



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunopatologia

Papel do ferro na infecção experimental por *Toxoplasma gondii*

Mário Cézar de Oliveira

Uberlândia/MG
Fevereiro - 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Laboratório de Imunopatologia

Papel do ferro na infecção experimental por *Toxoplasma gondii*

Tese apresentada ao Colegiado
do Programa de Pós Graduação
em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como parte de
obtenção do título de Doutor.

Mário Cézar de Oliveira

Orientadora: Dr^a Neide Maria da Silva

Uberlândia/MG
Fevereiro - 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48p
2018 Oliveira, Mário Cézar de, 1989
 Papel do ferro na infecção experimental por *Toxoplasma gondii* /
 Mário Cézar de Oliveira. - 2018.
 112 f. : il.

Orientadora: Neide Maria da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.61>
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Intestino
delgado - Teses. 4. Sulfato ferroso - Teses. I. Silva, Neide Maria da. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Mário Cézar de Oliveira

“Papel do ferro na infecção experimental por *Toxoplasma gondii*”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e
Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 28 de fevereiro de 2018.

Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
UFTM

Prof. Dra. Jair Pereira da Cunha Junior
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Carlos José Freire de Oliveira
UFTM

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva
ICBIM/UFU

Prof. Dra. Neide Maria da Silva – orientadora
ICBIM/UFU

Dedicatória

Aos meus pais, Lia e Lico, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, sempre me apoiando e me incentivando a seguir em frente. Muito obrigado pelo amor incondicional e por todos os esforços que fizeram para que eu chegasse até aqui. Sem vocês nada disso existiria e não teria sentido. Vocês são meus verdadeiros heróis. Obrigado!

À minha irmã, Marina Cézar, por todo o convívio desde criança, pelos momentos de alegria e descontração que vivemos juntos e que temos quando nos encontramos. Obrigado!

À minha esposa, Loyane, que entrou em minha vida no momento certo e que só me trouxe alegrias e satisfações. Obrigado por tudo, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão e pelos momentos incríveis que serão eternos. Pela dedicação, não só na vida pessoal, mas também na vida acadêmica, Te amo!

À Amaury e Regina, duas pessoas incríveis que tive o prazer de conhecer e conviver. Obrigado pela atenção, carinho e pelos momentos juntos. Vocês se tornaram meus segundos pais. Obrigado!

Sem Mais Lágrimas

Chorar não resolve, falar pouco é uma virtude, aprender a se colocar em primeiro lugar não é egoísmo. Para qualquer escolha se segue alguma consequência, vontades efêmeras não valem a pena, quem faz uma vez, não faz duas necessariamente, mas quem faz dez, com certeza faz onze. Perdoar é nobre, esquecer é quase impossível. Quem te merece não te faz chorar, quem gosta cuida, o que está no passado tem motivos para não fazer parte do seu presente, não é preciso perder pra aprender a dar valor, e os amigos ainda se contam nos dedos. Aos poucos você percebe o que vale a pena, o que se deve guardar para o resto da vida, e o que nunca deveria ter entrado nela. Não tem como esconder a verdade, nem tem como enterrar o passado, o tempo sempre vai ser o melhor remédio, mas seus resultados nem sempre são imediatos.

Charles Chaplin

Agradecimentos

À minha orientadora, Dr^a Neide Maria da Silva, por ter me aceitado para fazer meu estágio curricular e me orientado durante o mestrado e doutorado. Pela ajuda durante todo esse período.

Obrigado pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao grupo do Laboratório de Imunopatologia: pelos momentos de trabalho e descontração. Ester, Layane, Natália, Yusmaris, Rômulo, Angelo, Carlos, Mariele e Marisol. De modo especial, obrigado a Dr^a. Loyane Bertagnolli Coutinho, Ms. Ester Borges Araújo, Ms. Marisol Pallete Briceño e Ms. Marcos Paulo Almeida de Oliveira pela ajuda nas reações e no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Histologia e Embriologia: as secretárias Juscélia e Ana e aos técnicos: Fabrício, Ester, Rosiane e Mariani, obrigado pelo convívio e pelos momentos de descontrações.

As colegas do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução: Dr^a Eloisa Amália Vieira Ferro e Dr^a Bellisa de Freitas Barbosa. Obrigado pela atenção e ajuda.

As secretárias da Pós-Graduação, Lucileide e Lucélia, pela ajuda e atenção em resolver todos os problemas encontrados.

Ao apoio financeiro da CAPES, FAPEMIG e CNPQ.

Lista de abreviações

- ABC - Complexo avidina biotina
BSA - Albunima de soro bovino
DCYTB - Citocromo duodenal B
DFO - Deferoxamina
DMT-1 - Transportador divalente de metal 1
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO - Eosinófilo peroxidase
FAC - Citrato de amônio férrico
FPN-1 - Ferroportina 1
GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HAMP - Gene para transcrição do peptídeo antimicrobrial da hepcidina
IFN- γ - Interferon gama
IL - Interleucina
M - Molaridade
 $MgCl_2$ - Cloreto de magnésio
MPO - Mieloperoxidase
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl - Cloreto de sódio
NAG - β -N-acetylglucosaminidase
PBS - Tampão fosfato salino
PBS-T - Tampão fosfato salino Tween
pH - Potencial hidrogeniônico
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
RNA - Ácido ribonucleico
SOCS3 - Supressor da sinalização de citocina 3
STAg - Antígeno solúvel de taquizoíto
TNF - Fator de necrose tumoral

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da absorção de ferro pelos enterócitos.....	15
Figura 2. Representação esquemática comparando a ultraestrutura de dois estágios infectantes de <i>T. gondii</i>	22
Figura 3. Acúmulo de ferro no intestino delgado de camundongos C57BL/6.....	56
Figura 4. Acúmulo de ferro no pulmão e fígado de camundongos C57BL/6.....	58
Figura 5. Ferro sérico, variação de peso, porcentagem de sobrevivência e comprimento intestinal de camundongos C57BL/6.....	61
Figura 6. Número de parasitos, escore inflamatório, NAG, MPO, EPO, células caliciformes e células de Paneth no intestino de camundongos C57BL/6.....	64/65
Figura 7. Expressão relativa de <i>ifny</i> , <i>dcytb</i> , <i>dmt1</i> , <i>fpn1</i> e <i>hamp</i> de camundongos C57BL/6.....	68
Figura 8. Número de parasitos e área alveolar pulmonar em camundongos C57BL/6.....	70
Figura 9. Número de parasitos, peso hepático, TGP e foco inflamatório de camundongos C57BL/6.....	72
Figura 10. Perfil de citocinas: IFN-γ, TNF, IL-6, IL-2, IL-4 e IL-10 de camundongos C57BL/6.....	74
Figura 11. Níveis de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> IgM e IgA no soro e IgA secretada anti- <i>T. gondii</i> e anti- <i>E. coli</i> nas fezes de camundongos C57BL/6.....	77
Figura 12. Viabilidade celular e número de parasitos em células Caco-2.....	79

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista das sequências dos <i>primers</i> utilizados para os ensaios de expressão gênica por qPCR.....	50
---	----

Sumário

Resumo.....	X
Abstract.....	XI
1.Introdução.....	13
1.1 Papel do ferro nos processos biológicos.....	13
1.2 Absorção e transporte de ferro.....	13
1.3 Regulação da homeostasia do ferro.....	15
1.4 Organismo infeccioso.....	17
1.5 Epidemiologia.....	18
1.6 Cepas de <i>T. gondii</i>	19
1.7 <i>Toxoplasma gondii</i>	20
1.8 Intereração parasito - hospedeiro.....	23
1.9 Formas infectantes e ciclo biológico.....	24
1.10 Resposta Imune ao parasito.....	27
1.11 Microorganismos patogênicos e aquisição de ferro.....	32
2. Justificativa.....	34
3. Objetivos.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. Materiais e Métodos.....	38
4.1 Experimento <i>in vivo</i>	38
4.1.1 Animais de experimentação.....	38
4.1.2 Organismo infeccioso – ME-49 de <i>T. gondii</i>	38
4.1.3 Modelo experimental.....	38
4.1.4 Coloração de Perls.....	39
4.1.5 Dosagem de ferro sérico.....	40
4.1.6 Comprimento intestinal.....	40
4.1.7 Análise histológica.....	41
4.1.8 Coloração de Alcian Blue para detecção de células caliciformes.....	42
4.1.9 Quantificação de células de Paneth em cortes histológicos de intestino delgado..	42
4.1.10 Quantificação de mieloperoxidase (MPO) e β-N-acetilglucosaminidase (NAG) no intestino delgado.....	43
4.1.11 Quantificação de eosinófilo peroxidase (EPO) no intestino delgado.....	44
4.1.12 Imunohistoquímica para detecção de parasitos.....	45
4.1.13 Dosagem sérica de transamisase pirúvica.....	45
4.1.14 Quantificação de IgM, IgA e IgA secretada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).....	46
4.1.15 Mensuração de citocinas no soro dos animais experimentais por “Cytometric Beads Arrays” (CBA).....	47
4.1.16 Avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA) para DMT-1, DYCTB, HAMP, FPN, IFN-γ e GAPDH no intestino delgado.....	48
4.1.17 Extração de mRNA e confecção do DNA complementar.....	48
4.1.18 Quantificação das mensagens por reação de PCR quantitativo (qPCR).....	49
4.2 Experimento <i>in vitro</i>	50
4.2.1 Cultura celular.....	50
4.2.2 Organismo infeccioso - clone RH-2F1 de <i>T. gondii</i>	51
4.2.3 Análise de viabilidade celular	51
4.2.4 Infecção e tratamento das células Caco-2.....	52
4.3 Análise estatística.....	54

4.4 Normas de Biossegurança.....	54
5. Resultados.....	55
5.1 Infecção por <i>T. gondii</i> induz acúmulo de ferro no intestino delgado.....	54
5.2 Infecção por <i>T. gondii</i> induz acúmulo de ferro no pulmão e fígado.....	57
5.3 Privação e suplementação de ferro influenciam a infecção oral por <i>T. gondii</i> em camundongos C57BL/6.....	59
5.4 <i>T. gondii</i> necessita de ferro para sua replicação no intestino delgado e altera o perfil celular intestinal.....	62
5.5 Infecção por <i>T. gondii</i> induz mudança na expressão gênica de marcadores que controlam a absorção de ferro no intestino delgado.....	66
5.6 A privação de ferro está envolvida no controle da proliferação de <i>T. gondii</i> e alterações histológicas no pulmão dos animais infectados.....	69
5.7 A disponibilidade de ferro está envolvida na proliferação de <i>T. gondii</i> no fígado assim como as alterações histológicas induzidas pelo parasito no órgão.....	71
5.8 Privação ou suplementação de ferro altera a detecção sistêmica de IL-6 e IL10 em camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. gondii</i>	73
5.9 Camundongos C57BL/6 desenvolvem níveis similares de IgM e IgA total específico durante infecção por <i>T. gondii</i> independente a privação ou suplementação de ferro.....	75
5.10 Suplementação com ferro aumenta a quantidade de parasitos <i>in vitro</i> na linhagem celular de adenocarcinoma do cólon humano (Caco-2).....	78
6. Discussão.....	80
7. Conclusões.....	92
8. Referências Bibliográficas.....	94
9. Anexo I (Comitê de Ética em Experimentação Animal).....	112
10. Anexo II (Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos).....	113

Resumo

Muitos microorganismos desenvolveram a habilidade de adquirir ferro a partir do seu hospedeiro para seu próprio metabolismo. *Toxoplasma gondii*, um parasito intracelular obrigatório, produz proteínas de tropílias que são capazes de ligar ao transportador de ferro. Além disso, quelante de ferro foi capaz de controlar o parasitismo em células intestinais de rato. Logo, este trabalho teve como objetivo investigar a relação do efeito da adição ou privação de ferro na multiplicação de *T. gondii* e resultado da infecção quando o parasito é administrado por via oral e em cultura celular. Camundongos C57BL/6 foram infectados oralmente com *T. gondii* e tratados com um quelante de ferro, deferoxamina ou suplementados com ferro e o parasitismo, parâmetros imunológicos e histológicos foram analisados. Observou-se que a infecção aumentou a deposição de ferro no intestino delgado, pulmão e fígado e também sistematicamente. O tratamento com deferoxamina foi capaz de diminuir os níveis de ferro nas amostras de soro. O tratamento com deferoxamina diminuiu a carga parasitária no intestino delgado e alterações inflamatórias no órgão, preservando seu comprimento e também diminuiu o parasitismo pulmonar. Além disso, a suplementação com ferro aumentou a carga parasitária no intestino delgado, pulmão e fígado, associado com alterações inflamatórias nesses órgãos, bem como houve aumento da proliferação parasitária em cultivo celular com células Caco-2. A infecção oral modulou o perfil de expressão de marcadores de absorção de ferro, aumentando os níveis de IL-6 sistêmicos. Juntos, nossos resultados sugerem que a quelação de ferro comumente usada para tratar a sobrecarga de ferro pode ser um medicamento promissor para controlar a proliferação de *T. gondii* e consequentemente a inflamação causada por infecção e que o ferro é um nutriente essencial para o metabolismo de *T. gondii*.

Palavra chave: *Toxoplasma gondii*, ferro, deferoxamina, sulfato ferroso, intestino delgado

Abstract

Many microorganisms have developed the ability to acquire iron from their host to their own metabolism. *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular parasite, produces rhoptry proteins that are capable of binding to the iron transporter. In addition, iron chelator was able to control parasitism in rat intestinal cells. Therefore, the objective of this work was to investigate the relationship of the effect of iron addition or deprivation on the multiplication of *T. gondii* and the result of infection when the parasite is administered orally and in cell culture. C57BL/6 mice were orally infected with *T. gondii* and treated with an iron chelator, deferoxamine or iron supplemented and parasitism, immunological and histological parameters were analyzed. It was observed that the infection increased the deposition of iron in the small intestine, lung and liver and also systematically. Treatment with deferoxamine was able to decrease iron levels in the serum samples. Treatment with deferoxamine reduced parasite burden in the small intestine and inflammatory changes in the organ, preserving its length and also decreased pulmonary parasitism. In addition, iron supplementation increased parasite burden in the small intestine, lung and liver, associated with inflammatory changes in these organs, as well as increased parasite proliferation in cell culture with Caco-2 cells. Oral infection modulated the expression profile of iron absorption markers, increasing systemic IL-6 levels. Together, our results suggest that iron chelation commonly used to treat iron overload may be a promising drug to control *T. gondii* proliferation and consequently inflammation caused by infection and that iron is an essential nutrient for the metabolism of *T. gondii*.

Keyword: *Toxoplasma gondii*, iron, deferoxamine, ferrous sulfate, small intestine

1. Introdução

1.1 Papel do ferro nos processos biológicos

O ferro é um importante constituinte do nosso ambiente e um biometal necessário para quase todas as formas de vida. O ferro é incorporado em múltiplas proteínas, tais como na forma de cofatores orgânicos (heme) ou na forma de cofatores inorgânicos (grupos enxofre-ferro; ISC) (LILL, 2001). Proteínas contendo ferro exercem uma ampla variedade de funções orgânicas que incluem transporte de gases, transferência de elétrons na cadeia respiratória, catálise de biossíntese e biodegeneração, fatores de transcrição, enzimas do metabolismo intermediário e síntese e reparo de DNA (GOZZELINO et al., 2010; SHEFTEL et al., 2010), bem como formação de células vermelhas, função imune, desenvolvimento fetal e bem estar físico e mental (DAO, MEYDANI, 2013).

Adicionalmente, o corpo não tem meios ativos de excreção de ferro, portanto, a regulação no duodeno da absorção de ferro a partir da dieta desempenha um papel crítico na homeostasia do ferro (SIAH et al., 2006). Isso é extremamente importante, pois o ferro é essencial para o metabolismo celular, e a sobrecarga de ferro intracelular leva à toxicidade e morte celular através da formação de radicais livres e da peroxidação lipídica, portanto, a homeostasia de ferro requer uma regulação adequada (ANDREWS, 1999; MUÑOZ et al., 2009).

1.2 Absorção e transporte de ferro

A absorção do ferro da dieta, onde estão presentes as formas heme e não-heme, é realizada nas microvilosidades dos enterócitos nas regiões do duodeno e jejuno proximal (FRAZER, ANDERSON, 2005) (Figura 1). O primeiro passo no processo de

absorção é a captação do ferro no lúmen do intestino através da membrana apical nos enterócitos. Esse processo é mediado pelo transportador de metal divalente 1 (DMT-1; também conhecido como DCT-1 ou Nramp2), membro das proteínas de macrófagos associadas a resistência natural (Nramp), o qual transporta ferro na forma ferroso (Fe^{2+}) (GUNSHIN et al., 1997; CANONNE-HERGAUX et al., 1999; MACKENZIE et al., 2005). No entanto, grande parte do ferro proveniente da dieta está na forma oxidada ou férrica (Fe^{3+}) e, portanto, deve ser reduzido antes de ser absorvido pelos enterócitos. A redução do ferro férrico para o ferro ferroso é realizado por uma redutase férrica intestinal conhecida como enzima citocromo duodenal B (DcytB) (MCKIE et al., 2001; LATUNDE-DADA et al., 2008; LUO et al., 2014) (Figura 1).

Uma vez dentro do enterócito, o ferro intracelular pode ser utilizado diretamente para processos metabólicos (por exemplo, biossíntese da heme), pode ser estocado na forma de ferritina ou transportado para membrana basolateral dos enterócitos (FORD et al., 1984). A saída do ferro intracelular pela membrana basolateral e entrada na circulação é mediada por uma proteína transportadora de ferro, a ferroportina 1 (FPN-1; conhecida também como proteína transportadora de metal 1, MTP-1; ou transportador regulador de ferro 1, IREG-1), sendo esse transporte realizado na forma de ferro ferroso (DONOVAN et al., 2000; 2005). A ferroportina também é expressa pelos hepatócitos, macrófagos e células da placenta (NEMETH et al., 2004). Ferroportina é acoplada com hefaestina, uma ferroxidase presente na membrana basolateral dos enterócitos (HAN, KIM, 2007; YEH et al., 2011). A hefaestina funciona convertendo ferro ferroso para ferro férrico o qual pode se ligar a apo-transferrina no sangue e ser transportado pelo corpo (CHEN et al., 2004). Em mamíferos, o ferro extracelular é transportado pela transferrina (Tf) ou lactoferrina (Lf), que são encontrados no sangue ou na mucosa, respectivamente (HUEBERS et al., 1976; FARNAUD, EVANS, 2003) (Figura 1).

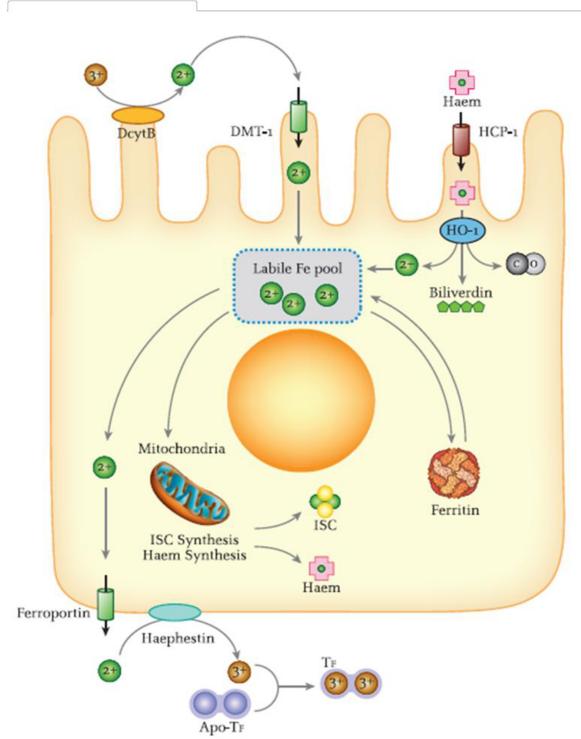


Figura 1. Representação esquemática da absorção de ferro pelos enterócitos. Ferro férreo (3^+); ferro ferroso (2^+); citocromo duodenal B (DcytB); transportador de metal divalente 1 (DMT-1); heme (Haem); proteína carreadora de heme 1 (HCP-1); hemeoxigenase (HO-1); transferrina (Tf); grupos enxofre-ferro (ISC); biliverdina (biliverdin); mitocôndria (mitochondria); ferroportina (ferroportin); hefaestina (haephestin); apo-transferrina (Apo-Tf); ferritina (ferrintin); proteína transportadora de heme (HCP-1); heme-oxygenase (HO-1). Adaptado de EVSTATIEV, GASCHE, 2012.

1.3 Regulação da homeostasia do ferro

A absorção de ferro pelos enterócitos é dependente do estoque de ferro no corpo, hipóxia, inflamação e taxa da eritropoiese. Dois mecanismos diferentes são observados na regulação da absorção de ferro. O primeiro mecanismo é pós-transcricional intracelular, baseado no sistema dependente de ferro IRP/IRE (proteína reguladora de ferro / elemento responsivo de ferro), e coordena a síntese de certas proteínas envolvidas no metabolismo de ferro intracelular. No segundo, o mecanismo é sistêmico e o ferro sérico é dependente da hepcidina (THEIL, EISENSTEIN, 2000; NICOLAS et al., 2002a; SCHNEIDER, LEIBOLD, 2003; MUÑOZ et al., 2011).

A concentração de ferro intracelular controla a interação citoplasmática entre IRP/IRE. Quando os níveis de ferro estão baixos, ocorre a interação entre IRP (proteínas ligadoras de RNA citoplasmático) e IRE, levando a regulação de proteínas da homeostasia do ferro, tais como, prevenindo a degradação do mRNA de DMT-1 e receptor de transferrina (TfR) através da ligação na região 3' não traduzida do mRNA. Assim, a atividade da IRP reflete uma baixa nos estoques de ferro do corpo e resulta na regulação positiva dessas proteínas nos enterócitos aumentando a absorção de ferro a partir da dieta. Além disso, a interação entre IRP/IRE na região 5' não traduzida do mRNA ocasiona a inibição da transcrição do mRNA de ferroportina, ferritina, aconitase mitocondrial e 5'-ácido aminolevulínico sintase, aumentando a quantidade de ferro nos enterócitos (KLAUSNER et al., 1993; MUCKENTHALER et al., 2008; MUÑOZ et al., 2009).

A hepcidina é um hormônio peptídeo pequeno (25 aminoácidos) produzido predominantemente por hepatócitos e secretado na corrente sanguínea, o qual interage com os enterócitos regulando a taxa de absorção do ferro (PARK et al., 2001; NEMETH, GANZ, 2009). A hepcidina interage diretamente com a ferroportina na membrana basolateral dos enterócitos levando a sua internalização e degradação através da fosforilação de tirosina, ubiquitinação e degradação no lisossomo (NEMETH et al., 2004; RAMEY et al., 2010). Macrófagos e neutrófilos também sintetizam hepcidina em resposta a agentes infecciosos permitindo a modulação da disponibilidade de ferro nos sítios de infecção (PEYSSONNAUX et al., 2006).

Altos níveis de ferro e a perda associada da função de exportação de ferro apresentam várias consequências. Primeiro, o ferro absorvido no intestino não entra na circulação, mas permanece preso nos enterócitos ou são perdidos nas fezes (OATES et al., 2000; MUSUMECI et al., 2014). Segundo, a degradação da ferroportina em

hepatócitos e macrófagos impede o fluxo de ferro para ser estocado nos órgãos apropriados, resultando em uma circulação baixa de ferro e sobrecarga de ferro intracelular. E terceiro, quando a hepcidina é altamente expressa durante o desenvolvimento embrionário, os fetos desenvolvem anemia grave por deficiência de ferro, indicando que a hepcidina inibe o transporte placentário de ferro (NICOLAS et al., 2002b).

A expressão da hepcidina é aumentada durante infecções e doenças inflamatórias crônicas. Isso resulta na deficiência funcional de ferro devido ao bloqueio nas vias de exportação do ferro, possivelmente um mecanismo de defesa do hospedeiro contra microorganismos (WEISS, GOODNOUGH, 2005). Citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e IL-1, aumentam a transcrição de mRNA de hepcidina via STAT-3 (LEE et al., 2005; VERGA FALZACAPPA et al., 2007).

1.4 Organismo infeccioso

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, sendo capaz de infectar e replicar em células nucleadas do hospedeiro, que incluem todos os animais de sangue quente e alguns invertebrados, tornando-se um patógeno de importância médica e veterinária, apresentando distribuição mundial (REY, 2001; DUBEY, 2004).

T. gondii teve seu primeiro registro feito por Charles Nicolle e Louis Manceaux (1908) em células mononucleares do baço e do fígado de roedores africanos (*Ctenodactylus gundi*) e simultaneamente por Alfonso Splendore (1908) no Brasil identificando o parasito em tecido de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Nicolle e Manceaux nomearam o gênero *Toxoplasma* por apresentar uma forma de arco (do grego: toxo, arco; plasma, vida) (KIM, WEISS, 2008). Embora *T. gondii* apresente uma

distribuição mundial, existe apenas uma espécie *Toxoplasma gondii* descrita no gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 2008).

Desde seu reconhecimento como agente causador da toxoplasmose (1930), muitas manifestações clínicas têm sido atribuídas à infecção por *T. gondii* incluindo linfoadenopatia, ileíte, coriorretinite, encefalite e infecções oculares tanto em crianças como em adultos. Geralmente assintomática e subclínica, a toxoplasmose pode ser grave para muitos hospedeiros, incluindo os humanos. *T. gondii* pode ser letal para o desenvolvimento fetal (causando aborto espontâneo ou doenças congênitas) e para indivíduos imunocomprometidos (portadores do vírus HIV) (JACKSON, HUTCHISON, 1989; TENTER et al., 2000; WEISS, DUBEY, 2009).

1.5 Epidemiologia

Estima-se que aproximadamente 25-30% da população humana mundial esteja infectada por *T. gondii* (MONTOYA, LIESENFELD, 2004). Contudo, as prevalências variam muito entre países e, muitas vezes dentro de um determinado país ou entre diferentes comunidades de uma mesma região (PAPPAS et al., 2009). Baixa soroprevalência (10-30%) foi encontrada na América do Norte, sudoeste da Ásia, norte da Europa e nos países em torno do deserto do Saara na África. Prevalências moderadas (30-50%) foram encontradas em países localizados no centro e no sul da Europa e altas prevalências foram encontradas na América Latina e nos países Africanos tropicais (ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012; FLEGR et al., 2014). No Brasil, 50-80% da população adulta é soropositiva para infecção por *T. gondii* e a transmissão pela água tem sido implicada como uma das maiores causas de infecção nos humanos (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DE MOURA et al., 2006).

1.6 Cepas de *T. gondii*

As cepas de *T. gondii* são altamente diversas, contudo, apenas algumas linhagens estão amplamente espalhadas. Diferentes genótipos do parasito mostram grande diversidade em patogenicidade e sensibilidade a drogas. Na Europa, América do Norte e África existem três linhagens clonais dominantes de *T. gondii* conhecidas como tipo I, tipo II e a tipo III (SIBLEY, BOOTHROYD, 1992; FLEGR et al., 2014). Essas linhagens diferem em sua prevalência, virulência, capacidade migratória dentro do hospedeiro e habilidade para converter em bradizoítos. Expansões dessas linhagens coincidem com a domesticação de gatos, bem como, mudanças na prática agrícola (SU et al., 2003). Múltiplas infecções com diferentes cepas podem resultar na produção de um número grande de formas recombinantes e atípicas, que são altamente prevalentes na América do Sul onde cepas exóticas, tais como COUG, MAS e CAST são encontradas (LINDSTRÖM et al., 2008; SIBLEY et al., 2009; DUBEY et al., 2011).

Cepas do tipo I (RH, GT1, CAST e VEL) são virulentas em camundongos e podem causar a morte desses animais. Em humanos, a cepa tipo I está associada a manifestações clínicas graves da toxoplasmose, incluindo manifestações oculares atípicas e surtos agudos, além de ser registradas em pacientes com doenças congênitas (APPLEFORD, SMITH, 2000; GRIGG et al., 2001; BOOTHROYD, GRIGG, 2002).

