bradizoítos e encistamento nesses órgãos (Israelski *et al.*, 1989; Derouin e Garin, 1991; Dubey, 1997; Dubey *et al.*, 1997).

Ao longo de todo esse trajeto os parasitos encontram células fagocíticas que podem ingeri-los. A ingestão de patógenos por células fagocíticas leva à produção de ROS pela NOX2, conforme mostrado em diversos trabalhos que utilizam diferentes patógenos como modelo experimental (Correa *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2012). Entretanto, o papel das ROS em infecções por patógenos é bem contraditório. Trabalhos realizados com diferentes patógenos mostraram que as ROS podem eliminá-los (Chaves *et al.*, 2019; Ware *et al.*, 2019), não ter efeito algum sobre eles (Roma *et al.*, 2016; Grayczyk e Alonzo, 2019; Hu *et al.*, 2019) ou até mesmo favorecer a sua proliferação (Goes *et al.*, 2016; Dallenga *et al.*, 2017). Os patógenos, por sua vez, podem utilizar estratégias antioxidantes para resistirem aos efeitos provocados pelas ROS (Ding *et al.*, 2004).

No caso específico de *T. gondii*, Moreira *et al.* e Matta *et al.* mostraram, através de experimentos *in vitro*, que as ROS não são detectáveis após a fagocitose de taquizoítos por macrófagos, além de não serem ativas contra esses parasitos (Moreira-Souza *et al.*, 2017; Matta *et al.*, 2018). De toda forma, o parasito apresenta diversas estratégias antioxidantes, que incluem a produção de enzimas, como superóxido dismutase (SOD)

(que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio), catalase e peroxidase (que decompõem moléculas de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água) (Ding *et al.*, 2000; Kaasch e Joiner, 2000; Odberg-Ferragut *et al.*, 2000; Son *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2004). No nosso trabalho, temos evidências *in vivo* de que as ROS provenientes de células fagocíticas do hospedeiro são inócuas na resistência ao *T. gondii*, uma vez que camundongos PHOX KO não se apresentam mais debilitados pela infecção em comparação aos camundongos WT.

Os taquizoítos livres são expostos aos mecanismos efetores induzidos por citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, o \bullet NO produzido por células fagocíticas (Hayashi *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2015). A produção de \bullet NO por células fagocíticas a partir da L-arginina é catalisada pela iNOS e atua como inibidor da replicação do parasito dentro dessas células (Adams *et al.*, 1990; Gazzinelli *et al.*, 1992; Gazzinelli, Eltoun, *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2017). Para sobreviver ao estresse mediado por \bullet NO, o *T. gondii* pode induzir uma maior expressão de subconjuntos de antígenos específicos de bradizoítos, que podem levar os taquizoítos a se diferenciarem em bradizoítos, formarem a parede dos cistos e se alojarem nos tecidos. Quando alojados nos tecidos, os cistos são considerados latentes e não-imunogênicos por evitarem a ativação do sistema imune do hospedeiro, uma vez que suas paredes são constituídas por proteínas derivadas do tecido infectado (Bohne *et al.*, 1994; Soete e Dubremetz, 1996). Com isso, a produção de \bullet NO em resposta ao parasito impede que os taquizoítos se multipliquem descontroladamente nos tecidos e, como mecanismo de sobrevivência, se diferenciam em bradizoítos e se encistam nesses tecidos. Essa latência dos cistos é mantida por uma resposta adaptativa mediada por células T que tem como principal citocina envolvida o IFN- γ . Essa citocina, além de ser crucial na produção de \bullet NO para o controle da proliferação dos taquizoítos, também previne a reativação dos cistos contendo bradizoítos nos tecidos (Scharton-Kersten *et al.*, 1997).

Sabendo-se que a iNOS é traduzida em resposta à interação de IFN- γ e TNF com seus receptores (Green *et al.*, 1990; Liew *et al.*, 1990; Assreuy *et al.*, 1993; Liew *et al.*, 1997; Moura *et al.*, 2015), avaliamos a presença de IFN- γ , TNF e \bullet NO nos camundongos WT e PHOX KO. Nossos resultados mostraram que a infecção causou aumento das duas citocinas e do \bullet NO no soro dos camundongos (Figura 8). Em alguns pontos da infecção os camundongos WT apresentaram níveis maiores de IFN- γ (15 dias) e de TNF (7 dias), que foram refletidos em maiores níveis de nitrato e nitrito no soro desses camundongos

(12 e 15 dias) em relação aos camundongos PHOX KO. Entretanto, este aumento de $\bullet\text{NO}$ detectado sistemicamente nos camundongos WT não foi suficiente para promover uma maior resistência ao parasitismo (Figura 7B). Em um trabalho anterior, nosso grupo mostrou que na ausência de ROS camundongos PHOX KO infectados com *Trypanosoma cruzi* apresentavam níveis maiores de nitrato e nitrito no soro provenientes de $\bullet\text{NO}$ produzido pela iNOS do que camundongos WT. Essa diferença foi atribuída à reação do $\bullet\text{NO}$ com superóxido proveniente da NOX2 de camundongos WT, que gera peroxinitrito (Santiago *et al.*, 2012).

Como dito anteriormente, no caso do *T. gondii*, a literatura mostra que não há produção detectável de ROS após a fagocitose do parasito por células fagocíticas profissionais (Matta *et al.*, 2018). Assim, não esperaríamos que houvesse reação do $\bullet\text{NO}$ com superóxido no nosso modelo selvagem. Como será mostrado adiante, os camundongos PHOX KO parecem apresentar menores níveis de inflamação, o que explicaria o fato desses camundongos apresentarem uma menor quantidade de IFN- γ e TNF em seus soros que os camundongos WT. Uma menor disponibilidade de IFN- γ e TNF gerará uma menor produção de $\bullet\text{NO}$, que pode resultar no aumento no número de patógenos em diversos modelos de infecções. Green *et al.* mostraram que altas quantidades de IFN- γ e LPS ($> 0,1$ ng) em macrófagos aumentam a produção de $\bullet\text{NO}$ e consequentemente aumentam a atividade citotóxica contra amastigotas de *Leishmania major*. Ao inibirem o TNF, esses autores mostraram que a produção de $\bullet\text{NO}$ é dependente da ação dessa citocina (Green *et al.*, 1990). Outro trabalho desse mesmo autor mostrou que a administração de anticorpos anti-IFN- γ e anti-TNF leva à diminuição dos níveis de $\bullet\text{NO}$ e aumento da mortalidade de camundongos em um modelo de infecção *in vivo* e *in vitro* por *Francisella tularensis*. (Green *et al.*, 1993).

Em relação ao *T. gondii*, o IFN- γ exerce importante papel no controle da infecção. Scharton-Kersten *et al.* mostraram que camundongos nocautes na produção de IFN- γ infectados com taquizoítos de *T. gondii* *in vivo* sucumbiram à infecção pelo parasito em nove dias. Eles associaram a alta mortalidade com a replicação não controlada dos taquizoítos (Scharton-Kersten *et al.*, 1996). O trabalho de Sher *et al.* mostrou que a produção de IFN- γ em resposta ao *T. gondii* é dependente da produção de TNF. A administração de um anticorpo anti-TNF promoveu redução dos níveis de IFN- γ em células NK quando estimuladas com taquizoítos ou com extratos proteicos do parasito (Sher *et al.*, 1993). Em nossos resultados, a presença de IFN- γ , TNF e $\bullet\text{NO}$ nos

camundongos WT e PHOX KO infectados pode nos indicar que os mecanismos em resposta ao *T. gondii* são ativados de maneira eficiente, já que não houve mortalidade dos camundongos infectados no período de infecção avaliado devido à ausência ou baixa produção dessas citocinas. Com isso, essas citocinas promovem papel protetor contra a proliferação descontrolada dos taquizoítos nos tecidos. Apesar do efeito protetor, os altos níveis dessas citocinas foram prejudiciais aos camundongos WT, já que elas ocasionaram maior perda de peso e dano tecidual do que nos camundongos PHOX KO. Associamos essas características observadas nos camundongos WT infectados com a produção de ROS via NOX2, que será discutida adiante.