As cepas do tipo II (ME-49, WIL, PDS e PLK) e tipo III (VEG, MOO, SOU e CEP) são显著mente menos virulentas em camundongos e a infecção por essas cepas tendem a cronificar. Cepa tipo II são mais comumente isolado a partir de casos clínicos de toxoplasmose em seres humanos e em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Cepas do tipo III têm sido registradas a partir de isolados de animais (HOWE, SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002).

Um estudo realizado em Uberlândia - MG demonstrou uma alta prevalência de frangos soropositivos para *T. gondii* (71.3%). Além disso, foram isolados e caracterizados a partir do coração de frangos dois novos clones de *T. gondii* denominados de UD1 e UD2, ambos demonstraram alta virulência em modelo de camundongos, sendo a UD1 capaz de induzir formação de cisto cerebral (LOPES et al., 2016).

1.7 *Toxoplasma gondii*

Morfologicamente *T. gondii* possui uma estrutura alongada com forma curvilínea ou crescente com as extremidades arqueadas, podendo também apresentar um formato oval, indicando o início do processo de divisão celular (REY, 2001). Em seu interior encontramos núcleo, situado na região central do parasito ou mais próximo da extremidade posterior, organelas característica de células eucariontes (mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e lisossomo), além de outras organelas particulares ao parasito (conóide, micronemas, roptrias e grânulos densos) (DUBEY et al., 1998; NEVES, 2005) (Figura 2).

A região anterior do parasito é caracterizada pela presença do complexo apical onde se encontra o conóide (Figura 2). O conóide é uma estrutura em forma de cone, formada por três anéis de microtúbulos, sendo dois na região apical e um situado posteriormente, conhecido como anel polar. Do anel polar parte uma rede de citoesqueleto composta por vinte e dois microtúbulos que se dispõe de maneira espiral sob o complexo de membrana interna e se estendem em sentido a região posterior do parasito. No interior do conóide estão as micronemas e roptrias (LERICHE, DUBREMETZ, 1990; NEVES, 2005). Além de manter a forma do parasito, estas estruturas estão envolvidas com a mobilidade e direcionamento de vesículas secretórias

durante o mecanismo de invasão a célula hospedeira (DUBEY et al., 1998; HU et al., 2006).

As micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas, domínios tipo integrinas, fator de crescimento epitelial e lectina, sendo localizada na região apical do parasito (FOURMAUX et al., 1996; MEISSNER et al., 2002; SAOUROS et al., 2005) (Figura 2). Essas organelas atuam no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores de superfícies da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002; NEVES, 2005). Onze proteínas de micronemas já foram descritas (MIC1 a MIC11), sendo que a MIC1, MIC4 e MIC6 possuem propriedades de adesão celular (CARRUTHERS, 2002; SIBLEY, 2004).

As roptrias são organelas especializadas associadas com as micronemas, sendo seu conteúdo liberado durante a invasão do parasito, movimento de junção e formação do vacúolo parasitóforo (BRADLEY et al., 2005; BOOTHROYD, DUBREMETZ, 2008). Roptrias estão localizadas na região anterior ao núcleo do parasito e são constituídas por formações membranosas de extremidades dilatadas (LYCKE et al., 1975; BLACK, BOOTHROYD, 2000) (Figura 2). Já foram descritas vinte e nove proteínas de roptrias (ROP1 a ROP29) e elas estão associadas à internalização do parasito à célula hospedeira (BOOTHROYD, DUBREMETZ, 2008). Essa internalização é feita através da liberação de enzimas proteolíticas, como ROP-1 que atuam na digestão de proteínas da membrana celular do hospedeiro (KIM, WEISS, 2004). Além disso, as roptrias liberam seu conteúdo protéico no citoplasma da célula hospedeira e atuam na formação do vacúolo parasitóforo ficando associadas a ele, garantindo a natureza não fusogênica do vacúolo e atuando no recrutamento de mitocôndrias e retículo endoplasmático (SINAI et al., 1997; CARRUTHERS, 2002; SINAI, 2008). Outras proteínas tais como Rab11 e toxofilina têm sido identificadas

como proteínas pertencentes às roptrias. Rab11 está envolvida no controle de reciclagem do colesterol, enquanto toxofilina se liga a actina facilitando a invasão do parasito (POUPEL et al., 2000; HÖLTTÄ-VUORI et al., 2002).

Além dessas organelas, há no citoplasma dos parasitos, estruturas envoltas por membranas de conteúdo elétron-denso (Figura 2). Tais estruturas denominam-se grânulos densos e contém uma família de glicoproteínas de diferentes pesos moleculares (GRA1 a GRA10). Uma das funções desses grânulos é a liberação de glicoproteínas no vacúolo parasitóforo, possibilitando ao parasito evadir das respostas imunes da célula hospedeira, bem como a formação de túbulos especializados para aumentar a aquisição de nutrientes pelo parasito (COPPENS et al., 2006; CARRUTHERS, BOOTHROYD, 2007).

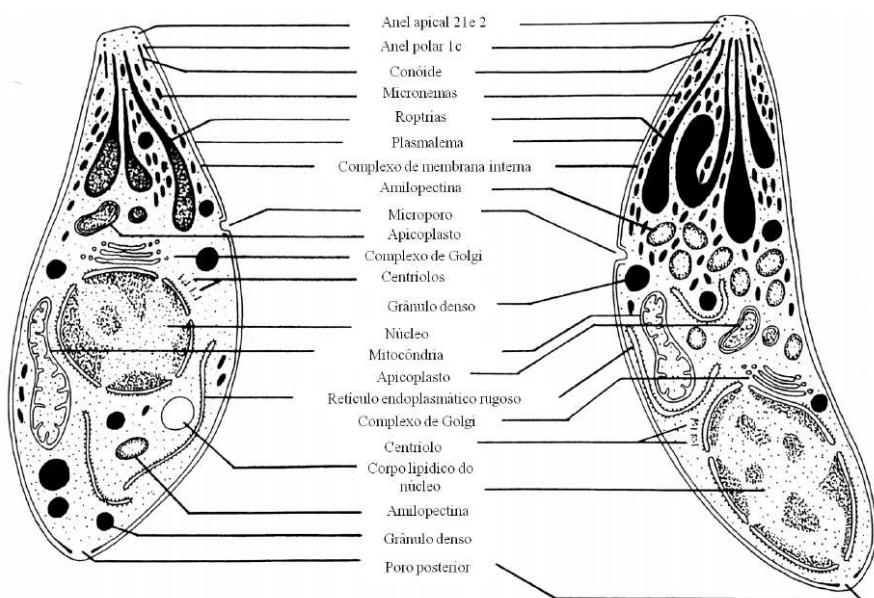


Figura 2. Representação esquemática comparando a ultraestrutura de dois estágios infectantes de *T. gondii*. Taquizoíto (esquerda) e bradizoíto (direita). Adaptado de DUBEY et al., 1998.

1.8 Interação parasito - hospedeiro

T. gondii apresenta a capacidade de invadir uma variedade de células do hospedeiro. Essa invasão é um processo ativo, complexo e depende de múltiplos fatores de regulação, tais como, mobilidade do parasito e secreção de proteínas a partir de suas organelas (micronemas, roptrias e grânulos densos) (BLADER, SAEIJ, 2009; ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012).

A interação com a membrana celular do hospedeiro é um pré-requisito para invasão do parasito e requer a secreção de adesinas dependente de cálcio a partir das micronemas, tais como MIC2, que reconhecem receptores celulares do hospedeiro e promovem a orientação do parasito (WANG et al., 2014). A invasão celular depende de uma interação entre a superfície da célula hospedeira e do parasito, o qual leva a um processo denominado movimentação do tipo *gliding*, onde ocorre uma interação entre actina-miosina e rearranjos dinâmicos do citoesqueleto do parasito (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Essa invasão é um processo rápido, ocorrendo entre 15 a 30 segundos, sendo distinto do processo normal de endocitose (ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012).

T. gondii forma uma associação forte entre sua extremidade apical e a membrana da célula hospedeira, o qual ocasiona a internalização do parasito dentro do vacúolo parasitóforo. Esse movimento de junção induz o parasito a expressar em sua superfície o antígeno de membrana apical (AMA1), secretado pelas micronemas, e a secreção de proteínas constituintes das roptrias (RONs), tais como RON2, RON4, RON5 E RON8. Juntas, essas proteínas promovem a locomoção do parasito para o interior da célula hospedeira (ALEXANDER et al., 2005; DUBREMETZ, 2007; STRAUB et al., 2009). A formação da membrana do vacúolo parasitóforo requer a secreção de proteínas das roptrias, tais como ROP-2 e ROP-18, bem como a secreção de proteínas dos grânulos

densos durante a primeira hora após a invasão do parasito (EL HAJJ et al., 2007; LALIBERTÉ, CARRUTHERS, 2008).

A maioria das proteínas transmembranas do hospedeiro são removidas da membrana do vacúolo parasitóforo durante o processo de invasão, alterando assim as características bioquímicas da membrana do vacúolo parasitóforo e impedindo a fusão com lisossomos ou qualquer vesícula citoplasmática. A secreção de grânulos densos também mantém o desenvolvimento de uma rede complexa de túbulos de membrana que se desenvolve a partir da membrana do vacúolo parasitóforo e se estende até o lúmen vacuolar (MERCIER et al., 2005).

Essa rede de túbulos está envolvida na troca de nutrientes entre o parasito e a célula hospedeira, facilitando o tráfego de triptofano, arginina, poliamidas, purinas, colesterol, ferro entre outros nutrientes essenciais do citoplasma celular para o parasito, auxiliando em sua sobrevivência (CHAUDHARY et al., 2004; FOX et al., 2004; GAIL et al., 2004; SEABRA et al., 2004; NISHIKAWA et al., 2005; LALIBERTÉ, CARRUTHERS, 2008). Além disso, o vacúolo parasitóforo está associado com as mitocôndrias da célula hospedeira contribuindo para o metabolismo do parasito (ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012). A saída do parasito da célula é um processo ativo que depende do aumento nas concentrações de cálcio intracelular liberado a partir do armazenamento celular (SIBLEY, 2010).

1.9 Formas infectantes e ciclo biológico

T. gondii apresenta uma forma de vida heteroxênica, tendo como hospedeiro definitivo (reprodução sexuada) os felídeos e hospedeiros intermediários (reprodução assexuada) animais de sangue quente, incluindo humano e aves. O parasito apresenta três formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos e oocistos (TENTER et al., 2000;

ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012). Todas as três formas são infecciosas tanto para o hospedeiro definitivo quanto para o hospedeiro intermediário, e sua via de transmissão ocorre principalmente por ingestão oral de oocistos infecciosos do meio ambiente (solo, água ou alimentos), ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida e transmissão transplacentária de taquizoítos, além disso, taquizoítos podem ser transmitidos através do leite materno para o filho (DUBEY et al., 1998; CARRUTHERS, SUZUKI, 2007).

O taquizoíto é a forma de disseminação do parasito (grego: *tachis* = rápido), medindo 2-4 µm de largura e 4-8µm de comprimento, capaz de invadir todo tipo de célula por penetração ativa, multiplicando dentro do vacúolo parasitóforo. Depois de repetidas replicações, as células do hospedeiro são rompidas e os taquizoítos são disseminados pela corrente sanguínea infectando todo o organismo, incluindo o sistema nervoso central, olhos, tecido muscular cardíaco ou esquelético e placenta. Taquizoítos causam uma resposta inflamatória forte, levando a destruição tecidual característica das manifestações clínicas da doença. Sua transformação em bradizoítos ocorre devido à pressão da resposta imune do hospedeiro (DUBEY et al., 1998; MONTOYA, LIESENFELD, 2004).

Os bradizoítos são originados a partir da conversão dos taquizoítos em estágios de divisão lenta (grego: *brady* = lento), são encontrados dentro de cistos teciduais durante a infecção crônica. São morfologicamente idênticos aos taquizoítos, contudo expressam moléculas de estágio específico, apresentando função diferente. Cistos teciduais contêm centenas a milhares de bradizoítos e são formados dentro das células hospedeiras encontradas no tecido muscular cardíaco ou esquelético e cérebro. Seu tamanho é variado podendo medir entre 5 -70 µm. Os bradizoítos podem ser liberados dos cistos e se diferenciarem em taquizoítos causando o reaparecimento da infecção em

pacientes imunocomprometidos (DUBEY et al., 1998; MONTOYA, LIESENFELD, 2004).

Os oocistos são esféricos, medem entre 10-12 μm e possuem uma parede dupla robusta que lhe confere proteção contra ações mecânicas e químicas. Sua parede é formada por mais de 90% de proteínas. Os oocistos são a forma de resistência do parasita e são encontrados nas fezes de felídeos. Durante a infecção aguda, milhares de oocistos são liberados nas fezes dos gatos por 7-21 dias, esses oocistos contém esporozoítos que dão origem aos taquizoítos (DUBEY et al., 1998; MAI et al., 2009; DUMÈTRE et al., 2013).

A reprodução sexual ocorre somente em felídeos (gatos domésticos ou selvagens). Após a ingestão de cistos presentes no tecido de um hospedeiro intermediário, a parede do cisto é destruída por enzimas gástricas. Os bradizoítos infectam os enterócitos, onde começam a multiplicação assexuada (endodiogenia), caracterizada pelo desenvolvimento de merozoítos dentro do esquizonte (DUBEY, 1998). Esse primeiro passo é seguido por um desenvolvimento sexual com a formação dos gametas masculinos e femininos (gametogonia) no epitélio do intestino delgado (FERGUSON, 2002). Após a fertilização, oocistos formados dentro dos enterócitos, são liberados no lúmen intestinal por rompimento das células e excretados como forma não esporulada nas fezes de gatos (TENTER et al., 2000).

O processo de esporogonia ocorre após alguns dias no meio externo. Mudanças morfológicas levam a formação de um oocisto esporulado com dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos haploides. A liberação de oocistos começa 3 a 7 dias após a ingestão de cistos teciduais e pode continuar por mais 20 dias. Gatos infectados podem liberar em torno de 100 milhões de oocistos nas fezes (JONES, DUBEY, 2010). Esses podem infectar vários hospedeiros intermediários, praticamente todos os animais

de sangue quente, de mamíferos a aves, quando ingeridos juntos aos alimentos ou água. Oocistos também podem infectar outros gatos embora seja menos eficiente (ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012).

No hospedeiro intermediário, o parasito apresenta duas fases no desenvolvimento assexuado. Na primeira fase, após a ingestão do oocisto, esporozoítos são liberados. Eles penetram no epitélio intestinal onde diferenciam em taquizoítos. Esses taquizoítos replicam rapidamente por endodiogenia dentro de qualquer tipo de célula e dissemiram por todo o organismo. A segunda fase começa quando taquizoítos iniciam a conversão para bradizoítos (cisto tecidual) ocorrendo a partir de 7-10 dias após a infecção. Dentro do cisto tecidual, bradizoítos se multiplicam por endodiogenia, e apresentam alta afinidade por tecido muscular e cerebral, contudo, podem ser encontrados em vísceras, tais como pulmão, fígado e rins (DUBEY et al., 1998). Cisto tecidual é o estágio de vida terminal no hospedeiro intermediário sendo altamente infeccioso e podem permanecer durante toda a vida na maioria dos hospedeiros (TENTER et al., 2000).

Após a ingestão desses cistos teciduais por um hospedeiro intermediário através de carne crua ou mal cozida, os cistos são rompidos e passam pelo trato digestivo causando a liberação dos bradizoítos. Os bradizoítos irão infectar o epitélio intestinal do novo hospedeiro podendo se diferenciar em taquizoítos e se disseminar por todo o organismo (ROBERT-GANGNEUX, DARDÉ, 2012).

1.10 Resposta Imune ao parasito

A resposta imunológica a infecção por *T. gondii* é individual, complexa e compartmentalizada. Esta variação individual pode ser explicada pelo elevado nível de heterogeneidade no *background* genético dos indivíduos. Além disso, *T. gondii* tem a

capacidade de se disseminar por todos os tecidos e cada compartimento tecidual apresenta sua própria resposta imune específica, em particular no sistema nervoso central e na placenta (FILISETTI, CANDOLFI, 2004).

Para permanecer no hospedeiro, *T. gondii* contém uma série de genes que permitem a invasão de células do hospedeiro, modulação da expressão gênica e evasão da resposta imune. Essas estratégias incluem alterações na expressão e secreção de citocinas imunomodulatórias, alterações na viabilidade celular e bloqueio dos mecanismos antimicrobianos. Contudo, *T. gondii* não consegue suprimir totalmente a resposta imune do hospedeiro, e sim, diminuir parcialmente. Portanto, *T. gondii* parece manter um delicado equilíbrio entre a indução e supressão da resposta imune garantindo a sobrevivência tanto do hospedeiro quanto do parasito (MUÑOZ et al., 2011).

A defesa do hospedeiro na mucosa intestinal é fornecida pela primeira camada de células epiteliais que revestem o intestino delgado e atuam como uma barreira física impedindo o acesso do conteúdo luminal ao hospedeiro (SHAO et al., 2001). Além disso, as células epiteliais são fontes de quimiocinas que coordenam o recrutamento de células imunes (JU et al., 2009). Células epiteliais especializadas encontradas no intestino delgado, tais como as células de Paneth, são células que liberam defensinas e outros peptídeos antimicrobianos no lúmen intestinal (OUELLETTE et al., 1992; ZASLOFF, 2002). Outro tipo celular encontrado são as células caliciformes, que são células especializadas em secretar glicoproteínas (mucinas), as quais contribuem para a camada de muco protegendo a mucosa epitelial intestinal (ROGERS, 2003).

Subjacente ao epitélio intestinal encontramos a lâmina própria onde residem diversos tipos celulares responsáveis pela defesa contra patógenos, tais como macrófagos, células dendríticas, células *Natural Killer* (NK), células T CD4⁺ e CD8⁺ e linfócitos B especializados na produção de anticorpo IgA (MENNECHET et al., 2002;

VAROL et al., 2010; MASAHAITA et al., 2014; WANG et al., 2017). Além disso, células linfóides inatas (ILC) foram identificadas na lâmina própria. Atualmente são conhecidas três populações (ILC1, ILC2 e ILC3) que são definidas pela produção de citocinas imunorreguladoras, que incluem IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 e IL-22 (SANOS, DIEFENBACH, 2013; KLOSE et al., 2014).

Esses elementos do sistema imune da mucosa intestinal compreende a primeira linha de defesa contra a infecção por *T. gondii*. Com uma resposta adequada envolvendo uma rede de imunoregulação, a replicação do parasito é controlada e a imunopatologia evitada (COHEN, DENKERS, 2014). As citocinas do perfil Th1 desencadeiam efeitos microbicidas que matam os taquizoítos, contudo alguns parasitos conseguem evitar a destruição migrando do intestino e estabelecendo infecções latentes sem danos ao hospedeiro (SUZUKI et al., 1988; GAZZINELLI et al., 1991). No entanto, sob inóculos mais elevados ou com certas deficiências imunorreguladoras, *T. gondii* desencadeia uma resposta imune disfuncional, resultando em inflamação grave, o qual se assemelha à patologia da doença intestinal inflamatória humana (IBD) (EGAN et al., 2012).

Durante a resposta imune inata, monócitos, neutrófilos e células dendríticas são recrutados para os sítios de infecção sendo necessária para resistência do organismo durante a infecção por *T. gondii*. Uma das funções da resposta imune inata é a capacidade de reconhecer o patógeno e produzir IL-12 que estimulam as células NK e células T a produzirem IFN- γ (GAZZINELLI et al., 1993; HUNTER et al., 1994). IFN- γ é o maior mediador de resistência à infecção por *T. gondii* e ativa vários mecanismos intracelulares para eliminar o parasito e inibir sua replicação. Estudos utilizando camundongos geneticamente deficientes em IL-12 ou IFN- γ infectados com *T. gondii* morrem com a doença aguda e não conseguem controlar a carga parasitária (SUZUKI et al., 1988; GAZZINELLI et al., 1994).

Membros da família do TNF, tais como CD40L, TNF- α e LT- α são necessários para a proteção durante a infecção crônica (REICHMANN et al., 2000; SCHLÜTER et al., 2013). O papel crítico do TNF- α é demonstrado pelo estudo em que a neutralização desta citocina resulta no aumento da suscetibilidade e aumento da carga parasitária (GAZZINELLI et al., 1993).

Receptores do sistema imune inato tais como os receptores tipo-Toll (TLRs) têm um importante papel no reconhecimento do parasito pelo hospedeiro. Os TLRs específicos envolvidos no reconhecimento de *T. gondii* incluem TLRs 2, 4, 9, e 11. TLR-11 responde a moléculas tipo profilinas que são conservadas entre parasitos protozoários, enquanto TLRs 2 e 4 reconhecem glicosilfosfatidilinositolícos na superfície do parasito (YAROVINSKY et al., 2005; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007). Além disso, estudo utilizando camundongos deficientes para molécula adaptadora MyD88, que está envolvida na sinalização intracelular dos TLRs, são suscetíveis a infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii* (SCANGA et al., 2002).

Monócitos estão envolvidos na resistência durante a toxoplasmose, pois essa população celular contribui para o controle direto de *T. gondii* através da produção de espécies reativas de oxigênio e espécies intermediárias de nitrogênio, inibindo assim a replicação do parasito (GAZZINELLI et al., 1992; DUNAY, SIBLEY, 2010). Camundongos geneticamente deficientes em iNOS ($iNOS^{-/-}$) sobrevivem a infecção aguda por *T. gondii*, contudo, esses animais apresentam uma alta carga parasitária (KHAN et al., 1997).

As células NK são outro tipo de população inata envolvida na imunidade contra *T. gondii*. Células NK migram para os tecidos linfoides dos sítios de infecção onde liberam IFN- γ ativando os macrófagos e aumentando a expressão de MHC classe II (HUNTER et al., 1994). Camundongos deficientes em CCR5 (receptor de quimiocina

envolvido na migração de células NK) infectados com *T. gondii* mostram diminuição no recrutamento de células NK para os sítios de infecção (KHAN et al., 2006). Além disso, estudos com camundongos deficientes em células T mostram que as células NK fornecem um mecanismo limitado de resistência à infecção por *T. gondii* através da produção de IFN-γ (DENKERS et al., 1993; SHER et al., 1993; HUNTER et al., 1994).

Durante a resposta imune adaptativa, as células T CD4⁺ fornecem várias funções reguladoras em mediar à resistência na toxoplasmose. No estágio inicial da infecção, células T CD4⁺ contribuem para resposta de células T CD8⁺ e células B através da produção de citocinas, tais como IFN-γ ou expressando CD40L, um ligante de CD40 que é expresso em macrófagos e em outras células inatas, ativando mecanismos efetores e fazendo com que essas células controlem a infecção crônica (REICHMANN et al., 2000; JOHNSON, SAYLES, 2002; LÜTJEN et al., 2006). Células T CD8⁺ podem controlar a infecção por *T. gondii* através da produção de citocinas inflamatórias, tais como IFN-γ, interação entre CD40/CD40L ou através da citólise mediada pela perforina em células infectadas do hospedeiro (DENKERS et al., 1997; REICHMANN et al., 2000).

Infecção por *T. gondii* promove a produção de anticorpos e esses podem controlar o parasita. O papel dos anticorpos na imunidade contra *T. gondii* é demonstrado utilizando camundongos μMT (deficientes em células B). Esses camundongos desenvolvem uma resposta normal para IFN-γ, contudo morrem 3 a 4 semanas pós-infecção associada com uma alta carga de parasitos no sistema nervoso central (KANG et al., 2000). Esse aumento na suscetibilidade é devido à falta de anticorpos anti-*T. gondii*, pois um estudo mostrou que a transferência passiva de anticorpos confere proteção em camundongos deficientes em células B (JOHNSON, SAYLES, 2002). Anticorpos podem mediar efeitos protetores contra *T. gondii* por

vários mecanismos. Estudos *in vitro* mostraram que esses anticorpos podem opsonizar o parasito para fagocitose, bloquear sua invasão e ativar a via clássica do complemento (SCHREIBER, FELDMAN, 1980; ERBE et al., 1991; VERCAMMEN et al., 1999).

Citocinas reguladoras desempenham um importante papel na resposta contra infecção por *T. gondii*. A citocina anti-inflamatória IL-10 é altamente regulada durante a infecção oral por *T. gondii*. A importância desta citocina em prevenir a patologia é evidente pela suscetibilidade de camundongos deficientes em IL-10 ($IL10^{-/-}$) causando danos hepáticos e intestinais, respectivamente (GAZZINELLI et al., 1996; SUZUKI et al., 2000). Além disso, camundongos deficientes de IL-10 especificamente em células T são suscetíveis à patologia intestinal induzida por *T. gondii* (ROERS et al., 2004).

1.11 Microorganismos patogênicos e aquisição de ferro

Os protozoários parasitos são patógenos responsáveis por doenças significativas e fatais em todo o mundo. Esses parasitas desenvolveram a habilidade de manipular as respostas do hospedeiro e estabelecer infecções (LAMBERT, BARRAGAN, 2010). Durante a evolução, os parasitos adaptaram para sobreviver dentro de hospedeiros durante o período de vida sem causar danos ou morte do mesmo. Além disso, os parasitos expressam sistemas de absorção de nutrientes e mecanismos de patogenicidade que muitas vezes causam alterações profundas no seu hospedeiro (BURCHMORE, BARRETT, 2001; BLUME et al., 2009; LANDFEAR, 2011).

Bactérias, protozoários e fungos desenvolveram a habilidade de utilizar ferro da lactoferrina do hospedeiro para sua replicação, levando a infecções agudas e crônicas e podendo causar sérios danos ao hospedeiro. Além disso, a habilidade de adquirir ferro a partir da lactoferrina do hospedeiro é um determinante de virulência microbiana (WEINBERG, 2009). Alguns protozoários, tais como *Tritrichomonas*, *Giardia* e

Entamoeba necessitam particularmente de altas quantidades de ferro para seu metabolismo (NIXON et al., 2003; DE JESUS et al., 2006). Alguns mecanismos pelo qual os microorganismos obtém ferro a partir da lactoferrina são conhecidos. Entre eles estão a expressão de proteínas ligadoras de lactoferrina, expressão de receptores que ligam a lactoferrina, secreção de proteases que clivam lactoferrina e expressão de redutases que reduzem ferro férrico ligado a lactoferrina para a forma ferro ferroso (TALBOT et al., 1991; TACHEZY et al., 1996; WILSON et al., 2002; TANAKA et al., 2004; DZIADEK et al., 2005; FLANNERY et al., 2011).

Protozoários, tais com *Leishmania major* apresentam transportadores de ferro (LIT1 e LIT2) que são essenciais para a replicação do parasito dentro do fagolisossomo em macrófagos (HUYNH et al., 2006; 2008). Além disso, *L. chagasi* tem desenvolvido mecanismos para utilizar a transferrina e lactoferrina do hospedeiro para seu crescimento (WILSON et al., 1994), bem como o ferro é importante para o crescimento do *Trichomonas vaginalis* (LEHKER, ALDERETE, 1992). Em enterócitos de ratos ou em macrófagos peritoneais, a replicação de *T. gondii* e *T. cruzi*, respectivamente, é dependente de ferro (LOO, LALONDE, 1984; DIMIER, BOUT, 1998), adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram que duas proteínas da família das roptrias de *T. gondii* (ROP2 e ROP4) ligam em lactoferrina humana, o qual pode estar envolvido em mecanismos patogênicos do parasito, tais como invasão e replicação dentro do vacúolo parasítóforo (DZIADEK et al., 2007).

Considerando a demanda de ferro para proliferação de *T. gondii*, a captação de ferro por enterócitos, principalmente no duodeno, e que parasitos invadem e proliferam em células intestinais e dissemina para outros órgãos, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da adição ou privação de ferro na infecção e multiplicação do parasito em resposta quando o organismo é infectado oralmente.

2. Justificativa

Devido à distribuição cosmopolita de *T. gondii* e a utilização cada vez maior de drogas imunossupressoras, dois grupos de risco para a infecção por esse parasito tem sido alvo de estudos: os indivíduos imunossuprimidos e as mulheres gestantes, onde o parasito pode ser transmitido verticalmente e causar alterações importantes ao feto.

Camundongos são modelos experimentais amplamente utilizados para se estudar a relação patógeno-hospedeiro. Em modelos experimentais o parasito causa sérias alterações histológicas em camundongos da linhagem C57BL/6, onde a infecção via oral pela cepa ME-49 de *T. gondii* causam lesões intestinais, devido à resposta imune exacerbada (LIESENFELD et al., 1996). Em infecção por *Trypanosoma cruzi*, o tratamento de camundongos com deferoxamina diminuiu a parasitemia e a mortalidade (ARANTES et al., 2011). Além disso, o tratamento com deferoxamina induziu uma proteção de 70% em camundongos Swiss infectados com a cepa RH de *T. gondii* via intraperitoneal (MAHMOUD, 1999).

Modelos *in vitro*, tais como cultura celular, são utilizados para avaliar o comportamento das células frente a uma infecção ou tratamento, limitando a influência de outros fatores encontrados em modelo *in vivo*. Células intestinais, tais como células Caco-2, são utilizadas para estudos representativos da interação de patógenos que penetram no organismo via trato gastrointestinal (SAEGUSA et al., 2007). Por ser a primeira barreira contra patógenos, as células intestinais são importantes no controle desses microorganismos visando minimizar sua disseminação, limitando fontes nutricionais e auxiliando na resposta imune.

Portanto, estudos adicionais a respeito do papel do ferro durante a infecção oral por *T. gondii*, tratamento com deferoxamina, suplementação e proteínas envolvidas com o metabolismo do ferro nas células intestinais para controle do parasito nesse

importante sítio de infecção trariam novas informações a respeito da resposta imune local e possíveis perspectivas no tratamento contra esse parasito.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do ferro em infecção por *T. gondii* quando o parasito é inoculado pela via natural de infecção, a oral, e em células epiteliais intestinais humanas, *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a relação do ferro durante a infecção oral pela cepa ME-49 de *T. gondii*.
2. Avaliar os efeitos do tratamento com quelante de ferro, a deferoxamina e com a suplementação de ferro, sulfato ferroso, durante a infecção oral pela cepa ME-49 de *T. gondii*.
3. Avaliar a efeito da suplementação e privação de ferro sobre índices de mortalidade na infecção por *T. gondii*.
4. Avaliar o efeito da suplementação e privação de ferro no parasitismo no intestino delgado, pulmão, fígado e alterações histológicas nesses órgãos.
5. Avaliar o efeito da suplementação e privação de ferro na manutenção da função de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e contagem de células de Paneth e caliciforme durante a infecção oral por *T. gondii*.
6. Avaliar os efeitos da privação ou suplementação de ferro na disseminação e proliferação de *T. gondii* em outros órgãos.
7. Avaliar os efeitos da privação ou suplementação de ferro na quantificação de citocinas em amostras de soro.
8. Avaliar os efeitos da privação ou suplementação de ferro no perfil de anticorpos IgM e IgA em amostras de soro e fezes dos animais tratados e infectados.

9. Avaliar os efeitos da privação ou suplementação de ferro na expressão de hepcidina, DMT-1, ferroportina, DcytB e IFN- γ em amostras de intestino delgado.
10. Avaliar os efeitos da privação ou suplementação na viabilidade celular e quantificar o parasitismo *in vitro* em células Caco-2 infectadas com o clone RH-2F1 de *T. gondii*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Experimento *in vivo*

4.1.1 Animais de experimentação

Camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas com 8 a 12 semanas de idade foram criados e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), livres de patógenos específicos, em ciclos de 12 horas claro/escuro e livre acesso à ração e água filtrada. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFU, com o número de protocolo de 087/12 (Anexo I).

4.1.2 Organismo infeccioso – ME-49 de *T. gondii*

A cepa ME-49 de *T. gondii* foi mantida em camundongos Swiss, os quais foram inoculados por via oral com 10 cistos de *T. gondii*. Um mês após o inóculo, o cérebro foi removido, lavado em PBS 0,01M pH 7,2 e homogeneizado com seringa e agulha de calibre 25 x 7. Os cistos cerebrais foram contados em microscópico de luz utilizando objetivo de 10x de aumento e utilizados para infecção dos animais experimentais.

4.1.3 Modelo experimental

Camundongos C57BL/6 foram tratados com injeção intraperitoneal (i.p.) com 100 mg/Kg de sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO_4) (suplementação de ferro) ou com 300 mg/Kg de deferoxamina (DFO) (quelante de ferro) ou com veículo (PBS 1X) no dia anterior a infecção oral com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e por mais 7 dias consecutivos pós-infecção. Camundongos não infectados e não tratados foram analisados com grupo controle. Todos os reagentes foram adquiridos pela Sigma Aldrich, St. Louis, EUA. No oitavo dia após a infecção os animais foram anestesiados

com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil) e Xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) via intraperitoneal e foram eutanasiados por deslocamento cervical. Amostras de sangue foram coletadas por punção do plexo retro orbital para análises sorológicas, bem como amostras de fezes formadas. Órgãos (intestino delgado, pulmão e fígado) foram coletados, fixados em formol tamponado a 10% e posteriormente incluído em parafina. Além disso, fragmentos do intestino delgado foram coletados, acondicionados em microtubos e congelados em nitrogênio líquido, armazenados à -80°C para análise de expressão gênica (DMT-1, DctyB, FPN-1, IFN-γ, HAMP e GAPDH) pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

Para análise de variação de peso, os animais foram pesados diariamente antes de serem tratados durante 8 dias e o resultado foi expresso em gramas (g). Já para análise de mortalidade, os animais foram acompanhados durante 70 dias após a infecção. Após esse tempo os animais sobreviventes foram eutanasiados e o resultado foi expresso em porcentagem de sobrevivência (%). Os resultados foram expressos com a média de pelo menos dois experimentos independentes ($n = 4$).

4.1.4 Coloração de Perls

Para demonstrar ferro no tecido dos animais, cortes teciduais de 4 µm de espessura do intestino delgado, pulmão e fígado foram desparafinados em xanol durante 45 minutos, reidratados em álcoois de concentrações decrescentes (100, 90, 80 e 70%) durante 1 minuto cada. A seguir as lâminas contendo os cortes foram imersas em solução de ferrocianeto de potássio 10% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de ferrocianeto de potássio 10% e ácido clorídrico 10% (Labimpex Lab. Ltda, São Paulo, Brasil) durante 20

minutos. Após o tempo, as lâminas foram lavadas em água destilada, sendo logo após, imersas em vermelho nuclear rápido (Merck KGaA) por 5 minutos e lavadas em água destilada rapidamente. Para montagem das lâminas, estas foram desidratadas em alcoóis de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), durante 1 minuto cada e depois três passagens em xanol por 45 minutos. As lâminas foram montadas com lamínula e Bálsamo do Canadá. Para a quantificação das áreas positivas para ferro, as sessões teciduais de cada animal foram analisadas utilizando microscópio óptico e as áreas que tinham marcação para ferro foram fotografadas em aumento de 40x. As imagens foram capturadas utilizando sistema de câmera digital (Leica ICC 50, Wetzlar, Alemanha) e analisadas utilizando o software Image J (versão 1.50i) e o resultado expresso em porcentagem de marcação para ferro (área azul) por sessão tecidual.

4.1.5 Dosagem de ferro sérico

Níveis de ferro sérico foram analisados por espectrofotometria em amostras de soro não hemolisadas usando um Kit comercial (FE Liquiform, Labtest Diagnostic, Lagoa Santa, MG, Brasil). Um calibrador padrão de ferro (soro bovino liofilizado) de concentração 223 µg/dL foi utilizado. A absorbância foi obtida a 560 nm pelo programa *SoftMax® Pro* Versão 6.3, através de sua leitura em espectrofotômetro de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) e os níveis de ferro sérico foram expressos em µg/dL.

4.1.6 Comprimento intestinal

Para verificar a presença ou não de encurtamento do intestino delgado, o comprimento do órgão foi medido usando papel milimetrado e calculado pela divisão do comprimento médio dos intestinos não infectados e não tratados (M) menos o comprimento médio do intestino dos animais tratados e infectados aos 8 dias após a

infecção (L) divido pelo comprimento médio dos intestinos dos animais não infectados e não tratados multiplicado por 100. O resultado foi expresso em porcentagem de encurtamento (E) dado pela fórmula abaixo (HEIMESAAT et al., 2006):

$$E = \frac{(M - L) \times 100}{M}$$

4.1.7 Análise histológica

Para observação de alterações histológicas nos órgãos (intestino delgado, pulmões e fígado) dos animais infectados, cortes teciduais foram corados por Hematoxilina e Eosina. Para tal, cortes teciduais de 4 µm de espessura foram desparafinados em xanol durante 45 minutos, re-hidratados em alcoóis de concentrações decrescentes (100, 90, 80 e 70%) durante 1 minuto cada. A seguir as lâminas contendo os cortes foram imersas em hematoxilina de Harris por 1 minuto. Procedeu-se a uma lavagem em água corrente durante 10 minutos, sendo logo após, imersas em eosina por 40 segundos e lavadas em água corrente rapidamente. Para montagem das lâminas, estas foram desidratadas em alcoóis de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), durante 1 minuto cada e depois e depois três passagens em xanol por 15 minutos cada. As lâminas foram montadas em lamínula e Bálsamo do Canadá.

Para as análises histológicas foram avaliadas a infiltração de leucócitos no intestino delgado e fígado. O escore inflamatório foi realizado como previamente descrito por Benevides e colaboradores (2008). A área alveolar do pulmão foi analisada utilizando o *software* ImageJ em 10 campos microscópicos utilizando aumento de 10X. No fígado, focos inflamatórios foram quantificados em 40 campos utilizando objetiva de 10X de aumento. O escore inflamatório no intestino delgado foi representado como unidades arbitrárias como sendo: 0 – 2, suave; 2 – 4, moderado; 4 – 6, grave; e acima de

6, muito grave. Todas as análises foram feitas em 2 cortes histológicos por animal, com a objetiva de 40x de aumento, em ensaio duplo cego.

4.1.8 Coloração de Alcian Blue para detecção de células caliciformes

Para observação de células caliciformes no intestino delgado dos animais, cortes teciduais de 4 µm de espessura foram desparafinados em xanol durante 45 minutos, rehidratados em alcoóis de concentrações decrescentes (100, 90, 80 e 70%) durante 1 minuto cada. A seguir as lâminas contendo os cortes foram imersas em ácido acético glacial a 3% por 7 minutos. Logo após, imersas em corante de Alcian Blue a 1% por 4 horas a 45°C e lavadas 2X em água destilada por 1 minuto. Os cortes foram contra corados em eosina por 40 segundos. Para montagem das lâminas, estas foram desidratadas em alcoóis de concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%), durante 1 minuto cada e depois três passagens em xanol por 15 minutos cada. As lâminas foram montadas em lamínula e Bálsmo do Canadá. As células caliciformes foram analisadas em 200 campos microscópicos utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento, em duas secções teciduais de cada órgão coletado dos animais.

4.1.9 Quantificação de células de Paneth em cortes histológicos de intestino delgado

As lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina como anteriormente descrito foram avaliadas para quantificação de células de Paneth. As análises foram feitas em 400 criptas intestinais utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento, em duas secções teciduais de cada órgão coletado dos animais.

4.1.10 Quantificação de mieloperoxidase (MPO) e β-N-acetilglucosaminidase (NAG) no intestino delgado

A atividade de neutrófilos e macrófagos foi analisada a partir da atividade das enzimas MPO e NAG, respectivamente. Fragmentos de intestino delgado foram pesados e triturados em 400 µL de tampão fosfato 0,02M gelado, contendo NaCl 0,1M e EDTA 1,015M (pH 4,7), centrifugadas a 600 x g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado novamente em 200 µL de tampão fosfato 0,02M e adicionado 400 µL de NaCl 0,2% gelado durante 30 segundos a temperatura ambiente para lise das hemácias. Em seguida adicionou 400 µL de solução NaCl 1,6% e glicose 5% e as amostras foram centrifugadas a 600 x g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de tampão fosfato 0,05M contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma Aldrich) e realizado 3 ciclos de criólise (nitrogênio líquido e banho-maria 37°C). As amostras foram centrifugadas a 15.000 x g por 15 minutos 4°C e o sobrenadante utilizado para leitura.

Para atividade enzimática da mieloperoxidase, 50 µL do sobrenadante foi adicionado com 50 µL do substrato TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina, Sigma Aldrich) e incubada a 37°C durante 15 minutos protegido da luz. A reação foi interrompida utilizando 25 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e a densidade óptica (OD) foi mensurada a 450 nm pelo programa *SoftMax® Pro* Versão 6.3, através de sua leitura em espectrofotômetro de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader). O resultado foi expresso pela razão entre a densidade óptica da amostra pelo peso do tecido em gramas (g).

Para atividade enzimática da β-N-acetylglucosaminidase, 25 µL do sobrenadante foi adicionado com 25 µL do substrato p-nitrofenil-2-acetamida-β-D-glicopiranoseideo (Sigma Aldrich) em tampão citrato e incubada a 37°C durante 60 minutos. A reação foi interrompida utilizando 100 µL de tampão glicina e a densidade

óptica foi mensurada a 405 nm pelo programa *SoftMax® Pro* Versão 6.3, através de sua leitura em espectrofotômetro de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader). O resultado foi expresso pela razão entre a densidade óptica da amostra pelo peso do tecido em gramas (g).

4.1.11 Quantificação de eosinófilo peroxidase (EPO) no intestino delgado

A atividade de eosinófilos no intestino delgado foi avaliada a partir da detecção da atividade da enzima EPO. Fragmentos de intestino delgado foram pesados e triturados em 400 µL de solução salina balanceada de Hanks (HBSS) seguido de uma centrifugação a 2.000 x g por 15 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspensionado em 1 ml de PBS 1X e acrescentado água destilada e salina a 3,5% para realizar o choque hipotônico, em seguida as amostras foram centrifugadas novamente e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de HBSS – HTAB e realizado 3 ciclos de criólise (nitrogênio líquido e banho-maria 37°C). As amostras foram centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos 4°C e o sobrenadante utilizado para leitura. Em uma placa de 96 poços, 50 µL do sobrenadante foi adicionado com 50 µL de 0,03% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 1 mg/mL de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma Aldrich) e incubados a 37 °C durante 30 minutos protegido da luz. A reação foi interrompida utilizando 25 µL de H₂SO₄ e a densidade óptica foi mensurada a 492 nm pelo programa *SoftMax® Pro* Versão 6.3, através de sua leitura em espectrofotômetro de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader). O resultado foi expresso pela razão entre a densidade óptica da amostra pelo peso do tecido em gramas (g).

4.1.12 Imunohistoquímica para detecção de parasitos

O parasitismo tecidual foi avaliado no intestino delgado, pulmões e fígado. Os cortes histológicos foram desparafinizados e incubados com H₂O₂ a 3% para bloquear a peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito em tampão citrato, pH 6.0, em forno microondas e os sítios não específicos foram bloqueados por incubação dos cortes com leite desnaturado 3% (Molico – Nestlé). Feito isso, os cortes foram incubados durante toda a noite com soro de camundongos infectados com *T. gondii* diluído em saponina 0,01% (1:50) e no dia seguinte, com IgG de cabra anti-IgG de camundongo biotinilada (Sigma Aldrich). A reação foi amplificada usando o sistema ABC (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Calif.) e desenvolvida com diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich). Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula e examinados em microscópio de luz. O parasitismo tecidual foi avaliado contando-se o número de vacúolos parasitóforos e estruturas como cisto presentes em secções de intestino delgado, pulmões e fígado. As análises foram feitas utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento, em duas secções teciduais de cada órgão coletado dos animais.

4.1.13 Dosagem sérica de transamisane pirúvica

Níveis séricos de transaminase pirúvica (TGP) foram analisados por espectrofotometria em amostras de soro não hemolisadas usando um Kit comercial (Labtest Diagnostic, Lagoa Santa, MG, Brasil). A absorbância foi obtida a 505 nm pelo programa *SoftMax® Pro* Versão 6.3, através de sua leitura em espectrofotômetro de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader) e os níveis de TGP sérico expressos em Unidades/dL.

4.1.14 Quantificação de IgM, IgA e IgA secretada por ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA)

Para quantificação de IgM no soro, placas de alta afinidade (Costar-Corning) foram sensibilizadas com 10 µg/mL de STAg (50 µL/poço) a 4 °C por 16 horas. As placas foram lavadas com PBS-T 0,05% e incubadas com soro dos camundongos (1:10) diluídos em PBS-TM 5% (50 µL/poço) a 37 °C por 2 hora. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado anti-IgM de camundongo (Rockland Immunochemical Inc., Limerck, PA, EUA) diluído 1:2000 em PBS-TM 1% (50 µL/poço) por 1 hora a 37° C. Logo após, a placa foi incubada com estreptavidina – peroxidase (1:1000) diluídos em PBS-TM 1% (50 µL/poço) a 37 °C por 30 minutos. A reação foi revelada com o substrato enzimático constituído de 0,03% de H₂O₂ e 1 mg/mL de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma Aldrich). A densidade óptica foi mensurada a 492 nm pelo programa *SoftMax® Pro* Versão 6.3, através de sua leitura em espectrofotômetro de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader).

Para quantificação de IgA no soro, placas de baixa afinidade (Kartell) foram sensibilizadas com 10 µg/mL de STAg (50 µL/poço) a 4 °C por 16 horas. As placas foram lavadas com PBS-T 0,05% e incubadas com soro dos camundongos (1:64) diluídos em PBS-TM 1% (50 µL/poço) a 37 °C por 1 hora. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-IgA de camundongo (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, EUA) diluído 1:2000 em PBS-TM 1% (50 µL/poço) por 1 hora a 37° C. A reação foi revelada com o substrato enzimático constituído de 0,03% de H₂O₂ e 1 mg/mL de OPD. A densidade óptica foi mensurada a 492 nm pelo programa *SoftMax® Pro* Versão 6.3, através de sua leitura em espectrofotômetro de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader).

A quantificação de IgA secretada (sIgA) foi realizada como previamente descrito com modificações (FREHN et al., 2014). Amostras de fezes foram diluídas (1:5) em tampão de diluição (90 ml de PBS 1X; 10 ml de EDTA 0,5M pH 8,0; 10 mg de tripsina; 666 µL de PMSF 160 mM). As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 5 minutos e o sobrenadante utilizado. As placas de alta afinidade (Costar-Corning) foram sensibilizadas com 10 µg/mL de STAg ou 10 µg/mL de extrato de *E. coli* (50 µL/poço) a 4 °C por 16 horas. A seguir, as placas foram lavadas com PBS-T 0,05% e bloqueadas com BSA 5% em PBS-T por 1 hora, lavadas e incubadas com o sobrenadante fecal solúvel (1:7) a 4 °C por 16 horas. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo IgG conjugado com peroxidase anti-IgA (Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:2000 a 37 °C por 2 horas (50 µL/poço). A reação foi revelada com o substrato enzimático constituído de 0,03% de H₂O₂ e 1 mg/mL de OPD. A densidade óptica foi mensurada a 492 nm pelo programa *SoftMax® Pro* Versão 6.3, através de sua leitura em espectrofotômetro de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader).

Os resultados foram expressos em índice ELISA (E.I.) da seguinte forma: E.I. = OD amostra/*cut-off*, onde o *cut-off* foi estabelecido pelos valores médios de OD dos soros controles negativos mais três desvios padrão. Com base em testes de triagem realizados com soros controles negativos e positivos, os valores de E.I. > 1,0 foram considerados resultados positivos.

4.1.15 Mensuração de citocinas no soro dos animais experimentais por “Cytometric Beads Arrays” (CBA)

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN-γ foram quantificadas pelo método “cytometric beads array assay” (CBA) (BD, San Jose, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de soro foram adquiridas usando o aparelho FACSCanto II Flow Cytometer (BD, Biosciences, México) e analisadas pelo

FCAPARRAY™ Software – versão 3.0 BD Biosciences – San Jose, CA, EUA. O limite de detecção das citocinas conforme o fabricante é: 0.1 pg/mL para IL-2; 0,03 pg/mL para IL-4; 1.4 pg/mL para IL-6; 16.8 pg/mL para IL-10; 0.9 pg/mL para TNF e 0.5 pg/mL para IFN-γ.

4.1.16 Avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA) para DMT-1, DYCTB, HAMP, FPN, IFN-γ e GAPDH no intestino delgado

4.1.17 Extração de mRNA e confecção do DNA complementar

A extração do RNA total de um fragmento do intestino delgado foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Brevemente, para cada amostra, foi adicionado o reagente Trizol (1 mL para 100 mg de tecido), agitando por 30 segundos e deixando à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 mL da suspensão foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (500 µL) foi transferida para outro microtubo e foi adicionado 0,5 mL de isopropanol gelado, com posterior agitação em “vortex” e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguido de nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido por inversão e ao *pellet* foram adicionadas 950 µL de etanol 75% seguido de agitação em “vortex” e centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi cuidadosamente removido por inversão e os *pellets* foram ressuspensos em água de injeção e armazenados a -80°C. Alíquotas de 2 µL de cada amostra, diluídas em 98 µL de água de injeção (fator de diluição de 50X) foram utilizadas para obtenção da concentração de RNA/µL nas amostras determinadas

utilizando o aparelho GeneQuant 1300 spectrophotometer (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

A reação para confecção do cDNA foi realizada utilizando RNA (5 ng/ μ L) e oligo (dT) primer (Promega, Fitchburg, EUA) diluídos em água de injeção. A mistura foi aquecida a 70°C durante 5 minutos em termociclador Arktik Thermal Cycler (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e depois foram adicionadas 11,5 μ L de uma solução contendo um tampão, MgCl₂, dNTPs, a enzima transcriptase reversa (Promega) e água de acordo com as concentrações recomendadas pelo fabricante. Em seguida, a mistura final foi incubada a 42°C por 1 hora no mesmo termociclador. Por fim, foram adicionados 17,5 μ L de água de injeção e as amostras foram acondicionadas a – 20°C até o momento do uso.

4.1.18 Quantificação das mensagens por reação de PCR quantitativo (qPCR)

Para a reação de qPCR, as amostras (2 μ L) foram misturadas com GOTaq® qPCR (Master Mix, Promega) e 0,15 pMol/ μ L de cada *primer* (Tabela 1) até o volume final de 10 μ L por reação. Todas as amostras também foram submetidas à reação para a detecção de RNA mensageiro para GAPDH (gene constitutivo) utilizado como controle positivo da reação de amplificação e uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par de sequências dos *primers* utilizados.

A reação foi realizada utilizando 40 ciclos com temperatura de anelamento a 60°C por 30 segundos desenvolvidas em aparelho de qPCR ABI7500 (Life Technologies). Os dados foram analisados em relação ao gene GAPDH usando o método do 2^{–ΔΔCt} (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1. Lista das sequências dos *primers* utilizados para os ensaios de expressão gênica por qPCR

Nome do gene	Sequências (5' → 3')	Referências*
<i>gapdh</i>	F: GGAGAACCTGCCAAGTATGATG R: CAGTAGCCCAAGATGCC	(BARENCO et al., 2014)
<i>dmt1</i>	F: GCTCTGGGTGCTCCTTT R: CTTGGGATACTGACGGTGACA	-
<i>dcytb</i>	F: GGCTGCTGGTGTCCGC R: CAGCCAAGCCCCCTCTCG	-
<i>ferroportina</i>	F: CTGTGTTCTGGTGGAACTCTATGG R: TCTTATCCACCCAGTCACCAATG	-
<i>ifny</i>	F: GGCTGTTCTGGCTGTTACTGC R: CATCCTTTGCCAGTTCTCC	(BARENCO et al., 2014)
<i>hamp</i>	F: AGCCTGAGCAGCACCACT R: CAATGTCTGCCCTGCTTCTT	-

*Os *primers* não referenciados foram desenhados utilizando o programa Primer Express V3 (Life Technologies).

F: sequência *forward*; R: sequência *reverse*

4.2 Experimento *in vitro*

4.2.1 Cultura celular

Células Caco-2 provenientes de adenocarcinoma do cólon humano (BCRJ:CR069 – Banco de Células do Rio de Janeiro) foram cultivadas e mantidas no Laboratório de Imunopatologia em garrafas de cultivo celular de 25 cm² em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Cutilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina (2mM), 1% de antibiótico (10 mg estreptomicina / 10.000 unidades de penicilina) (Sigma Aldrich), incubadas em temperatura de 37° C a 5% de CO₂ até a confluência.

Conforme o comunicado número 13/2012 emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia, pesquisas científicas que utilizem células adquiridas comercialmente não necessitam de análise ética por um comitê vigente desta instituição (Anexo II).

4.2.2 Organismo infeccioso - clone RH-2F1 de *T. gondii*

Para experimentos *in vitro*, foram utilizados taquizoítos do clone RH-2F1 de *T. gondii*, que foram mantidos em células da linhagem HeLa (célula cervical uterina humana) cultivadas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Cultilab) com 2% de SFB e 1% de antibiótico (10 mg estreptomicina / 10.000 unidades de penicilina) (Sigma Aldrich). À medida que as células infectadas foram lisadas pelo parasito, o meio contendo taquizoítos livres foi centrifugado a 174,6 x g (1.500 rpm) por 5 minutos e os parasitos foram homogeneizados em meio a 2% de SBF e distribuídos em novos frascos contendo células não infectadas.

4.2.3 Análise de viabilidade celular

A viabilidade das células Caco-2 expostas aos tratamentos com DFO, FeSO₄, citrato de amônio férrico (FAC) (Sigma Aldrich) e holo-transferrina humana (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) em diferentes concentrações, foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolim brometo (MTT, Sigma Aldrich) (MOSMANN, 1983). Para isso, as células Caco-2 (1×10^5 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços (Nest Biotech Co., Ltda, Wuxi, China) em meio DMEM a 20% de SFB e incubadas em temperatura de 37° C a 5% de CO₂. A concentração SFB foi reduzida a zero 24 horas antes das células serem tratadas. As células foram tratadas durante 24 horas com as seguintes doses: 125, 250 e 500 µM de DFO (DIMIER, BOUT, 1998); 125, 250 e 500 µM de FeSO₄ (DIMIER, BOUT, 1998); 5, 10, 50, 100 e 200 µg/mL de FAC (PORTUGAL et al., 2011) e 20, 100, 250, 500, 1000 e 2000 µg/mL de holo-transferrina humana (CHEN-ROETLING et al., 2011), diluídos em meio DMEM incompleto. Como controle para análise de viabilidade celular, as células foram incubadas com meio DMEM incompleto sem tratamento. Ao

final deste período, o sobrenadante dos poços foi removido e as células foram incubadas com 10 µL do reagente MTT a 5 mg/mL, acrescidos de 90 µL de meio DMEM incompleto (1:10), mantidos em estufa 37º C por 4 horas adicionais.

Por fim, a placa foi centrifugada a 174,6 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado, e os cristais de formazan de coloração violeta produzidos pelas células Caco-2 viáveis, as quais metabolizaram o reagente de MTT, foram solubilizados pela adição de 100 µL/poço de duodecil sulfato de sódio (SDS) (Labsynth Ltda, São Paulo, Brasil) a 10% em N,N-dimetil formamida (DMF) (Sigma Aldrich) a 50% (p/v). Após homogeneização completa dos cristais, a densidade óptica das amostras foi mensurada a 570 nm pelo programa *SoftMax® Pro* Versão 6.3, através de sua leitura em espectrofotômetro de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader) e os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação à condição meio (controle de 100%). Os resultados foram obtidos da média de 8 poços por condição a partir de um experimento.