Também pesquisamos a produção de citocinas *ex vivo* por células do baço e dos linfonodos mesentéricos (uma vez que o intestino é a porta de entrada dos parasitos). Notamos que a produção de citocinas por células dos linfonodos mesentéricos de camundongos infectados foi diferente daquela encontrada nas células de camundongos não infectados apenas no sétimo dia de infecção (Figura 9). Sabe-se que, nas infecções experimentais pela via oral, o *T. gondii* passa pela parede do intestino uma hora após a infecção, ali se multiplicando e permanecendo por aproximadamente quatro dias (Derouin e Garin, 1991; Paugam *et al.*, 1995; Dubey, 1997) Assim, espera-se que as células linfoides dos linfonodos que drenam a área ainda respondam com citocinas pró-inflamatórias à presença do parasito por algum tempo. A quantidade de IFN- γ produzida foi semelhante nos dois grupos avaliados, enquanto a quantidade de TNF e IL-10 foi maior nos camundongos PHOX KO.

Alguns trabalhos relataram a presença de elevados níveis de TNF e IL-10 em camundongos nocautes para a produção de ROS em diferentes modelos de infecção. Santiago *et al* mostraram que camundongos PHOX KO infectados com *Trypanosoma cruzi* apresentaram parasitemia semelhante, parasitismo tecidual e níveis semelhantes de IFN- γ e TNF em comparação aos camundongos WT (Santiago *et al.*, 2012). Li *et al* mostraram que camundongos p40^{phox} (nocautes para a subunidade p40^{phox} da NADPH oxidase) infectados com *Salmonella enterica serovar Typhimurium* apresentaram alta susceptibilidade à infecção, além de apresentarem altos níveis de TNF em comparação aos camundongos WT (Li *et al.*, 2017). Já Zhang *et al* mostraram que, ao injetarem LPS (50 μ g) por via intraperitoneal em camundongos PHOX KO, estes camundongos apresentaram altos níveis de TNF na circulação sanguínea e no pulmão. Apesar disso, os autores não observaram diferenças dessa citocina entre os camundongos WT e PHOX

KO (Zhang *et al.*, 2009). Em relação à IL-10, Li *et al.* mostraram que a inibição de NOX2 pode promover aumento na produção de IL-10 no sobrenadante de culturas de macrófagos infectados com *Pseudomonas aeruginosa*, apesar de não terem observado aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (Li *et al.*, 2018).

A IL-10 é uma citocina reguladora e sua produção ocorre paralela ou subsequentemente à produção das citocinas pró-inflamatórias (Fiorentino *et al.*, 1991; Aliberti *et al.*, 2001; O'brien *et al.*, 2019). Assim, a maior produção de IL-10 por camundongos PHOX KO pode ser uma resposta a uma maior produção de IFN- γ anterior aos 7 dias de infecção ou à maior produção de TNF nesses linfonodos. Até o presente momento, não há registros na literatura de diferenças na produção dessas citocinas entre camundongos WT e PHOX KO infectados com *T. gondii*. Apesar disso, especulamos que a maior produção de citocinas pró-inflamatórias observadas em camundongos WT resulte da ação do fator de transcrição NF- κ B, que atua como estimulador da expressão de genes que desencadeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 β e IL-6. Estudos mostraram que a ativação do NF- κ B é dependente do estímulo proveniente de ROS, principalmente aqueles derivados da NOX2 (Sulciner *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 2004; Matsuzawa *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2017).

A produção basal de citocinas por esplenócitos foi mais duradoura que a das células dos linfonodos mesentéricos, sendo maior que a dos camundongos não infectados no 7º e 12º dia após a infecção. No décimo quinto dia após a infecção, os níveis de citocinas produzidos por essas células já haviam caído para níveis basais (os mesmos encontrados nos camundongos não infectados). As únicas diferenças observadas foram uma maior produção de IL-10 no sétimo dia de infecção e uma maior produção de TNF nos camundongos PHOX KO, coerentes com os resultados obtidos para os linfonodos. Assim, ao contrário do observado para de citocinas sistêmicas, nos órgãos linfóides os camundongos PHOX KO produziram mais TNF e IL-10 que os camundongos WT. A maior produção de IL-10 por camundongos PHOX KO indica que esses camundongos apresentam uma resposta reguladora (anti-inflamatória) mais robusta do que aquela observada nos camundongos WT, que promove a diminuição de citocinas pró-inflamatórias. No caso dos camundongos WT, a diminuição dos níveis de IFN- γ e TNF posterior a 7 dias de infecção pode ser explicada pelo efeito regulador das moléculas de \bullet NO. Alguns trabalhos relatam que a ação de IL-10 e níveis elevados de \bullet NO inibem a

produção de citocinas pró-inflamatórias após 7 dias de infecção com *T. gondii* (Candolfi *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 1995)

É importante ressaltar que clinicamente os camundongos PHOX KO pareciam menos doentes, e a sua recuperação de peso foi melhor que aquela dos camundongos WT. As citocinas TNF, IL-12, IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , produzidas por células NK e células T CD4⁺ (Gazzinelli, Hieny, *et al.*, 1993; Sher *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1995; Yap e Sher, 1999) são mediadoras da caquexia. A caquexia é definida como uma síndrome metabólica complexa, geralmente associada a doenças crônicas, que pode causar anorexia, resistência à insulina, redução de apetite e aumento de custos energéticos, provocando redução de massa muscular com ou sem perda de gordura (Plata-Salaman, 1989; Rothwell, 1993; Wysocka *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 2008; Hatter *et al.*, 2018). Nossos resultados mostraram que os camundongos WT produziram mais IFN- γ e TNF em alguns pontos da infecção que os camundongos PHOX KO. Essa maior produção de citocinas mediadoras da caquexia e do choque séptico pode explicar a maior perda de peso (Figura 7A) observada nos camundongos WT infectados quando comparados com os camundongos PHOX KO.

Outra evidência de uma maior resposta inflamatória nos camundongos WT foi obtida através dos níveis das enzimas hepáticas AST e ALT no soro. Elevados níveis de ALT e AST na circulação sanguínea indicam dano hepático causado pela proliferação do *T. gondii* no órgão (Mordue *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2016). Encontramos elevados níveis dessas enzimas nos camundongos WT e menores níveis nos camundongos PHOX KO (Figura 10). Dados histológicos do fígado desses camundongos, também corroboram a menor resposta inflamatória observada nos camundongos PHOX KO. No exame histológico deste órgão (Figura 11), os camundongos WT apresentaram maior número e área de infiltrado celular, além de necrose, aos sete dias de infecção, enquanto os camundongos PHOX KO apresentaram apenas um infiltrado celular predominantemente de células mononucleadas. Aos 12 dias de infecção ambos os grupos infectados apresentaram focos de necrose hepática e aos 15 dias os camundongos PHOX KO já apresentavam arquitetura normal no fígado, diferente do observado para os camundongos WT. Considerando-se que os focos inflamatórios eram predominantemente de células mononucleadas e que monócitos e macrófagos respondem a infecções com a produção de \bullet NO e ROS, podemos supor que a ausência de atividade da NOX2 pode ter preservado o

fígado dos camundongos PHOX KO infectados, resultando em menor lesão e consequentemente menor patologia causada pelo *T. gondii* neste órgão.

Esta hipótese é sustentada através dos níveis de malonaldeído (MDA) obtidos pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As membranas celulares contêm grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados. A reação de lipídeos poli-insaturados com as ROS pode resultar na remoção de um átomo de hidrogênio do grupo metileno, que inicia o processo de peroxidação lipídica. Os radicais de carbono formados podem reagir espontaneamente com o oxigênio, formando radicais peróxido lipídicos que se propagam na cadeia de peroxidação lipídica removendo átomos de hidrogênio para formar hidroperóxidos e novos radicais de carbono, levando à oxidação de muitas moléculas de ácidos graxos (Figura 16). O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo a molécula medida pela técnica de TBARS. A formação de MDA pode ocorrer pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (Figura 15) (Bonnes-Taourel *et al.*, 1992; Jialal e Grundy, 1992; Halliwell e Chirico, 1993).