4.2.4 Infecção e tratamento das células Caco-2

As células Caco-2 foram plaqueadas em placas de 96 poços (Nest Biotech) a uma concentração de 1.0×10^5 células/poço mantidas em meio DMEM 20% a 37°C e 5% de CO₂. A concentração de soro fetal bovino foi reduzida a zero 24 horas antes das células serem infectadas. As células foram infectadas com o clone RH-2F1 de *T. gondii* na proporção de 1:1 (parasito:célula) em cada poço, incubadas por 3 horas a 37°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com meio DMEM incompleto para remoção dos parasitos não aderentes e então tratadas durante 24 horas com DFO, FeSO₄, FAC e

holo-transferrina humana, diluídas em DMEM incompleto, nas diferentes concentrações utilizadas para o ensaio de MTT.

Após o tempo de tratamento, a placa foi centrifugada a 174,6 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante dos poços foram cuidadosamente removido e a reação de β -galactosidase foi desenvolvida com modificações conforme descrito por Teo e colaboradores (2007).

Para isso, amostras de 50 μ L de taquizoítos clone RH-2F1 foram utilizadas para construir uma curva padrão, que se iniciou com 1×10^6 taquizoítos. A curva foi utilizada como referência para a determinação dos índices de proliferação de *T. gondii* nas diferentes condições de tratamentos analisadas. Feito isso, as amostras de células e a curva padrão, foram incubadas com 100 μ L de tampão de lise RIPA gelado (Tris-HCl a 0,05M; NaCl a 0,150M; Triton X-100 a 1% (v/v); deoxicolato de sódio a 1% (p/v) e SDS a 0,1% (p/v); pH 7,5), durante 15 minutos e, logo após, incubadas com 160 μ L de tampão de ensaio (PBS a 0,01M; MgCl₂ a 0,009M e β -mercaptoetanol a 0,102M) e com 40 μ L do reagente substrato *Chlorophenol Red-D- β -Galactopyranoside* (CPRG) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) reconstituído em água deionizada a 0,003M, ficando ao abrigo da luz para o desenvolvimento da reação. A atividade enzimática da β -galactosidase foi mensurada a 570 nm pelo programa *SoftMax® Pro* Versão 6.3, através de sua leitura em espectrofotômetro de microplacas (VersaMax ELISA Microplate Reader) e os resultados foram expressos como índice de proliferação intracelular de *T. gondii* com referência à curva padrão previamente construída. Os resultados foram obtidos da média de 8 poços por condição a partir de um experimento.

4.3 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 – GraphPad Software, Inc. Os grupos foram avaliados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (KS) e quando apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni e quando apresentaram distribuição não normal foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's para comparação de múltiplos grupos experimentais; ou pelo teste *t* não pareado (distribuição normal) ou pelo teste Mann-Whitney (distribuição não normal) quando apropriados para comparação de grupos experimentais. Os dados de mortalidade dos grupos experimentais foram analisados pelo teste do Quiquadrado (χ^2). Os outros resultados foram expressos como média ± desvio padrão (SD) dos resultados obtidos. Valores de $P < 0.05$ foram considerados com indicativo de significância.

4.4 Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos, incluindo a coleta do material biológico, utilização dos reagentes e dos equipamentos, bem como manuseio e conduta com os animais foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

5. Resultados

5.1 Infecção por *T. gondii* induz acúmulo de ferro no intestino delgado

Para avaliar se a infecção por *T. gondii* é capaz de induzir acúmulo de ferro no intestino delgado como necessidade para sua replicação, camundongos C57BL/6 fêmeas foram infectadas com a cepa ME-49 de *T. gondii* por via oral. Foi observado que camundongos não infectados apresentam um acúmulo basal de ferro no intestino delgado (Figura 3A). Contudo, camundongos infectados mostram um alto acúmulo de ferro no intestino delgado (Figura 3B). Esse acúmulo de ferro foi significativamente maior em camundongos infectados do que os não infectados ($p = 0,0485$; Figura 3C), sugerindo que o aumento do acúmulo de ferro no intestino delgado induzido pela infecção por *T. gondii* pode estar envolvido na necessidade nutricional do ferro pelo parasito.

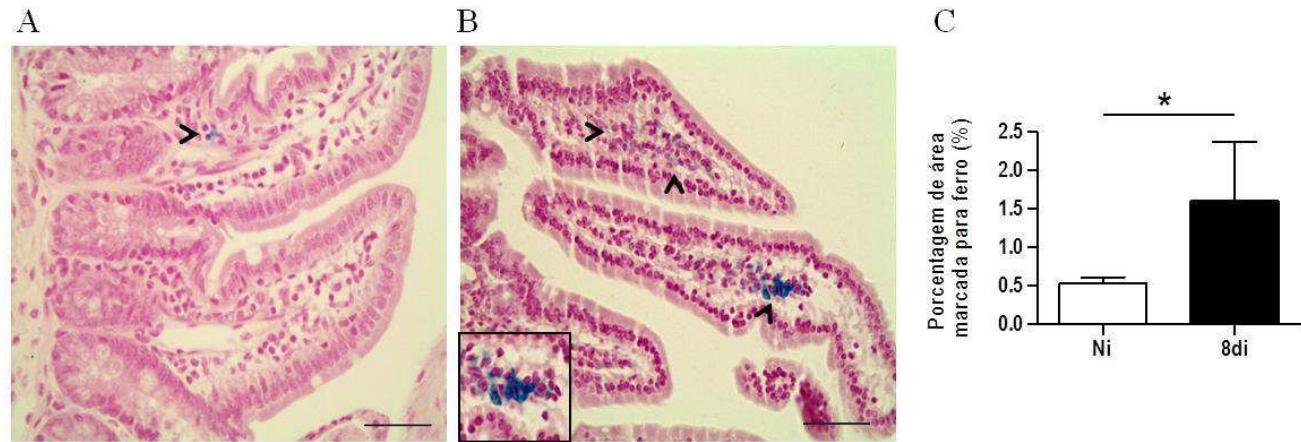


Figura 3. Fotomicrografia representativa do acúmulo de ferro no intestino delgado de camundongos C57BL/6 fêmeas não infectados (A) ou infectados (B) com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* 8 dias após infecção e corados pela coloração de Perls. As áreas com marcação celular positiva para ferro (azul) foram quantificadas por sessão tecidual utilizando o software ImageJ (C). Não infectados (Ni); dias de infecção (di). As setas indicam áreas com células positivas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes ($n=4$). *Diferença estatisticamente significante entre animais não infectados e infectados. Teste Mann Whitney, $p < 0,05$. Escala da barra = 50µm.

5.2 Infecção por *T. gondii* induz acúmulo de ferro no pulmão e fígado

Para verificar se a infecção por *T. gondii* é capaz de induzir acúmulo de ferro em outros órgãos que são atingidos por esse parasito, o pulmão e fígado de camundongos infectados por via oral com a cepa ME-49 de *T. gondii* foram analisados. Foi observado que camundongos não infectados apresentam poucas marcações de ferro no pulmão (Figura 4A), contudo, o parasito induziu um acúmulo maior de ferro no pulmão dos animais infectados (Figura 3B). O aumento do acúmulo de ferro no pulmão foi aproximadamente 5X maior em camundongos infectados do que os não infectados, apesar de não ser estatisticamente significante (Figura 4C).

Camundongos não infectados mostraram poucas marcações para ferro no fígado (Figura 4D), no entanto, após 8 dias de infecção, a quantidade de marcação de ferro no fígado dos animais infectados foi maior (Figura 4E). Esse acúmulo de ferro no fígado foi significativamente maior em camundongos infectados do que os não infectados ($p = 0,0381$; Figura 4F). O acúmulo de ferro nesses órgãos induzida pela infecção por *T. gondii* mostra a possível associação do parasito por esse biometal.

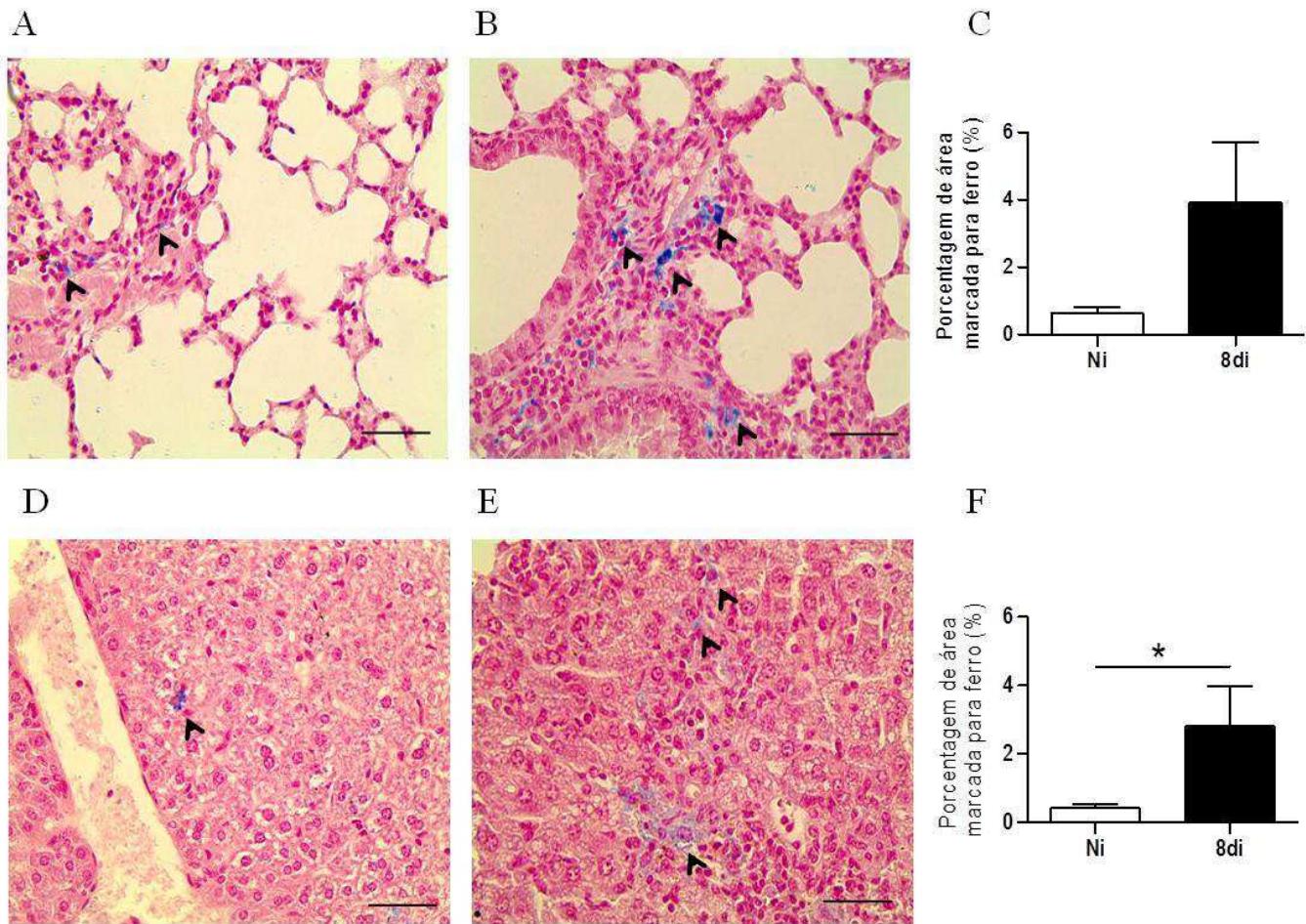


Figura 4. Fotomicrografia representativa do acúmulo de ferro no pulmão e fígado de camundongos C57BL/6 fêmeas não infectados (A e D) ou infectados (B e E) com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* 8 dias após infecção e corados pela coloração de Perls. A área com marcação celular positiva para ferro (azul) foram quantificadas por sessão tecidual utilizando o software ImageJ (C e F). Não infectados (Ni); dias de infecção (di). As setas indicam áreas com células positivas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes ($n=4$). *Diferença estatisticamente significante entre animais não infectados e infectados. Teste *t* pareado e Mann Whitney, $p<0,05$. Escala da barra = 50 μ m.

5.3 Privação e suplementação de ferro influenciam a infecção oral por *T. gondii* em camundongos C57BL/6

Para avaliar o envolvimento do ferro durante a infecção oral por *T. gondii*, camundongos C57BL/6 foram tratados com DFO (quelante de ferro) ou suplementados com sulfato ferroso (FeSO_4). Primeiro, foi verificado se a infecção por *T. gondii* altera os níveis séricos de ferro. Observamos que camundongos infectados por via oral por *T. gondii* e tratados com FeSO_4 ou veículo apresentaram altos níveis séricos de ferro quando comparados com os animais não infectados ($p < 0,05$), e o tratamento com DFO foi capaz de diminuir os níveis sistêmicos de ferro ($p < 0,05$) (Figura 5A).

Nos primeiros cinco dias após a infecção ambos os tratamentos com DFO ($p < 0,05$) e FeSO_4 ($p < 0,05$) induziram uma maior perda de peso quando comparado com os animais infectados e tratados com veículo, contudo, o tratamento com FeSO_4 induziu maior perda de peso nos primeiros dias nos camundongos infectados quando comparados com os tratados com DFO ($p < 0,05$) (Figura 5B). O tratamento com DFO induziu uma maior sobrevida nos camundongos infectados quando comparados com os animais tratados com veículo, os quais morreram no 60º dia após a infecção. Já os animais infectados e tratados com FeSO_4 morreram no 50º dia após a infecção (Figura 5C).

Estudos anteriores mostram que a infecção por *T. gondii* induz encurtamento do intestino delgado (BERESWILL et al., 2010). Nossos resultados mostraram que animais infectados e tratados com veículo ($p < 0,05$) e animais infectados e tratados com FeSO_4 ($p < 0,05$) mostraram uma significante redução do comprimento intestinal quando comparado com os animais não infectados e não tratados (Figura 5D, E). Por outro lado, o comprimento intestinal dos animais infectados e tratados com DFO não apresentou diferença estatisticamente significante em relação aos animais não infectados e não

tratados (Figura 5D, E). Além disso, a porcentagem de encurtamento intestinal foi menor em animais infectados e tratados com DFO do que em animais infectados e tratados com veículo ou suplementados com FeSO₄ (Figura 5F). Esses resultados sugerem que a disponibilidade de ferro é importante durante a infecção oral por *T. gondii* e causa comprometimento ao intestino delgado.

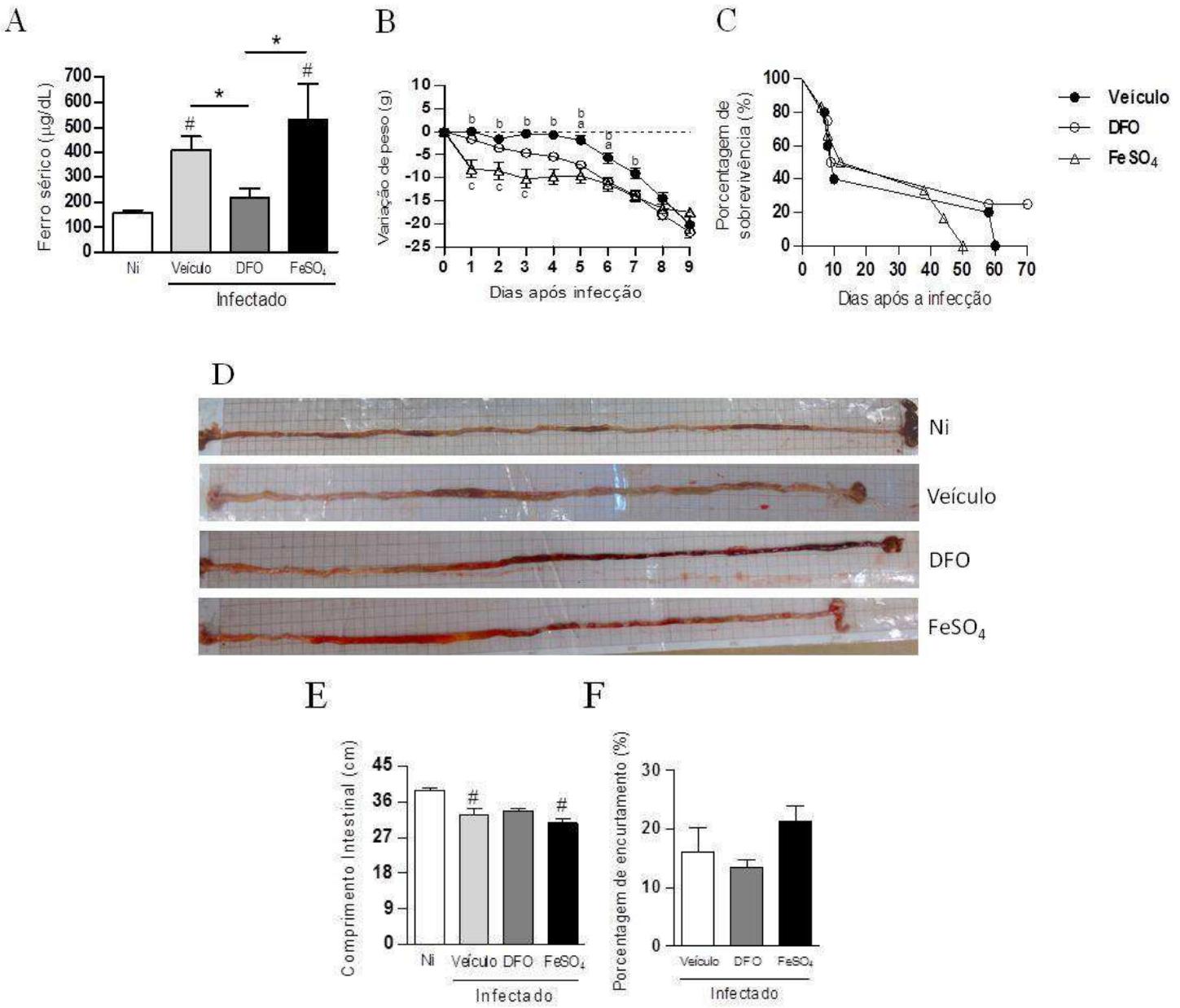


Figura 5. Níveis séricos de ferro em camundongos C57BL/6 não infectados (Ni) ou infectados com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* por via oral e tratados com veículo (PBS) ou 300 mg/Kg de deferoxamina (DFO) ou 100 mg/Kg de sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO_4) por via intraperitoneal (i.p.) um dia antes da infecção e por mais 7 dias adicionais pós-infecção (A). Variação de peso corporal (B). Porcentagem de sobrevivência (C). Fotografia representativa do intestino delgado (D). Comprimento intestinal (E) e porcentagem de encurtamento do intestino delgado (F). *Diferença estatisticamente significante entre os animais infectados e tratados com veículo, DFO e suplementados com FeSO_4 . ^(a)Diferença estatística entre veículo e DFO; ^(b)diferença estatística entre veículo e FeSO_4 , ^(c)diferença estatística entre DFO e FeSO_4 . Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes ($n=4$). #Diferença estatisticamente significante entre os animais não infectados/não tratados e animais infectados/tratados. Teste ANOVA e comparação múltipla de Bonferroni, $p<0,05$.

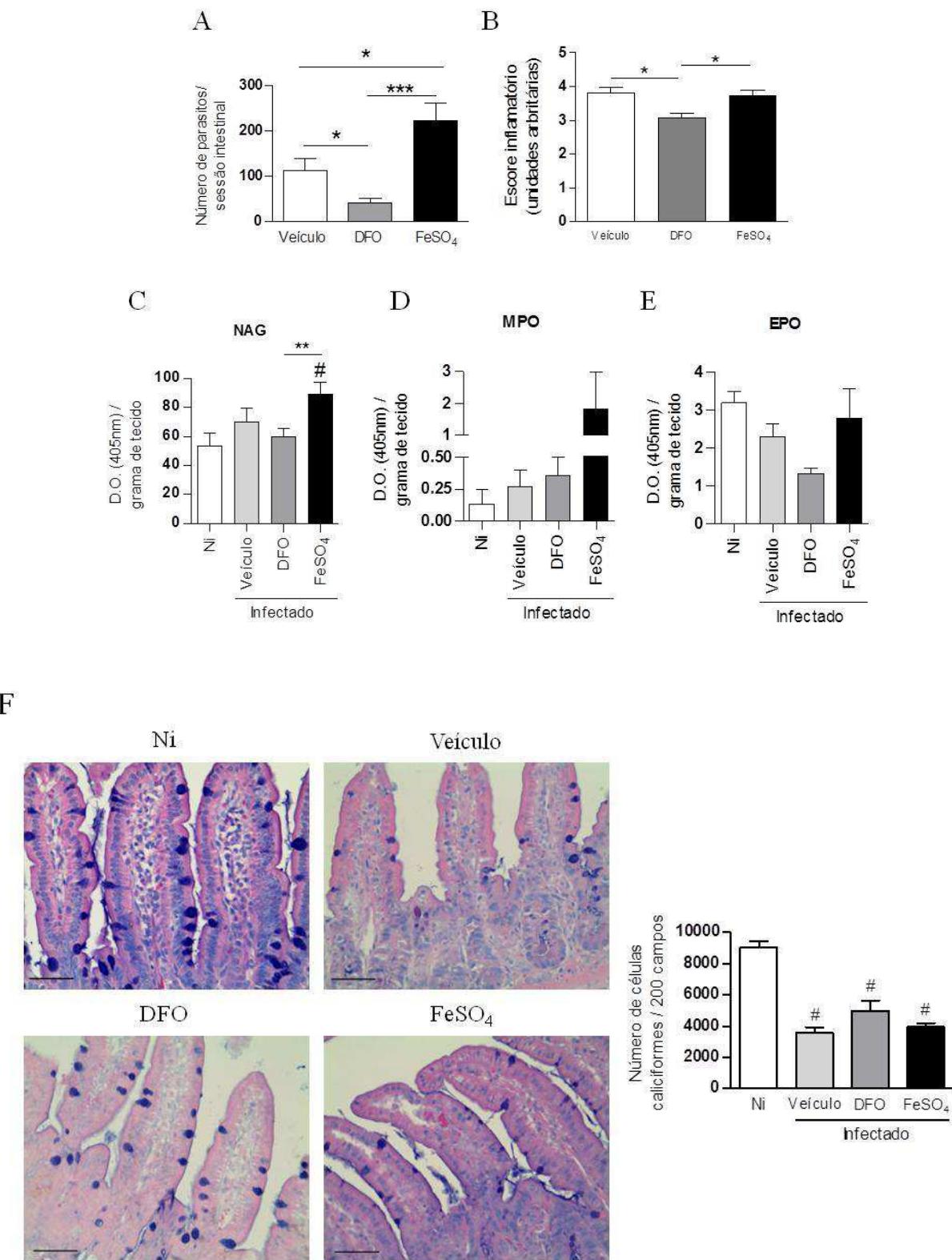
5.4 *Toxoplasma gondii* necessita de ferro para sua replicação no intestino delgado e altera o perfil celular intestinal

Para avaliar se o ferro é necessário para a replicação de *T. gondii* no intestino delgado após a infecção oral, os animais foram tratados com DFO ou FeSO₄ e reações de imunohistoquímica foram feitas para contagem do parasitismo. Foi observado que a diminuição da disponibilidade de ferro induzida pelo tratamento com DFO, diminuiu a carga parasitária no intestino delgado quando comparado com os animais infectados e tratados com veículo ($p < 0,05$). Ao passo que a suplementação de ferro com FeSO₄ aumentou a carga parasitária quando comparada com os animais infectados e tratados com o veículo ($p < 0,05$), e também em relação aos animais infectados e tratados com DFO ($p < 0,05$) (Figura 6A). Além disso, os animais tratados com DFO mostraram um menor escore inflamatório no intestino delgado quando comparado com os animais tratados com o veículo ($p < 0,05$) ou suplementados com FeSO₄ ($p < 0,05$) (Figura 6B). Esses dados sugerem que o ferro é necessário para replicação de *T. gondii* no intestino delgado durante a infecção oral e o maior parasitismo provavelmente esteja induzindo alterações inflamatórias mais graves.

Para verificar quais células possam estar envolvidas no processo inflamatório no intestino delgado, reações enzimáticas foram feitas para marcadores de macrófagos (NAG), neutrófilos (MPO) e eosinófilos (EPO). Foi observado um aumento de NAG no intestino delgado após a infecção oral por *T. gondii*, sendo que a suplementação com FeSO₄ foi significativamente maior quando comparado com os animais não infectados e não tratados ($p < 0,05$), bem como um aumento em relação aos animais infectados e tratados com DFO ($p < 0,05$) (Figura 6C). Observou-se uma tendência para aumento de MPO, apesar de não se obsevar uma diferença estatisticamente significante, sendo que os animais tratados com FeSO₄ apresentaram uma maior tendência de aumento dessa

enzima em relação aos outros tratamentos (Figura 6D). Contudo, a infecção por *T. gondii* induziu uma tendência a diminuição da enzima EPO nos animais infectados e tratados, sendo o tratamento com DFO o que apresentou uma maior tendência a diminuição dessa enzima (Figura 6E). Portanto, macrófagos estão presentes no processo inflamatório no intestino delgado causado por *T. gondii* após a infecção oral.

Células caliciformes e células de Paneth também foram quantificadas no intestino delgado de animais não infectados, infectados e infectados e tratados com DFO ou FeSO₄. Foi observado que a infecção por *T. gondii* diminui a quantidade de células caliciformes no intestino delgado dos animais infectados independente o tratamento, contudo, os animais infectados e tratados com DFO apresentaram uma contagem maior em relação aos animais infectados e tratados com veículo ou suplementados com FeSO₄, apesar de não ser estatisticamente significante (Figura 6F). Além disso, a infecção oral por *T. gondii* causa diminuição na quantidade de células de Paneth no intestino delgado dos animais infectados ($p < 0,05$), contudo, os animais infectados e tratados com DFO apresentaram uma maior quantidade de células de Paneth em comparação aos animais infectados e tratados com veículo ($p < 0,05$) ou suplementados com FeSO₄ ($p < 0,05$) (Figura 6G). Logo, a infecção oral por *T. gondii* induz uma diminuição das células caliciformes e células de Paneth no intestino delgado e o tratamento com DFO ajuda a preservar, ao menos parcialmente, essas células.