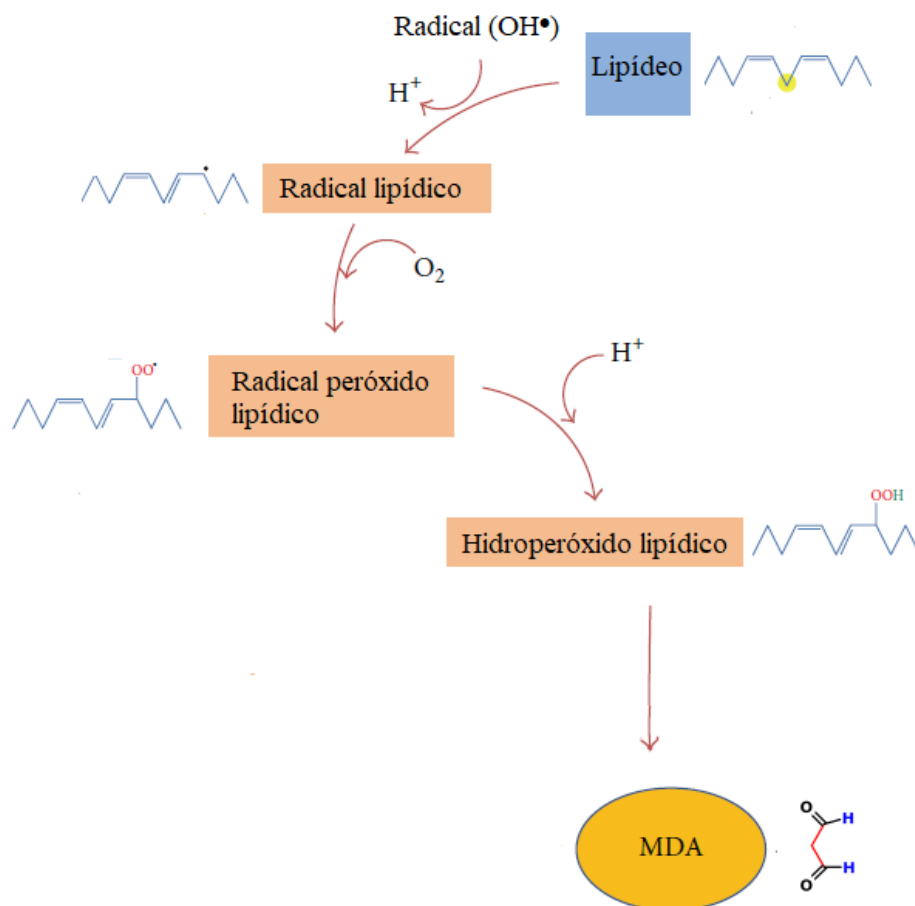


Figura 15: Formação de MDA através da peroxidação lipídica. Os pró-oxidantes, como o radical hidroxila (OH•), removem o hidrogênio das moléculas de lipídeos, formando moléculas de radicais lipídicos. O radical lipídico formado reage rapidamente com o oxigênio para formar um radical peróxido lipídico que pode remover um hidrogênio de outra molécula lipídica gerando um novo radical lipídico e moléculas de hidroperóxido lipídico. A decomposição de hidroperóxidos lipídicos leva à formação de moléculas de MDA, reveladas através do ensaio de TBARS (Adaptado de Ayala et al., 2014).

A técnica de TBARS mostrou que após 12 e 15 dias de infecção, camundongos WT apresentaram maiores níveis de MDA no fígado em relação aos camundongos PHOX KO. Entretanto, no sétimo dia de infecção, ambos os camundongos apresentaram níveis de MDA elevados, sem diferença significativa entre os grupos. Esse estresse oxidativo nos camundongos nocautes pode ser explicado pela atividade de outras isoformas da NOX (Kim *et al.*, 2017; Matta *et al.*, 2018), pela atividade mitocondrial (Moreira-Souza *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019) ou a outras enzimas geradoras de ROS em lesões inflamatórias, como a xantina oxidase (Murray e Cohn, 1979; Doleski *et al.*, 2017). Quando avaliamos os níveis de MDA no duodeno, não observamos diferenças entre os grupos infectados. Esse resultado pode ser explicado pela ausência de taquizoítos do *T. gondii* no duodeno a partir de 7 dias de infecção, já que o parasito colonizou o órgão nos tempos iniciais da infecção e a partir do sétimo dia de infecção, o *T. gondii* provavelmente atingiu outros órgãos e os que se mantiveram foram eliminados pela resposta imune local.

Ao avaliar a produção de ROS em resposta à infecção, não detectamos aumento das ROS nos homogenatos de fígado e duodeno de camundongos WT e PHOX KO. Especulamos que esse resultado encontrado pode ser devido à natureza instável das ROS. Essas moléculas, por possuírem baixa meia vida (como por exemplo os íons superóxido que possuem meia vida de milissegundos), tendem a reagir com outras moléculas e ter sua disponibilidade reduzida para a sua detecção através de ensaios de ROS (Comhair e Erzurum, 2002). Apesar disso, há na literatura relatos de detecção dessas espécies em preparações semelhantes às nossas (Yu *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2017).

Além de avaliarmos o dano oxidativo e a possível presença de ROS nos tecidos de camundongos infectados, também analisamos os níveis das enzimas antioxidantes presentes nesses tecidos em resposta à infecção. Níveis basais e similares da atividade da enzima SOD foram detectados no fígado dos camundongos infectados de ambos os grupos, indicando que esses níveis não são afetados pela presença do parasito neste órgão. Entretanto, no duodeno, detectamos aumento da atividade de SOD nos camundongos WT após 7 dias de infecção e nos camundongos PHOX KO após 7 e 12 dias de infecção. Ao avaliar os níveis de atividade da enzima catalase no fígado, detectamos uma diminuição nos camundongos WT após 7 e 12 dias de infecção e nos camundongos PHOX KO após 12 dias de infecção. No duodeno, detectamos aumento dos níveis da enzima em camundongos WT (15 dias) e uma diminuição nos camundongos PHOX KO (12 dias).

Ao relacionar os nossos resultados com os encontrados na literatura, nossos resultados parecem ser inconclusivos. Xu et al. mostraram que a presença do *T. gondii* diminuiu os níveis de SOD tanto no homogenato de fígado quanto no soro de camundongos infectados (Xu et al., 2019). Isso possivelmente ocorre devido à produção de ROS em resposta ao parasito, pela NOX2 em camundongos WT e por outras fontes nos camundongos PHOX KO, já que alguns trabalhos tanto *in vivo* quanto *in vitro* mostraram que elevadas quantidades de ROS podem inibir a atividade de SOD (Kim et al., 2001; Costa et al., 2002; Portes et al., 2015). Apesar disso, não encontramos níveis elevados de ROS em resposta à infecção pelo *T. gondii* nos homogenatos de fígado e duodeno dos nossos camundongos infectados para que houvesse a diminuição da atividade de SOD. Já em relação à enzima catalase, Murray et al. mostraram que macrófagos infectados com *T. gondii* foram capazes de promover a ativação da enzima catalase em resposta ao dano oxidativo. Apesar de promover maior atividade antioxidante nos macrófagos em resposta aos altos níveis de ROS, essas ROS não foram capazes de eliminar o parasito. (Murray et al., 1980). Assim como a SOD, não encontramos aumento da atividade de catalase nos homogenatos de fígado e duodeno de nossos camundongos infectados. No duodeno, especulamos que os níveis de SOD e catalase nos camundongos infectados podem ser explicados através da provável ausência do parasito a partir do sétimo dia de infecção no órgão, apesar das variações na atividade encontradas em alguns tempos da infecção. No geral, a hipótese que melhor poderia explicar nossos resultados é que a presença de altos níveis de $\bullet\text{NO}$ pode atuar como inibidor da atividade de enzimas antioxidantes, como catalase, glutathione peroxidase e SOD (Asahi et al., 1995; Dobashi et al., 1997). Em nossos resultados observamos elevados níveis de nitratos e nitritos circulantes com 7 dias de infecção em todos os grupos infectados, que refletiriam na produção de $\bullet\text{NO}$ nos tecidos, com decorrente diminuição nos demais tempos de infecção avaliados.

Em conclusão, nosso trabalho mostrou que as ROS provenientes da NOX2 parecem não ter efeito sobre o parasito *in vivo*. A infecção com 10 cistos por via intragástrica foi bem-sucedida tanto em camundongos WT quanto em camundongos PHOX KO e não ocasionou a morte dos camundongos durante 15 dias de infecção. Entretanto, nossos dados mostraram que a presença de NOX2 gera uma resposta inflamatória mais intensa, que resulta na debilitação dos camundongos infectados. Isso pode ser uma consequência da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IFN-

γ e \bullet NO, que estão relacionadas a quadros de caquexia. Os camundongos WT infectados pelo *T. gondii* também apresentaram maior dano hepático, provavelmente devido ao maior estresse oxidativo causado pelas células inflamatórias que expressam NOX2 ativa. O dano hepático causado pela presença do parasito induz a migração de células inflamatórias e provoca um dano ainda maior em um ciclo que é eventualmente controlado pelo hospedeiro, mas que o debilita. Ao contrário da nossa hipótese levantada, nossos dados demonstraram que as ROS não se relacionam apenas na eliminação do parasito por estresse oxidativo, além de não resultar em vantagens para os camundongos WT. De maneira surpreendente, a produção de ROS via NOX2 resultou em consequências negativas para o hospedeiro infectado. Dessa forma, concluímos que a NOX2 promove maior susceptibilidade à infecção por *T. gondii* em camundongos.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, L. B.; HIBBS, J. B., JR.; TAINTOR, R. R.; KRAHENBUHL, J. L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **J Immunol**, v. 144, n. 7, p. 2725-9, 1990.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984.

AKERMAN, S. E.; MULLER, S. Peroxiredoxin-linked detoxification of hydroperoxides in *Toxoplasma gondii*. **J Biol Chem**, v. 280, n. 1, p. 564-70, 2005.

ALEXANDER, D. L.; MITAL, J.; WARD, G. E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J. C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathog**, v. 1, n. 2, p. e17, 2005.

ALEXANDER, J.; JEBBARI, H.; BLUETHMANN, H.; BROMBACHER, F.; ROBERTS, C. W. The role of IL-4 in adult acquired and congenital toxoplasmosis. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 1, p. 113-20, 1998.

ALIBERTI, J. C.; SOUTO, J. T.; MARINO, A. P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M. M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol**, v. 158, n. 4, p. 1433-40, 2001.

ALIEV, G.; PRIYADARSHINI, M.; REDDY, V. P.; GRIEG, N. H.; KAMINSKY, Y.; CACABELOS, R.; ASHRAF, G. M.; JABIR, N. R.; KAMAL, M. A.; NIKOLENKO, V. N.; ZAMYATNIN, A. A., JR.; BENBERIN, V. V.; BACHURIN, S. O. Oxidative stress mediated mitochondrial and vascular lesions as markers in the pathogenesis of Alzheimer disease. **Curr Med Chem**, v. 21, n. 19, p. 2208-17, 2014.

ALMEIDA, T. F.; PALMA, L. C.; MENDEZ, L. C.; NORONHA-DUTRA, A. A.; VERAS, P. S. *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. **Parasite Immunol**, v. 34, n. 10, p. 492-8, 2012.

ALVES, C. M.; SILVA, D. A.; AZZOLINI, A. E.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MINEO, J. R. Galectin-3 is essential for reactive oxygen species production by peritoneal neutrophils from mice infected with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 140, n. 2, p. 210-9, 2013.

ANDRADE, W. A.; SOUZA MDO, C.; RAMOS-MARTINEZ, E.; NAGPAL, K.; DUTRA, M. S.; MELO, M. B.; BARTHOLOMEU, D. C.; GHOSH, S.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Cell Host Microbe**, v. 13, n. 1, p. 42-53, 2013.

ASAHI, M.; FUJII, J.; SUZUKI, K.; SEO, H. G.; KUZUYA, T.; HORI, M.; TADA, M.; FUJII, S.; TANIGUCHI, N. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. **J Biol Chem**, v. 270, n. 36, p. 21035-9, 1995.

ASSARI, T. Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. **Med Immunol**, v. 5, p. 4, 2006.

ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. **Br J Pharmacol**, v. 108, n. 3, p. 833-7, 1993.

AYALA, A.; MUNOZ, M. F.; ARGUELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 360438, 2014.

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest**, v. 73, n. 3, p. 599-601, 1984.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-76, 1999.

BARONDES, S. H.; COOPER, D. N.; GITT, M. A.; LEFFLER, H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **J Biol Chem**, v. 269, n. 33, p. 20807-10, 1994.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.

BEKPEN, C.; HUNN, J. P.; ROHDE, C.; PARVANOV, I.; GUETHLEIN, L.; DUNN, D. M.; GLOWALLA, E.; LEPTIN, M.; HOWARD, J. C. The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. **Genome Biol**, v. 6, n. 11, p. R92, 2005.

BELA, S. R.; OLIVEIRA SILVA, D. A.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; PIROVANI, C. P.; CHAVES-BORGES, F. A.; REIS DE CARVALHO, F.; CARRIJO DE OLIVEIRA, T.; MINEO, J. R. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 62, n. 3, p. 245-54, 2008.

BESTEIRO, S.; MICHELIN, A.; PONCET, J.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Export of a *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein complex at the host cell membrane to form the moving junction during invasion. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 2, p. e1000309, 2009.

BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1761-7, 1994.

BONFA, G.; BENEVIDES, L.; SOUZA MDO, C.; FONSECA, D. M.; MINEO, T. W.; ROSSI, M. A.; SILVA, N. M.; SILVA, J. S.; DE BARROS CARDOSO, C. R. CCR5 controls immune and metabolic functions during *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104736, 2014.

BONNES-TAOUREL, D.; GUERIN, M. C.; TORREILLES, J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? **Biochem Pharmacol**, v. 44, n. 5, p. 985-8, 1992.

BOOTHROYD, J. C.; HEHL, A.; KNOLL, L. J.; MANGER, I. D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 1, p. 3-9, 1998.

BOWIE, W. R.; KING, A. S.; WERKER, D. H.; ISAAC-RENTON, J. L.; BELL, A.; ENG, S. B.; MARION, S. A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team. **Lancet**, v. 350, n. 9072, p. 173-7, 1997.

BRYDGES, S. D.; CARRUTHERS, V. B. Mutation of an unusual mitochondrial targeting sequence of SODB2 produces multiple targeting fates in *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 22, p. 4675-85, 2003.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978.

CALLAHAN, H. L.; CROUCH, R. K.; JAMES, E. R. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? **Parasitol Today**, v. 4, n. 8, p. 218-25, 1988.

CAMPOS, M. A.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E. P.; PROCOPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; SMITH, J. A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J Immunol**, v. 167, n. 1, p. 416-23, 2001.

CANDOLFI, E.; HUNTER, C. A.; REMINGTON, J. S. Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1995-2001, 1994.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **Eur J Cell Biol**, v. 73, n. 2, p. 114-23, 1997.

CAVALCANTI, M. G.; MESQUITA, J. S.; MADI, K.; FEIJO, D. F.; ASSUNCAO-MIRANDA, I.; SOUZA, H. S.; BOZZA, M. T. MIF participates in *Toxoplasma gondii*-induced pathology following oral infection. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25259, 2011.

CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. **Traffic**, v. 5, n. 11, p. 855-67, 2004.

CHAVES, M. M.; SINFLORIO, D. A.; THORSTENBERG, M. L.; MARTINS, M. D. A.; MOREIRA-SOUZA, A. C. A.; RANGEL, T. P.; SILVA, C. L. M.; BELLIO, M.; CANETTI, C.; COUTINHO-SILVA, R. Non-canonical NLRP3 inflammasome activation and IL-1beta signaling are necessary to *L. amazonensis* control mediated by P2X7 receptor and leukotriene B4. **PLoS Pathog**, v. 15, n. 6, p. e1007887, 2019.

CHOI, S. H.; PARK, S. J.; CHA, G. H.; QUAN, J. H.; CHANG, N. S.; AHN, M. H.; SHIN, D. W.; LEE, Y. H. *Toxoplasma gondii* protects against H₂O₂-induced apoptosis in ARPE-19 cells through the transcriptional regulation of apoptotic elements and downregulation of the p38 MAPK pathway. **Acta Ophthalmol**, v. 89, n. 4, p. e350-6, 2011.

CHOI, W. Y.; NAM, H. W.; KWAK, N. H.; HUH, W.; KIM, Y. R.; KANG, M. W.; CHO, S. Y.; DUBEY, J. P. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. **J Infect Dis**, v. 175, n. 5, p. 1280-2, 1997.

COMHAIR, S. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 283, n. 2, p. L246-55, 2002.

CONTINI, C. Clinical and diagnostic management of toxoplasmosis in the immunocompromised patient. **Parassitologia**, v. 50, n. 1-2, p. 45-50, 2008.