G

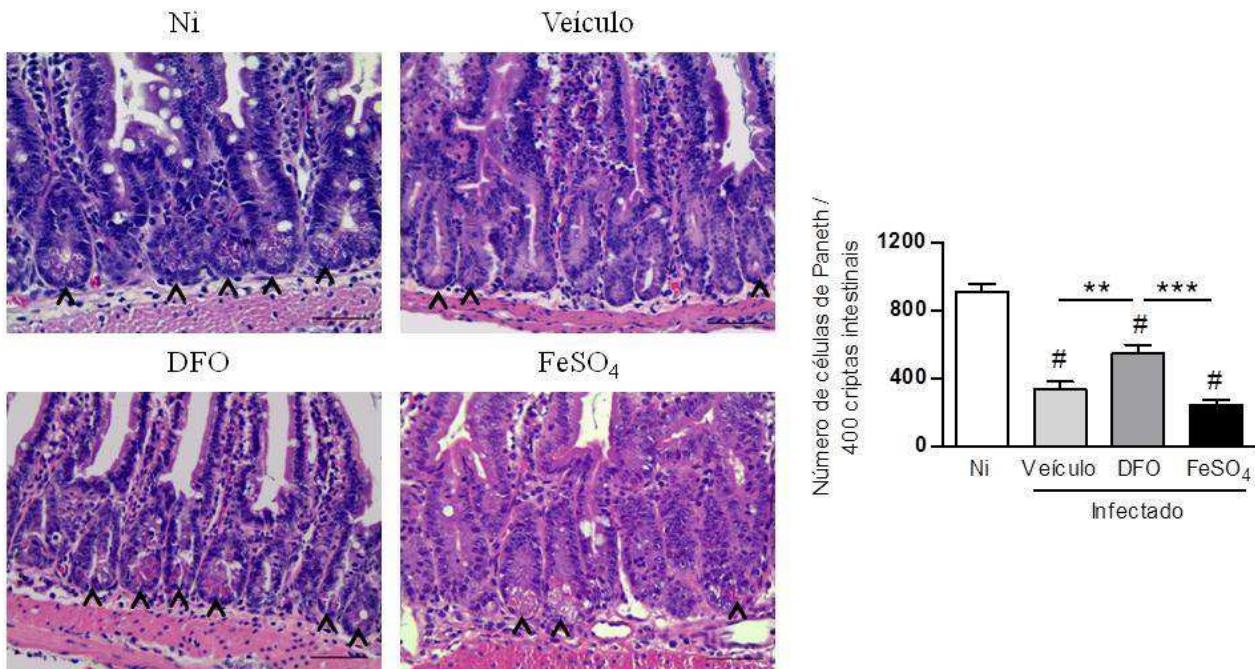


Figura 6. Parasitismo tecidual no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* por via oral e tratados com veículo (PBS) ou 300 mg/Kg de deferoxamina (DFO) ou 100 mg/Kg de sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO₄) via intraperitoneal (i.p.) um dia antes da infecção e por mais 7 dias adicionais após a infecção. O parasitismo foi detectado por coloração de imunohistoquímica e o número de vacúolos parasitóforos foi quantificado em 200 campos microscópicos (A). Escore inflamatório no intestino delgado foi avaliado em seções teciduais coradas por Hematoxilina e Eosina e analisados em 40 campos microscópicos (B). Quantificação intestinal das enzimas β -N-acetilglucosaminidase; NAG (C), mieloperoxidase; MPO (D) e eosinófilo peroxidase; EPO (E). Células caliciformes foram coradas com Alcian Blue e quantificadas em 200 campos microscópicos (F). Células de Paneth foram coradas com Hematoxilinas e Eosina e quantificadas em 400 criptas intestinais (G). As setas indicam as células de Paneth. Não infectado (Ni). Os dados são representativos de dois experimentos independentes ($n=4$). *Diferença estatisticamente significante entre os animais infectados e tratados com veículo, DFO e suplementados com FeSO₄. #Diferença estatisticamente significante entre os animais não infectados/não tratados e animais infectados/tratados. Teste ANOVA e comparação múltipla de Bonferroni, $p<0,05$. Escala da barra = 50 μ m.

5.5 Infecção por *T. gondii* induz mudança na expressão gênica de marcadores que controlam a absorção de ferro no intestino delgado

Para verificar se a infecção oral por *T. gondii* influencia na regulação de proteínas envolvidas na absorção de ferro no intestino delgado, reação de PCR quantitativa foi realizada. Primeiramente, foi observado que *T. gondii* aumentou a expressão de IFN-γ nos animais infectados, independente do tratamento ($p < 0,05$) (Figura 7A). A expressão do DcytB não foi alterada nos animais infectados e tratados, independente o tratamento em relação aos animais não infectados e não tratados, apesar de mostrarem uma tendência a diminuição nos animais infectados e tratados com DFO ou FeSO₄ (Figura 7B). Na expressão do transportador apical DMT-1, a infecção pelo parasita induziu uma tendência em aumentar a expressão desse gene, os animais infectados e tratados com FeSO₄ apresentaram perfil similar aos animais infectados e não tratados (Figura 7C). No entanto, a expressão de DMT-1 no intestino delgado dos animais infectados e tratados com DFO mostrou-se similar a expressão detectadas nos animais não infectados (Figura 7C).

Para a expressão do transportador basolateral FPN1, não observamos uma alteração significativa nos índices de expressão quando comparado aos animais não infectados e não tratados (Figura 7D). Por fim, a expressão de HAMP no intestino delgado foi aparentemente aumentada após a infecção oral por *T. gondii*, e os animais infectados e tratados com veículo ou FeSO₄ apresentaram uma tendência de maior expressão em relação aos animais infectados e tratados com DFO (Figura 7E). Portanto, a infecção oral por *T. gondii* aparentemente aumenta a expressão gênica de DMT-1 em animais infectados e infectados e suplementados com ferro (FeSO₄), assim como de HAMP quando infectados independente de tratados com quelante de ferro ou suplementados com ferro, portanto, esses dados sugerem que esses genes possam estar

envolvidos na absorção de ferro no intestino delgado, sugerindo que o parasito consegue modular os enterócitos para internalizar e manter o ferro no citoplasma da célula.

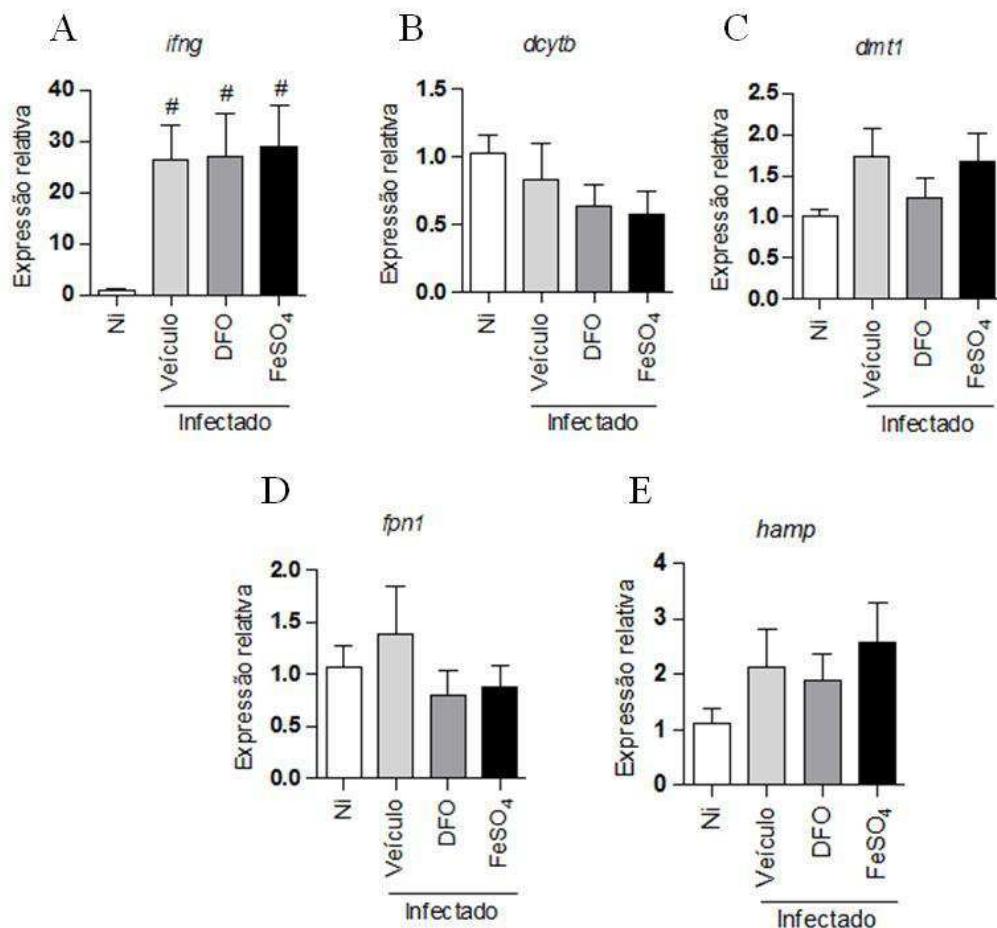


Figura 7. Quantificação de mensagens por reação de PCR quantitativa (qPCR) para IFN- γ (A), DCYTB (B), DMT-1 (C), FPN1 (D) e HAMP (E) em amostra de intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* via oral e tratados com veículo (PBS) ou 300 mg/Kg de deferoxamina (DFO) ou 100 mg/Kg de sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO₄) via intraperitoneal (i.p.) um dia antes da infecção e por mais 7 dias adicionais pós-infecção. Não infectado (Ni). Expressão relativa: expressão do gene indicado em relação ao gene GAPDH. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=4). *Diferença estatisticamente significante entre os animais não infectados/não tratados e animais infectados/tratados. Teste ANOVA e comparação múltipla de Bonferroni, p<0,05.

5.6 A privação de ferro está envolvida no controle da proliferação de *T. gondii* e alterações histológicas no pulmão dos animais infectados

Sabendo que a presença de ferro é requerida para a replicação do parasito no intestino delgado, o próximo passo foi analisar se esse metal estaria envolvido na proliferação e alterações histológicas no pulmão. Foi observado que a quantidade de parasito encontrado no pulmão de animais infectados e tratados com DFO foi menor quando comparado com os animais infectados e tratados com veículo ($p < 0,05$), além disso, a suplementação com FeSO₄ aumentou a quantidade de parasitos encontrada no pulmão quando comparado com os animais infectados e tratados com DFO ($p < 0,05$) (Figura 8A).

Além disso, observamos que os animais infectados apresentaram uma infiltração de células inflamatórias mononucleares nos septos alveolares (Figura 8B - veículo) levando a um comprometimento da área dos alvéolos pulmonares quando comparado com os animais não infectados e não tratados ($p < 0,05$) (Figura 8B, gráfico). Animais infectados e tratados com veículo ou FeSO₄ apresentaram alterações similares (Figura 8B - Veículo e DFO). Contudo, os animais infectados e tratados com DFO apresentaram uma menor infiltração de células inflamatórias nos septos alveolares (Figura 8B - DFO) e uma porcentagem maior da área alveolar quando comparados com os animais infectados e tratados com veículo ou com FeSO₄ ($p < 0,05$) (Figura 8B). Portanto, a proliferação de *T. gondii* no pulmão é diminuída com a privação de ferro (tratamento com DFO), e consequentemente as alterações inflamatórias nesse órgão.

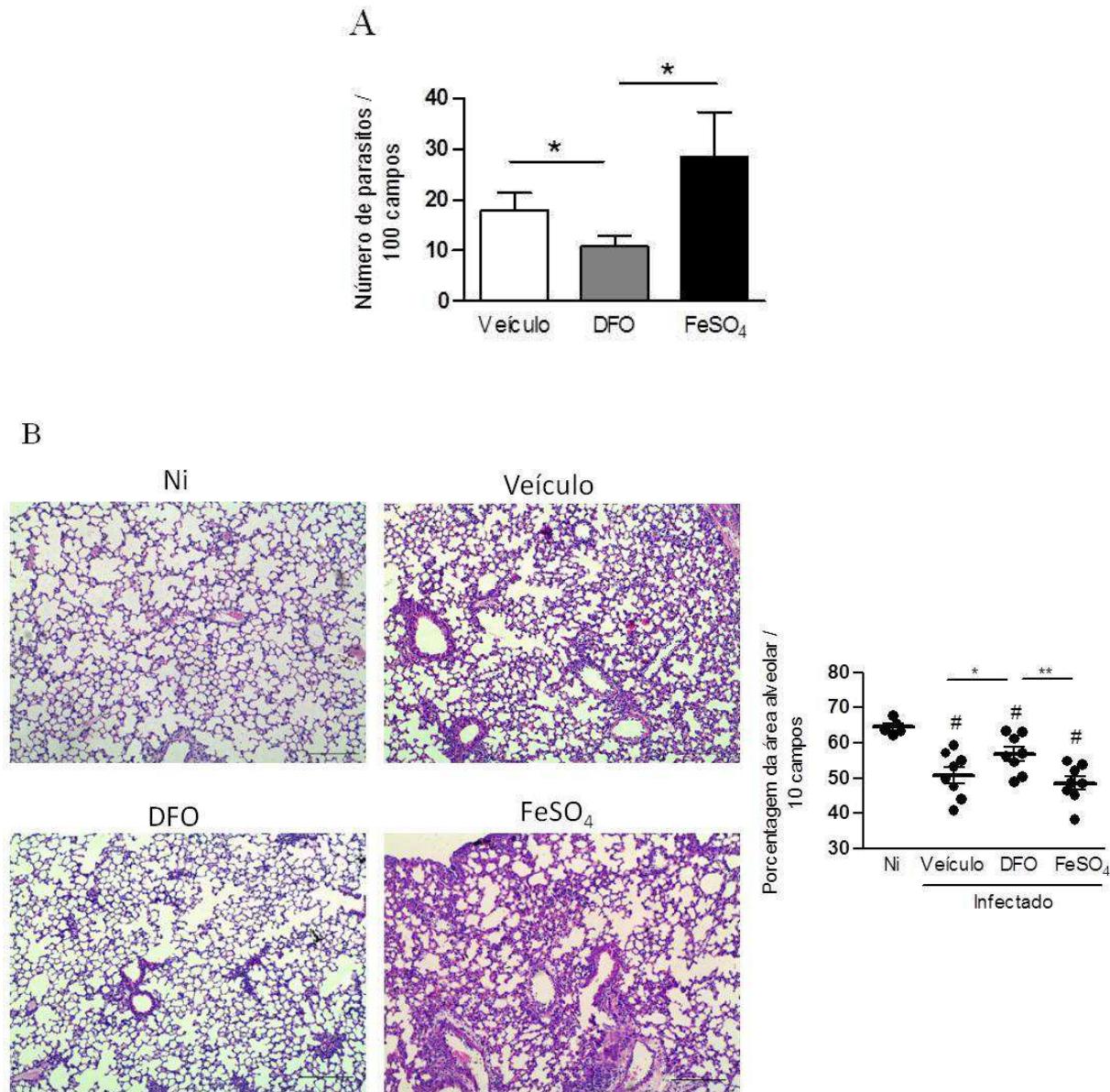


Figura 8. Parasitismo tecidual no pulmão de camundongos C57BL/6 infectados com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* por via oral e tratados com veículo (PBS) ou 300 mg/Kg de deferoxamina (DFO) ou 100 mg/Kg de sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO₄) via intraperitoneal (i.p.) um dia antes da infecção e por mais 7 dias adicionais após a infecção. O número de vacúolos parasitóforos foi quantificado em 100 campos microscópicos (A). Coloração do tecido pulmonar com Hematoxilina e Eosina e quantificação da área alveolar em 10 campos microscópicos utilizando o software ImageJ (B). *Diferença estatisticamente significante entre os animais infectados e tratados com veículo, DFO e suplementados com FeSO₄. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=4). #Diferença estatisticamente significante entre os animais não infectados/não tratados e animais infectados/tratados. Teste ANOVA e comparação múltipla de Bonferroni, p<0,05. Escala da barra = 50µm.

5.7 A disponibilidade de ferro está envolvida na proliferação de *T. gondii* no fígado assim como as alterações histológicas induzidas pelo parasito no órgão

O fígado é outro órgão acometido por *T. gondii* durante a infecção aguda, portanto analisamos se o ferro está envolvido na proliferação do parasito. No fígado a suplementação com FeSO₄ nos animais infectados induziu um aumento do parasitismo tecidual quando comparado com os animais infectados e tratados com DFO ($p < 0,05$), além disso, o tratamento com DFO não diminuiu significativamente a carga parasitária no fígado quando comparado com os animais infectados e tratados com veículo (Figura 9A). A infecção por *T. gondii* induziu um aumento no peso hepático nos animais tratados com veículo ($p < 0,05$) e suplementados com FeSO₄ ($p < 0,05$) quando comparado com os animais não infectados e não tratados, sendo esse aumento significativo entre os animais suplementados com FeSO₄ e tratados com DFO ($p < 0,05$) (Figura 9B).

A infecção oral por *T. gondii* induziu um aumento nos níveis séricos de TGP nos animais infectados quando comparados com os animais não infectados e não tratados ($p < 0,05$) (Figura 9C). Contudo, os animais infectados e tratados com DFO tiveram uma diminuição dos níveis séricos de TGP quando comparado com os animais infectados e tratados com veículo ($p < 0,05$) ou com FeSO₄ ($p < 0,05$) (Figura 9C). Os animais infectados com *T. gondii* apresentaram focos inflamatórios distribuídos pelo parênquima, os quais foram constituídos por células mononucleadas (Figura 9D). A suplementação dos animais infectados com FeSO₄ induziu uma maior quantidade de focos inflamatórios no fígado quando comparados com os animais infectados e tratados com veículo ($p < 0,05$) ou com DFO ($p < 0,05$) (Figura 9D). Portanto, a disponibilidade de ferro para *T. gondii* é capaz de aumentar a proliferação do parasito no fígado e consequentemente causar maiores danos hepáticos.

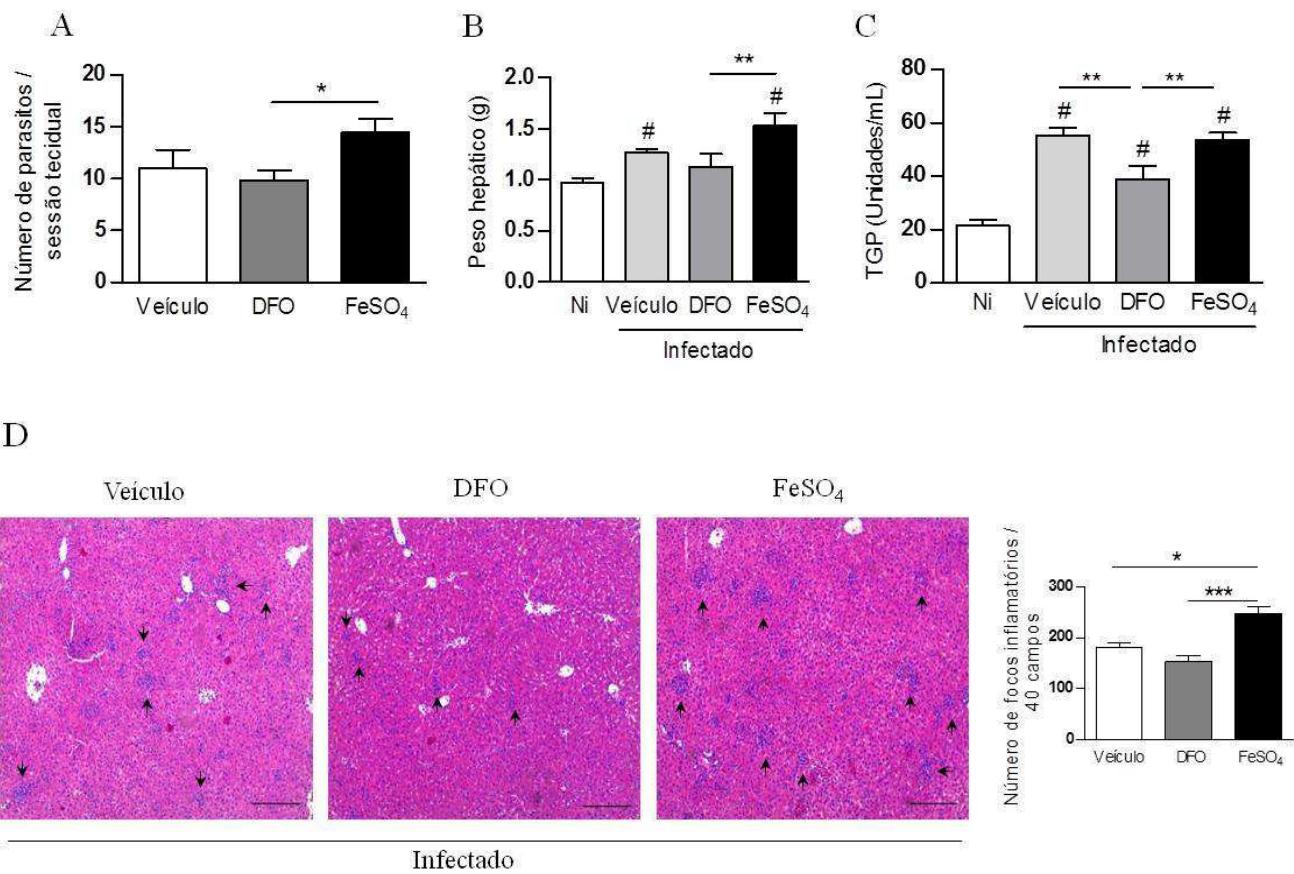


Figura 9. Parasitismo tecidual no fígado foi detectado por coloração de imunohistoquímica e o número de vacúolos parasitóforos foram quantificados por sessão tecidual (A) em camundongos C57BL/6 infectados com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* por via oral e tratados com veículo (PBS) ou 300 mg/Kg de deferroxamina (DFO) ou 100 mg/Kg de sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO₄) por via intraperitoneal (i.p.) um dia antes da infecção e por mais 7 dias adicionais após a infecção. Peso hepático (B). Dosagem sérica de transaminase pirúvica (TGP) (C). Alterações histológicas no fígado em secções coradas com Hematoxilina e Eosina e quantificados em 40 campos microscópicos (D). As setas indicam os focos inflamatórios. *Diferença estatisticamente significante entre os animais infectados e tratados com veículo, DFO e suplementados com FeSO₄. Os dados são representativos de dois experimentos independentes ($n=4$). #Diferença estatisticamente significante entre os animais não infectados/não tratados e animais infectados/tratados. Teste ANOVA e comparação múltipla de Bonferroni, $p<0,05$. Escala da barra = 50µm.

5.8 Privação ou suplementação de ferro altera a detecção sistêmica de IL-6 e IL10 em camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*

A infecção por *T. gondii* induz uma resposta imune do perfil Th1 (DOGRUMAN-AL et al., 2011). Para verificar se a privação ou suplementação de ferro afeta o perfil de citocinas na infecção por *T. gondii*, os níveis de IFN-γ, TNF, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 foram mensuradas em amostras de soro dos animais dos grupos experimentais. A infecção por *T. gondii* aumentou os níveis sistêmicos de IFN-γ e TNF, independente se os animais foram tratados com DFO ou FeSO₄ ($p < 0,05$) (Figura 10A, B). A infecção também aumentou os níveis de IL-6 em amostras de soro dos animais tratados, sendo significativamente maior nos animais tratados com veículo ($p < 0,05$) ou com FeSO₄ ($p < 0,05$) (Figura 10C). A suplementação com FeSO₄ parece diminuir os níveis de TNF em amostras de soro em relação com o tratamento com o veículo (Figura 10B), e o tratamento com DFO apresentou aparentemente menores níveis de IL-6 em relação aos tratamentos com veículo ou FeSO₄ (Figura 10C). No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos de animais suplementados com FeSO₄ ou tratados com DFO em relação a produção de IFN-γ, TNF e IL-6.

Níveis séricos de IL-2 e IL-4 dos animais infectados e tratados com veículo, DFO ou suplementados com FeSO₄ não se alteraram (Figura 10D, E). Finalmente, quando analisamos os níveis de IL-10 em amostras de soro, observamos que a infecção por *T. gondii* aumentou os níveis sistêmicos de IL-10 quando comparados entre os animais não infectados e não tratados e os animais infectados e tratados com veículo ($p < 0,05$) ou FeSO₄ ($p < 0,05$), e os animais infectados e tratados com DFO apresentam níveis séricos aparentemente menores que os animais tratados com veículo ou FeSO₄ (Figura 10F).

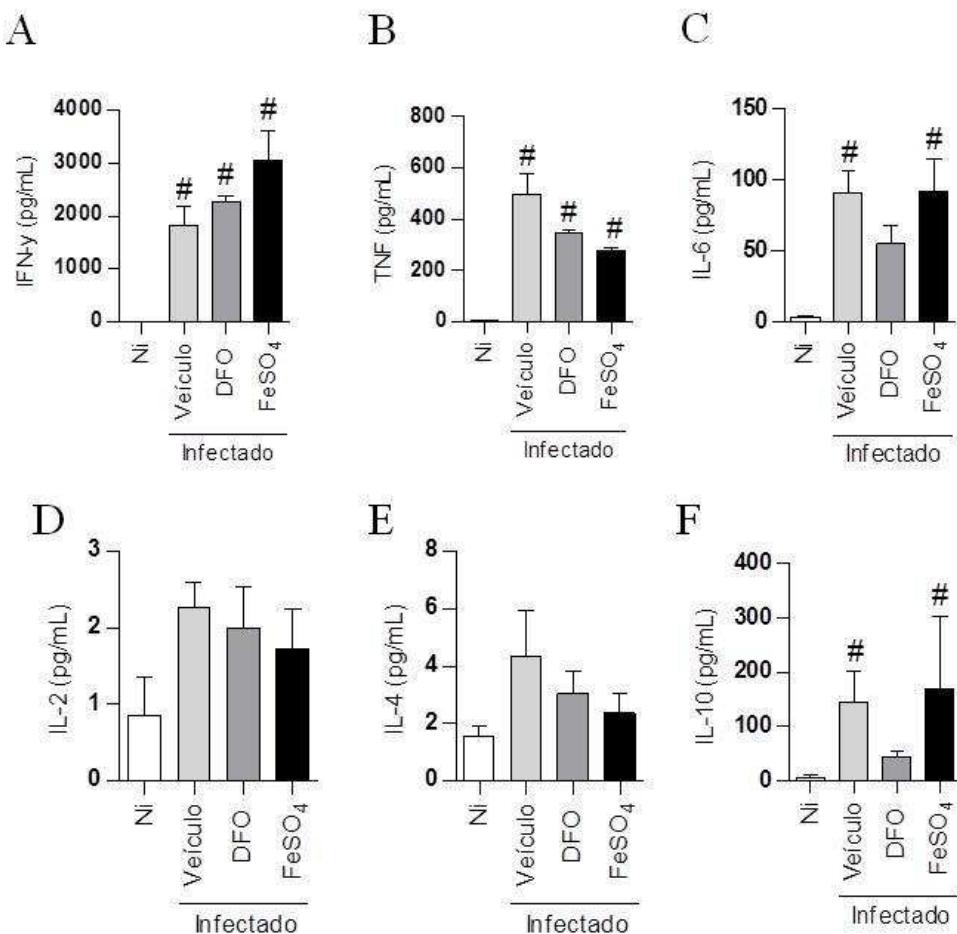


Figura 10. Perfil de citocinas em amostras de soro de camundongos C57BL/6 não infectados (Ni) ou infectados com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* por via oral e tratados com veículo (PBS) ou 300 mg/Kg de deferoxamina (DFO) ou 100 mg/Kg de sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO₄) por via intraperitoneal (i.p.) um dia antes da infecção e por mais 7 dias adicionais após a infecção. Os níveis de IFN-γ (A), TNF (B), IL-6 (C), IL-2 (D), IL-4 (E) e IL-10 (F) foram mensurados pelo método de CBA (*Cytometric bead array*). Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=4). *Diferença estatisticamente significante entre os animais não infectados/não tratados e animais infectados/tratados. Teste Kruskall-Wallis e comparação múltipla de Dunn's e ANOVA e comparação múltipla de Bonferroni, p<0,05.

5.9 Camundongos C57BL/6 desenvolvem níveis similares de IgM e IgA total específico durante infecção por *T. gondii* independente a privação ou suplementação de ferro

A infecção por *T. gondii* causa um número de desordens imunológicas e induzem uma resposta humoral específica (SABIN, FELDMAN, 1948; BESSIÈRES et al., 1992). Para verificar a influência da privação ou suplementação de ferro na detecção de IgM e IgA total específico durante a infecção por *T. gondii*, animais foram infectados e tratados com DFO ou suplementados com FeSO₄, respectivamente, e níveis de imunoglobulinas foram analisados por ELISA em amostra de soro e fezes no oitavo dia após a infecção. Foi observado que a infecção por *T. gondii* aumentam os níveis de IgM e IgA específicos em amostras de soro ($p < 0,05$), contudo, a privação ou suplementação de ferro não modificou os níveis de imunoglobulinas em relação aos animais tratados com veículo (Figura 11A, B). O tratamento com DFO apresentou uma tendência em aumentar os níveis séricos de IgA em relação aos animais tratados com veículo ou FeSO₄ (Figura 11B).