CORREA, D.; CANEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRIA, L. B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C. P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 12, p. 651-60, 2007.

CORREA, G.; MARQUES DA SILVA, C.; DE ABREU MOREIRA-SOUZA, A. C.; VOMMARO, R. C.; COUTINHO-SILVA, R. Activation of the P2X₇ receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. **Microbes Infect**, v. 12, n. 6, p. 497-504, 2010.

COSTA, V. M.; AMORIM, M. A.; QUINTANILHA, A.; MORADAS-FERREIRA, P. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 11, p. 1507-15, 2002.

CROSS, A. R.; CURNUTTE, J. T. The cytosolic activating factors p47phox and p67phox have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. **J Biol Chem**, v. 270, n. 12, p. 6543-8, 1995.

CROSS, A. R.; SEGAL, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. **Biochim Biophys Acta**, v. 1657, n. 1, p. 1-22, 2004.

DALLENKA, T.; REPNIK, U.; CORLEIS, B.; EICH, J.; REIMER, R.; GRIFFITHS, G. W.; SCHAIBLE, U. E. *M. tuberculosis*-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. **Cell Host Microbe**, v. 22, n. 4, p. 519-530 e3, 2017.

DARCY, F.; DESLEE, D.; SANTORO, F.; CHARIF, H.; AURIAULT, C.; DECOSTER, A.; DUQUESNE, V.; CAPRON, A. Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunol**, v. 10, n. 5, p. 553-67, 1988.

DARDE, M. L. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 366-71, 2008.

DE DEKEN, X.; CORVILAIN, B.; DUMONT, J. E.; MIOT, F. Roles of DUOX-mediated hydrogen peroxide in metabolism, host defense, and signaling. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 17, p. 2776-93, 2014.

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.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F.; NIEHUS, S.; CODDEVILLE, B.; ELASS, E.; POIRIER, F.; WEINGART, R.; SCHMIDT, R. R.; MAZURIER, J.; GUERARDEL, Y.; SCHWARZ, R. T. Binding of *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols to galectin-3 is required for their recognition by macrophages. **J Biol Chem**, v. 285, n. 43, p. 32744-50, 2010.

DEROUIN, F.; GARIN, Y. J. *Toxoplasma gondii*: blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice. **Exp Parasitol**, v. 73, n. 4, p. 460-8, 1991.

DIEBOLD, B. A.; BOKOCH, G. M. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. **Nat Immunol**, v. 2, n. 3, p. 211-5, 2001.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-9, 2000.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol**, v. 141, n. 7, p. 2407-12, 1988.

DING, M.; CLAYTON, C.; SOLDATI, D. *Toxoplasma gondii* catalase: are there peroxisomes in toxoplasma? **J Cell Sci**, v. 113 (Pt 13), p. 2409-19, 2000.

DING, M.; KWOK, L. Y.; SCHLUTER, D.; CLAYTON, C.; SOLDATI, D. The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. **Mol Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 47-61, 2004.

DOBASHI, K.; PAHAN, K.; CHAHAL, A.; SINGH, I. Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C6 glial cells. **J Neurochem**, v. 68, n. 5, p. 1896-903, 1997.

DOLESKI, P. H.; LEAL, D. B.; MACHADO, V. S.; BOTTARI, N. B.; CASALI, E. A.; MORITZ, C. E.; CAMILLO, G.; VOGEL, F. F.; STEFANI, L. M.; DA SILVA, A. S. Hepatic xanthine oxidase activity and purine nucleosides levels as physiological mediators to analyze a subcutaneous treatment with (PhSe)₂ in mice infected by *Toxoplasma gondii*. **Microb Pathog**, v. 104, p. 180-183, 2017.

DRIVER, A. S.; KODAVANTI, P. R.; MUNDY, W. R. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. **Neurotoxicol Teratol**, v. 22, n. 2, p. 175-81, 2000.

DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **J Eukaryot Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 592-602, 1997.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Vet Parasitol**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **J Protozool**, v. 19, n. 1, p. 155-77, 1972.

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.; SPEER, C. A.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; BLIXT, J. A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **J Parasitol**, v. 83, n. 5, p. 870-82, 1997.

EE, T. Y.; SINGH, M.; YAP, E. H. The determination of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in different IgG subclasses of human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 20, n. 1, p. 71-9, 1989.

EVANS, W. J.; MORLEY, J. E.; ARGILES, J.; BALES, C.; BARACOS, V.; GUTTRIDGE, D.; JATOI, A.; KALANTAR-ZADEH, K.; LOCHS, H.; MANTOVANI, G.; MARKS, D.; MITCH, W. E.; MUSCARITOLI, M.; NAJAND, A.; PONIKOWSKI, P.; ROSSI FANELLI, F.; SCHAMBELAN, M.; SCHOLS, A.; SCHUSTER, M.; THOMAS, D.; WOLFE, R.; ANKER, S. D. Cachexia: a new definition. **Clin Nutr**, v. 27, n. 6, p. 793-9, 2008.

FERREIRA ADE, M.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 1, p. 22-31, 2006.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J Immunol**, v. 146, n. 10, p. 3444-51, 1991.

FRANCHINI, A. M.; HUNT, D.; MELENDEZ, J. A.; DRAKE, J. R. FcγR-driven release of IL-6 by macrophages requires NOX2-dependent production of reactive oxygen species. **J Biol Chem**, v. 288, n. 35, p. 25098-108, 2013.

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.

FURUTA, T.; KIKUCHI, T.; AKIRA, S.; WATANABE, N.; YOSHIKAWA, Y. Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4-mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis. **Int Immunol**, v. 18, n. 12, p. 1655-62, 2006.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 12, p. 895-906, 2006.

GAZZINELLI, R. T.; ELTOUM, I.; WYNN, T. A.; SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **J Immunol**, v. 151, n. 7, p. 3672-81, 1993.

GAZZINELLI, R. T.; HIENY, S.; WYNN, T. A.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 13, p. 6115-9, 1993.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; JAMES, S. L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **J Immunol**, v. 148, n. 6, p. 1792-6, 1992.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **J Immunol**, v. 157, n. 2, p. 798-805, 1996.

GIGLEY, J. P.; FOX, B. A.; BZIK, D. J. Long-term immunity to lethal acute or chronic type II *Toxoplasma gondii* infection is effectively induced in genetically susceptible C57BL/6 mice by immunization with an attenuated type I vaccine strain. **Infect Immun**, v. 77, n. 12, p. 5380-8, 2009.

GOES, G. R.; ROCHA, P. S.; DINIZ, A. R.; AGUIAR, P. H.; MACHADO, C. R.; VIEIRA, L. Q. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004555, 2016.

GRAYCZYK, J. P.; ALONZO, F., 3RD. *Staphylococcus aureus* lipoic acid synthesis limits macrophage reactive oxygen and nitrogen species production to promote survival during infection. **Infect Immun**, 2019.

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol**, v. 145, n. 12, p. 4290-7, 1990.

GREEN, S. J.; NACY, C. A.; SCHREIBER, R. D.; GRANGER, D. L.; CRAWFORD, R. M.; MELTZER, M. S.; FORTIER, A. H. Neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha blocks in vivo synthesis of nitrogen oxides from L-arginine and protection against *Francisella tularensis* infection in Mycobacterium bovis BCG-treated mice. **Infect Immun**, v. 61, n. 2, p. 689-98, 1993.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem J**, v. 386, n. Pt 3, p. 401-16, 2005.

HAKANSSON, S.; CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. Toxoplasma evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **EMBO J**, v. 20, n. 12, p. 3132-44, 2001.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am J Clin Nutr**, v. 57, n. 5 Suppl, p. 715S-724S; discussion 724S-725S, 1993.

HALONEN, S. K.; WEISS, L. M. Toxoplasmosis. **Handb Clin Neurol**, v. 114, p. 125-45, 2013.

HATTER, J. A.; KOUICHE, Y. M.; MELCHOR, S. J.; NG, K.; BOULEY, D. M.; BOOTHROYD, J. C.; EWALD, S. E. *Toxoplasma gondii* infection triggers chronic cachexia and sustained commensal dysbiosis in mice. **PLoS One**, v. 13, n. 10, p. e0204895, 2018.

HAYASHI, S.; CHAN, C. C.; GAZZINELLI, R.; ROBERGE, F. G. Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis. **J Immunol**, v. 156, n. 4, p. 1476-81, 1996.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clin Exp Med**, v. 3, n. 2, p. 84-105, 2003.

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

HU, H.; TIAN, M.; LI, P.; BAO, Y.; GUAN, X.; LIAN, Z.; YIN, Y.; DING, C.; YU, S. Brucella infection regulates peroxiredoxin-5 protein expression to facilitate intracellular survival by reducing the production of nitric oxide and reactive oxygen species. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 516, n. 1, p. 82-88, 2019.

HUNTER, C. A.; CHIZZONITE, R.; REMINGTON, J. S. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. **J Immunol**, v. 155, n. 9, p. 4347-54, 1995.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 766-78, 2012.

HUSKINSON, J.; STEPICK-BIEK, P. N.; ARAUJO, F. G.; THULLIEZ, P.; SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. S. Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 9, p. 2031-8, 1989.

ISRAELSKI, D. M.; ARAUJO, F. G.; CONLEY, F. K.; SUZUKI, Y.; SHARMA, S.; REMINGTON, J. S. Treatment with anti-L3T4 (CD4) monoclonal antibody reduces the inflammatory response in toxoplasmic encephalitis. **J Immunol**, v. 142, n. 3, p. 954-8, 1989.

JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 46, p. 11-21, 1960.

JIALAL, I.; GRUNDY, S. M. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 669, p. 237-47; discussion 247-8, 1992.

JOHNSON, A. M. Strain-dependent, route of challenge-dependent, murine susceptibility to toxoplasmosis. **Z Parasitenkd**, v. 70, n. 3, p. 303-9, 1984.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. **Exp Parasitol**, v. 124, n. 1, p. 10-25, 2010.

JONES, J. L.; KRUEGER, A.; SCHULKIN, J.; SCHANTZ, P. M. Toxoplasmosis prevention and testing in pregnancy, survey of obstetrician-gynaecologists. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 1, p. 27-33, 2010.

JONES, J. L.; OGUNMODEDE, F.; SCHEFTEL, J.; KIRKLAND, E.; LOPEZ, A.; SCHULKIN, J.; LYNFIELD, R. Toxoplasmosis-related knowledge and practices among pregnant women in the United States. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 11, n. 3, p. 139-45, 2003.

KAASCH, A. J.; JOINER, K. A. Targeting and subcellular localization of *Toxoplasma gondii* catalase. Identification of peroxisomes in an apicomplexan parasite. **J Biol Chem**, v. 275, n. 2, p. 1112-8, 2000.

KAFSACK, B. F.; PENA, J. D.; COPPENS, I.; RAVINDRAN, S.; BOOTHROYD, J. C.; CARRUTHERS, V. B. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. **Science**, v. 323, n. 5913, p. 530-3, 2009.

KANG, H.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma,

TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. **J Immunol**, v. 164, n. 5, p. 2629-34, 2000.

KHAN, I. A.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. **Parasite Immunol**, v. 17, n. 4, p. 185-95, 1995.

KHAN, N. M.; HASEEB, A.; ANSARI, M. Y.; DEVARAPALLI, P.; HAYNIE, S.; HAQQI, T. M. Wogonin, a plant derived small molecule, exerts potent anti-inflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human Osteoarthritis chondrocytes. **Free Radic Biol Med**, v. 106, p. 288-301, 2017.

KIM, H.; LEE, J.; HYUN, J. W.; PARK, J. W.; JOO, H. G.; SHIN, T. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. **Cell Biol Int**, v. 31, n. 7, p. 655-62, 2007.

KIM, J. H.; LEE, J.; BAE, S. J.; KIM, Y.; PARK, B. J.; CHOI, J. W.; KWON, J.; CHA, G. H.; YOO, H. J.; JO, E. K.; BAE, Y. S.; LEE, Y. H.; YUK, J. M. NADPH oxidase 4 is required for the generation of macrophage migration inhibitory factor and host defense against *Toxoplasma gondii* infection. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 6361, 2017.

KIM, S. Y.; KWON, O. J.; PARK, J. W. Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye. **Biochimie**, v. 83, n. 5, p. 437-44, 2001.

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **Am J Med**, v. 118, n. 3, p. 212-6, 2005.

LAROUX, F. S.; ROMERO, X.; WETZLER, L.; ENGEL, P.; TERHORST, C. Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria. **J Immunol**, v. 175, n. 9, p. 5596-600, 2005.

LETO, T. L.; ADAMS, A. G.; DE MENDEZ, I. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 22, p. 10650-4, 1994.

LI, H.; LUO, Y. F.; WANG, Y. S.; YANG, Q.; XIAO, Y. L.; CAI, H. R.; XIE, C. M. Using ROS as a Second Messenger, NADPH Oxidase 2 Mediates Macrophage Senescence via Interaction with NF-kappaB during *Pseudomonas aeruginosa* Infection. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2018, p. 9741838, 2018.

LI, Y.; LV, M.; SU, C.; LONG, S.; ZHANG, W.; CONWAY, K. L.; LI, W.; XAVIER, R. J.; SHI, H. N. p40 (phox) -Deficient Mice Exhibit Impaired Bacterial Clearance and Enhanced Pro-inflammatory Responses during *Salmonella enterica serovar Typhimurium* Infection. **Front Immunol**, v. 8, p. 1270, 2017.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunology**, v. 71, n. 4, p. 556-9, 1990.

LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 352, n. 1359, p. 1311-5, 1997.

LIU, F. T. Regulatory roles of galectins in the immune response. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 136, n. 4, p. 385-400, 2005.

LOPEZ, A.; DIETZ, V. J.; WILSON, M.; NAVIN, T. R.; JONES, J. L. Preventing congenital toxoplasmosis. **MMWR Recomm Rep**, v. 49, n. RR-2, p. 59-68, 2000.

LOURIDO, S.; SHUMAN, J.; ZHANG, C.; SHOKAT, K. M.; HUI, R.; SIBLEY, L. D. Calcium-dependent protein kinase 1 is an essential regulator of exocytosis in *Toxoplasma*. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 359-62, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUDER, C. G.; WALTER, W.; BEUERLE, B.; MAEURER, M. J.; GROSS, U. *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 5, p. 1475-84, 2001.

LUFT, B. J.; CHUA, A. Central Nervous System Toxoplasmosis in HIV Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy. **Curr Infect Dis Rep**, v. 2, n. 4, p. 358-362, 2000.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clin Infect Dis**, v. 15, n. 2, p. 211-22, 1992.

MARSHALL, E. S.; ELSHEKIHA, H. M.; HAKIMI, M. A.; FLYNN, R. J. *Toxoplasma gondii* peroxiredoxin promotes altered macrophage function, caspase-1-dependent IL-1beta secretion enhances parasite replication. **Vet Res**, v. 42, p. 80, 2011.

MASUR, H.; JONES, T. C.; LEMPert, J. A.; CHERUBINI, T. D. Outbreak of toxoplasmosis in a family and documentation of acquired retinochoroiditis. **Am J Med**, v. 64, n. 3, p. 396-402, 1978.

MATSUZAWA, A.; SAEGUSA, K.; NOGUCHI, T.; SADAMITSU, C.; NISHITOH, H.; NAGAI, S.; KOYASU, S.; MATSUMOTO, K.; TAKEDA, K.; ICHIJO, H. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. **Nat Immunol**, v. 6, n. 6, p. 587-92, 2005.

MATTA, S. K.; PATTEN, K.; WANG, Q.; KIM, B. H.; MACMICKING, J. D.; SIBLEY, L. D. NADPH Oxidase and Guanylate Binding Protein 5 Restrict Survival of Avirulent Type III Strains of *Toxoplasma gondii* in Naive Macrophages. **MBio**, v. 9, n. 4, 2018.

MCGONIGLE, S.; DALTON, J. P.; JAMES, E. R. Peroxidoxins: a new antioxidant family. **Parasitol Today**, v. 14, n. 4, p. 139-45, 1998.

MITAL, J.; MEISSNER, M.; SOLDATI, D.; WARD, G. E. Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 9, p. 4341-9, 2005.