Os níveis de IgA secretada específicos para *T. gondii* em amostras de fezes foram maiores nos animais infectados e tratados ou não com relação aos animais não infectados e não tratados ($p < 0,05$) (Figura 11C). Contudo, não houve diferença entre animais tratados com veículo, DFO ou FeSO₄ para IgA secretada nas fezes (Figura 11C). Observamos também que a infecção por *T. gondii* induziu um aumento dos níveis de IgA secretada anti-*E. coli* nas fezes, sendo esse aumento significante nos animais infectados e tratados com FeSO₄ em relação aos animais não infectados e não tratados ($p < 0,05$). Apesar de mostrar uma tendência nítida de maior produção de IgA secretada nas fezes de animais infectados e tratados com FeSO₄, ela não foi estatisticamente significante. Portanto, a privação ou suplementação de ferro não alteram os níveis

séricos de IgM e IgA, nem os níveis de IgA - específica secretada nas fezes dos animais infectados via oral por *T. gondii*, no entanto, a suplementação de ferro aumentou os níveis de IgA secretada anti-*E. coli* nas fezes e esse aumento foi aparentemente maior nos animais infectados e suplementados com ferro.

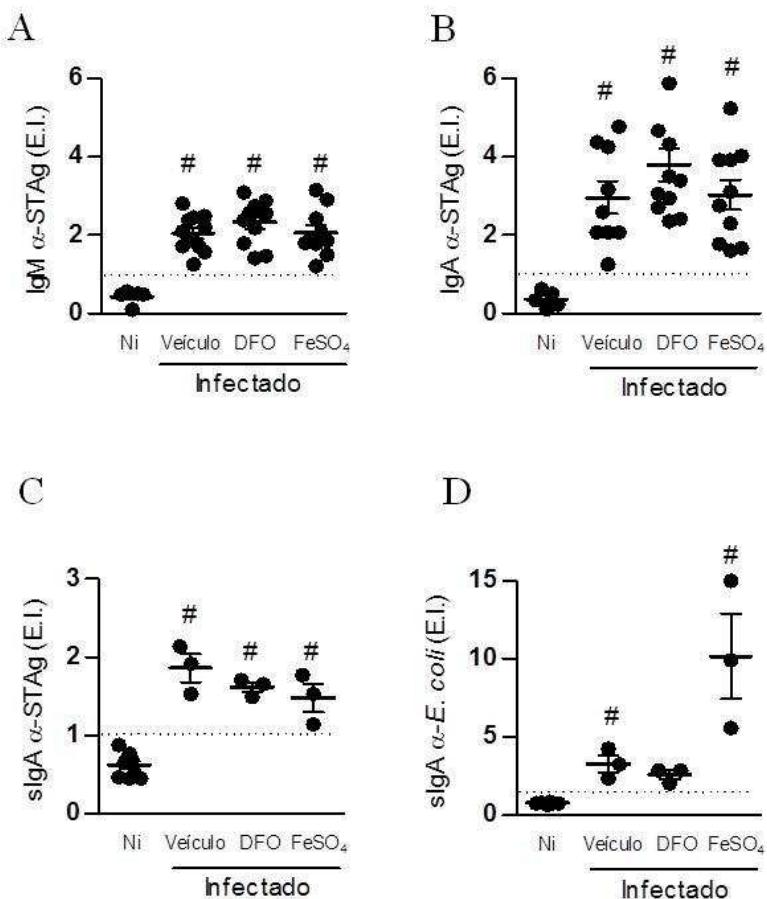


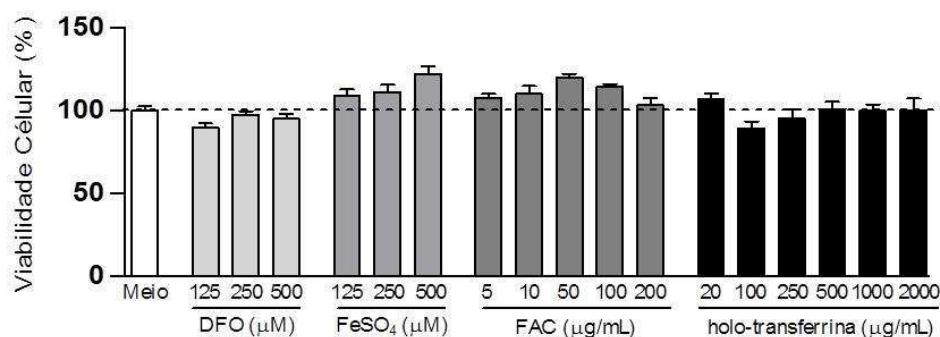
Figura 11. Níveis de anticorpo IgM (A), IgA (B) anti-*T. gondii* em amostras de soro e IgA secretada (C) anti-*T. gondii* e IgA secretada (D) anti-*E. coli* em fezes de camundongos C57BL/6 não infectados/não tratados (Ni) e infectados com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* via oral e tratados com veículo (PBS) ou 300 mg/Kg de deferroxamina (DFO) ou 100 mg/Kg de sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO₄) via intraperitoneal (i.p.) um dia antes da infecção e por mais 7 dias adicionais pós-infecção. Os níveis de IgM e IgA específico foram mensurados pelo imunoensaio enzimático indireto (ELISA) e os resultados expresso em Índice ELISA (E.I.). *Diferença estatisticamente significante entre os animais infectados e tratados com veículo, DFO e suplementados com FeSO₄. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=4). #Diferença estatisticamente significante entre os animais não infectados/não tratados e animais infectados/tratados. Teste Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn's e ANOVA e comparação múltipla de Bonferroni, p<0,05.

5.10 Suplementação com ferro aumenta a quantidade de parasitos *in vitro* na linhagem celular de adenocarcinoma do cólon humano (Caco-2)

Para verificar se a privação ou suplementação de ferro influenciam na carga parasitária em modelo *in vitro*, foi utilizado células de linhagem intestinal Caco-2 infectadas com o clone RH-2F1 de *T. gondii* e tratadas com DFO, FeSO₄, FAC ou holo-transferrina. Primeiramente foi realizado um ensaio de viabilidade celular para testar as concentrações dos tratamentos nas células Caco-2. Observamos que as concentrações utilizadas não alteram a viabilidade das células Caco-2 (Figura 12A). Posteriormente, observamos que a privação de ferro através do tratamento com DFO apresentou uma tendência em diminuir a quantidade de parasitos na concentração de 500 µM (Figura 11B), não sendo estatisticamente significante. A suplementação com ferro com as concentrações de FeSO₄ e FAC (50, 10, 50 e 100 µM) não alteraram significativamente a quantidade de parasitos em relação ao grupo controle, no entanto a concentração de 200 µg/mL de FAC apresentou uma tendência de aumento no número de parasito, não sendo estatisticamente significante (Figura 12B).

A suplementação com ferro através da holo-transferrina foi a que apresentou melhores resultados nos ensaios *in vitro*. As concentrações de 20 e 100 µg/mL aumentaram o número de parasito em relação ao grupo controle, contudo as concentrações de 250, 500, 1000 e 2000 µg/mL aumentaram significativamente o número de parasitos em relação ao grupo controle infectado e tratado somente com o meio (Figura 12B). Logo, no modelo de linhagem celular intestinal Caco-2, o parasito clone RH-2F1 de *T. gondii* necessita de ferro para sua multiplicação, sendo a melhor fonte de ferro para sua replicação o tratamento com holo-transferrina.

A



B

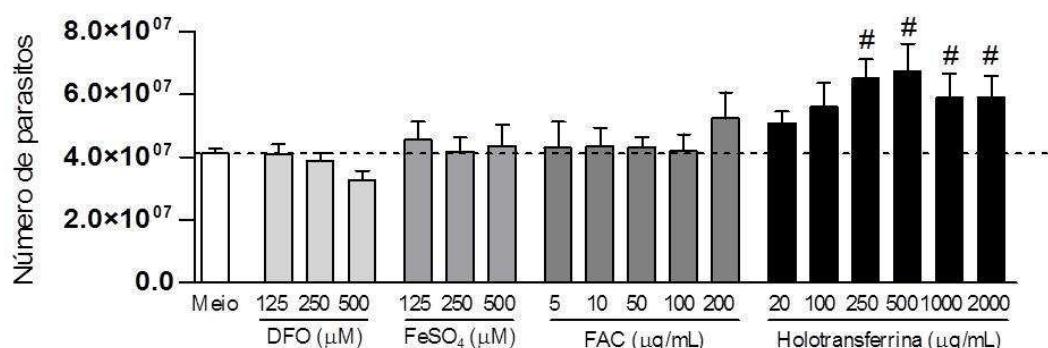


Figura 12. As células Caco-2 foram plaqueadas em meio DMEM a 20% de soro fetal bovino na concentração de 1×10^5 /poço até sua polarização. Um dia antes dos tratamentos as células foram mantidas em meio DMEM incompleto. As células foram tratadas com deferoxamina (DFO), sulfato ferroso (FeSO₄), citrato de amônio férrico (FAC) e holo-transferrina durante 24 horas. A reação foi revelada pelo ensaio de MTT (A). Número de parasitos em células Caco-2 infectadas com o clone RH-2F1 de *T. gondii* na proporção 1:1 e tratadas com DFO, FeSO₄, FAC e holo-transferrina durante 24 horas. A reação foi revelada pelo ensaio de β -galactosidase (B). Os dados são representativos de um experimento (n=8). #Diferença estatisticamente significante entre as células não tratadas (meio) e células tratadas. Teste ANOVA e comparação múltipla de Bonferroni, p<0,05.

6. Discussão

A interação patógeno-hospedeiro permite ao parasito competir com seu hospedeiro pela aquisição de muitos compostos essenciais, tais como glicose, colesterol, triptofano e ferro (SIBLEY et al., 1994; KIRK et al., 1996; COPPENS et al., 2000; HUYNH et al., 2006; 2008). Organismos infecciosos tais como *T. brucei* (TANAKA et al., 2004), *T. gondii* (DZIADEK et al., 2007), *T. vaginalis* (PETERSON, ALDERETE, 1984), apresentam em suas superfícies proteínas ligadoras de lactoferrina. A lactoferrina (PETERSON, ALDERETE, 1984; LEÓN-SICAIROS et al., 2005) ou transferrina (SCHELL et al., 1991) são utilizadas por *Entamoeba histolytica* e *T. vaginalis*, e *T. brucei*, respectivamente, para seu crescimento; além disso, ambas moléculas são usadas por promastigotas de *L. chagasi* para sua proliferação (WILSON et al., 1994).

Durante a infecção oral, taquizoítos de *T. gondii* desenvolvem dentro do epitélio intestinal através de um rápido crescimento, e lisam as células e liberam um número grande de novos taquizoítos, indicando uma alta necessidade de nutrientes (DUBEY et al., 1998). Adicionalmente, muitas enzimas associadas com aquisição de nutrientes do hospedeiro, tais como glicose e colesterol, são reguladas positivamente durante infecção por *T. gondii* em células HFF (fibroblasto do prepúcio humano) (BLADER et al., 2001). No presente estudo, quando camundongos C57BL/6 foram infectados oralmente com *T. gondii*, foi observado um acúmulo de ferro no epitélio intestinal, bem como no pulmão, fígado e um aumento nos níveis séricos de ferro, sugerindo que o ferro é um nutriente necessário para o desenvolvimento e proliferação de *T. gondii*. Além disso, receptor de transferrina (TfR) foi encontrado estar especificamente regulado positivamente em células HFF infectadas com *T. gondii*, o qual funciona para captação de ferro através da ligação com a transferrina (GAIL et al., 2001; 2004). Além disso, Dziadek e colaboradores identificaram duas proteínas da família das roptrias (ROP2 e ROP4) em

T. gondii que são capazes de ligar à proteína transportadora de ferro, a lactoferrina (DZIADEK et al., 2005; 2007).

Mesilato de deferoxamina é um quelante de ferro com propriedades antioxidantes (RACHIDI et al., 1994). Sobrecarga de ferro catalisa a formação de radicais hidroxilos altamente reativos que causam danos à membrana e desnaturação de proteínas, sendo a deferoxamina usado para quelar o ferro (VERMYLEN, 2008). Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado que a deferoxamina apresenta efeitos benéficos no tratamento contra protozoários, tais como *T. cruzi* e *P. berguei*, não apresentando grandes efeitos colaterais hematológicos (HERSHKO, PETO, 1988; ARANTES et al., 2011; PAIVA et al., 2012). Células intestinais de ratos (DIMIER, BOUT, 1998) e células HFF tratadas com deferoxamina (GAIL et al., 2004) diminuíram a replicação de *T. gondii* de maneira dose dependente. Nós tratamos camundongos C57BL/6 por via intraperitoneal com deferoxamina e observamos o resultado da infecção, principalmente no crescimento do parasito e lesões no intestino delgado. Em nosso trabalho, observamos que a deferoxamina diminuiu o crescimento de *T. gondii* no intestino delgado. A carga parasitária baixa observada neste órgão pode estar relacionada com a privação de ferro para o crescimento do parasito. Portanto, como foi observado *in vitro* para cepa RH (DIMIER, BOUT, 1998; GAIL et al., 2004), a privação de ferro também foi capaz de interferir no crescimento da cepa ME-49 de *T. gondii* *in vivo*.

Por outro lado, a necessidade de ferro por *T. gondii* para seu metabolismo e proliferação foi confirmado pela suplementação de ferro com sulfato ferroso nos animais. Nós verificamos que com maior disponibilidade de ferro a carga parasitária intestinal dos animais foi elevada. Parasitemia aumentada relacionada com a disponibilidade de ferro também foi verificada em estudos *in vivo* e *in vitro* com

Plasmodium. Cultura de células de hepatoma Huh7 infectadas com *P. berghei* apresentou alta porcentagem de formas exoeritrocíticas do parasito após a suplementação com citrato de amônio férreo, bem como aumento da carga parasitária hepática de *P. berghei* em camundongos infectados 40 horas após a suplementação de ferro (PORTUGAL et al., 2011). Além disso, a suplementação com sulfato ferroso reverteu à diminuição mediada pelo tratamento com cobalto protoporfirina no parasitismo em macrófagos peritoneais infectados *in vitro* com *T. cruzi* (PAIVA et al., 2012).

Em nossos resultados foi verificado que o tratamento com DFO melhora os parâmetros intestinais que são afetados pela infecção por *T. gondii*, tais como comprimento e alterações inflamatórias no intestino delgado. Esses efeitos benéficos do tratamento com DFO pode estar relacionado com a diminuição da carga parasitária e também pelas propriedades antioxidantes da droga. A privação de ferro através do tratamento com DFO estendeu por mais alguns dias a porcentagem de sobrevida dos animais, em contrate com os animais que foram suplementados com FeSO₄, no qual morreram mais precocemente. Os resultados de Mahmoud (1999) mostraram que camundongos Swiss infectados com a cepa RH e tratados com 400 mg de DFO durante 10 dias após a infecção levou a uma sobrevida de 70% dos animais até o dia 30 após a infecção (MAHMOUD, 1999).

A homeostasia no intestino depende da interação entre vários tipos celulares do epitélio intestinal com células imunes locais, os quais forma uma barreira física e bioquímica contra microorganismos comensais e patogênicos (PETERSON, ARTIS, 2014). Dentre essas células encontramos as células de Paneth, especializadas em secretar peptídeos antimicrobianos (lisozimas e criptidinas) dentro do lúmen intestinal (CLEVERS, BEVINS, 2013). A infecção oral pela cepa ME-49 de *T. gondii* induz uma

diminuição do número de células de Paneth, bem como a diminuição da expressão de defensina-6 e criptidina-2 em camundongos C57BL/6 (BURGER et al., 2018). Em nosso estudo observamos que a infecção também levou a uma diminuição das células de Paneth no intestino delgado, contudo, o tratamento com DFO levou a uma contagem maior de células de Paneth em relação aos outros grupos. Além disso, também observamos que a infecção por *T. gondii* levou a uma diminuição das células caliciformes no intestino delgado, conforme já demonstrado em outro estudo onde a infecção oral de ratos com oocistos da cepa ME-49 levou a uma redução das células caliciformes (SCHNEIDER et al., 2017). E novamente, o tratamento com DFO levou a contagem maior de células caliciforme após a infecção, o que poderia estar contribuindo para o menor parasitismo e alterações inflamatórias menos graves no órgão.

A lâmina própria contém numerosas células imunes, tais como macrófagos, eosinófilos e células B. Os macrófagos são os mais abundantes na lâmina própria e estão envolvidos na fagocitose e eliminação de microorganismos (MOWAT, AGACE, 2014). O influxo de neutrófilo para o intestino é associado a uma imunopatologia grave, sugerindo que essas células contribuem para o desenvolvimento da lesão (CHRISTOFFERSSON, PHILLIPSON, 2018). Administração de anticorpos específicos que diminuem neutrófilos melhoram os danos intestinais associados com a infecção por *T. gondii* (DUNAY et al., 2010). A infecção por *T. gondii* ocasiona o aumento dessas células (BLISS et al., 1999, MORDUE, SIBLEY, 2003), e nossos dados confirmaram esse aumento através do aumento das enzimas NAG e MPO, sendo que esse aumento pode estar relacionado a elevada carga parasitária em animais com maior disponibilidade de ferro, ou seja, animais tratados com FeSO₄. Nossos resultados também mostraram uma tendência para diminuição do marcador de eosinófilos (EPO)

após a infecção oral por *T. gondii*, conforme foi demonstrado por Fenoy e colaboradores onde a quantidade de eosinófilos foi menor no lavado bronco alveolar de animais BALB/c infectados com a cepa Berverley de *T. gondii* (FENOY et al., 2009). Curiosamente, os animais tratados com DFO apresentaram níveis baixos de EPO. Essa diminuição pode estar relacionada com a propriedade do DFO, pois estudos demonstraram que o tratamento de camundongos BALB/c com o complexo DFO/zinco-gálio melhora o processo inflamatório envolvido com a asma, além de diminuir a quantidade de eosinófilos no lavado bronco alveolar (BIBI et al., 2014).

Muitos protozoários patogênicos têm modulado e desenvolvido mecanismos para aquisição de ferro a partir de seus hospedeiros (LOO, LALONDE, 1984; WILSON et al., 1994; DIMIER, BOUT, 1998; HUYNH et al., 2006; DZIADEK et al., 2007; HUYNH et al., 2008). Nossos resultados mostraram que a infecção por *T. gondii* modula a expressão gênica de proteínas envolvidas na absorção de ferro intestinal com o objetivo de manter o ferro nos enterócitos. A infecção oral por *T. gondii* apresentou uma tendência em aumentar a expressão do transportador apical DMT-1, o que não foi evidente nos animais infectados e tratados com DFO e não alterou a expressão gênica do transportador basolateral ferroportina. Além disso, a infecção por *T. gondii* aumentou a expressão gênica da hepcidina, o hormônio que leva à degradação de ferroportina e consequente aumento dos níveis de ferro intracelular. Portanto, o parasito parece influenciar na expressão de receptores que induzem a internalização de ferro, DMT-1, exceto nos animais que mostraram menor parasitismo (tratados com DFO), e diminuir a expressão daqueles que levam a saída de ferro celular, favorecendo a proliferação do parasito num ambiente rico no nutriente.

Após a infecção oral, *T. gondii* cruza o epitélio intestinal e dissemina para outros tecidos (ARAUJO et al., 2013). *T. gondii* entra no hospedeiro através da mucosa

intestinal e infecta leucócitos expressando CD11c e CD11b o qual são transportados para colonizar tecidos distantes tais como cérebro (COURRET et al., 2006). Nós mostramos que a migração de *T. gondii* para o pulmão e fígado foi observada nesses órgãos aos 8 dias de infecção, e a suplementação com ferro por FeSO₄ foi capaz de aumentar a replicação do parasito no tecido pulmonar e hepático, e o tratamento com DFO foi capaz de diminuir o crescimento do parasito no pulmão, levando a uma diminuição dos danos teciduais alveolares causados pela infecção. Assim, o ferro favorece a proliferação de *T. gondii* em diferentes tecidos. Além disso, a alta carga parasitária no fígado de camundongos suplementados com ferro pode ter contribuído para aumentar as alterações inflamatórias nesse órgão. O fígado é um órgão que necessita ser melhor estudado em relação a dose-resposta da deferoxamina, pois o fígado é um dos órgãos onde ocorre o estoque de ferro na forma de ferritina, sendo assim uma fonte de nutriente para infecções parasitárias (RISHI, SUBRAMANIAM, 2017).

A infecção por *T. gondii* desencadeia a produção de IL-12 que age em sinergismo com TNF para induzir a produção de IFN-γ pelas células NK, sendo que a infecção normalmente desencadeia uma imunidade celular protetora na qual IFN-γ tem um papel central (DENKERS, GAZZINELLI, 1998). IFN-γ e TNF são importantes na indução de reativos intermediários de nitrogênio (óxido nítrico - NO) que apresentam atividade microbicida contra taquizoítos (SIBLEY et al., 1991; LANGERMANS et al., 1992). Contudo, quando certas linhagens de camundongos são infectadas por via oral, tais como C57BL/6, uma resposta imune Th1 exacerbada se desenvolve com necrose maciça das células epiteliais do intestino delgado, com células T CD4⁺, IFN-γ, TNF e NO mediando o desenvolvimento de lesões intestinais (LIESENFELD et al., 1996; 1999). Em nosso estudo, foi observado que a quantidade de ferro disponível para o

metabolismo de *T. gondii* não alterou os elevados níveis de IFN-γ e TNF que normalmente ocorrem na infecção por *T. gondii*. Em adição, Okada e colaboradores demonstraram uma aumentada expressão do receptor de IFN-γ, IFN-γR1 e principalmente IFN-γR2 em linhagens de células de carcinoma hepatocelular após o tratamento com DFO (OKADA et al., 2007), sugerindo que IFN-γ pode efetivamente ser um dos mecanismos protetores mediados por DFO.

Em adição às citocinas acima, IL-2 e IL-4 estão envolvidas na infecção por *T. gondii*. Sharma e colaboradores mostraram que a administração de IL-2 recombinante diminuiu a mortalidade de camundongos infectados com *T. gondii*, bem como houve diminuição do número de cistos no cérebro (SHARMA et al., 1985). Estudos usando camundongos IL-4^{-/-} mostraram que a taxa de mortalidade foi alta na fase aguda da infecção com a cepa RRA (Beverly) do que nos camundongos controles (ROBERTS et al., 1996). Outro estudo usando camundongos IL-4^{-/-} (*background* 129/J) mostraram que esses animais são mais suscetíveis à infecção oral pela cepa ME-49 do que camundongos controles, e desenvolvem alterações inflamatórias no cérebro com uma alta carga parasitária (SUZUKI et al., 1996). Embora IL-2 e IL-4 são ambas citocinas importantes no curso da infecção por *T. gondii*, nós não observamos qualquer diferença entre os grupos em relação a produção de IL-2 e IL-4 independente da adição ou privação de ferro.

IL-6 é uma citocina com atividade pleiotrópica, sendo produzida por diferentes tipos de células, incluindo monócitos/macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, células da glia, condrocitos, osteoblastos, células T, células B, granulócitos, mastócitos e células tumorais (AKIRA et al., 1993). Camundongos geneticamente deficientes em IL-6 (IL-6^{-/-}, *background* C57BL/6) foram mais suscetíveis que seus controles quando infectados com 10 cistos de *T. gondii* por via intraperitoneal, e

apresentaram uma grande área de necrose no cérebro com presença de taquizoítos. Animais apresentaram um maior número de cistos que os animais controles, e pequenas quantidades de IFN-γ e altos níveis de mRNA IL-10 no cérebro na oitava semana após a infecção (SUZUKI et al., 1997). Em acordo, quando camundongos IL-6^{-/-} foram infectados com a cepa RRA, por via oral, com 20 cistos, eles foram mais suscetíveis apresentando alta mortalidade até 28 dias após a infecção e uma alta carga parasitária com altos níveis séricos de IFN-γ entre os dias 7-8 após infecção, e alta inflamação no cérebro com áreas de necrose (JEBBARI et al., 1998).

Contudo, a quantidade de IL-6 deve ser bem controlada, uma vez que camundongos C57BL/6 com deficiência em SOCS3 em linhagens de neutrófilos e macrófagos infectados com 10⁴ taquizoítos por via intraperitoneal com a cepa Prugniaud de *T. gondii* foram altamente suscetíveis, morrendo até o décimo dia após a infecção e apresentando alta produção de IL-6 no oitavo dia, sendo essa suscetibilidade associada com os altos níveis de IL-6 que se torna um potente antagonista da produção de IL-12 (WHITMARSH et al., 2011). Nossos dados mostraram que o tratamento com deferoxamina diminui os níveis séricos de IL-6 correlacionando com números menores de parasitos encontrados nos órgãos durante a fase aguda de infecção. Além disso, IL-6 pode agir na regulação sistêmica de ferro através da indução do hormônio hepcidina (NEMETH et al., 2004), sendo a hepcidina o regulador da entrada de ferro para a corrente sanguínea, aprisionando o ferro dentro dos enterócitos (NEMETH et al., 2009). A ausência de IL-6 é prejudicial ao hospedeiro infectado com *T. gondii*, no entanto, a citocina em altos níveis pode ser mais prejudicial que benéfica. No contexto de nossos trabalhos experimentais, elevados níveis de IL-6 induzidos pela infecção oral por *T. gondii* pode favorecer o crescimento do parasito, uma vez que o eixo IL-6-hepcidina

aumenta a disponibilidade de ferro dentro dos enterócitos facilitando o uso deste biometal pelo parasito.

A citocina anti-inflamatória IL-10 desempenha um papel crítico no controle da resposta inflamatória por *T. gondii*. Camundongos C57BL/6 IL-10^{-/-} não são capazes de controlar os efeitos inflamatórios induzidos por IFN-γ após a infecção intraperitoneal com a cepa ME-49 e morrem durante a fase aguda dessa doença com elevada patologia hepática e níveis altos de IL-12 e IFN-γ (GAZZINELLI et al., 1996). Em nosso estudo, observamos que a quantidade de parasito influenciou nos níveis séricos de IL-10, e baixos níveis dessa citocina após o tratamento com DFO pode estar relacionado com o número baixo de parasitos, que por sua vez induziu um menor grau de inflamação nesses animais.

Tem sido por muito tempo reconhecido que a infecção por *T. gondii* promove uma resposta mediada por anticorpos, e que esses anticorpos afetam taquizoítos extracelulares, mas não afetam taquizoítos intracelulares (SABIN, FELDMAN, 1948). Usando camundongos μMT (deficientes de célula B), foi observado que a imunização com taquizoítos da cepa ts-4 induziu uma alta suscetibilidade quando os animais foram desafiados com a cepa RH, sendo sua sobrevivência prolongada quando administrado soro imune contra *T. gondii*, o efeito protetor foi mediado pela inibição da infecção das células do hospedeiro pelo taquizoíto (SAYLES et al., 2000). Em paralelo, outro estudo utilizando camundongos μMT mostrou que a infecção oral com a cepa ME-49 induziu alta mortalidade associada com uma alta carga parasitária e alterações inflamatórias no cérebro (KANG et al., 2000). Como esperado anticorpos IgM e IgA específicos foram encontrados em amostras de soro no dia 8 após a infecção, independente da privação ou suplementação com ferro. Foi anteriormente mostrado que IgA é detectada em amostras de soro na segunda semana após a infecção por via oral com 40 cistos de cepa 76K de *T.*

gondii em camundongos OF1 e no dia 21 após a infecção a IgA é encontrada em secreções intestinais (CHARDÈS et al., 1990).