MIZRAHI, A.; BERDICHEVSKY, Y.; UGOLEV, Y.; MOLSHANSKI-MOR, S.; NAKASH, Y.; DAHAN, I.; ALLOUL, N.; GORZALCZANY, Y.; SARFSTEIN, R.; HIRSHBERG, M.; PICK, E. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 5, p. 881-95, 2006.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **J Infect Dis**, v. 185 Suppl 1, p. S73-82, 2002.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-76, 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin Infect Dis**, v. 47, n. 4, p. 554-66, 2008.

MORDUE, D. G.; DESAI, N.; DUSTIN, M.; SIBLEY, L. D. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. **J Exp Med**, v. 190, n. 12, p. 1783-92, 1999.

MORDUE, D. G.; MONROY, F.; LA REGINA, M.; DINARELLO, C. A.; SIBLEY, L. D. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **J Immunol**, v. 167, n. 8, p. 4574-84, 2001.

MOREIRA-SOUZA, A. C. A.; ALMEIDA-DA-SILVA, C. L. C.; RANGEL, T. P.; ROCHA, G. D. C.; BELLIO, M.; ZAMBONI, D. S.; VOMMARO, R. C.; COUTINHO-SILVA, R. The P2X7 Receptor Mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages

through Canonical NLRP3 Inflammasome Activation and Reactive Oxygen Species Production. **Front Immunol**, v. 8, p. 1257, 2017.

MOURA, J. F.; MOTA, J. M.; LEITE, C. A.; WONG, D. V.; BEZERRA, N. P.; BRITO, G. A.; LIMA, V.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. A novel model of megavoltage radiation-induced oral mucositis in hamsters: Role of inflammatory cytokines and nitric oxide. **Int J Radiat Biol**, v. 91, n. 6, p. 500-9, 2015.

MURRAY, H. W.; COHN, Z. A. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. **J Exp Med**, v. 150, n. 4, p. 938-49, 1979.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F.; COHN, Z. A. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. IV. Role of endogenous scavengers of oxygen intermediates. **J Exp Med**, v. 152, n. 6, p. 1610-24, 1980.

MURRAY, H. W.; SZURO-SUDOL, A.; WELLNER, D.; OCA, M. J.; GRANGER, A. M.; LIBBY, D. M.; ROTHERMEL, C. D.; RUBIN, B. Y. Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. **Infect Immun**, v. 57, n. 3, p. 845-9, 1989.

NAGAMUNE, K.; HICKS, L. M.; FUX, B.; BROSSIER, F.; CHINI, E. N.; SIBLEY, L. D. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 207-10, 2008.

NGUYEN, T. D.; BIGAIGNON, G.; MARKINE-GORIAYNOFF, D.; HEREMANS, H.; NGUYEN, T. N.; WARNIER, G.; DELMEE, M.; WARNY, M.; WOLF, S. F.; UYTENHOVE, C.; VAN SNICK, J.; COUTELIER, J. P. Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL12 and gamma-interferon. **J Med Microbiol**, v. 52, n. Pt 10, p. 869-76, 2003.

NIEHUS, S.; ELASS, E.; CODDEVILLE, B.; GUERARDEL, Y.; SCHWARZ, R. T.; DEBIERRE-GROCKIEGO, F. Glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii* induce matrix metalloproteinase-9 production and degradation of galectin-3. **Immunobiology**, v. 217, n. 1, p. 61-4, 2012.

O'BRIEN, C. A.; BATISTA, S. J.; STILL, K. M.; HARRIS, T. H. IL-10 and ICOS Differentially Regulate T Cell Responses in the Brain during Chronic *Toxoplasma gondii* Infection. **J Immunol**, v. 202, n. 6, p. 1755-1766, 2019.

ODBERG-FERRAGUT, C.; RENAULT, J. P.; VISCOGLIOSI, E.; TOURSEL, C.; BRICHE, I.; ENGELS, A.; LEPAGE, G.; MORGENSTERN-BADARAU, I.; CAMUS, D.; TOMAVO, S.; DIVE, D. Molecular cloning, expression analysis and iron metal cofactor characterisation of a superoxide dismutase from *Toxoplasma gondii*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 106, n. 1, p. 121-9, 2000.

ORLOFSKY, A.; SOMOGYI, R. D.; WEISS, L. M.; PRYSTOWSKY, M. B. The murine antiapoptotic protein A1 is induced in inflammatory macrophages and constitutively expressed in neutrophils. **J Immunol**, v. 163, n. 1, p. 412-9, 1999.

OSUNKALU, V. O.; AKANMU, S. A.; OFOMAH, N. J.; ONYIAORAH, I. V.; ADEDIRAN, A. A.; AKINDE, R. O.; ONWUEZUBE, I. A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* IgG antibody in HIV-infected patients at the Lagos University Teaching Hospital. **HIV AIDS (Auckl)**, v. 3, p. 101-5, 2011.

PANDAY, A.; SAHOO, M. K.; OSORIO, D.; BATRA, S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cell Mol Immunol**, v. 12, n. 1, p. 5-23, 2015.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 12, p. 1385-94, 2009.

PAUGAM, A.; DUPOUY-CAMET, J.; SUMUYEN, M. H.; ROMAND, S.; LAMORIL, J.; DEROUIN, F. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by polymerase chain reaction in perorally infected mice. **Parasite**, v. 2, n. 2, p. 181-4, 1995.

PLATA-SALAMAN, C. R. Immunomodulators and feeding regulation: a humoral link between the immune and nervous systems. **Brain Behav Immun**, v. 3, n. 3, p. 193-213, 1989.

PLATTNER, F.; YAROVINSKY, F.; ROMERO, S.; DIDRY, D.; CARLIER, M. F.; SHER, A.; SOLDATI-FAVRE, D. Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 2, p. 77-87, 2008.

POLLARD, A. M.; ONATOLU, K. N.; HILLER, L.; HALDAR, K.; KNOLL, L. J. Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun**, v. 76, n. 1, p. 103-10, 2008.

POLLOCK, J. D.; WILLIAMS, D. A.; GIFFORD, M. A.; LI, L. L.; DU, X.; FISHERMAN, J.; ORKIN, S. H.; DOERSCHUK, C. M.; DINAUER, M. C. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. **Nat Genet**, v. 9, n. 2, p. 202-9, 1995.

PORTES, J. A.; SOUZA, T. G.; DOS SANTOS, T. A.; DA SILVA, L. L.; RIBEIRO, T. P.; PEREIRA, M. D.; HORN, A., JR.; FERNANDES, C.; DAMATTA, R. A.; DE SOUZA, W.; SEABRA, S. H. Reduction of *Toxoplasma gondii* Development Due to Inhibition of Parasite Antioxidant Enzymes by a Dinuclear Iron(III) Compound. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 12, p. 7374-86, 2015.

REMYINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 3, p. 941-5, 2004.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 2, p. 264-96, 2012.

ROBERT, A. M.; ROBERT, L. Xanthine oxidoreductase, free radicals and cardiovascular disease. A critical review. **Pathol Oncol Res**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2014.

ROMA, E. H.; MACEDO, J. P.; GOES, G. R.; GONCALVES, J. L.; CASTRO, W.; CISALPINO, D.; VIEIRA, L. Q. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. **Parasit Vectors**, v. 9, p. 193, 2016.

ROTHWELL, N. J. Cytokines and thermogenesis. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 17 Suppl 3, p. S98-101; discussion 115, 1993.

RYAN, K. A.; SMITH, M. F., JR.; SANDERS, M. K.; ERNST, P. B. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2123-30, 2004.

SANTANA, S. S.; SILVA, D. A.; VAZ, L. D.; PIROVANI, C. P.; BARROS, G. B.; LEMOS, E. M.; DIETZE, R.; MINEO, J. R.; CUNHA-JUNIOR, J. P. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. **Immunol Lett**, v. 143, n. 2, p. 193-201, 2012.

SANTIAGO, H. C.; GONZALEZ LOMBANA, C. Z.; MACEDO, J. P.; UTSCH, L.; TAFURI, W. L.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ALVES, R. O.; ALVES-FILHO, J. C.; ROMANHA, A. J.; CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; RADI, R.; VIEIRA, L. Q. NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1492, 2012.

SASAI, M.; PRADIPTA, A.; YAMAMOTO, M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. **Int Immunol**, v. 30, n. 3, p. 113-119, 2018.

SCANGA, C. A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **J Immunol**, v. 168, n. 12, p. 5997-6001, 2002.

SCHARTON-KERSTEN, T. M.; WYNN, T. A.; DENKERS, E. Y.; BALA, S.; GRUNVALD, E.; HIENY, S.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. **J Immunol**, v. 157, n. 9, p. 4045-54, 1996.

SCHARTON-KERSTEN, T. M.; YAP, G.; MAGRAM, J.; SHER, A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **J Exp Med**, v. 185, n. 7, p. 1261-73, 1997.

SHAPIRA, S.; HARB, O. S.; MARGARIT, J.; MATRAJT, M.; HAN, J.; HOFFMANN, A.; FREEDMAN, B.; MAY, M. J.; ROOS, D. S.; HUNTER, C. A. Initiation and termination of NF-kappaB signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 15, p. 3501-8, 2005.

SHER, A.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; GAZZINELLI, R. T. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol**, v. 150, n. 9, p. 3982-9, 1993.

SHRESTHA, S. P.; TOMITA, T.; WEISS, L. M.; ORLOFSKY, A. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 4, p. 433-41, 2006.

SIBLEY, L. D.; MORDUE, D. G.; SU, C.; ROBBEN, P. M.; HOWE, D. K. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 357, n. 1417, p. 81-8, 2002.

SILVA, N. M.; RODRIGUES, C. V.; SANTORO, M. M.; REIS, L. F.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; GAZZINELLI, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infect Immun**, v. 70, n. 2, p. 859-68, 2002.

SMEYNE, M.; SMEYNE, R. J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 62, p. 13-25, 2013.

SOETE, M.; DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion in vitro. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 219, p. 76-80, 1996.

SON, E. S.; SONG, K. J.; SHIN, J. C.; NAM, H. W. Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Toxoplasma gondii*. **Korean J Parasitol**, v. 39, n. 2, p. 133-41, 2001.

SOUZA, M. C.; FONSECA, D. M.; KANASHIRO, A.; BENEVIDES, L.; MEDINA, T. S.; DIAS, M. S.; ANDRADE, W. A.; BONFA, G.; SILVA, M. A. B.; GOZZI, A.; BORGES, M. C.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Chronic *Toxoplasma gondii* Infection Exacerbates Secondary Polymicrobial Sepsis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, p. 116, 2017.

STUTZ, A.; KESSLER, H.; KASCHEL, M. E.; MEISSNER, M.; DALPKE, A. H. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. **Immunobiology**, v. 217, n. 1, p. 28-36, 2012.

SUBAUSTE, C. Animal models for *Toxoplasma gondii* infection. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 19, p. Unit 19 3 1-23, 2012.

SULCINER, D. J.; IRANI, K.; YU, Z. X.; FERRANS, V. J.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.; FINKEL, T. rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 12, p. 7115-21, 1996.

SUN, P. R.; GAO, F. F.; CHOI, H. G.; ZHOU, W.; YUK, J. M.; KWON, J.; LEE, Y. H.; CHA, G. H. Diphenyliodonium Induces Growth Inhibition of *Toxoplasma gondii* through ROS Induction in ARPE-19 Cells. **Korean J Parasitol**, v. 57, n. 2, p. 83-92, 2019.

SUSS-TOBY, E.; ZIMMERBERG, J.; WARD, G. E. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 16, p. 8413-8, 1996.

SUZUKI, Y.; SHER, A.; YAP, G.; PARK, D.; NEYER, L. E.; LIESENFELD, O.; FORT, M.; KANG, H.; GUFWOLI, E. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, v. 164, n. 10, p. 5375-82, 2000.

TAIT, E. D.; HUNTER, C. A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 201-10, 2009.

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.

TOUYZ, R. M.; CHEN, X.; TABET, F.; YAO, G.; HE, G.; QUINN, M. T.; PAGANO, P. J.; SCHIFFRIN, E. L. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. **Circ Res**, v. 90, n. 11, p. 1205-13, 2002.

VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; MACHADO AZEVEDO, D. O.; CAMPOS, W. R.; OREFICE, F.; QUEIROZ-ANDRADE, G. M.; CARELLOS, E. V.; CASTRO ROMANELLI, R. M.; JANUARIO, J. N.; RESENDE, L. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; DE AGUIAR VASCONCELOS CARNEIRO, A. C.; ALMEIDA VITOR, R. W.; CAIAFFA, W. T.; GROUP, U. C. T. B. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology**, v. 116, n. 11, p. 2199-205 e1, 2009.

WARE, H. H.; KULKARNI, V. V.; WANG, Y.; PANTALEON GARCIA, J.; LEIVA JUAREZ, M.; KIRKPATRICK, C. T.; WALI, S.; SYED, S.; KONTOYIANNIS, A. D.; SIKKEMA, W. K. A.; TOUR, J. M.; EVANS, S. E. Inducible lung epithelial resistance requires multisource reactive oxygen species generation to protect against bacterial infections. **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. e0208216, 2019.

WEISS, G.; SCHAIBLE, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunol Rev**, v. 264, n. 1, p. 182-203, 2015.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 8, p. 895-901, 2009.

WHITMARSH, R. J.; GRAY, C. M.; GREGG, B.; CHRISTIAN, D. A.; MAY, M. J.; MURRAY, P. J.; HUNTER, C. A. A critical role for SOCS3 in innate resistance to *Toxoplasma gondii*. **Cell Host Microbe**, v. 10, n. 3, p. 224-36, 2011.

WILSON, C. B.; TSAI, V.; REMINGTON, J. S. Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages: possible mechanism for survival of intracellular pathogens. **J Exp Med**, v. 151, n. 2, p. 328-46, 1980.

WYSOCKA, M.; KUBIN, M.; VIEIRA, L. Q.; OZMEN, L.; GAROTTA, G.; SCOTT, P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 3, p. 672-6, 1995.

XU, L.; SANG, R.; YU, Y.; LI, J.; GE, B.; ZHANG, X. The polysaccharide from *Inonotus obliquus* protects mice from *Toxoplasma gondii*-induced liver injury. **Int J Biol Macromol**, v. 125, p. 1-8, 2019.

XUE, J.; JIANG, W.; CHEN, Y.; GONG, F.; WANG, M.; ZENG, P.; XIA, C.; WANG, Q.; HUANG, K. Thioredoxin reductase from *Toxoplasma gondii*: an essential virulence effector with antioxidant function. **FASEB J**, v. 31, n. 10, p. 4447-4457, 2017.

YAMAMOTO, M.; OKUYAMA, M.; MA, J. S.; KIMURA, T.; KAMIYAMA, N.; SAIGA, H.; OHSHIMA, J.; SASAI, M.; KAYAMA, H.; OKAMOTO, T.; HUANG, D. C.; SOLDATI-FAVRE, D.; HORIE, K.; TAKEDA, J.; TAKEDA, K. A cluster of interferon-gamma-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 37, n. 2, p. 302-13, 2012.

YAN, X.; JI, Y.; LIU, X.; SUO, X. Nitric oxide stimulates early egress of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from Human foreskin fibroblast cells. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 420, 2015.

YAP, G. S.; SHER, A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **J Exp Med**, v. 189, n. 7, p. 1083-92, 1999.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 2, p. 109-21, 2014.

YU, Y.; SUN, X.; GU, J.; YU, C.; WEN, Y.; GAO, Y.; XIA, Q.; KONG, X. Deficiency of DJ-1 Ameliorates Liver Fibrosis through Inhibition of Hepatic ROS Production and Inflammation. **Int J Biol Sci**, v. 12, n. 10, p. 1225-1235, 2016.

ZHANG, W. J.; WEI, H.; FREI, B. Genetic deficiency of NADPH oxidase does not diminish, but rather enhances, LPS-induced acute inflammatory responses in vivo. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 6, p. 791-8, 2009.

ZHANG, X.; JIN, L.; CUI, Z.; ZHANG, C.; WU, X.; PARK, H.; QUAN, H.; JIN, C. Antiparasitic effects of oxymatrine and matrine against *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. **Exp Parasitol**, v. 165, p. 95-102, 2016.

ZHOU, W.; QUAN, J. H.; LEE, Y. H.; SHIN, D. W.; CHA, G. H. *Toxoplasma gondii* Proliferation Require Down-Regulation of Host Nox4 Expression via Activation of PI3 Kinase/Akt Signaling Pathway. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66306, 2013.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiol Rev**, v. 94, n. 3, p. 909-50, 2014.