Em nossos estudos, camundongos tratados com DFO apresentaram uma tendência em aumentar os níveis sistêmicos de IgA em relação aos animais infectados e tratados com veículo ou FeSO₄. Assim, em nosso trabalho experimental a detecção de IgA no soro foi mais precoce daquela observada em outros estudos, o que pode estar relacionado com a linhagem do camundongo ou a cepa de parasito utilizado, e elevados níveis sistêmicos de IgA podem estar correlacionados com menor carga parasitária observada nesses animais, visto que IgA a partir do leite materno de mulheres infectadas causam redução na infecção de enterócitos *in vitro* (MACK, MACLEOD, 1992). Além disso, a infecção por *T. gondii* induziu uma aumento de IgA secretada específica anti-*T. gondii* em amostras de fezes, adicionalmente, a infecção por *T. gondii* causa comprometimento da barreira intestinal e exposição do conteúdo luminal (BARRAGAN, SIBLEY, 2002). A infecção por *T. gondii* levou a aumento da produção de anticorpos IgA secretada anti-*E. coli* em amostras de fezes, no qual níveis altos foram encontrados após a suplementação de ferro devido a alta carga parasitária e maior comprometimento intestinal, no entanto, os níveis de anticorpos IgA secretada anti-*E. coli* nos animais infectados apenas ou infectados e tratados com DFO foram menores, apesar de não estatisticamente significante, sugerindo um menor comprometimento da barreira intestinal em relação aos animais infectados e suplementados com ferro. *T. gondii* causa quebra da fisiologia intestinal e funções de barreira, seguido por acúmulo de bactérias gram-negativas no íleo, translocação bacteriana, entre elas *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, e *Bacteroides spp* e agravamento mediado por bactérias da inflamação intestinal (HEIMESSAT et al., 2006). Portanto, nossos achados que os animais suplementados com ferro apresentam maiores níveis de IgA específica

para *E. coli*, sugere que nesses animais provavelmente esteja ocorrendo maior proliferação de bactérias no lúmen intestinal ou maior translocação bacteriana, consequentemente maior inflamação.

Modelos *in vitro* com células Caco-2 são utilizadas para entender a barreira intestinal para determinados fármacos e infecções (ARTURSSON et al., 2001). Nossos resultados *in vitro* mostraram que a replicação de *T. gondii* através da infecção pelo clone RH-2F1 é dependente de ferro, sendo que a alta carga parasitária foi encontrada com a suplementação de ferro disponível a partir da holo-transferrina, conforme demonstrado em células HFF que aumentam a expressão do TfR após infecção por *T. gondii* (GAIL et al., 2001; 2004). Deferoxamina diminuiu a carga parasitária celular, contudo, seu efeito só foi satisfatório apenas em concentração alta ($500\mu M$), apesar de não ser estatisticamente significante. Portanto, o ferro influencia na proliferação de *T. gondii* também em linhagens celulares intestinais humanas.

Os resultados deste trabalho demonstram que a infecção oral por *T. gondii* induz o acúmulo de ferro nos órgãos que são acometidos durante a fase aguda da infecção, tais como o intestino delgado, pulmão e fígado em camundongos C57BL/6. O tratamento com deferoxamina demonstrou resultados promissores na infecção por *T. gondii*, uma vez que o tratamento diminuiu o parasitismo intestinal e pulmonar, bem como induziu uma melhora no processo inflamatório intestinal e pulmonar. Por outro lado, a disponibilidade de ferro aumenta a proliferação do parasito, pois o tratamento com sulfato ferroso aumentou a carga parasitária no intestino delgado, pulmão e fígado, e comprometimento da barreira intestinal. Além disso, este trabalho indica que a expressão gênica de certas proteínas envolvidas na regulação da absorção de ferro pelos enterócitos, tais como DMT-1 e HAMP, bem como a produção da citocina IL-6 poderia estar envolvida no mecanismo de internalização do ferro e favorecimento da

multiplicação de *T. gondii*. Portanto, estudos adicionais necessitam ser realizado para melhor compreender a relação entre ferro e *T. gondii*, bem como, uma possível forma alternativa ou complementar do tratamento com deferoxamina durante a infecção por esse parasito.

7. Conclusões

- A infecção oral pela cepa ME-49 de *T. gondii* induz acúmulo de ferro no intestino delgado, pulmão e fígado, bem como aumento dos níveis séricos de ferro em camundongos C57BL/6.
- A privação de ferro após o tratamento com DFO apresentou efeitos satisfatórios em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*, em oposição, a suplementação de ferro com FeSO₄ que induziu efeitos exacerbados da infecção pelo parasita.
- A privação de ferro pelo tratamento com DFO induziu uma menor carga parasitária no intestino delgado e pulmão, seguido de menores alterações inflamatórias causadas pela infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, no entanto, a disponibilidade de ferro pela suplementação com FeSO₄ aumentou a carga parasitária no intestino delgado, pulmão e fígado dos animais, bem como induziu maiores alterações inflamatórias nesses órgãos.
- A disponibilidade de ferro pelo tratamento com FeSO₄ levou a um aumento dos marcadores enzimáticos para macrófagos e neutrófilos no intestino delgado, bem como um menor número de células de Paneth. A privação de ferro pelo tratamento com DFO preservou o número de células de Paneth e em menor extensão de células caliciformes.
- O tratamento com DFO diminuiu os níveis séricos de IL-6 e IL10 em camundongos C57BL/6 infectados por via oral com a cepa ME-49 de *T. gondii*.

- A privação ou suplementação de ferro não alterou os níveis dos anticorpos anti-*T. gondii* IgM, IgA no soro e IgA secretado nas fezes dos camundongos C57BL/6 infectados por via oral pela cepa ME-49 de *T. gondii*, contudo, a suplementação com FeSO₄ induziu maiores níveis de IgA secretada anti-*E. coli* nas fezes.

- A infecção oral pela cepa ME-49 de *T. gondii* em camundongos C57BL/6 alterou a expressão gênica de DMT-1 e HAMP no intestino delgado, apesar de não ser de forma estatisticamente significante, e a privação de ferro pelo tratamento com DFO mostrou uma tendência em diminuir a expressão de DMT-1.

- A suplementação de ferro pelo tratamento com holo-transferrina aumentou o número de parasitos do clone RH-2F1 de *T. gondii* em cultivo celular em linhagem intestinal humana Caco-2. Já o tratamento com DFO induziu uma diminuição do número de parasitos somente na concentração de 500µM.

8. Referências Bibliográficas

- Ajzenberg, D.; Cogné, N.; Paris, L.; Bessières, M. H.; Thulliez, P.; Filisetti, D.; Pelloux, H.; Marty, P.; Dardé, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *The Journal of Infections Disease*. V. 186, n. 5, p. 684-689, 2002. <https://doi.org/10.1086/342663>.
- Akira, S.; Taga, T.; Kishimoto, T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Advances in Immunology*. V. 54, p. 1-78, 1993. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60532-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60532-5).
- 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 Pathogens*. V. 1, n. 2, p. e17, 2005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010017>.
- Andrews, N. C. Disorders of iron metabolism. *The New England Journal of Medicine*. V. 341, n. 26, p. 1986-1995, 1999. <https://doi.org/10.1056/NEJM199912233412607>.
- Appleford, P. J.; Smith, J. E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. *International Journal for Parasitology*. V. 30, n. 11, p. 1187-1191, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00109-0).
- Arantes, J. M.; Francisco, A. F.; De Abreu Vieira, P. M.; Silva, M.; Araújo, M. S.; De Carvalho, A. T.; Pedrosa, M. L.; Carneiro, C. M.; Tafuri, W. L.; Martins-Filho, O. A.; Elói-Santos, S. M. *Trypanosoma cruzi*: desferrioxamine decreases mortality and parasitemia in infected mice through a trypanostatic effect. *Experimental Parasitology*. V. 128, n. 4, p. 401-408, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.05.011>.
- Araujo, E. C.; Barbosa, B. F.; Coutinho, L. B.; Barenco, P. V.; Sousa, L. A.; Milanezi, C. M.; Bonfá, G.; Pavanelli, W. R.; Silva, J. S.; Ferro, E. A.; Silva, D. A.; Cunha-Junior, J. P.; Silva, N. M. Heme oxygenase-1 activity is involved in the control of *Toxoplasma gondii* infection in the lung of BALB/c and C57BL/6 and in the small intestine of C57BL/6 mice. *Veterinary Research*. V. 44, p. 89, 2013. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-89>.
- Artursson, P.; Palm, K.; Luthman, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Review*. V. 46, n. 1-3, p. 27-43, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00128-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00128-9).
- Bahia-Oliveira, L. M.; Jones, J. L.; Azevedo-Silva, J.; Alves, C. C.; Oréfice, F.; Addiss, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. V. 9, n. 1, p. 55-62, 2003. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020160>.
- Barenco, P. V.; Lourenço, E. V.; Cunha-Júnior, J. P.; Almeida, K. C.; Roque-Barreira, M. C.; Silva, D. A.; Araújo, E. C.; Coutinho, L. B.; Oliveira, M. C.; Mineo, T. W.; Mineo, J. R.; Silva, N. M. *Toxoplasma gondii* 70 kDa heat shock protein: systemic detection is associated with the death of the parasites by the immune response and its increased expression in the brain is associated with parasite replication. *PLoS One*. V. 9, n. 5, e96527, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096527>.
- Barragan, A.; Sibley, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *The Journal of Experimental Medicine*. V. 195, n. 12, p. 1625-1633, 2002. <https://doi.org/10.1084/jem.20020258>.

Benevides, L.; Milanezi, C. M.; Yamauchi, L. M.; Benjamim, C. F.; Silva, J. S.; Silva, N. M. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. *The American Journal of Pathology*. V. 173, n. 3, p. 741-751, 2008. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080129>.

Bereswill, S.; Muñoz, M.; Fischer, A.; Plickert, R.; Haag, L. M.; Otto, B.; Kühl, A. A.; Loddenkemper, C.; Göbel, U. B.; Heimesaat, M. M. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS One*. V. 5, n. 12, e15099, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015099>.

Bessières, M. H.; Roques, C.; Berrebi, A.; Barre, V.; Cazaux, M.; Séguéla, J. P. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. *Journal of Clinical Pathology*. V. 45, n. 7, p. 605-608, 1992. <https://doi.org/10.1136/jcp.45.7.605>.

Bibi, H.; Vinokur, V.; Waisman, D.; Elenberg, Y.; Landesberg, A.; Faingersh, A.; Yadid, M.; Brod, V.; Pesin, J.; Berenshtein, E.; Eliashar, R.; Chevion, M. Zn/Ga-DFO iron-chelating complex attenuates the inflammatory process in a mouse model of asthma. *Redox Biology*. V. 2, p. 814-819, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.009>.

Black, M. W.; Boothroyd, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. V. 64, n. 3, p. 607-623, 2000. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>.

Blader, I. J.; Manger, I. D.; Boothroyd, J. C. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells. *The Journal of Biology Chemistry*. V. 276, n. 26, p. 24223-2431, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100951200>.

Blader, I. J.; Saeij, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. V. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02453.x>.

Bliss, S. K.; Zhang, Y.; Denkers, E. Y. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. *Journal of Immunology*. V. 163, n. 4, p. 2081-2088, 1999.

Blume, M.; Rodriguez-Contreras, D.; Landfear, S.; Fleige, T.; Soldati-Favre, D.; Lucius, R.; Gupta, N. Host-derived glucose and its transporter in the obligate intracellular pathogen *Toxoplasma gondii* are dispensable by glutaminolysis. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. V. 106, n. 31, p. 12998-123003, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903831106>.

Boothroyd, J. C.; Grigg, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Current Opinion in Microbiology*. V. 5, n. 4, p. 438-442, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00349-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00349-1).

Boothroyd, J. C.; Dubremetz, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature Reviews: Microbiology*. V. 6, n. 1, p. 79-88, 2008. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>.

Bradley, P. J.; Ward, C.; Cheng, S. J.; Alexander, D. L.; Coller, S.; Coombs, G. H.; Dunn, J. D.; Ferguson, D. J.; Sanderson, S. J.; Wastling, J. M.; Boothroyd, J. C. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 280, n. 40, p. 34245-34258, 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504158200>.

Burchmore, R. J.; Barrett, M. P. Life in vacuoles - nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. International Journal for Parasitology. V. 31, n. 12, p. 1311-1320, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00259-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00259-4).

Burger, E.; Araujo, A.; López-Yglesias, A.; Rajala, M. W.; Geng, L.; Levine, B.; Hooper, L. V.; Burstein, E.; Yarovinsky, F. Loss of Paneth Cell Autophagy Causes Acute Susceptibility to *Toxoplasma gondii*-Mediated Inflammation. Cell Host & Microbe. S1931-3128, n. 18, p. 30001-30005, 2018.

Canonne-Hergaux, F.; Gruenheid, S.; Ponka, P.; Gros, P. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. Blood. V. 93, n. 12, p. 4406-4417, 1999.

Carruthers, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Tropica. V. 81, n. 2, p. 111-122, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00201-7).

Carruthers, V.; Boothroyd, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. Current Opinion in Microbiology. V. 10, n. 1, p. 83-89, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>.

Carruthers, V. B.; Suzuki, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. Schizophrenia Bulletin. V. 33, n. 3, p. 745-751, 2007. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbm008>.

Chardès, T.; Bourguin, I.; Mevelec, M. N.; Dubremetz, J. F.; Bout, D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. Infection and Immunity. V. 58, n. 5, p. 1240-1246, 1990.

Chaudhary, K.; Darling, J. A.; Fohl, L. M.; Sullivan, W. J. jr.; Donald, R. G.; Pfefferkorn, E. R.; Ullman, B.; Roos, D. S. Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. The Journal of Biological Chemistry. V. 279, n. 30, p. 31221-31227, 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404232200>

Chen, H.; Attieh, Z. K.; Su, T.; Syed, B. A.; Gao, H.; Alaeddine, R. M.; Fox, T. C.; Usta, J.; Naylor, C. E.; Evans, R. W.; Mckie, A. T.; Anderson, G. J.; Vulpe, C. D. Hephaestin is a ferroxidase that maintains partial activity in sex-linked anemia mice. Blood. V. 103, n. 10, p. 3933-3939, 2004. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3139>.

Chen-Roetling, J.; Liu, W.; Regan, R. F. Iron accumulation and neurotoxicity in cortical cultures treated with holotransferrin. Free Radical Biology & Medicine. V. 51, n. 11, p. 1966-1974, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.021>.

Christoffersson, G.; Phillipson, M. The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas? Cell and Tissue Research. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2780-z>.

Clevers, H. C.; Bevins, C. L. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. Annual Review of Physiology. V. 75, p. 289-311, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744>.

Cohen, S. B.; Denkers, E. Y. Border maneuvers: deployment of mucosal immune defenses against *Toxoplasma gondii*. Mucosal Immunology. V. 7, n. 4, p. 744-752, 2014. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.25>.

Coppens, I.; Sinai, A. P.; Joiner, K. A. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *The Journal of Cell Biology*. V. 149, n. 1, p. 167-180, 2000. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.1.167>.

Coppens, I.; Dunn, J. D.; Romano, J. D.; Pypaert, M.; Zhang, H.; Boothroyd, J. C.; Joiner, K. A. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*. V. 125, n. 2, p. 261-274, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.056>.

Courret, N.; Darche, S.; Sonigo, P.; Milon, G.; Buzoni-Gatel, D.; Tardieu, I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood*. V. 107, n. 1, p. 309-316, 2006. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0666>.

Dao, M. C.; Meydani, S. N. Iron Biology, Immunology, Aging, and Obesity: Four Fields Connected by the Small Peptide Hormone Hepcidin. *Advances in Nutrition*. V. 4, n. 6, p. 602-617, 2013. <https://doi.org/10.3945/an.113.004424>.

Debierre-Grockiego, F.; Campos, M. A.; Azzouz, N.; Schmidt, J.; Bieker, U.; Resende, M. G.; Mansur, D. S.; Weingart, R.; Schmidt, R. R.; Golenbock, D. T.; Gazzinelli, R. T.; Schwarz, R. T. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. V. 179, n. 2, p. 1129-1137, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1129>.

De Jesus, J. B.; Ferreira, M. A.; Cuervo, P.; Britto, C.; E SILVA-FILHO, F. C.; MEYER-FERNANDES, J. R. Iron modulates ecto-phosphohydrolase activities in pathogenic trichomonads. *Parasitology International*. V. 55, n. 4, p. 285-290, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2006.08.002>.

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.; Graça, R. M.; Da Silva, A. J.; Moura, I.; Dubey, J. P.; Garrett, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerging Infectious Diseases*. V. 12, n. 2, p. 326-329, 2006. <https://doi.org/10.3201/eid1202.041115>.

Denkers, E. Y.; Gazzinelli, R. T.; Martin, D.; Sher, A. Emergence of NK1.1⁺ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine*. V. 178, n. 5, p. 1465-1472, 1993. <https://doi.org/10.1084/jem.178.5.1465>.

Denkers, E. Y.; Yap, G.; Scharton-Kersten, T.; Charest, H.; Butcher, B. A.; Caspar, P.; Heiny, S.; Sher, A. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. V. 159, n. 4, p. 1903-1908, 1997.

Denkers, E. Y.; Gazzinelli, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews*. V. 11, n. 4, p. 569-588, 1998.

Dimier, I. H.; Bout, D. T. Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron. *Immunology*. V. 94, n. 4, p. 488-495, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00553.x>.

Dogruman-Al, F.; Fidan, I.; Celebi, B.; Yesilyurt, E.; Erdal, B.; Babur, C.; Kustimur, S. Cytokine profile in murine toxoplasmosis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. V. 4, n. 1, p. 16-19, 2011. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60024-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60024-2).

Donovan, A.; Brownlie, A.; Zhou, Y.; Shepard, J.; Pratt, S. J.; Moynihan, J.; Paw, B. H.; Drejer, A.; Barut, B.; Zapata, A.; Law, T. C.; Brugnara, C.; Lux, S. E.; Pinkus, G. S.; Pinkus, J. L.;

Kingsley, P. D.; Palis, J.; Fleming, M. D.; Andrews, N. C.; Zon, L. I. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. V. 403, n. 6771, p. 776-781, 2000. <https://doi.org/10.1038/35001596>.

Donovan, A.; Lima, C. A.; Pinkus, J. L.; Pinkus, G. S.; Zon, L. I.; Robine, S.; Andrews, N. C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism*. V. 1, n. 3, p. 191-200, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.003>.

DUBEY JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. V. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00023-X).

Dubey, J. P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*. V. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>.

Dubey, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. V. 55, n. 6, p. 467-475, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>.

Dubey, J. P.; Velmurugan, G. V.; Rajendran, C.; Yabsley, M. J.; Thomas, N. J.; Beckmen, K. B.; Sinnett, D.; Ruid, D.; Hart, J.; Fair, P. A.; Mcfee, W. E.; Shearn-Bochsler, V.; Kwok, O. C.; Ferreira, L. R.; Choudhary, S.; Faria, E. B.; Zhou, H.; Felix, T. A.; Su, C. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *International Journal for Parasitology*. V. 41, n. 11, p. 1139-1147, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.06.005>.

Dubremetz, J. F. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cellular Microbiology*. V. 9, n. 4, p. 841-848, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00909.x>.

Dumètre, A.; Dubey, J. P.; Ferguson, D. J.; Bongrand, P.; Azas, N.; Puech, P. H. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*. V. 110, n. 28, p. 11535-11540, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308425110>.

Dunay, I. R.; Sibley, L. D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. *Current Opinion in Immunology*. V. 22, n. 4, p. 461-466, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.coim.2010.04.008>.

Dunay, I. R.; Fuchs, A.; Sibley, L. D. Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infection and Immunity*. V. 78, n. 4, p. 1564-1570, 2010. <https://doi.org/10.1128/IAI.00472-09>.

Dziadek, B.; Dzitko, K.; Dlugonska, H. *Toxoplasma gondii* binds human lactoferrin but not transferrin. *Experimental Parasitology*. V. 110, n. 2, p. 165-167, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.019>.

Dziadek, B.; Dziadek, J.; Dlugonska, H. Identification of *Toxoplasma gondii* proteins binding human lactoferrin: a new aspect of rhoptry proteins function. *Experimental Parasitology*. V. 115, n. 3, p. 277-282, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.09.012>.

Egan, C. E.; Cohen, S. B.; Denkers, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. *Immunology and Cell Biology*. V. 90, n. 7, p. 668-675, 2012. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.93>.

El Hajj, H.; Lebrun, M.; Arold, S. T.; Vial, H.; Labesse, G.; Dubremetz, J. F. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathogens. V. 3, n. 2, p. e14, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030014>.

Erbe, D. V.; Pfefferkorn, E. R.; FANGER, M W. Functions of the various IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology. V. 146, n. 9, p. 3145-3151, 1991.

Farnaud, S.; Evans, R. W. Lactoferrin a multifunctional protein with antimicrobial properties. Molecular Immunology. V. 40, n. 7, p. 395-405, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(03\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(03)00152-4).

Fenoy, I.; Giovannoni, M.; Batalla, E.; Martin, V.; Frank, F. M.; Piazzon, I.; Goldman, A. *Toxoplasma gondii* infection blocks the development of allergic airway inflammation in BALB/c mice. Clinical and Experimental Immunology. V. 155, n. 2, p. 275-284, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03813.x>.

Ferguson, D. J. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? Trends in Parasitology. V. 18, n. 8, p. 355-359, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02330-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02330-9).

Filisetti, D.; Candolfi, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. V. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.

Flannery, A. R.; Huynh, C.; Mittra, B.; Mortara, R. A.; Andrews, N. W. LFR1 ferric iron reductase of *Leishmania amazonensis* is essential for the generation of infective parasite forms. The Journal of Biology Chemistry. V. 286, n. 26, p. 23266-23279, 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229674>.

Flegr, J.; Prandota, J.; Sovičková, M.; Israili, Z. H. Toxoplasmosis - a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. PLoS One. V. 9, n. 3, p. e90203, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203>.

Ford, G. C.; Harrison, P. M.; Rice, D. W.; Smith, J. M.; Treffry, A.; White, J. L.; Yariv, J. Ferritin: design and formation of an iron-storage molecule. Philosophical Transaction of the Royal Society of London. V. 304, n. 1121, p. 551-565, 1984. <https://doi.org/10.1098/rstb.1984.0046>.

Fourmaux, M. N.; Achbarou, A.; Mercereau-Puijalon, O.; Biderre, C.; Briche, I.; Loyens, A.; Odberg-Ferragut, C.; Camus, D.; Dubremetz, J. F. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. Molecular and Biochemical Parasitology. V. 83, n. 2, p. 201-210, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02773-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02773-9).

Fox, B. A.; Gigley, J. P.; Bzik, D. J. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. International Journal for Parasitology. V. 34, n. 3, p. 323-331, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.001>.

Frazer, D. M.; Anderson, G. J. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology. V. 289, n. 4, p. 631-635, 2005. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00220.2005>.

Frehn, L.; Jansen, A.; Bennek, E.; Mandic, A. D.; Temizel, I.; Tischendorf, S.; Verdier, J.; Tacke, F.; Streetz, K.; Trautwein, C.; Sellge, G. Distinct patterns of IgG and IgA against food

and microbial antigens in serum and feces of patients with inflammatory bowel diseases. PLoS One. V. 9, n. 9, e106750, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106750>.

Gail, M.; Gross, U.; Bohne, W. Transcriptional profile of *Toxoplasma gondii*-infected human fibroblasts as revealed by gene-array hybridization. Molecular Genetics and Genomics. V. 265, n. 5, p. 905-912, 2001. <https://doi.org/10.1007/s004380100487>.

Gail, M.; Gross, U.; Bohne, W. Transferrin receptor induction in *Toxoplasma gondii*-infected HFF is associated with increased iron-responsive protein 1 activity and is mediated by secreted factors. Parasitology Research. V. 94, n. 3, p. 233-239, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1209-2>.

Gazzinelli, R. T.; Hakim, F. T.; Hieny, S.; Shearer, G. M.; Sher, A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. Journal of Immunology. V. 146, n. 1, p. 286-292, 1991.

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. Journal of Immunology. V. 148, n. 6, p. 1792-1796, 1992.

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. Journal of Immunology. V. 151, n. 7, p. 3672-3681, 1993.

Gazzinelli, R. T.; Wysocka, M.; Hayashi, S.; Denkers, E. Y.; Hieny, S.; Caspar, P.; Trinchieri, G.; Sher, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology. V. 153, n. 6, p. 2533-2543, 1994.

Gazzinelli, R. T.; Wysocka, M.; Hieny, S.; Scharton-Kersten, T.; Cheever, A.; Kühn, R.; Müller, 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. Journal of Immunology. V. 157, n. 2, p. 798-805, 1996.

Grigg, M. E.; Ganatra, J.; Boothroyd, J. C.; Margolis, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. The Journal of Infectious Disease. V. 184, n. 5, p. 633-639, 2001. <https://doi.org/10.1086/322800>.

Gunshin, H.; Mackenzie, B.; Berger, U. V.; Gunshin, Y.; Romero, M. F.; Boron, W. F.; Nussberger, S.; Gollan, J. L.; Hediger, M. A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. Nature. V. 388, n. 6641, p. 482-488, 1997. <https://doi.org/10.1038/41343>.

Gozzelino, R.; Jeney, V.; Soares, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. V. 50, p. 323-354, 2010. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600>.

Han, O.; Kim, E. Y. Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells. Journal of Cellular Biochemistry. V. 101, n. 4, p. 1000-1010, 2007. <https://doi.org/10.1002/jcb.21392>.

Heimesaat, M. M.; Bereswill, S.; Fischer, A.; Fuchs, D.; Struck, D.; Niebergall, J.; Jahn, H. K.; Dunay, I. R.; Moter, A.; Gescher, D. M.; Schumann, R. R.; Göbel, U. B.; Liesenfeld, O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. V. 177, n. 12, p. 8785-8795, 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8785>

Hershko, C.; Peto, T. E. Deferoxamine inhibition of malaria is independent of host iron status. *The Journal of Experimental Medicine*. V. 168, n. 1, p. 375-387, 1988. <https://doi.org/10.1084/jem.168.1.375>.

Hölttä-Vuori, M.; Tanhuanpää, K.; Möbius, W.; Somerharju, P.; Ikonen, E. Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Molecular Biology of Cell*. V. 13, n. 9, p. 3107-3122, 2002. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-01-0025>.

Howe, D. K.; Sibley, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Disease*. V. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>.

Hu, K.; Johnson, J.; Florens, L.; Fraunholz, M.; Suravajjala, S.; Dilullo, C.; Yates, J.; Roos, D. S.; Murray, J. M. Cytoskeletal components of an invasion machine-the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*. V. 2, n. 2, p. e13, 2006. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020013>.

Huebers H, Huebers E, Rummel W, CRICHTON RR. Isolation and characterization of iron-binding proteins from rat intestinal mucosa. *European Journal of Biochemistry*. V. 66, n. 3, p. 447-455, 1976. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10569.x>.

Hunter, C. A.; Subauste, C. S.; Van Cleave, V. H.; Remington, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity*. V. 62, n. 7, p. 2818-2824, 1994.

Huynh, C.; Sacks, D. L.; Andrews, N. W. A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *The Journal of Experimental Medicine*. V. 203, n. 10, p. 2363-2375, 2006. <https://doi.org/10.1084/jem.20060559>.

Huynh, C.; Andrews, N. W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. *Cellular Microbiology*. V. 10, n. 2, p. 293-300, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01095.x>.

Jackson, M. H.; Hutchison, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Advances in Parasitology*. V. 28, p. 55-105, 1989. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60331-0](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60331-0).

Jebbari, H.; Roberts, C. W.; Ferguson, D. J.; Bluethmann, H.; Alexander, J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*. V. 20, n. 5, p. 231-239, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00152.x>.

Johnson, L. L.; Sayles, P. C. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infection and Immunity*. V. 70, n. 1, p. 185-191, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.185-191.2002>.

- Jones, J. L.; Dubey, J. P. Waterborne toxoplasmosis-recent developments. *Experimental Parasitology.* V. 124, n. 1, p. 10-25, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>.
- Ju, C. H.; Chockalingam, A.; Leifer, C. A. Early response of mucosal epithelial cells during *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of Immunology.* V. 183, n. 11, p. 7420-7427, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900640>.
- 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. *Journal of Immunology.* V. 164, n. 5, p. 2629-2634, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2629>.
- Khan, I. A.; Schwartzman, J. D.; Matsuura, T.; Kasper, L. H. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* V. 94, n. 25, p. 13955-13960, 1997. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13955>.
- Khan, I. A.; Thomas, S. Y.; Moretto, M. M.; Lee, F. S.; Islam, S. A.; Combe, C.; Schwartzman, J. D.; Luster, A. D. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathogens.* V. 2, n. 6, e49, 2006. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020049>.
- Kim, K.; Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *International Journal of Parasitology.* V. 34, n. 3, p. 423-432, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>.
- Kim, K.; Weiss, L. M. Toxoplasma: the next 100 years. *Microbes and Infection.* V. 10, n. 9, p. 978-984, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.015>.
- Kirk, K.; Horner, H. A.; Kirk, J. Glucose uptake in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is an equilibrative not an active process. *Molecular and Biochemical Parasitology.* V. 82, n. 2, p. 195-205, 1996. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(96\)02734-X](https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02734-X).
- Klausner, R. D.; Rouault, T. A.; Harford, J. B. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell.* V. 72, n. 1, p. 19-28, 1993. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90046-S](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90046-S)
- Klose, C. S. N.; Flach, M.; Möhle, L.; Rogell, L.; Hoyler, T.; Ebert, K.; Fabiunke, C.; Pfeifer, D.; Sexl, V.; Fonseca-Pereira, D.; Domingues, R. G.; Veiga-Fernandes, H.; Arnold, S. J.; Busslinger, M.; Dunay, I. R.; Tanriver, Y.; Diefenbach, A. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell.* V. 157, n. 2, p. 340-356, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.030>
- Laliberté, J.; Carruthers, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cellular and Molecular Life Sciences.* V. 65, n. 12, p. 1900-1915, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7556-x>
- Lambert, H.; Barragan, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology.* V. 12, n. 3, p. 292-300, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01417.x>.
- Landfear, S. M. Nutrient transport and pathogenesis in selected parasitic protozoa. *Eukaryotic Cell.* V. 10, n. 4, p. 483-493, 2011. <https://doi.org/10.1128/EC.00287-10>.
- Langermans, J. A.; Van Der Hulst, M. E.; Nibbering, P. H.; Van Furth, R. Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii*

and Listeria monocytogenes in recombinant gamma interferon-treated mice. *Infection and Immunity*. V. 60, n. 12, p. 5107-5112, 1992.

Latunde-Dada, G. O.; Simpson, R. J.; Mckie, A. T. Duodenal cytochrome B expression stimulates iron uptake by human intestinal epithelial cells. *The Journal of Nutrition*. V. 138, n. 6, p. 991-995, 2008. <https://doi.org/10.1093/jn/138.6.991>.

Lee, P.; Peng, H.; Gelbart, T.; Wang, L.; Beutler, E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*. V. 102, n. 6, p. 1906-1910, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409808102>.

Lehker, M. W.; Alderete, J. F. Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Molecular Microbiology*. V. 6, n. 1, p. 123-132, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00844.x>.

León-Sicairos, N.; Reyes-López, M.; Canizalez-Román, A.; Bermúdez-Cruz, R. M.; Serrano-Luna, J.; Arroyo, R.; De La Garza, M. Human hololactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology*. V. 151, n. 12, p. 3859-3871, 2005. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28121-0>

Leriche, M. A.; Dubremetz, J. F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitology Research*. V. 76, n. 7, p. 559-562, 1990. <https://doi.org/10.1007/BF00932560>.

Liesenfeld, O.; Kosek, J.; Remington, J. S.; Suzuki, Y. Association of CD4⁺ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Experimental Medicine*. V. 184, n. 2, p. 597-607, 1996. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.597>.

Liesenfeld, O.; Kang, H.; Park, D.; Nguyen, T. A.; Parkhe, C. V.; Watanabe, H.; Abo, T.; Sher, A.; Remington, J. S.; Suzuki, Y. TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*. V. 21, n. 7, p. 365-376, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00237.x>.

Lill, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*. V. 460, n. 7257, p. 831-838, 2009. <https://doi.org/10.1038/nature08301>.

Lindström, I.; Sundar, N.; Lindh, J.; Kironde, F.; Kabasa, J. D.; Kwok, O. C.; Dubey, J. P.; Smith, J. E. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. *Parasitology*. V. 135, n. Pt 1, p. 39-45, 2008.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. V. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Loo, V. G.; Lalonde, R. G. Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. V. 45, n. 3, p. 726-730, 1984.

Lopes, C. S.; Franco, P. S.; Silva, N. M.; Silva, D. A.; Ferro, E. A.; Pena, H. F.; Soares, R. M.; Gennari, S. M.; Mineo, J. R. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. *Epidemiology and Infection*. V. 144, n. 9, p. 1865-1875, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0950268815003295>.

Lycke, E.; Carlberg, K.; Norrby, R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. Infection and Immunity. V. 11, n. 4, p. 853-861, 1975.

Luo, X.; Hill, M.; Johnson, A.; Latunde-Dada, G. O. Modulation of Dcytb (Cybrd 1) expression and function by iron, dehydroascorbate and Hif-2 α in cultured cells. Biochimica et Biophysica Acta. V. 1840, n. 1, p. 106-112, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.012>.

Lütjen, S.; Soltek, S.; Virna, S.; Deckert, M.; Schlüter, D. Organ-and disease-stage-specific regulation of *Toxoplasma gondii*-specific CD8-T-cell responses by CD4 T cells. Infection and Immunity. V. 74, n. 10, p. 5790-5801, 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.00098-06>.

Mack, D. G.; Mcleod, R. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces T. gondii infection of enterocytes in vitro. The Journal of Clinical Investigation. V. 90, n. 6, p. 2585-2592, 1992. <https://doi.org/10.1172/JCI116153>.

Mackenzie, B.; Garrick, M. D. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology. V. 289, n. 6, p. 981-986, 2005. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00363.2005>.

Mahmoud, M. S. Effect of deferoxamine alone and combined with pyrimethamine on acute toxoplasmosis in mice. Journal of the Egyptian Society of Parasitology. V. 29, n. 3, p. 791-803, 1999.

Mai, K.; Sharman, P. A.; Walker, R. A.; Katrib, M.; De Souza, D.; Mcconville, M. J.; Wallach, M. G.; Belli, S. I.; Ferguson, D. J.; Smith, N. C. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. V. 104, n. 2, p. 281-289, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200022>.

Masahata, K.; Umemoto, E.; Kayama, H.; Kotani, M.; Nakamura, S.; Kurakawa, T.; Kikuta, J.; Gotoh, K.; Motooka, D.; Sato, S.; Higuchi, T.; Baba, Y.; Kurosaki, T.; Kinoshita, M.; Shimada, Y.; Kimura, T.; Okumura, R.; Takeda, A.; Tajima, M.; Yoshie, O.; Fukuzawa, M.; Kiyono, H.; Fagarasan, S.; Iida, T.; Ishii, M.; Takeda, K. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. Nature Communication. V. 5, p. 3704, 2014. <https://doi.org/10.1038/ncomms4704>.

Mckie, A. T.; Barrow, D.; Latunde-Dada, G. O.; Rolfs, A.; Sager, G.; Mudaly, E.; Mudaly, M.; Richardson, C.; Barlow, D.; Bomford, A.; Peters, T. J.; Raja, K. B.; Shirali, S.; Hediger, M. A.; Farzaneh, F.; Simpson, R. J. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. Science. V. 291, n. 5509, p. 1755-1759, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1057206>.

Meissner, M.; Reiss, M.; Viebig, N.; Carruthers, V. B.; Tournel, C.; Tomavo, S.; Ajioka, J. W.; Soldati, D. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorters. Journal of Cell Science. V. 115, n. 3, p. 563-574, 2002.

Mennechet, F. J.; Kasper, L. H.; Rachinel, N.; Li, W.; Vandewalle, A.; Buzoni-Gatel, D. Lamina propria CD4 $^{+}$ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. Journal of Immunology. V. 168, n. 6, p. 2988-2996, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.6.2988>.

Mercier, C.; Adjogble, K. D.; Däubener, W.; Delauw, M. F. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? International Journal for Parasitology. V. 35, n. 8, p. 829-849, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.011>.

Mineo, J. R.; Silva, D. A. O.; Sopelete, M. C.; Leal, G. S.; Vidigal, L. H. G.; Tapia, L. E. R.; Bacchin, M. I. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. Uberlândia. EDUFU, 273p, 2005.

Montoya, J. G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. Lancet. V. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X).

Mordue, D. G.; Sibley, L. D. A novel population of Gr-1⁺-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. Journal of Leukocyte Biology. V. 74, n. 6, p. 1015-1025, 2003. <https://doi.org/10.1189/jlb.0403164>.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. V. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Mowat, A. M.; Agace, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. Nature Review. Immunology. V. 14, n. 10, p. 667-685, 2014. <https://doi.org/10.1038/nri3738>.

Muckenthaler, M. U.; Galy, B.; Hentze, M. W. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. Annual Review of Nutrition. V. 28, p. 197-213, 2008. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521>.

Muñoz, M.; Villar, I.; García-Erce, J. A. An update on iron physiology. World Journal of Gastroenterology. V. 15, n. 37, p. 4617-4626, 2009. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.4617>.

Muñoz, M.; García-Erce, J. A.; Remacha, A. F. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homoeostasis. Journal of Clinical Pathology. V. 64, n. 4, p. 281-286, 2011. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.079046>.

Munoz, M.; Liesenfeld, O.; Heimesaat, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. Immunological Reviews. V. 240, n. 1, p. 269-285, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x>.

Musumeci, M.; Maccari, S.; Massimi, A.; Stati, T.; Sestili, P.; Corritore, E.; Pastorelli, A.; Stacchini, P.; Marano, G.; Catalano, L. Iron excretion in iron dextran-overloaded mice. Blood Transfusion. V. 12, n. 4, p. 485-490, 2014.

Nemeth, E.; Tuttle, M. S.; Powelson, J.; Vaughn, M. B.; Donovan, A.; Ward, D. M.; Ganz, T.; Kaplan, J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science. V. 306, n. 5704, p. 2090-2093, 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1104742>.

Nemeth, E.; Ganz, T. The role of hepcidin in iron metabolism. Acta Haematologica. V. 122, n. 2-3, p. 78-86, 2009. <https://doi.org/10.1159/000243791>.

Neves, D. P. Parasitologia Humana. 11^a ed. Atheneu, São Paulo, p. 147-156, 2005.

Nicolas, G.; Chauvet, C.; Viatte, L.; Danan, J. L.; Bigard, X.; Devaux, I.; Beaumont, C.; Kahn, A.; Vaulont, S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. The Journal of Clinical Investigation. V. 110, n. 7, p. 1037-1044, 2002a. <https://doi.org/10.1172/JCI0215686>.

Nicolas, G.; Bennoun, M.; Porteu, A.; Mativet, S.; Beaumont, C.; Grandchamp, B.; Sirito, M.; Sawadogo, M.; Kahn, A.; Vaulont, S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice

expressing liver hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* V. 99, n. 7, p. 4596-4601, 2002b. <https://doi.org/10.1073/pnas.072632499>.

Nishikawa, Y.; Quittnat, F.; Stedman, T. T.; Voelker, D. R.; Choi, J. Y.; Zahn, M.; Yang, M.; Pypaert, M.; Joiner, K. A.; Coppens, I. Host cell lipids control cholesterol ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cellular Microbiology.* V. 7, n. 6, p. 849-867, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00518.x>

Nixon, J. E.; Field, J.; McArthur, A. G.; Sogin, M. L.; Yarlett, N.; Loftus, B. J.; Samuelson, J. Iron-dependent hydrogenases of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: activity of the recombinant entamoebic enzyme and evidence for lateral gene transfer. *The Biological Bulletin.* V. 204, n. 1, p. 1-9, 2003. <https://doi.org/10.2307/1543490>.

Oates, P. S.; Jeffrey, G. P.; Basclain, K. A.; Thomas, C.; Morgan, E. H. Iron excretion in iron-overloaded rats following the change from an iron-loaded to an iron-deficient diet. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* V. 15, n. 6, p. 665-674, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02210.x>.

Okada, T.; Sawada, T.; Kubota, K. Deferoxamine enhances anti-proliferative effect of interferon-gamma against hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters.* V. 248, n. 1, p. 24-31, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.05.014>.

Ouellette, A. J.; Miller, S. I.; Henschen, A. H.; Selsted, M. E. Purification and primary structure of murine cryptdin-1, a Paneth cell defensin. *FEBS Letters.* V. 304, n. 2-3, p. 146-148, 1992. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80606-H](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80606-H).

Paiva, C. N.; Feijó, D. F.; Dutra, F. F.; Carneiro, V. C.; Freitas, G. B.; Alves, L. S.; Mesquita, J.; Fortes, G. B.; Figueiredo, R. T.; Souza, H. S.; Fantappié, M. R.; Lannes-Vieira, J.; Bozza, M. T. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The Journal of Clinical Investigation.* V. 122, n. 7, p. 2531-2542, 2012. <https://doi.org/10.1172/JCI58525>.

Pappas, G.; Roussos, N.; Falagas, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology.* V. 39, n. 12, p. 385-394, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>.

Park, C. H.; Valore, E. V.; Waring, A. J.; Ganz, T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of Biology Chemistry.* V. 276, n. 11, p. 7806-7810, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008922200>.

Peterson, K. M.; Alderete, J. F. Iron uptake and increased intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by *Trichomonas vaginalis* receptors. *The Journal of Experimental Medicine.* V. 160, n. 2, p. 398-410, 1984. <https://doi.org/10.1084/jem.160.2.398>.

Peterson, L. W.; Artis, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews. Immunology.* V. 14, n. 3, p. 141-153, 2014. <https://doi.org/10.1038/nri3608>.

Peyssonnaux, C.; Zinkernagel, A. S.; Datta, V.; Lauth, X.; Johnson, R. S.; Nizet, V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood.* V. 107, n. 9, p. 3727-3732, 2006. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2259>.

Portugal, S.; Carret, C.; Recker, M.; Armitage, A. E.; Gonçalves, L. A.; Epiphanio, S.; Sullivan, D.; Roy, C.; Newbold, C. I.; Drakesmith, H.; Mota, M. M. Host-mediated regulation of

superinfection in malaria. *Nature Medicine*. V. 17, n. 6, p. 732-737, 2011.
<https://doi.org/10.1038/nm.2368>.

Poupel, O.; Boleti, H.; Axisa, S.; Couture-Tosi, E.; Tardieu, I. Toxofilin, a novel actin-binding protein from *Toxoplasma gondii*, sequesters actin monomers and caps actin filaments. *Molecular Biology of the Cell*. V. 11, n. 1, p. 355-368, 2000.
<https://doi.org/10.1091/mbc.11.1.355>.

Rachidi, S.; Coudray, C.; Baret, P.; Gelon, G.; Pierre, J. L.; Favier, A. Inhibition of lipid peroxidation by a new family of iron chelators. Comparison with desferrioxamine. *Biological Trace Element Research*. V. 41, n. 1-2, p. 77-87, 1994. <https://doi.org/10.1007/BF02917219>.

Ramey, G.; Deschemin, J. C.; Durel, B.; Canonne-Hergaux, F.; Nicolas, G.; Vaulont, S. Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica*. V. 95, n. 3, p. 501-504, 2010. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.014399>.

Reichmann, G.; Walker, W.; Villegas, E. N.; Craig, L.; Cai, G.; Alexander, J.; Hunter, C. A. The CD40/CD40 ligand interaction is required for resistance to toxoplasmic encephalitis. *Infection and Immunity*. V. 68, n. 3, p. 1312-1328, 2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1312-1318.2000>.

Rey, L. *Parasitologia*. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 866p, 2001.

Rishi, G.; Subramaniam, V. N. The liver in regulation of iron homeostasis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. V. 313, n. 3, p. 157-165, 2017.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00004.2017>.

Roberts, C. W.; Ferguson, D. J.; Jebbari, H.; Satoskar, A.; Bluethmann, H.; Alexander, J. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity*. V. 64, n. 3, p. 897-904, 1996.

Robert-Gangneux, F.; Dardé, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*. V. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.
<https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>.

Roers, A.; Siewe, L.; Strittmatter, E.; Deckert, M.; Schlueter, D.; Stenzel, W.; Gruber, A. D.; Krieg, T.; Rajewsky, K.; Müller, W. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *The Journal of Experimental Medicine*. V. 200, n. 10, p. 1289-1297, 2004.
<https://doi.org/10.1084/jem.20041789>.

Rogers, D. F. The airway goblet cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. V. 35, n. 1, p. 1-6, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00083-3).

Sabin, A. B.; Feldman, H. A. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science*. V. 108, p. 660-663, 1948.
<https://doi.org/10.1126/science.108.2815.660>,

Saegusa, S.; Totsuka, M.; Kaminogawa, S.; Hosoi, T. Cytokine responses of intestinal epithelial-like Caco-2 cells to non-pathogenic and opportunistic pathogenic yeasts in the presence of butyric acid. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. V. 71, n. 10, p. 2428-2434, 2007. <https://doi.org/10.1271/bbb.70172>.

Sanos, S. L.; Diefenbach, A. Innate lymphoid cells: from border protection to the initiation of inflammatory diseases. *Immunology and Cell Biology*. V. 91, n. 3, p. 215-224, 2013. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.3>.

Saouros, S.; Edwards-Jones, B.; Reiss, M.; Sawmynaden, K.; Cota, E.; Simpson, P.; Dowse, T. J.; Jäkle, U.; Ramboarina, S.; Shivarattan, T.; Matthews, S.; Soldati-Favre, D. A novel galectin-like domain from *Toxoplasma gondii* micronemal protein 1 assists the folding, assembly, and transport of a cell adhesion complex. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 280, n. 46, p. 38583-38591, 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500365200>.

Sayles, P. C.; Gibson, G. W.; Johnson, L. L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*. V. 68, n. 3, p. 1026-1033. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1026-1033.2000>.

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. *Journal of Immunology*. V. 168, n. 12, p. 5997-6001, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.5997>.

Schell, D.; Borowy, N. K.; Overa, T. H. P. Transferrin is a growth factor for the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology Research*. V. 77, n. 7, p. 558-560, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF00931012>.

Schlüter, D.; Kwok, L. Y.; Lütjen, S.; Soltek, S.; Hoffmann, S.; Körner, H.; Deckert, M. Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *Journal of Immunology*. V. 170, n. 12, p. 6172-682, 2003. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.6172>.

Schneider, B. D.; Leibold, E. A. Effects of iron regulatory protein regulation on iron homeostasis during hypoxia. *Blood*. V. 102, n. 9, p. 3404-3411, 2003. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0433>.

Schneider, L. C. L.; Do Nascimento, J. C. P.; Trevizan, A. R.; Góis, M. B.; Borges, S. C.; Beraldi, E. J.; GARCIA, J. L.; SANT'ANA, D. M. G.; BUTTOW, N. C. *Toxoplasma gondii* promotes changes in VIPergic submucosal neurons, mucosal intraepithelial lymphocytes, and goblet cells during acute infection in the ileum of rats. *Neurogastroenterology and Motility*. 2017. <https://doi.org/10.1111/nmo.13264>.

Schreiber, R. D.; Feldman, H. A. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *The Journal of Infectious Disease*. V. 141, n. 3, p. 366-369, 1980. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.3.366>.

Seabra, S. H.; Damatta, R. A.; De Mello, F. G.; De Souza, W. Endogenous polyamine levels in macrophages is sufficient to support growth of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*. V. 90, n. 3, p. 455-460, 2004. <https://doi.org/10.1645/GE-179R>.

Shao, L.; Serrano, D.; Mayer, L. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Seminars in Immunology*. V. 13, n. 3, p. 163-176, 2001. <https://doi.org/10.1006/smim.2000.0311>.

Sharma, S. D.; Hofflin, J. M.; Remington, J. S. *In vivo* recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. V. 135, n. 6, p. 4160-4163, 1985.

Sheftel, A.; Stehling, O.; Lill, R. Iron-sulfur proteins in health and disease. Trends in Endocrinology and Metabolism. V. 21, n. 5, p. 302-314, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.12.006>.

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. Journal of Immunology. V. 150, n. 9, p. 3982-3989, 1993.

Siah, C. W.; Ombiga, J.; Adams, L. A.; Trinder, D.; Olynyk, J. K. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. The Clinical Biochemist. Reviews. V. 27, n. 1, p. 5-16, 2006.

Sibley, L. D.; Adams, L. B.; Fukutomi, Y.; Krahenbuhl, J. L. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. Journal of Immunology. V. 147, n. 7, p. 2340-2345, 1991.

Sibley, L. D.; Boothroyd, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature. V. 359, n. 6390, p. 82-85, 1992. <https://doi.org/10.1038/359082a0>.

Sibley, L. D.; Messina, M.; Niesman, I. R. Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. Proceedings of the National Academy of Science USA. V. 91, n. 12, p. 5508-5512, 1994.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5508>.

Sibley, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. Science. V. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1094717>.

Sibley, L. D.; Khan, A.; Ajioka, J. W.; Rosenthal, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. Philosophical Transactions of the Royal Society of Lond. Series B, Biological Science. V. 364, n. 1530, p. 2749-2761, 2009.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0087>.

Sibley, L. D. How apicomplexan parasites move in and out of cells. Current Opinion in Biotechnology. V. 21, n. 5, p. 592-598, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.05.009>.

Sinai, A. P.; Webster, P.; Joiner, K. A. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. Journal of Cell Science. V. 110, n. 17, p. 2117-2128, 1997.

Sinai, A. P. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. Sub-cellular Biochemistry. V. 47, p. 155-164, 2008. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_12.

Straub, K. W.; Cheng, S. J.; Sohn, C. S.; Bradley, P. J. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. Cellular Microbiology. V. 11, n. 4, p. 590-603, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01276.x>.

Su, C.; Evans, D.; Cole, R. H.; Kissinger, J. C.; Ajioka, J. W.; Sibley, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. Science. V. 299, n. 5605, p. 414-416, 2003.
<https://doi.org/10.1126/science.1078035>.

Suzuki, Y.; Orellana, M. A.; Schreiber, R. D.; Remington, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science. V. 240, n. 4851, p. 516-518, 1988.
<https://doi.org/10.1126/science.3128869>.

Suzuki, Y.; Yang, Q.; Yang, S.; Nguyen, N.; Lim, S.; Liesenfeld, O.; Kojima, T.; Remington, J. S. IL-4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis. *Journal of Immunology*. V. 157, n. 6, p. 2564-2569, 1996.

Suzuki, Y.; Rani, S.; Liesenfeld, O.; Kojima, T.; Lim, S.; Nguyen, T. A.; Dalrymple, S. A.; Murray, R.; Remington, J. S. Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin-6-deficient mice. *Infection and Immunity*. V. 65, n. 6, p. 2339-2345, 1997.

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*. *Journal of Immunology*. V. 164, n. 10, p. 5375-5382, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5375>.

Tachezy, J.; Kulda, J.; Bahníková, I.; Suchan, P.; Rázga, J.; Schrével, J. *Tritrichomonas foetus*: iron acquisition from lactoferrin and transferrin. *Experimental Parasitology*. V. 83, n. 2, p. 216-228, 1996. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0068>.

Talbot, J. A.; Nielsen, K.; Corbeil, L. B. Cleavage of proteins of reproductive secretions by extracellular proteinases of *Tritrichomonas foetus*. *Canadian Journal of Microbiology*. V. 37, n. 5, p. 384-390, 1991. <https://doi.org/10.1139/m91-062>.

Tanaka, T.; Abe, Y.; Inoue, N.; Kim, W. S.; Kumura, H.; Nagasawa, H.; Igarashi, I.; Shimazaki, K. The detection of bovine lactoferrin binding protein on *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Veterinary Medical Science*. V. 66, n. 6, p. 619-625, 2004. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.619>. Tenter, A. M.; Heckerth, A. R.; Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*. V. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7).

Teo, C. F.; Zhou, X. W.; Bogyo, M.; Carruthers, V. B. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V. 51, n. 2, p. 679-688, 2007. <https://doi.org/10.1128/AAC.01059-06>.

Theil, E. C.; Eisenstein, R. S. Combinatorial mRNA regulation: iron regulatory proteins and iso-iron-responsive elements (Iso-IREs). *The Journal of Biology Chemistry*. V. 275, n. 52, p. 40659-40662, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000019200>.

Varol, C.; Zigmond, E.; Jung, S. Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nature Reviews. Immunology*. V. 10, n. 6, p. 415-426, 2010. <https://doi.org/10.1038/nri2778>.

Vercammen, M.; Scorza, T.; El Bouhdidi, A.; Van Beeck, K.; Carlier, Y.; Dubremetz, J. F.; Verschueren, H. Opsonization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture. *Parasite Immunology*. V. 21, n. 11, p. 555-563, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00256.x>.

Verga Falzacappa, M. V.; Vujic Spasic, M.; Kessler, R.; Stolte, J.; Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*. V. 109, n. 1, p. 353-358, 2007. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-033969>.

Vermylen, C. What is new in iron overload? European Journal of Pediatrics. V. 167, n. 4, p. 377-381, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00431-007-0604-y>.

Wang, Y.; Fang, R.; Yuan, Y.; Hu, M.; Zhou, Y.; Zhao, J. Identification of host proteins interacting with the integrin-like A domain of *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC2 by yeast-two-hybrid screening. Parasites & Vectors. V. 7, p. 543, 2014. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0543-1>.

Wang, F.; Peng, P. L.; Lin, X.; Chang, Y.; Liu J.; Zhou, R.; Nie, J. Y.; Dong, W. G.; Zhao, Q.; Li, J. Regulatory role of NKG2D⁺ NK cells in intestinal lamina propria by secreting double-edged Th1 cytokines in ulcerative colitis. Oncotarget. V. 8, n. 58, p. 98945-98952, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22132>.

Weinberg, E. D. Iron availability and infection. Biochimica et Biophysica Acta. V. 1790, n. 7, p. 600-605, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.07.002>.

Weiss, G.; Goodnough, L. T. Anemia of chronic disease. The New England Journal of Medicine. V. 352, n. 10, p. 1011-1023, 2005. <https://doi.org/10.1056/NEJMra041809>.

Weiss, L. M.; Dubey, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. International Journal for Parasitology. V. 39, n. 8, p. 895-901, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>.

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. 224-236, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.07.009>.

Wilson, M. E.; Vorhies, R. W.; Andersen, K. A.; Britigan, B. E. Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. Infection and Immunity. V. 62, n. 8, p. 3262-3269, 1994.

Wilson, M. E.; Lewis, T. S.; Miller, M. A.; McCormick, M. L.; Britigan, B. E. *Leishmania chagasi*: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. Experimental Parasitology. V. 100, n. 3, p. 196-207, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(02\)00018-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(02)00018-8).

Yarovinsky, F.; Zhang, D.; Andersen, J. F.; Bannenberg, G. L.; Serhan, C. N.; Hayden, M. S.; Hieny, S.; Sutterwala, F. S.; Flavell, R. A.; Ghosh, S.; Sher, A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. Science. V. 308, n. 5728, p. 1626-1629, 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1109893>.

Yeh, K. Y.; Yeh, M.; Glass, J. Interactions between ferroportin and hephaestin in rat enterocytes are reduced after iron ingestion. Gastroenterology. V. 141, n. 1, p. 292-299, 2011. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.03.059>.

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. V. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002. <https://doi.org/10.1038/415389a>.

9. Anexo I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 124/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 087/12

Projeto Pesquisa: "Papel do ferro na infecção experimental por *Toxoplasma gondii*".

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Neide Maria da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 31 de outubro de 2012

Profa. Dra. Ana Elizabeth Iannini Custódio
Vice Coordenadora *Pro tempore* da CEUA/UFU

10. Anexo II



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP/UFU

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco A Sala 224 –
Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG – CEP 38408-144 - FONE/FAX (034)3239-4134/4335;
e-mail: cep@prop.ufu.br ; www.comissoes.propo.ufu.br

COMUNICADO SOBRE PESQUISA COM USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS COMERCIALMENTE

COMUNICADO Nº. 13/2012

O COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS COMUNICA QUE AS PESQUISAS CUJOS DADOS SERÃO OBTIDOS EXCLUSIVAMENTE COM O USO DE CÉLULAS ADQUIRIDAS COMERCIALMENTE NÃO NECESSITAM DE ANÁLISE ÉTICA POR UM CEP.

EXEMPLOS DESSAS CÉLULAS: HeLa; BeWo; JEG-3; HTR-8; HFF; Caco-2.

Uberlândia, 04 de maio de 2012.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU