

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Papel da enzima 5-lipoxigenase na infecção oral por *Toxoplasma gondii*

Ester Cristina Borges Araujo

Uberlândia – 2018

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Papel da enzima 5-lipoxigenase na infecção oral por *Toxoplasma gondii*

Tese apresentada ao Colegiado do Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial a obtenção do título de Doutor

Ester Cristina Borges Araujo

Orientadora: Dra. Neide Maria da Silva

Uberlândia – 2018

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

A663p
2018 Araujo, Ester Cristina Borges, 1987
 Papel da enzima 5-lipoxigenase na infecção oral por *Toxoplasma gondii* / Ester Cristina Borges Araujo. - 2018.
 76 p. : 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.2018.473>
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Araquidonato 5-Lipoxigenase - Teses. 4. Intestino delgado - 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

Ester Cristina Borges Araujo

“Papel da enzima 5-lipoxigenase na infecção oral 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).

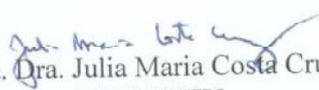
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

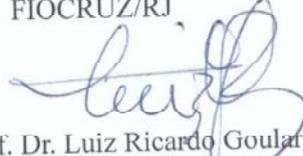
Banca Examinadora:

Uberlândia, 25 de junho de 2018.


 Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes
 UFMG


 Dra. Joseli Lannes Vieira
 FIOCRUZ/RJ


 Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz
 ICBIM/UFU


 Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
 INGEB/UFU


 Profa. Dra. Neide Maria da Silva – coordenadora
 ICBIM/UFU

DEDICATÓRIA

*Aos meus avós, **Kosmo** (in memoriam) e **Vanda** (in memoriam).*

*A você, **vovô**, por sempre fazer o papel de pai, mas, com a doçura e concessões de um avô. Por sempre querer o melhor para mim e não medir esforços para isso. Por ser exemplo de homem honesto, responsável e do bem.*

*A você, **vovó**, por sempre me colocar em suas orações, por ser exemplo de mulher forte e de Deus. Por todo abraço, colo e gesto de carinho. Por toda preocupação e cuidado. Por sempre me emocionar com suas belas palavras e demonstrar tanta sabedoria. Por sempre acreditar na educação e nunca parar de buscar novos conhecimentos.*

A vocês, por fazerem da sua casa, meu lar. E por fazerem de mim, grande parte do que sou hoje.

Para sempre terão minha gratidão, minha admiração e meu amor. Vocês são minha maior saudade!

AGRADECIMENTOS

*A **Deus**, por guiar meu caminho, ouvir minhas orações e ter planos melhores do que os meus. Por nunca me desamparar, não desistir de mim e sempre se manifestar nas pequenas coisas. Por ser bom o tempo todo!*

*À **Maria**, Nossa Senhora, por todas as intercessões de Mãe protetora e cuidadosa! Por acalmar meu coração nas horas difíceis. Por nunca me deixar sozinha.*

*À minha mãe, **Vanilda**, por todo apoio e compreensão durante esses anos de vida acadêmica. Obrigada por me mostrar que tudo vai ficar bem. Por todo zelo e amor dedicados a mim. Por sempre fazer tudo que está ao seu alcance para me ajudar. Amo muito você, mamãe!*

*À minha irmã, **Clarisa**, por ser luz na minha vida. Por trazer leveza aos meus dias, por ser tão emoção, equilibrando a minha razão. Obrigada por me escutar falando desse “universo” da pesquisa mesmo sem fazer parte dele. Obrigada por toda a positividade, por todo amor. Por toda nossa conexão, que me faz tão bem! Te admiro muito como irmã, amiga, mulher e agora como mãe. Te amo, mana!*

*Às minhas tias, **Lili** e **Vanderléia**, por todo amor, por me fazerem sentir tão acolhida, como se eu fosse filha de vocês. Não tenho palavras para descrever o que vocês representam para mim! Amo vocês!*

*Aos meus tios **João** e **Débora** e minha prima/afilhada **Eduarda**, pelos bons momentos de convivência, ainda que corridos e cheios de saudade. Obrigada por fortalecerem ainda mais nossa pequena grande família!*

*Ao meu pai, **Carlos** (in memoriam), por sempre ter olhado por mim.*

À minha orientadora, **Dra. Neide Maria da Silva**, por todos esses anos de convivência quase que diária. Por todo o exemplo de competência e dedicação à pesquisa. Por ter me ensinado muito além do *Toxoplasma* e resposta imune! Por acreditar em mim, muitas vezes, mais do que eu mesma. Obrigada pela confiança durante todo esse tempo e por sempre me incentivar a aprimorar meu lado profissional!

A todos aqueles que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Imunopatologia (IMPAT): **Angelo Alves, Carlos Trindade, Layane Alencar, Loyane Bertagnolli, Marcos Paulo, Mariele Venâncio, Mário César, Marisol Pallette, Natália Carnevalli, Paulo Victor, Romulo Oliveira, Wânia Lima e Yusmaris Cariaco** por todo o apoio na execução dos experimentos, por cada intestino enrolado sempre com muito bom humor e por facilitarem o andamento do trabalho. Essa pesquisa não seria possível sem a participação de vocês no meu dia-a-dia! Gratidão!

Ao **Marcos Paulo, Mário César, Marisol Pallette, Natália Carnevalli, Paulo Victor, Wânia Lima e Yusmaris Cariaco** por participarem diretamente da construção dos resultados aqui apresentados. Obrigada pela disponibilidade e por compartilharem seus conhecimentos comigo.

À **Dra. Júlia Maria Costa-Cruz** pela valiosa parceria e à sua equipe do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, em especial ao **José Eduardo Neto de Sousa**, pela concessão do antígeno de *Strongyloides venezuelensis*.

À **Dra. Ana Cláudia Arantes Marques Pajuaba**, pelo grande auxílio na execução e análises dos experimentos com citocinas.

Aos colegas de trabalho que se tornaram amigos, **Anna Isabel, Enio, Fabrício, Juscélia, Mariani e Rosiane**. Obrigada por me ajudarem a conciliar os experimentos com a rotina do laboratório e por fazerem do nosso ambiente de trabalho mais agradável!

*Aos amigos **Angelo, Camila, Carlos, Layane, Mariele, Marisol, Natália, Yusmaris** por todos bons momentos vividos nesses anos! Por todas as risadas e histórias que construímos juntos. Espero que nossa amizade sempre esteja além dos limites do laboratório!*

*Às minhas queridas amigas **Bellisa, Loyane, Nágilla e Rosiane**, obrigada pela cumplicidade e lealdade durante tantos anos! Independente dos rumos que nossas vidas tomam, ainda sim temos umas às outras. Sei que estaremos sempre juntas! Vocês são essenciais na minha vida!*

*À minha amiga **Mariana**, por todos esses anos de amizade, por todas as horas e horas no telefone, por todos os e-mails e mensagens sobre os mais variados assuntos. Obrigada por sempre torcer por mim, por vibrar a cada conquista e ser um ombro amigo nas horas mais difíceis. Obrigada por se fazer tão presente, mesmo com a distância!*

*À minha amiga **Mara Lúvia**, por todos os bons momentos compartilhados, por sempre fazer dos nossos encontros tão agradáveis, mesmo que breves, e por sempre me mostrar a leveza que a vida pode ter! Gratidão por sua amizade! Te levo sempre comigo!*

*Às secretárias da Pós-graduação, **Lucélia e Lucileide**, por serem solícitas e gentis quando recorro a vocês.*

*Ao pessoal da limpeza, **Dona Vitória, Dona Elva, Dona Raimunda e Maria Lúcia**, obrigada por fazerem tudo com tanto carinho! Obrigada pelos grandes aprendizados, os quais vão além dos livros e artigos científicos.*

*A **CAPES, FAPEMIG e CNPq**, pelo apoio financeiro.*

LISTA DE ABREVIACÕES

5-LO – 5-lipoxigenase

5-LO^{-/-} – camundongos geneticamente deficientes para 5-lipoxigenase

AA – ácido araquidônico

ABC – complexo avidina biotina peroxidase

AgSv – antígeno de *Strongyloides venezuelensis*

ALCAM – molécula de adesão celular de leucócitos ativados

AMP – peptídeos antimicrobianos

ATP – adenosina trifosfato

BLT – receptores de ligação de leucotrienos

BSA – albumina sérica bovina

CBA – *Cytometric Bead Array*

CBEA – Centro de Bioterismo e Experimentação Animal

cDNA – DNA complementar

CD – *cluster of differentiation*

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

Células NK – células *natural killer*

Ct – *cycle threshold*

DAB – 3,3'-Diaminobenzidina

Defa – α -defensina

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*

FACS – *fluorescence activated cell sorter*

FLAP – proteína ativadora de 5-LO

GAPDH – *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GPCR – receptores com sete domínios transmembrânicos acoplados a proteína G

H&E – hematoxilina e eosina

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

IL-4^{-/-} – camundongos geneticamente deficientes para interleucina 4

iNOS – enzima óxido nítrico sintase induzível

LT – leucotrieno
LXA₄ – lipoxina A₄
Lyz – lisozima
MCP-1 – proteína 1 quimiotática de monócitos
MHC – *major histocompatibility complex*
MIF – fator da inibição de migração de macrófagos
mRNA – RNA mensageiro
NADPH – *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NDGA – ácido nordihidroguaiarético
NFκB – fator nuclear kappa B
NI – camundongo não infectado
PBS – solução salina tamponada com fosfato
PBS-T - solução salina tamponada com fosfato contendo Tween
PCR – reação em cadeia da polimerase
qPCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA – ácido ribonucleico
sIgA – imunoglobulina A secretada
STAg – antígeno solúvel de taquizoítas
Tg – camundongo infectado com *Toxoplasma gondii*
TGP – transaminase glutâmico pirúvica
Th – linfócitos T *helper*
TNF – fator de necrose tumoral
TNFRp55 – receptor p55 do fator de necrose tumoral
Treg – linfócito T regulador
UFU – Universidade Federal de Uberlândia
VCAM-1 – molécula de adesão celular vascular-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do tratamento com MK886, AgSv ou LTB ₄ em camundongos C57BL/6 infectados com <i>Toxoplasma gondii</i>	27
Figura 2. <i>Toxoplasma gondii</i> diminui a expressão de 5-LO no intestino delgado independente do tratamento com AgSv	34
Figura 3. O tratamento com AgSv não altera os parâmetros clínicos de camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	35
Figura 4. O tratamento com AgSv diminui o parasitismo no intestino delgado e pulmão durante a fase aguda da infecção por <i>T. gondii</i>	37
Figura 5. AgSv diminui a produção de citocinas durante a infecção por <i>T. gondii</i>	39
Figura 6. O tratamento com MK886 ou LTB ₄ não altera a sobrevivência de camundongos C57BL/6 durante a infecção por <i>T. gondii</i>	40
Figura 7. LTB ₄ diminui o parasitismo no intestino delgado durante a infecção por <i>T. gondii</i>	42
Figura 8. LTB ₄ exógeno atenua a diminuição do número de células de Paneth e da expressão de α -defensina 1 no intestino delgado ocasionadas por <i>T. gondii</i>	43
Figura 9. LTB ₄ exógeno aumenta a quantidade de IgA específica no lúmen intestinal	44
Figura 10. A inibição da via de 5-LO diminui a produção de citocinas durante a infecção por <i>T. gondii</i>	46
Figura 11. LTB ₄ exógeno diminui a inflamação e o parasitismo no pulmão e fígado durante a infecção por <i>T. gondii</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das sequências de primers utilizados para quantificação de mRNA em amostra de íleo de camundongos	31
--	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.2. Ciclo de vida	16
1.3. Resposta imune ao parasito.....	17
1.4. Mediadores lipídicos.....	19
1.5. 5-LO na resposta imune a infecções	20
1.6. LTB ₄ na resposta imune.....	20
1.7. 5-LO e LTB ₄ na toxoplasmose	21
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Animais experimentais	23
3.2. Manutenção da cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	23
3.3. Obtenção das larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i>	24
3.4. Preparação do extrato salino total de <i>S. venezuelensis</i>	24
3.5. Preparação dos tratamentos	24
3.6. Delineamento experimental	25
3.7. Análises histológicas.....	27
3.8. Avaliação do parasitismo tecidual por imuno-histoquímica.....	28
3.9. Avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA) para 5-LO, BLT-1, lisozima e α -defensinas no intestino delgado dos animais experimentais.....	29
3.9.1. Extração de RNA e confecção do DNA complementar.....	29
3.9.2. Reação de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	30
3.10. Quantificação bioquímica de TGP em amostras de soro.....	31
3.11. Mensuração de citocinas no intestino delgado e no soro dos animais experimentais ..	31
3.12. Quantificação de IgA secretada no intestino delgado por ELISA	32
3.13. Normas de biossegurança	32
3.14. Análise estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1. <i>T. gondii</i> diminui a expressão de 5-LO independente do tratamento com AgSv	33

4.2. O tratamento com AgSv diminui o parasitismo no intestino delgado e pulmão durante a fase aguda da infecção por <i>T. gondii</i>	35
4.3. O tratamento com AgSv diminui os níveis de citocinas relacionadas à inflamação durante a infecção por <i>T. gondii</i>	38
4.4. O tratamento com MK886 ou LTB ₄ não altera os parâmetros clínicos ou a sobrevivência de camundongos infectados.....	40
4.5. LTB ₄ diminui o parasitismo no intestino delgado durante a infecção por <i>T. gondii</i>	41
4.6. A diminuição do número de células de Paneth e da expressão de α -defensina 1 ocasionadas por <i>T. gondii</i> é atenuada na presença de altos níveis de LTB ₄	42
4.7. LTB ₄ aumenta a quantidade de IgA específica no lúmen intestinal	44
4.8. A inibição da via de 5-LO diminui a produção de IL-6, IFN- γ e TNF no intestino delgado de camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	45
4.9. LTB ₄ diminui a inflamação e o parasitismo no pulmão e fígado durante a infecção por <i>T. gondii</i>	46
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO I.....	76

RESUMO

A enzima 5-lipoxigenase (5-LO) é necessária para a produção de leucotrienos e lipoxinas, possuindo papel importante em diversas infecções parasitárias. *In vitro*, *Toxoplasma gondii* inibe a produção de leucotrieno B₄ (LTB₄), um subproduto da via de 5-LO, e camundongos deficientes para a enzima são mais susceptíveis à infecção por esse parasito. O objetivo desse estudo foi investigar o papel da via de 5-LO em camundongos susceptíveis C57BL/6 infectados oralmente com *T. gondii*. Para isso, camundongos C57BL/6 foram tratados com MK886, um inibidor da via de 5-LO, ou com LTB₄, simulando assim, uma maior atividade da enzima. Além disso, uma vez que *Strongyloides venezuelensis* induz a atividade de 5-LO, camundongos foram tratados com antígeno de *S. venezuelensis* (AgSv) com o intuito de induzir essa via. Inicialmente, foi observado que *T. gondii* por si só é capaz de diminuir a expressão de 5-LO no intestino delgado de camundongos com o haplotipo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) relacionados à susceptibilidade (H2^b) ou resistência (H2^d) durante a infecção por *T. gondii*. O tratamento com AgSv aumenta a expressão de 5-LO no intestino delgado, entretanto, o parasito é capaz de diminuir os níveis da enzima mesmo nos camundongos tratados. Ainda assim, o tratamento com AgSv é capaz de controlar a replicação de *T. gondii* no intestino delgado de camundongos. Em contrapartida, o tratamento com MK886 reforça ainda mais essa redução de 5-LO no intestino delgado durante a infecção e os camundongos tratados e infectados apresentam alto parasitismo e uma baixa produção local de IL-6, IFN- γ , e TNF. O tratamento com LTB₄ é capaz de controlar a replicação do parasito no intestino delgado, fígado e pulmão, assim como diminui os danos histológicos no fígado e pulmão, porém não altera o perfil de citocinas, assim como as alterações histológicas no intestino delgado de camundongos infectados. Além disso, no intestino delgado, LTB₄ é capaz de aumentar a expressão de α -defensina 1, um peptídeo antimicrobiano produzido pelas células de Paneth e preservar um maior número dessas células, as quais são importantes para a homeostase intestinal e são reduzidas durante a infecção por *T. gondii*. Ainda, o tratamento com LTB₄ aumentou os níveis de IgA específicas para *T. gondii* e *Escherichia coli* no intestino delgado. Em conjunto, esses dados demonstram que *T. gondii* por si só interfere na via de 5-LO, sendo a sua inibição ainda mais favorável para o parasito; contrariamente, tratamento com LTB₄, um subproduto da via, desempenha um papel protetor no intestino delgado durante a infecção experimental, ressaltando a importante relação entre 5-LO e a toxoplasmose.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, *Strongyloides venezuelensis*, 5-lipoxigenase, LTB₄, intestino delgado, células de Paneth

ABSTRACT

5-lipoxygenase (5-LO) is an enzyme required for production of leukotrienes and lipoxins and interferes with parasitic infections. In vitro, *Toxoplasma gondii* inhibits leukotriene B₄ (LTB₄) production and mice deficient in 5-LO are highly susceptible to infection. The aim of this study was to investigate the role of the 5-LO pathway in susceptible C57BL/6 mice infected by oral route with *T. gondii*. For this propose, C57BL/6 mice were treated with MK886, an inhibitor of 5-LO pathway, or with LTB₄, in order to simulate an increased enzyme activity. In addition, once *Strongyloides venezuelensis* induces 5-LO activity, mice were treated with *S. venezuelensis* antigen (AgSv) to induce this pathway. Initially, it was observed that *T. gondii* itself decreased 5-LO expression in small intestine of mice with susceptible (H2^b) or resistant (H2^d) major histocompatibility complex (MHC) haplotype to *T. gondii* infection. AgSv treatment increased the expression of 5-LO in the small intestine, however, the parasite reduced 5-LO even in treated mice. Nevertheless, AgSv treatment controlled the replication of *T. gondii* in the small intestine of mice. In contrast, treatment with MK886 reinforce this reduction of 5-LO during infection, once treated infected-mice presented higher intestinal parasitism and lower local production of IL-6, IFN- γ , and TNF. Treatment with LTB₄ decreased parasite replication in the small intestine, liver and lung, as well as reduced the histological damage in the liver and lung, although does not alter the cytokine profile or histological damage in the small intestine of infected mice. In addition, in the small intestine, LTB₄ enhanced α -defensin 1 expression, an antimicrobial peptide produced by Paneth cells which are important for intestinal homeostasis and, preserved the numbers of this cell phenotype, despite presenting lower compared with uninfected mice. Moreover, LTB₄ treatment increased *T. gondii*- and *Escherichia coli*-specific IgA levels in the small intestine of infected animals. Altogether, these data demonstrated that *T. gondii* itself interferes in the 5-LO pathway, and the inhibition of this pathway is beneficial for the parasite; conversely, treatment with LTB₄, an end-product of the pathway, had a protective role in the small intestine during experimental infection, highlighting the important relationship between 5-LO and toxoplasmosis.

Key words: *Toxoplasma gondii*, *Strongyloides venezuelensis*, 5-lipoxygenase, LTB₄, small intestine, Paneth cells

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, e ordem Coccidia (REY, 2001). A primeira descrição do parasito foi feita em 1908 por Nicole e Manceaux, que encontraram o protozoário nos tecidos do roedor *Ctenodactylus gundi* na Tunísia e por Splendore, no Brasil, que encontrou o parasito em coelhos utilizados para experimentos laboratoriais (DUBEY, 2008).

Esse parasito é capaz de infectar uma série de aves e mamíferos, inclusive humanos, e ainda tem a capacidade de se multiplicar na maioria das células dos hospedeiros (DUBEY, 2004; ELMORE *et al.*, 2010; SASAI; PRADIPTA; YAMAMOTO, 2018), apresentando uma alta prevalência mundial e importância médica e veterinária (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Aproximadamente 25-30% da população mundial está infectada com *T. gondii* (MAENZ *et al.*, 2014), no entanto, a infecção pelo parasito é assintomática na maioria dos adultos e crianças, sendo que apenas aproximadamente 10% dos casos apresentam sintomas não-específicos que raramente precisam de tratamento (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DUBEY; JONES, 2008).

T. gondii apresenta três estágios infecciosos: taquizoítas (do grego *tachys* = rápido; em grupos ou clones), formas características da fase aguda e responsável pela penetração ativa na célula hospedeira, na qual se multiplicam assexuadamente por divisões binárias; bradizoítas (do grego *brady* = lento, em cistos teciduais), formas que pela pressão imposta pela resposta imune encontram-se dentro de cistos sob replicação lenta na fase crônica da infecção; esporozoítas (contidos dentro dos oocistos liberados nas fezes de felídeos), que corresponde às formas infectantes oriundas do processo de reprodução sexuada do parasito (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY, 2008; JONES; DUBEY, 2010; GAZZINELLI *et al.*, 2014). Os cistos teciduais de *T. gondii* são encontrados em diferentes órgãos, tais como pulmão, fígado e rim, porém, são mais prevalentes nos tecidos muscular e nervoso, incluindo o cérebro, olho, músculos esquelético e cardíaco. Esses cistos teciduais podem permanecer latentes no hospedeiro por toda sua vida sem lhe causar danos ou desencadear uma resposta inflamatória (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MAENZ *et al.*, 2014)

As cepas de *T. gondii* isoladas em humanos e outros animais na Europa e América do Norte são classificadas em três linhagens genéticas (tipos I, II e III) (HOWE; SIBLEY, 1995). As cepas do tipo I (RH, ENT e Martin) são virulentas em camundongos, podendo levar a morte desses animais durante a fase aguda da infecção, enquanto as cepas do tipo II (ME-49, PDS e PLK) e III (CEP e VEG) são raramente fatais durante a fase aguda, mas desencadeiam diversas

alterações histológicas nos hospedeiros (SUZUKI; COLLIN; REMINGTON, 1989; APPLEFORD; SMITH, 2000). Entretanto, além dessas três linhagens, análises genéticas demonstraram que existe uma ampla variedade de cepas, sendo que as linhagens encontradas na Europa e América do Norte apresentam características diferentes daquelas encontradas na América do Sul (AJZENBERG, 2015; SU *et al.*, 2012). Além das diferenças genotípicas, as cepas brasileiras estão associadas a formas graves de toxoplasmose ocular (GLASNER *et al.*, 1992; KHAN *et al.*, 2006). Em estudos recentes, foi demonstrado que essa variedade de cepas também é observada em Uberlândia – MG. Os isolados TgCHBrUD1 e TgCHBrUD2, ambos provenientes de galinhas da região, apresentaram características de intermediária ou alta virulência, respectivamente, quando inoculadas em animais experimentais (FRANCO *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2016).

1.2. Ciclo de vida

Os felídeos, como os gatos domésticos e selvagens, são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, uma vez que o estágio sexuado do parasito acontece no intestino delgado desses animais (DUBEY 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010; GAZINNELLI *et al.*, 2014).

O estágio sexuado inicia-se quando os hospedeiros definitivos ingerem alguma das três formas infectantes do parasito: taquizoítas, bradizoítas ou esporozoítas. Após a ingestão de cistos teciduais, a parede do cisto é degradada por enzimas proteolíticas no estômago e no intestino delgado. Então, bradizoítas provenientes dos cistos penetram nas células epiteliais do intestino delgado e multiplicam-se assexuadamente por um processo denominado endodiogenia (merogonia), dando origem a merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo. Os merozoítos, então, darão origem aos gametas masculinos e femininos. O gameta feminino é então fecundado pelo masculino e após a fertilização, a formação da parede do oocisto é iniciada em volta do zigoto, ocorre então a liberação dos mesmos no lúmen intestinal através da ruptura das células epiteliais intestinais e eliminação nas fezes dos felídeos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; FERGUSON, 2002; DUBEY, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010). Os oocistos não esporulados liberados nas fezes dos felídeos, em condições ideais de temperatura e umidade desenvolvem-se em oocistos esporulados, os quais contêm dois esporocistos com quatro esporozoítas cada (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY, 2004).

A fase assexuada do ciclo de *T. gondii* ocorre em ambos os hospedeiros, por meio da ingestão de cistos teciduais ou água e alimentos contaminados com oocistos esporulados. Após a ingestão de uma das formas infectantes do parasito, este invade as células epiteliais do intestino delgado de seu hospedeiro e se diferencia em taquizoítas. Após uma série de

multiplicações, os taquizoítas disseminam-se para outros tecidos do hospedeiro, completando assim o ciclo assexuado (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

Além da transmissão pela via fecal-oral, comum aos demais parasitos da ordem Coccidia, *T. gondii* pode ser transmitido pela via transplacentária ou por carnivorismo. A infecção por *T. gondii* durante a gestação pode desencadear a infecção do feto ou aborto (DUBEY, 2004; YAROVINSKY, 2014). A infecção no terceiro trimestre de gestação, geralmente é menos grave que aquela ocorrida no primeiro trimestre; sendo que no início da gestação pode ocorrer uma forma grave da doença, podendo levar a morte fetal no útero ou aborto espontâneo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.3. Resposta imune ao parasito

A resposta imune à infecção por *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada. Essa variação individual pode ser explicada pelo alto grau de diversidade genética do hospedeiro (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). Estudos anteriores mostraram que o gênero do hospedeiro e a cepa do parasito influenciam no desenvolvimento da toxoplasmose (FRANCO *et al.*, 2014). Além disso, o parasito é capaz de infectar uma série de tecidos, e a resposta imune é específica em cada um dos sítios de infecção (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

A imunidade celular é considerada o elemento chave da resposta imune do hospedeiro na infecção por *T. gondii*. Fazem parte dessa resposta macrófagos, linfócitos T e células *natural killer* (NK) juntamente com uma série de citocinas (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). O parasito desencadeia uma resposta do tipo Th1, uma vez que macrófagos, células NK, células dendríticas e neutrófilos produzem citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF), interferon (IFN)- γ e interleucina (IL)-12, levando a uma forte resposta mediada por células (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). Além disso, as células T CD4⁺ são importantes fontes de IFN- γ , bem como as células T CD8⁺, que, além de produzirem essa citocina, também podem eliminar diretamente células infectadas (STURGE; YAROVINSKY, 2014). Durante a fase aguda da infecção por *T. gondii*, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas produzem IL-12, a qual induz a produção de IFN- γ por células NK, aumentando assim a atividade microbicida dos macrófagos (GAZZINELLI *et al.*, 1994; BLISS; ZHANG; DENKERS, 1999). Estudos anteriores mostraram que a ativação de macrófagos por IFN- γ e TNF induzem a produção de altos níveis de intermediários reativos de nitrogênio, que estão envolvidos no controle da

replicação do parasito (ADAMS *et al.*, 1990; LANGERMANS *et al.*, 1992). Ainda, Silva e colaboradores (2009) demonstraram que TNF e a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) são importantes para o controle da replicação de *T. gondii*, uma vez que camundongos deficientes para receptor p55 do fator de necrose tumoral (TNFRp55) e iNOS apresentam maior carga parasitária no cérebro do que seus respectivos controles.

Apesar do controle da replicação de *T. gondii* ser dependente da produção de IFN- γ (YAP; SHER, 1999; SILVA *et al.*, 2002), a produção de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para as alterações histológicas da doença (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). Sendo assim, a regulação da resposta imune por citocinas como IL-10, é importante para o controle de uma resposta Th1 exacerbada (SUZUKI *et al.*, 2000). Durante a fase aguda da infecção oral por *T. gondii*, o intestino delgado de camundongos C57BL/6 apresenta graves inflamações desencadeadas principalmente pela resposta imune intensa contra o parasito, sendo esses danos mediados principalmente por células T CD4⁺ e uma alta produção de IFN- γ (LIESENFELD *et al.*, 1996). Na fase crônica, o controle do parasitismo no cérebro é mediado por células T CD4⁺, TCD8⁺ e macrófagos (SCHLÜTER *et al.*, 1991), contudo, camundongos C57BL/6 apresentam uma grave encefalite toxoplásmica decorrente da intensa migração de células inflamatórias, que podem estar relacionadas a alta expressão de moléculas de adesão no sistema nervoso central, tais como ALCAM (molécula de adesão celular de leucócitos ativados) e VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1) (SILVA *et al.*, 2010).

Embora a detecção de anticorpos seja uma ferramenta amplamente utilizada para o diagnóstico da toxoplasmose (LIU *et al.*, 2015), a resposta humoral durante a infecção por *T. gondii* desencadeada por linfócitos B é relevante, visto que tais linfócitos produzem anticorpos específicos contra o parasito, garantindo maior sobrevivência e menores danos histológicos em camundongos infectados (KANG; REMINGTON; SUZUKI, 2000). Além disso, camundongos imunizados infectados com *T. gondii* apresentam altos níveis de anticorpos específicos e são capazes de controlar a replicação do parasito (SAYLES; GIBSON; JOHNSON, 2000; CZARNEWSKI *et al.*, 2017).

As características da infecção por *T. gondii* em camundongos são muito semelhantes àquelas manifestadas em humanos. Por essa razão, a toxoplasmose experimental em modelo murino é muito utilizada como ferramenta para o entendimento de mecanismos imunológicos durante a infecção por esse parasito (DENKERS, 1999). Diante da infecção por *T. gondii*, diferentes linhagens de camundongos desenvolvem uma forte resposta Th1, independentemente de seus haplotipos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (GAZZINELLI *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 1992). Embora o haplotipo do MHC tenha influência na

susceptibilidade ou resistência de camundongos à toxoplasmose (BROWN; McLEOD, 1990; McLEOD *et al.*, 1989; SUZUKI *et al.*, 1994), o *background* genético de camundongos C57BL/6 é crítico para o desenvolvimento dos danos intestinais decorrentes da infecção por *T. gondii* (RESENDE *et al.*, 2008). A susceptibilidade de camundongos C57BL/6 diante de *T. gondii* também é observada ainda na forma congênita da infecção, visto que, diferentemente de camundongos BALB/c, camundongos C57BL/6 apresentaram intensa resposta inflamatória, levando a apoptose e necrose de sítios de implantação (COUTINHO *et al.*, 2012).

1.4. Mediadores lipídicos

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo, encontrado nas membranas celulares dos mamíferos, auxiliando na fluidez dessas membranas em temperaturas fisiológicas (BRASH, 2001). Os metabólitos biológicos derivados do AA são chamados de eicosanoides (ROCCA; FITZGERALD, 2002). Estes podem ser divididos em duas classes, de acordo com suas vias de síntese bioquímica: metabólitos de cicloxigenase, denominados de prostanoídes, e metabólitos de 5-lipoxigenase (5-LO), conhecidos como leucotrienos (LTs). Os prostanoídes e leucotrienos participam de inúmeros efeitos biológicos, tais como indução e regulação de respostas inflamatórias (ROCHA; PLUMB; COFFMAN, 2003). A enzima 5-LO é expressa em diferentes tipos celulares, tais como monócitos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e linfócitos B (RÅDMARK; SAMUELSSON, 2010; RÅDMARK *et al.*, 2015)

Em resposta a vários estímulos (físicos, químicos, hormonais, ação de citocinas) (ROCCA; FITZGERALD, 2002) o AA pode ser mobilizado a partir da bicamada lipídica através da fosfolipase A2. O AA livre é então oxigenado no carbono C5 pela 5-LO e posteriormente convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄) (SHIMIZU; RÅDMARK; SAMUELSSON, 1984; ROUZER; MATSUMOTO; SAMUELSSON, 1986; ROUZER; SAMUELSSON 1986). Para que haja uma efetiva ação da 5-LO é necessária a presença de uma proteína auxiliar denominada proteína ativadora da 5-LO (FLAP) (MILLER *et al.*, 1990). O LTA₄ pode ser hidrolisado para formar o LTB₄, ou conjugado a um resíduo de glutatona para formar o LTC₄. Este, por sua vez, é convertido em LTD₄ e LTE₄. Estes três últimos leucotrienos são conhecidos coletivamente como cisteinil LTs (SAMUELSSON, 1983; ROCHA; PLUMB; COFFMAN, 2003; NEWCOMER; GILBERT, 2010). Além disso, as células possuem especificidade quanto à produção de LTs: mastócitos e eosinófilos produzem principalmente cisteinil LTs, neutrófilos e células dendríticas produzem, sobretudo, LTB₄ e macrófagos produzem ambas as classes (PETERS-GONDEN *et al.*, 2005).

1.5. 5-LO na resposta imune a infecções

A 5-LO tem papel importante na resposta imune contra diversos patógenos, como em infecção experimental por *Strongyloides venezuelensis*, na qual a deleção genética da enzima ou a sua inibição por meio do tratamento com MK886 induzem alta carga parasitária no duodeno de camundongos infectados (MACHADO *et al.*, 2005).

A enzima 5-LO também está associada no controle da infecção experimental por *Histoplasma capsulatum* (SECATTO *et al.*, 2012), bem como aumenta a capacidade microbicida de macrófagos através da via NADPH contra *Klebsiella pneumoniae* (SEREZANI *et al.*, 2005), além de controlar a carga bacteriana em infecções por *Mycobacterium tuberculosis* (PERES *et al.*, 2007)

Em protozoários, estudos anteriores mostraram que 5-LO participa do controle da carga parasitária em infecções por *Trypanosoma cruzi* (BORGES *et al.*, 2009; PANIS *et al.*, 2011), embora a ausência da enzima não prejudique o controle da miocardite e a sobrevivência dos animais infectados (PAVANELLI *et al.*, 2010). Estudos anteriores mostraram que 5-LO também tem papel importante na resposta protetora contra *Leishmania amazonensis* (SEREZANI *et al.*, 2006; CHAVES *et al.*, 2014).

1.6. LTB₄ na resposta imune

LTB₄ exerce diversas atividades biológicas na resposta imune, incluindo aumento da fagocitose de microrganismos por neutrófilos e macrófagos, aumento do recrutamento de células para locais de inflamação e da produção de mediadores inflamatórios (SAMUELSSON *et al.*, 1987; LE BEL; BRUNET; GOSSELIN, 2014).

A ação de LTB₄ é mediada por meio dos receptores de ligação de leucotrienos (BLT) 1 e BLT2, os quais fazem parte da superfamília de receptores com sete domínios transmembrânicos acoplados a proteína G (GPCR) (TAGER; LUSTER, 2003). BLT1 é um receptor de alta afinidade expresso principalmente em leucócitos (YOKOMIZO, 2011), enquanto que BLT2 é um receptor de baixa afinidade, porém, amplamente expresso (YOKOMIZO *et al.*, 2000). BLT1 é responsável pelas propriedades quimioatrativas de LTB₄, bem como seus efeitos pró-inflamatórios (TAGER; LUSTER, 2003; LE BEL; BRUNET; GOSSELIN, 2014). Contudo, as funções de BLT2 ainda não são bem elucidadas (TAGER; LUSTER, 2003).

Nohgawa e colaboradores (1997) mostraram papel quimiotático de LTB₄ para neutrófilos, sendo encontrado no sítio inflamatório de várias condições patológicas. Além disso, tal leucotrieno possui importância no recrutamento de linfócitos T para o sítio de inflamação

tecidual (OTT *et al.*, 2003; TAGER *et al.*, 2003) e adesão dessas células às células endoteliais mediadas por BLT1 (TAGER *et al.*, 2003).

LTB₄ está envolvido em outros processos da resposta imune, participando da estimulação do fator nuclear kappa B (NFκB) (AOKI *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2004), levando a produção de mediadores inflamatórios, como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (HUANG *et al.*, 2004), e IL-8 (AOKI *et al.*, 1998). LTB₄ também induz produção de IL-1 (ROLA-PLESZCZYNSKI; LEMAIRE, 1985), IL-6 (ROLA-PLESZCZYNSKI; STANKOVÁ, 1992), TNF (STANKOVÁ *et al.*, 1993) em monócitos/macrófagos humanos. Além disso, LTB₄ também é capaz de induzir a produção de IL-5 (YAMAOKA; KOLB, 1993) e aumentar a expressão de receptores para IL-2 em linfócitos T (STANKOVÁ; GAGNON; ROLA-PLESZCZYNSKI, 1992). Em relação ao efeito desse mediador lipídico em células T, o mesmo parece inibir a diferenciação de células T reguladoras (Tregs) e induzir a formação de células Th17 (CHEN *et al.*, 2009).

Devido ao auxílio na migração das células T citotóxicas efectoras, LTB₄ poderia ser importante na resposta imune contra patógenos intracelulares (GOODARZI *et al.*, 2003). LTB₄ tem papel importante no desenvolvimento de uma resposta imune protetora em infecção por *M. tuberculosis* (PERES *et al.*, 2007). Além disso, LTB₄ é produzido por macrófagos estimulados com adenosina trifosfato (ATP) e infectados com *L. amazonensis*, participando da eliminação desse parasito (CHAVES *et al.*, 2014). LTB₄ também aumenta a fagocitose de *Streptococcus pyogenes* por monócitos/macrófagos (SOARES *et al.*, 2013).

1.7. 5-LO e LTB₄ na toxoplasmose

Estudos anteriores demonstraram que camundongos geneticamente deficientes para 5-LO (5-LO^{-/-}) são mais suscetíveis que seus controles à infecção por *T. gondii* (ALIBERTI; SERHAN; SHER, 2002; BENEVIDES *et al.*, 2013), apresentando elevados índices de IFN-γ e IL-12 e uma encefalite grave (ALIBERTI; SERHAN; SHER, 2002). Ainda, a inibição de 5-LO diminui a atividade microbicida de IFN-γ em macrófagos humanos infectados com *T. gondii* (YONG; CHI; HENDERSON, 1994).

Anteriormente, foi demonstrado que LTB₄ é capaz de causar danos morfológicos em *T. gondii*, tais como formação de vesículas na membrana celular, extravasamento de conteúdo citoplasmático e formação de vacúolos no citoplasma (YONG; CHI; HENDERSON, 1994). Além disso, *T. gondii* parece diminuir a produção de LTB₄ em macrófagos humanos infectados, porém, o tratamento desses macrófagos com IFN-γ é capaz de reestabelecer a produção desse

mediador lipídico (YONG; CHI; HENDERSON, 1994). De forma semelhante, pacientes HIV (vírus da imunodeficiência humana) positivos e com encefalite toxoplásmica apresentam baixos níveis de LTB₄ no líquido cefalorraquidiano, sugerindo que *T. gondii* inibe a produção desse leucotrieno (MAYATEPEK *et al.*, 1999).

A inibição da produção de LTB₄ por *T. gondii* poderia ser explicada pelo fato de taquizoítas de *T. gondii* apresentarem peptídeos homólogos a lipoxigenase tipo 1 de plantas com atividade de 15-lipoxigenase, que está envolvida na conversão do LTA₄ em lipoxina A₄ (LXA₄) (BANNENBERG *et al.*, 2004), um mediador lipídico dependente da via da 5-LO com propriedades anti-inflamatórias (revisado em ROMANO, 2010). Dessa forma, o parasito induziria uma maior conversão de LTA₄ em LXA₄.

Embora já tenha sido demonstrado que a deficiência de 5-LO aumenta a susceptibilidade a *T. gondii* e que LTB₄ é nocivo para o parasito, o papel de 5-LO e LTB₄ na imunopatologia de importantes sítios de infecção, tais como intestino delgado, pulmão e fígado, ainda não está elucidada, especificamente quando a infecção ocorre pela via natural, a oral. Sendo assim, avaliar a participação da via de 5-LO nesses sítios de infecção pode auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune ao *T. gondii*, e tais estudos são de grande valia para o desenvolvimento de ferramentas para o tratamento ou prevenção da toxoplasmose, uma vez que essa zoonose acomete grande parte da população mundial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a participação da via de 5-LO na resposta imune de camundongos oralmente infectados com *T. gondii*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de 5-LO e BLT-1 no intestino delgado de camundongos susceptíveis e resistentes infectados oralmente com *T. gondii*;
- Verificar se o tratamento com antígeno de *Strongyloides venezuelensis* (AgSv) ou MK886 é capaz de alterar a expressão de 5-LO no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*;
- Avaliar o efeito do tratamento com AgSv, MK886 e LTB₄ nos parâmetros clínicos e na sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*;

- Analisar o efeito do tratamento com AgSv, MK886 e LTB₄ na proliferação de *T. gondii*, bem como na inflamação ocasionada pela infecção no intestino delgado, pulmão e fígado de camundongos C57BL/6;
- Avaliar o número de células caliciformes e células de Paneth no intestino delgado de camundongos C57BL/6 tratados com AgSv, MK886 e LTB₄ e infectados com *T. gondii*;
- Avaliar a expressão do RNA mensageiro (mRNA) de peptídeos antimicrobianos no intestino delgado de camundongos tratados com LTB₄ e infectados com *T. gondii*;
- Avaliar a influência do tratamento com AgSv, MK886 e LTB₄ nos níveis de citocinas no soro e no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*;
- Avaliar os efeitos do tratamento com MK886 ou LTB₄ na produção de IgA específica no lúmen intestinal de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Para realização do presente estudo, foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6, C57BKs/J, BALB/c e CB10-H2 com idade de 8 a 12 semanas, sendo que cada grupo experimental continha no mínimo 6 animais. Ainda, fêmeas de camundongos Swiss de 8-12 semanas de idade foram utilizados para manutenção da cepa ME49 de *T. gondii*.

Todos os camundongos foram adquiridos 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 luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada. O experimento foi aprovado Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU sob o protocolo de número 0078/14 (ANEXO I).

3.2. Manutenção da cepa ME49 de *T. gondii*

A cepa ME49 de *T. gondii* foi mantida em camundongos Swiss, os quais foram inoculados por via intraperitoneal com 10 cistos de *T. gondii*. Um mês após o inóculo, o cérebro foi removido, lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,2 e homogeneizado com uma seringa e agulha de calibre 25 x 7. Os cistos cerebrais foram contados em microscópio de luz utilizando uma objetiva de 10 x de aumento e utilizados para a infecção dos animais experimentais (SILVA *et al.*, 2002).

3.3. Obtenção das larvas filarioides de *S. venezuelensis*

A linhagem de *S. venezuelensis* (BRUMPT, 1947) foi isolada do roedor silvestre *Bolomys lasiurus* (abril de 1986). Esta linhagem está sendo mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectados no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU. As larvas filarioides utilizadas foram obtidas por coprocultura das fezes de ratos Wistar infectados experimentalmente com *S. venezuelensis*. Para a coprocultura os animais foram colocados para defecar sobre papel toalha limpo e úmido no 7º dia após infecção no período da tarde e as fezes foram coletadas no 9º dia pela manhã. As fezes coletadas foram mantidas em cultura de carvão mineral por 3 dias a 28 °C, segundo Loos (NEVES *et al.*, 2011), e foram recuperadas pelo método de Rugai, Mattos e Brizola (1954).

3.4. Preparação do extrato salino total de *S. venezuelensis*

O preparo do antígeno de *S. venezuelensis* (AgSv) foi realizado pelo Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU. O extrato salino total foi produzido a partir de 300.000 larvas filarioides de *S. venezuelensis* conforme metodologia descrita por Gonzaga e colaboradores (2011), com algumas modificações. As larvas de *S. venezuelensis* foram descongeladas e ressuspendidas em 100 µL de solução PBS 0,01 M, pH 7,2. Posteriormente foram submetidas a 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (1 min, -196 °C) e adicionado 100 µL do coquetel de inibidores de proteases (cOmplete™ mini, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para cada um mL do homogenato. Em seguida, foi centrifugado a 12400 x g por 30 minutos a 4 °C. A concentração proteica no sobrenadante do extrato salino foi quantificado pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) e esse armazenado a -20 °C. O procedimento foi repetido para obtenção de quantidade necessária de antígenos para todos os experimentos.

3.5. Preparação dos tratamentos

MK886, um inibidor da FLAP (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), foi primeiramente diluído em etanol absoluto, seguido de diluição em água filtrada, resultando em uma solução de álcool etílico a 20% (SFORCIN *et al.*, 2007), a qual foi armazenada a -20°C até o momento de uso. Além disso, LTB₄ (Cayman Chemical) foi obtido na forma de solução em etanol e diluído em salina 0,9% (LE BEL; GOSSELIN, 2015) no momento do uso. Com relação ao AgSv, o mesmo foi diluído em PBS e armazenado a -20°C para posterior tratamento dos camundongos.

3.6. Delineamento experimental

Inicialmente, foi analisado se a expressão da enzima 5-LO em camundongos infectados com *T. gondii* é dependente do haplotipo do MHC. Para isso camundongos C57BL/6 e BALB/c, os quais apresentam alelos do MHC relacionados à susceptibilidade (H2^b) ou resistência (H2^d) a toxoplasmose, respectivamente (BROWN; MCLEOD, 1990); assim como seus congênicos CB10-H2 (*background* genético de BALB/c com haplotipo H2^b) e C57BKs/J (*background* genético de C57BL/6 com haplotipo H2^d) foram infectados por gavagem com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*.

Posteriormente, para avaliar o efeito da inibição da via de 5-LO, um grupo de camundongos C57BL/6 foi oralmente tratado com MK886 (5mg/kg/dia em 0,2 ml) (MACHADO *et al.*, 2005) uma hora antes da infecção oral com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e diariamente por mais 7 dias (Figura 1A).

Uma vez que estudos anteriores demonstraram que *S. venezuelensis* tem a capacidade de induzir a atividade de 5-LO em camundongos (MACHADO *et al.*, 2005), o presente estudo também objetivou investigar o efeito da indução da enzima mediada pelo AgSv durante a infecção oral com *T. gondii*. Para isso, camundongos C57BL/6 foram tratados intraperitonealmente com AgSv (100 µg/camundongo/dia em 0,1 ml) por três dias consecutivos antes da infecção com *T. gondii* e por mais três dias após a infecção (Figura 1B).

Além disso, outro grupo de camundongos C57BL/6 foi tratado por via intraperitoneal com LTB₄ (1 µg/kg/dia em 0,1 ml) (LE BEL; GOSSELIN, 2015), um produto final da via de 5-LO, do dia 1 ao dia 7 após a infecção (Figura 1C).

Em todos os experimentos, grupos de camundongos infectados foram tratados apenas com o veículo (etanol 20%, salina 0,9% ou PBS). Como os resultados obtidos do tratamento com os diferentes veículos foram semelhantes, os dados representados neste estudo são referentes ao grupo de animais tratados com etanol 20%.

No dia 7 após a infecção, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil)/Xilazina (Schering-Plough Coopers, Cotia, SP, Brasil) e o sangue coletado por punção do plexo retro orbital. Os animais foram então eutanasiados por deslocamento cervical e o intestino delgado, pulmão e fígado coletados. O intestino delgado foi coletado em toda a sua extensão e segmentado em quatro porções: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Essas foram lavadas com PBS e enroladas, cuidadosamente, em finos palitos de madeira formando um “rolo suíço”. Os órgãos foram então fixados em formol tamponado 10% e incluídos em parafina.

Para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) e dosagem de citocinas, fragmentos do íleo foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento do uso.

Para obtenção do soro, após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado durante 5 minutos a 3000 x g e o soro coletado e preservado à -80 °C até o momento do uso.

Além disso, camundongos C57BL/6 foram tratados com veículo, MK886, AgSv ou LTB₄, como descrito anteriormente, e infectados por via oral com 10 cistos da cepa ME49 para avaliação de morbidade, variação de peso corporal, sobrevivência e acompanhados diariamente por 40 dias após a infecção. A avaliação da morbidade foi estabelecida utilizando um sistema baseado em escores como previamente descrito (BARTLEY *et al.*, 2006), de acordo com os seguintes critérios: (0) pelo brilhante, animal ativo; (1) pelo ouriçado, animal ainda ativo; (2) pelo arrepiado, animal pouco ativo; (3) pelo muito arrepiado, diminuição na frequência de locomoção do animal; (4) pelo muito arrepiado, pouca movimentação do animal.

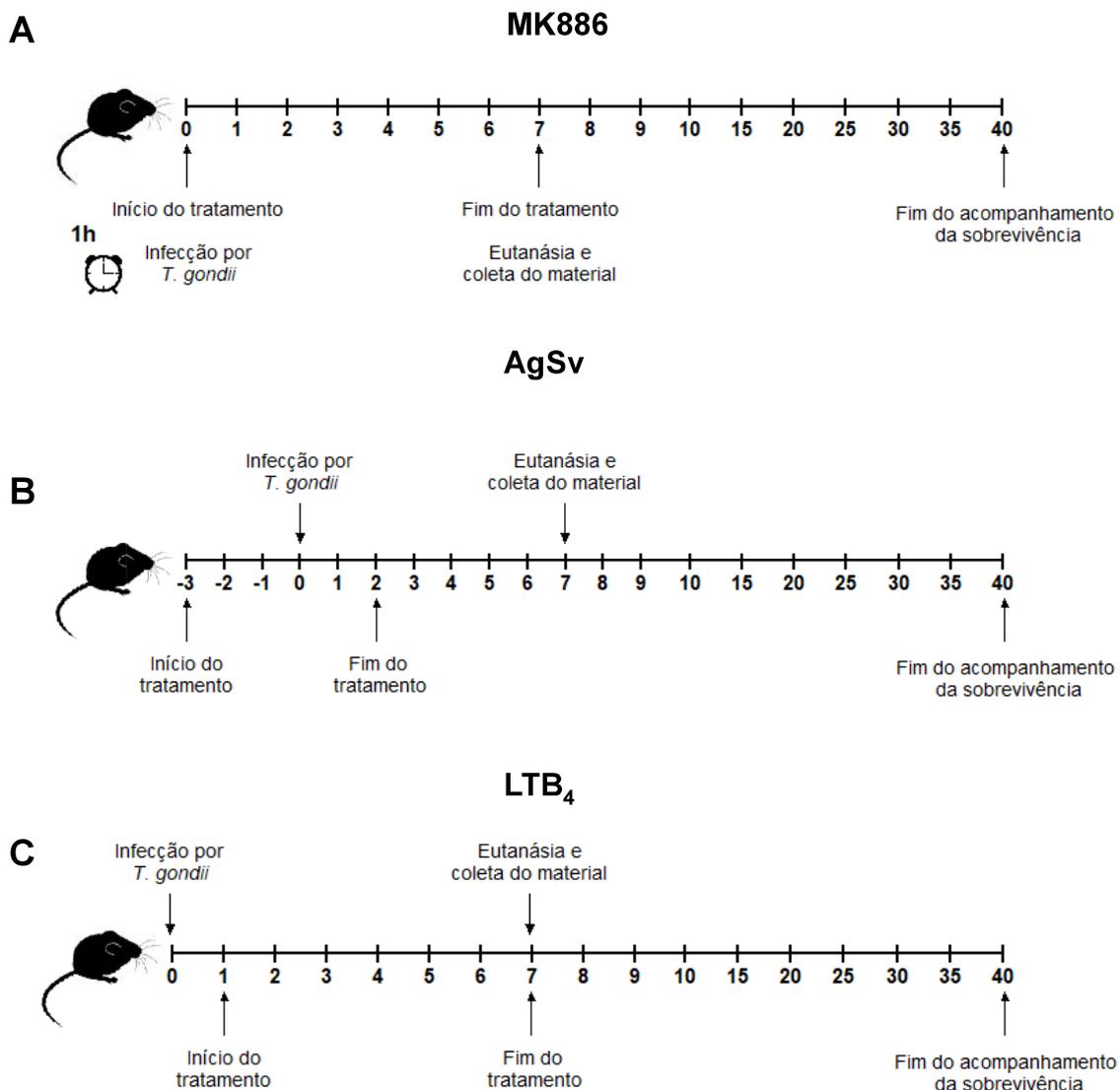


Figura 1. Esquema representativo do tratamento com MK886, AgSv ou LTB₄ em camundongos C57BL/6 infectados com *Toxoplasma gondii*. (A) Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com MK886 (5mg/kg/dia) uma hora antes da infecção e diariamente até o dia 7 após a infecção. (B) Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com LTB₄ (1 µg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. (C) Camundongos C57BL/6 foram tratados com AgSv (100 µg/camundongo/dia) durante 3 dias, infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e tratados por mais 3 dias consecutivos.

3.7. Análises histológicas

Secções teciduais do intestino delgado, pulmão e fígado foram desparafinizadas e submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) para verificação das alterações histológicas como previamente descrito (BENEVIDES *et al.*, 2013). Todas as análises foram realizadas em ensaio duplo cego. No intestino delgado, as lesões inflamatórias foram graduadas de acordo com a presença e extensão de infiltrados inflamatórios na lâmina própria e submucosa, alargamento das vilosidades e aumento em sua espessura, assim como presença de

necrose em toda a secção tecidual. Os escores inflamatórios foram representados como unidades arbitrárias, sendo: 0 – 2, suave; 2 – 4, moderado; 4 – 6, grave; e acima de 6, muito grave. Com relação ao fígado, foi realizada a contagem do número de infiltrados inflamatórios em 40 campos microscópicos no tecido hepático. Para avaliação das alterações histológicas tanto no intestino delgado quanto no fígado, as secções teciduais foram analisadas utilizando a objetiva de 10 x de aumento.

A inflamação pulmonar foi estimada por meio de uma análise morfométrica do tecido pulmonar, uma vez que essa inflamação é geralmente evidenciada por um espessamento das paredes alveolares. Para isso, utilizando a objetiva de 10 x de aumento, foram capturadas imagens de 10 campos microscópicos de cada lâmina/animal em um microscópio Leica DM5000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) equipado com uma câmera digital Leica ICC50 (Leica Microsystems). As imagens foram analisadas utilizando o *software* ImageJ versão 1.50i, no qual cada imagem foi convertida em uma imagem de 8 bit (escala de cinzas). Em seguida, o *threshold* foi configurado de tal maneira que apenas os pixels ocupados pelos septos pulmonares fossem ressaltados com a cor vermelha. A área do tecido pulmonar em relação à área total da imagem foi mensurada e os resultados expressos em porcentagem.

Para quantificação de células de Paneth e células caliciformes, secções teciduais de intestino delgado foram coradas em H&E ou Alcian Blue (pH 2,5), respectivamente. O número de células de Paneth foi obtido por meio da avaliação de 100 criptas intestinais em cada segmento de intestino delgado, totalizando 400 criptas intestinais analisadas por animal. Já para a quantificação das células caliciformes, foram analisados 50 campos teciduais por porção intestinal, totalizando 200 campos teciduais por camundongo. A quantificação de ambos os tipos celulares foi realizada utilizando a objetiva de 40 x de aumento, em ensaio duplo cego.

3.8. Avaliação do parasitismo tecidual por imuno-histoquímica

O parasitismo tecidual foi avaliado por imuno-histoquímica como previamente descrito (SILVA *et al.*, 2010). Resumidamente, os cortes, desparafinizados, foram primeiramente incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% para bloquear a peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito em tampão citrato, pH 6,0, em forno micro-ondas durante 7 minutos e os sítios não específicos bloqueados pela incubação dos cortes com leite desnatado 0,3% por 30 minutos (Molico; Nestlé Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Os cortes foram incubados com 0,1% de Triton X-100 em citrato de sódio 0,1%. Posteriormente, os cortes foram incubados durante a noite toda, com soro de camundongos Swiss infectados com *T. gondii* (produzido em nosso laboratório através da infecção de Swiss com a cepa ME49 de *T. gondii*)

diluído em PBS contendo saponina 0,01%. Como anticorpo secundário, foi utilizado imunoglobulina G (IgG) de cabra biotinizada anti-camundongo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA). A reação foi amplificada usando o complexo avidina biotina peroxidase (ABC) (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) e desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma). Os cortes foram contracolorados 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 cistos presentes em toda a secção tecidual de cada órgão, utilizando-se objetiva de 40x de aumento.

3.9. Avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA) para 5-LO, BLT-1, lisozima e α -defensinas no intestino delgado dos animais experimentais

3.9.1. Extração de RNA e confecção do DNA complementar

O RNA foi extraído de amostras de íleo dos camundongos utilizados neste estudo. A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, para cada amostra, foi adicionado o reagente Trizol (1 ml para 100 mg de tecido), e o tecido triturado com homogeneizador e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 ml da suspensão, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio e a amostra foi centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Em seguida, foi adicionado à fase aquosa o mesmo volume de isopropanol 100% e após 10 minutos de incubação a solução foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. Feito isso, o precipitado foi lavado em 1 ml de etanol 75%, seguido de centrifugação a 10000 x g por 5 minutos a 4°C. As amostras de RNA foram ressuspensas em 40 μ l de água deionizada e livre de RNase. Após a extração, a concentração, pureza e qualidade do RNA obtido foram determinadas usando o espectrofotômetro GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase, seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e armazenadas a -80°C.

O RNA purificado foi submetido à confecção do DNA complementar (cDNA) por meio do Sistema de Transcrição Reversa ImProm-II™ (Promega, Madison, WI, EUA), sendo adicionados 1 μ L de Oligo(dT), 1 μ g do RNA extraído e 7,5 μ l de água destilada. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos em termociclador Arktik (Thermo Fisher Scientific Inc.,

Rockford, IL, EUA) seguida de incubação no gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados a reação mix contendo 5 µL de tampão, 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTPs, 2 µl de água destilada e 1 µL da enzima Transcriptase Reversa ImProm-II™ (160 U/µL), totalizando 30 µL de volume final de reação.

3.9.2. Reação de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A expressão quantitativa de genes da 5-LO, BLT-1, lisozima e α -defensinas foi realizada com cDNA proveniente do RNA extraído das amostras de íleo dos camundongos. Para a reação de qPCR, foi utilizado 5 µl de SYBR Green Mix (Invitrogen), 0,5 µl de cada primer (senso e antissenso) a 5 µM e 4 µl de cDNA sintetizado a partir de 1 µg de RNA. A reação foi realizada no aparelho Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies), sendo 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 50 °C e 1 minuto a 60 °C. Um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60 a 95 °C foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de mRNA para a GAPDH, utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Os resultados foram normalizados com GAPDH e analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold*). O resultado foi calculado com a fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ amostra controle}$, onde $\Delta Ct = Ct \text{ gene estudado} - Ct \text{ GAPDH}$. O número de vezes de expressão diferencial do mRNA comparado com o controle foi definido pela fórmula do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os *primers* e sequências utilizados durante a reação de PCR em tempo real estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista das sequências de *primers* utilizados para quantificação de mRNA em amostra de íleo de camundongos.

Gene	Sequências (5' → 3')	Referência *
<i>gapdh</i>	GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG CAGTGTAGCCCAAGATGCCC	
<i>alox5</i>	AGCTGCCTGCTGTGCATCCC CCCGGTGGCATTGGCCTTGT	FAHEL <i>et al.</i> , 2015
<i>blt1</i>	TCCTCCACCATTCTGAGTC GTCTCTCTGCCCTGACTTGC	
<i>defa1</i>	TCAAGAGGCTGCAAAGGAAGAGAAC CGACAGCGACTTGTACCTCTGGT	RAETZ <i>et al.</i> , 2013
<i>defa3</i>	CAGGCTGTGTCTGTCTCTTTTG TCAGCGACAGCAGAGTGTGTA	FOUREAU <i>et al.</i> , 2010
<i>defa5</i>	TTGTCCTCCTCTCTGCCCTTGT ATGAAGAGCAGACCCTTCTTGG	FOUREAU <i>et al.</i> , 2010
<i>lyz</i>	GCCAAGGTCTACAATCGTTGTGAGTTG CAGTCAGCCAGCTTGACACCACG	RAETZ <i>et al.</i> , 2013

*Os *primers* não referenciados foram desenhados utilizando o programa Primer Express v3 (Life Technologies).

3.10. Quantificação bioquímica de TGP em amostras de soro

Como um indicativo de dano hepático, os níveis de transaminase glutâmico pirúvica (TGP) foram mensurados em amostras de soro de camundongos C57BL/6 por meio de um kit analítico (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi obtida a 505 nm e os níveis de TGP expressos em unidades/ml.

3.11. Mensuração de citocinas no intestino delgado e no soro dos animais experimentais

Para mensuração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17 e IL-10 no intestino delgado, fragmentos teciduais (200 mg) foram coletados no 7^o de infecção e estes foram homogeneizadas em 1 ml de PBS 0,01 M, pH 7,2 contendo inibidores de protease [aprotinina 0,016mM (Sigma), leupeptina 0,21mM (Sigma), benzamidina 1mM (Sigma), PMSF 1,6 mM (fluoreto de fenilmetilsulfonil, Sigma) e EDTA 5 mM]. Cada amostra foi então centrifugada durante 10 minutos a 3000 x g e o sobrenadante armazenado a -80°C.

As citocinas no sobrenadante do homogenato tecidual e no soro dos animais experimentais foram mensuradas utilizando o kit de citocinas murinas Th1/Th2/Th17 *Cytometric Bead Array (CBA)*TM (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Resumidamente, 25 μ l de *beads* de captura, 25 μ l de amostra e 25 μ l de anticorpo de detecção foram adicionados em tubo FACS (BD Biosciences). Após 3 horas de incubação à temperatura ambiente, foi adicionado 500 μ l do tampão de lavagem, seguida da centrifugação a 200 x g por

5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 300 µl de tampão de lavagem para leitura no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences) e posterior análise dos dados utilizando software FACSDIVA™ (BD Biosciences). A concentração final das citocinas foi determinada a partir de curvas padrão com concentrações conhecidas de proteínas recombinantes e os resultados foram expressos em pg/ml, observando os respectivos limites de detecção: IL-2 (0,1 pg/ml), IL-4 (0,03 pg/ml), IL-6 (1,4 pg/ml), IFN-γ (0,5 pg/ml), TNF (0,9 pg/ml), IL-17 (0,8 pg/ml) e IL-10 (16,8 pg/ml).

3.12. Quantificação de IgA secretada no intestino delgado por ELISA

A quantificação de IgA secretada (sIgA) foi realizada como previamente descrito (FREHN *et al.*, 2014) com modificações. Para preparação das amostras de fezes dos camundongos, essas foram coletadas e diluídas 1:5 em tampão de diluição fecal [90 ml de PBS 0,01 M, pH 7,2; 10 ml de EDTA 0,5M, pH 8; 10 mg de aprotinina (Sigma) e 666 µl PMSF (Sigma; 100mM)], obtendo assim uma solução fecal. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante coletado.

Para realização do ELISA, placas de alta afinidade (Corning®) foram sensibilizadas com 10 µg/mL de STAg (antígeno solúvel de taquizoítas; GAZZINELLI *et al.*, 1991) e colaboradores () ou de extrato de *Escherichia coli* (50 µL/poço) a 4 °C por 16 horas. A seguir, as placas foram lavadas com PBS-Tween (PBS-T) e bloqueadas com albumina sérica bovina (BSA) 5% em PBS-T por 1 hora, lavadas e incubadas com a solução fecal (1:7) a 4 °C por 16 horas. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase anti-IgA (Santa Cruz Biotechnology, Dalas, TX, EUA) 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 e lida em leitora de ELISA (VersaMax™, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) a 492 nm. Os resultados foram expressos em densidade óptica (DO).

3.13. Normas de biossegurança

Todos os procedimentos, incluindo coleta e manuseio de materiais biológicos e reagentes, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança, como descrito por Chaves-Borges e Mineo (1997).

3.14. Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O método de Kaplan-

Meier foi utilizado para estimar a porcentagem de camundongos sobreviventes em cada ponto após a infecção e as curvas de sobrevivência foram comparadas utilizando os testes do Quiquadrado (χ^2) e *log rank*. Os grupos foram analisados pelo teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni ou pelo teste t não-pareado, quando apropriados. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. *T. gondii* diminui a expressão de 5-LO independente do tratamento com AgSv

Estudos anteriores demonstraram que a infecção por *T. gondii* é capaz de diminuir a produção de LTB₄ (YONG; CHI; HENDERSON, 1994; MAYATEPEK *et al.*, 1999). Assim, o primeiro objetivo deste estudo foi avaliar se o parasito altera a expressão de 5-LO e BLT-1 no intestino delgado de animais infectados. Para isso, camundongos C57BL/6 e BALB/c, bem como seus respectivos congênicos, C57BKs/J e CB10-H2, foram infectados e a expressão de mRNA de 5-LO e BLT-1 mensurada no intestino delgado aos 7 dias de infecção.

Foi observado que a infecção por *T. gondii* diminuiu a expressão de 5-LO (Figura 2A) e BLT-1 (Figura 2B) tanto em camundongos susceptíveis C57BL/6 quanto em camundongos resistentes BALB/c. Essa diminuição dos níveis de mRNA para 5-LO e BLT-1 foi independente do haplotipo do MHC, uma vez que tal fenômeno também foi observado em camundongos congênicos C57BKs/J e CB10-H2 infectados (Figura 2A, 2B). Estes dados indicam que *T. gondii* interfere na via de 5-LO no intestino delgado, independente do *background* genético ou do haplotipo do MHC dos camundongos.

Com base nos resultados obtidos, teve-se como objetivo verificar o efeito do aumento da expressão da enzima durante a infecção por *T. gondii*. Os experimentos então, foram realizados com camundongos C57BL/6, já que essa linhagem apresenta maior susceptibilidade à toxoplasmose. Para induzir a expressão de 5-LO, os camundongos foram tratados com AgSv durante seis dias consecutivos.

Inicialmente, verificou-se que camundongos não infectados (NI) tratados com AgSv apresentaram maiores níveis de mRNA para 5-LO quando comparados com camundongos NI tratados apenas com PBS (Figura 2C), demonstrando que o tratamento com AgSv é capaz de induzir a expressão da enzima no intestino delgado. Contudo, quando os animais foram infectados com *T. gondii*, a expressão da enzima foi reduzida tanto nos camundongos tratados com AgSv quanto naqueles tratados apenas com PBS (Figura 2C). Esses dados sugerem que, ainda que AgSv induza a expressão de 5-LO, a infecção por *T. gondii* é capaz de diminuir os níveis da enzima no intestino delgado de camundongos infectados.

Em seguida, a fim de avaliar o efeito do bloqueio da via da 5-LO na expressão de mRNA de 5-LO e BLT1 no intestino delgado durante a toxoplasmose, camundongos C57BL/6 foram tratados com MK886, um inibidor da via da enzima. Observou-se que os camundongos infectados apresentaram níveis menores de mRNA para 5-LO e que essa diminuição foi ainda mais acentuada nos camundongos tratados com MK886 (Figura 2D). Além disso, a infecção por *T. gondii* diminui a expressão de BLT-1 independentemente do tratamento com MK886 (Figura 2E). Esses resultados indicam que o tratamento com MK886 foi capaz de diminuir a expressão de 5-LO no intestino delgado de camundongos infectados com *T. gondii*.

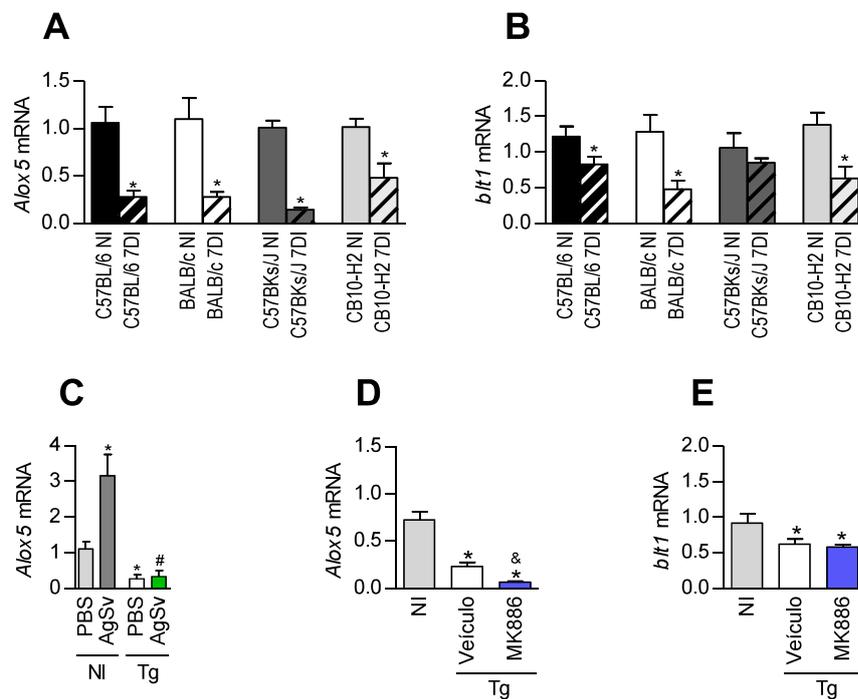


Figura 2. *T. gondii* diminui a expressão de 5-LO no intestino delgado independente do tratamento com AgSv. Camundongos C57BL/6 e BALB/c e seus congênicos, C57BKs/J e CB10-H2, respectivamente, foram infectados com 5 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*. No dia 7 após a infecção, o RNA do íleo foi extraído e os níveis de mRNA para 5-LO (A) e BLT-1 (B) foram mensurados por qPCR. (C) Níveis de mRNA para 5-LO no íleo de camundongos C57BL/6 tratados com AgSv (100 µg/camundongo/dia) ou PBS durante 3 dias, infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e tratados por mais 3 dias consecutivos e eutanasiados aos 7 dias após a infecção. Expressão de 5-LO (D) e BLT-1 (E) no íleo de camundongos C57BL/6 infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e tratados diariamente apenas com o veículo (etanol 20%) ou com MK886 (5mg/kg/dia). No 7º dia após a infecção, os níveis de mRNA para 5-LO ou BLT-1 foram mensurados no íleo por meio de qPCR. Os dados mostrados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de 6 animais por grupo experimental. NI: não infectados. Tg: infectados. * P < 0,05 comparado aos camundongos NI ou PBS NI. [#] P < 0,05 comparado aos camundongos AgSv NI. & P < 0,05 comparado aos camundongos Veículo Tg.

4.2. O tratamento com AgSv diminui o parasitismo no intestino delgado e pulmão durante a fase aguda da infecção por *T. gondii*

Ainda que a infecção por *T. gondii* seja capaz de diminuir a expressão de 5-LO mesmo diante do tratamento com AgSv, os efeitos desse tratamento durante a toxoplasmose experimental foram investigados. Primeiramente, verificou-se os efeitos de AgSv em relação aos parâmetros clínicos e sobrevivência de camundongos C57BL/6. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com AgSv não alterou a perda de peso (Figura 3A) ou o escore de morbidade (Figura 3B) observados durante a infecção por *T. gondii*. De forma interessante, o tratamento com AgSv tende a aumentar a sobrevivência dos animais infectados (Figura 3C), embora não seja estatisticamente significativa.

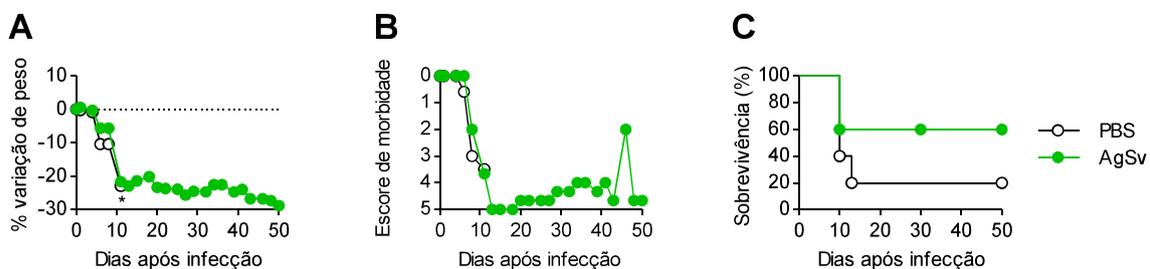


Figura 3. O tratamento com AgSv não altera os parâmetros clínicos de camundongos infectados com *T. gondii*. Camundongos C57BL/6 tratados com PBS ou AgSv (100 µg/camundongo/dia) durante 3 dias, infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e tratados por mais 3 dias consecutivos e observados quanto à variação de peso corporal (A), escore de morbidade (B) e sobrevivência (C) até o dia 50 após a infecção. * P < 0.05 comparado aos camundongos tratados com PBS.

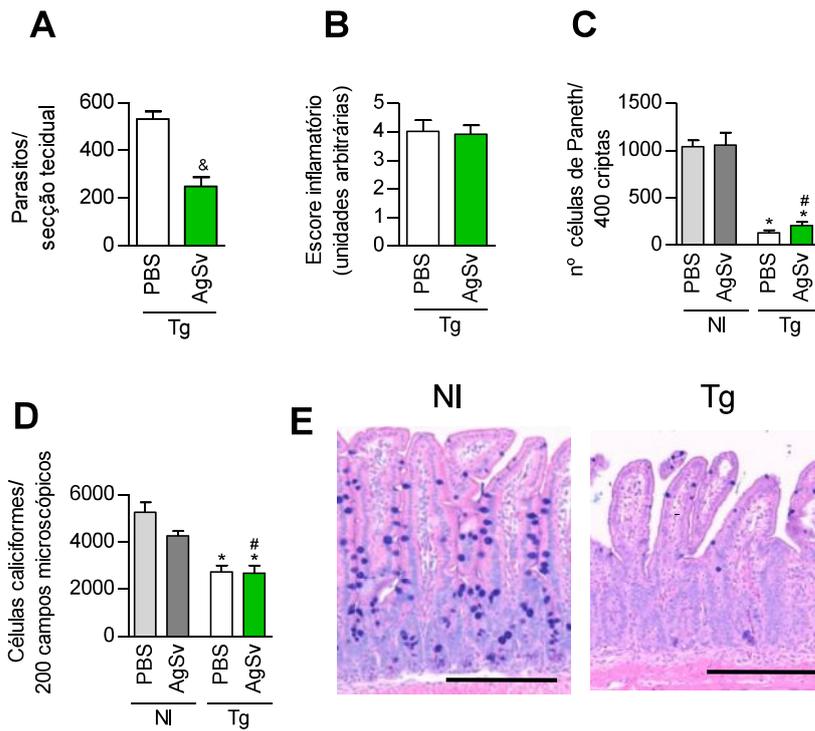
Posteriormente, foi avaliado se o tratamento com AgSv seria capaz de interferir na intensidade do parasitismo por *T. gondii*. Para isso, camundongos C57BL/6 infectados foram tratados com o antígeno e eutanasiados aos 7 dias de infecção. Com relação ao intestino delgado, o tratamento com AgSv diminuiu o parasitismo tecidual nesse órgão (Figura 4A). Entretanto, as alterações histológicas dos animais tratados foram similares aos dos animais tratados apenas com PBS (Figura 4B).

Ainda, uma vez que as células caliciformes e de Paneth são importantes para manutenção da homeostase intestinal (revisado em KURASHIMA; KIYONO, 2017), ambos os tipos celulares foram quantificados. Foi observado que a infecção por *T. gondii* diminuiu o número de células de Paneth (Figura 4C) e células caliciformes (Figura 4D, 4E), porém, o tratamento com AgSv não interferiu no número dessas células.

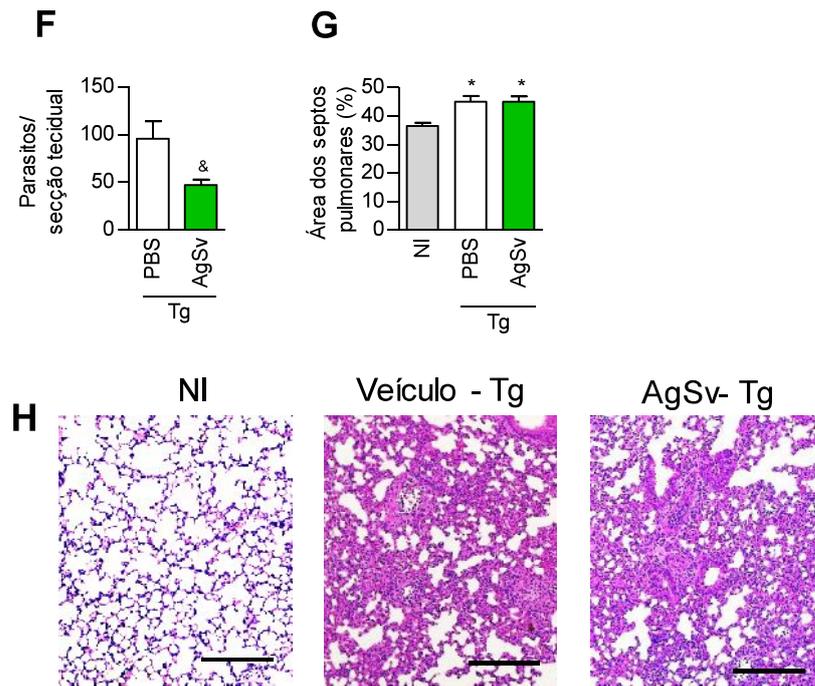
T. gondii possui a capacidade de migrar através da barreira epitelial intestinal e infectar diferentes tipos celulares, disseminando para vários órgãos, tais como pulmão, fígado, rins, cérebro e tecido muscular (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ARAUJO *et al.*, 2013). Assim,

os efeitos do tratamento com AgSv no pulmão e fígado dos camundongos infectados foram avaliados aos 7 dias de infecção. Semelhante aos dados obtidos no intestino delgado, a carga parasitária encontrada no pulmão dos animais tratados com AgSv foi menor quando comparada aos animais tratados com PBS (Figura 4F). Entretanto, foi observada infiltração de células inflamatórias mononucleadas nos septos alveolares dos animais infectados independente do tratamento com AgSv (Figura 4H), em paralelo foi observado um aumento da área dos septos alveolares, em ambos os grupos de camundongos infectados, tratados com PBS ou AgSv (Figura 4G). No fígado, o tratamento com o antígeno não alterou o parasitismo tecidual (Figura 4I). A infecção por *T. gondii* aumentou os níveis séricos de TGP, um indicativo de danos hepáticos, e tais níveis não foram modificados por meio do tratamento com AgSv (Figura 4J). Sendo assim, os resultados sugerem que o tratamento AgSv é capaz de controlar a replicação de *T. gondii* durante a fase aguda em importantes sítios de infecção, como intestino delgado e pulmão.

Intestino delgado



Pulmão



Fígado

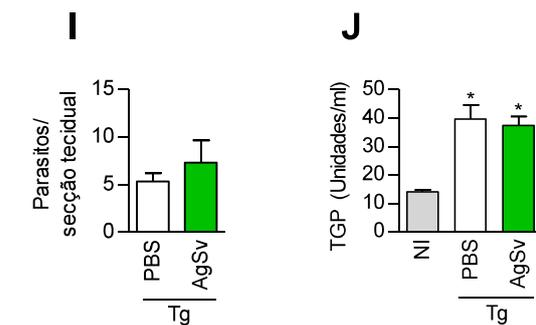


Figura 4. O tratamento com AgSv diminui o parasitismo no intestino delgado e pulmão durante a fase aguda da infecção por *T. gondii*. Camundongos C57BL/6 foram tratados com PBS ou AgSv (100 µg/camundongo/dia) durante 3 dias, infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*, tratados por mais 3 dias consecutivos e eutanasiados aos 7 dias de infecção. Secções teciduais de intestino delgado (A-E) foram submetidas à reação de imuno-histoquímica para detecção do parasitismo tecidual (A), à coloração de H&E para obtenção do escore inflamatório intestinal (B) e quantificação das células de Paneth (C). Quantificação (D) e fotomicrografias representativas (E) de células caliciformes em secções teciduais de intestino delgado submetidas à coloração de Alcian blue. Barras representam 200 µm. Secções teciduais de pulmão (F-H) foram submetidas à reação de imuno-histoquímica para detecção do parasitismo tecidual (F), à coloração de H&E para avaliação quantitativa (G) e obtenção das fotomicrografias representativas (H) e do espessamento dos septos pulmonares. Barras representam 200 µm. No fígado (I, J), o parasitismo tecidual foi detectado em secções teciduais submetidas à reação de imuno-histoquímica (I) e os níveis séricos de TGP (J) foram mensurados como um indicativo de dano hepático.

4.3. O tratamento com AgSv diminui os níveis de citocinas relacionadas à inflamação durante a infecção por *T. gondii*

Para verificar se o tratamento com AgSv altera a produção de citocinas durante a fase aguda da infecção por *T. gondii*, os níveis de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17, IL-10 e IL-4 foram mensuradas em amostras de soro e de homogenato intestinal coletadas aos 7 dias de infecção. Com relação a produção sistêmica de citocinas mensurada no soro, foi observado que a infecção por *T. gondii* aumentou os níveis de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF e IL-10 (Figura 5A). Porém, os níveis de IL-6, IFN- γ e TNF foram menores naqueles camundongos tratados com AgSv quando comparados com camundongos tratados apenas com PBS (Figura 5A). A produção de IL-17 não foi alterada durante a infecção, e o tratamento com AgSv aumentou os níveis séricos de IL-4, embora esse aumento não tenha sido estatisticamente significativo (Figura 5A).

Semelhante ao perfil sistêmico de citocinas, no intestino delgado houve um aumento dos níveis de IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF decorrente da infecção por *T. gondii*, enquanto que os níveis de IL-10 e IL-17 não foram alterados (Figura 5B). De forma interessante, neste importante sítio de infecção os níveis de IL-6, IFN- γ e TNF foram menores nos camundongos infectados tratados com AgSv (Figura 5B). Além disso, embora não tenha sido estatisticamente significativo, os níveis de IL-4 de camundongos infectados tratados com AgSv foram similares aos dos animais não infectados (Figura 5B).

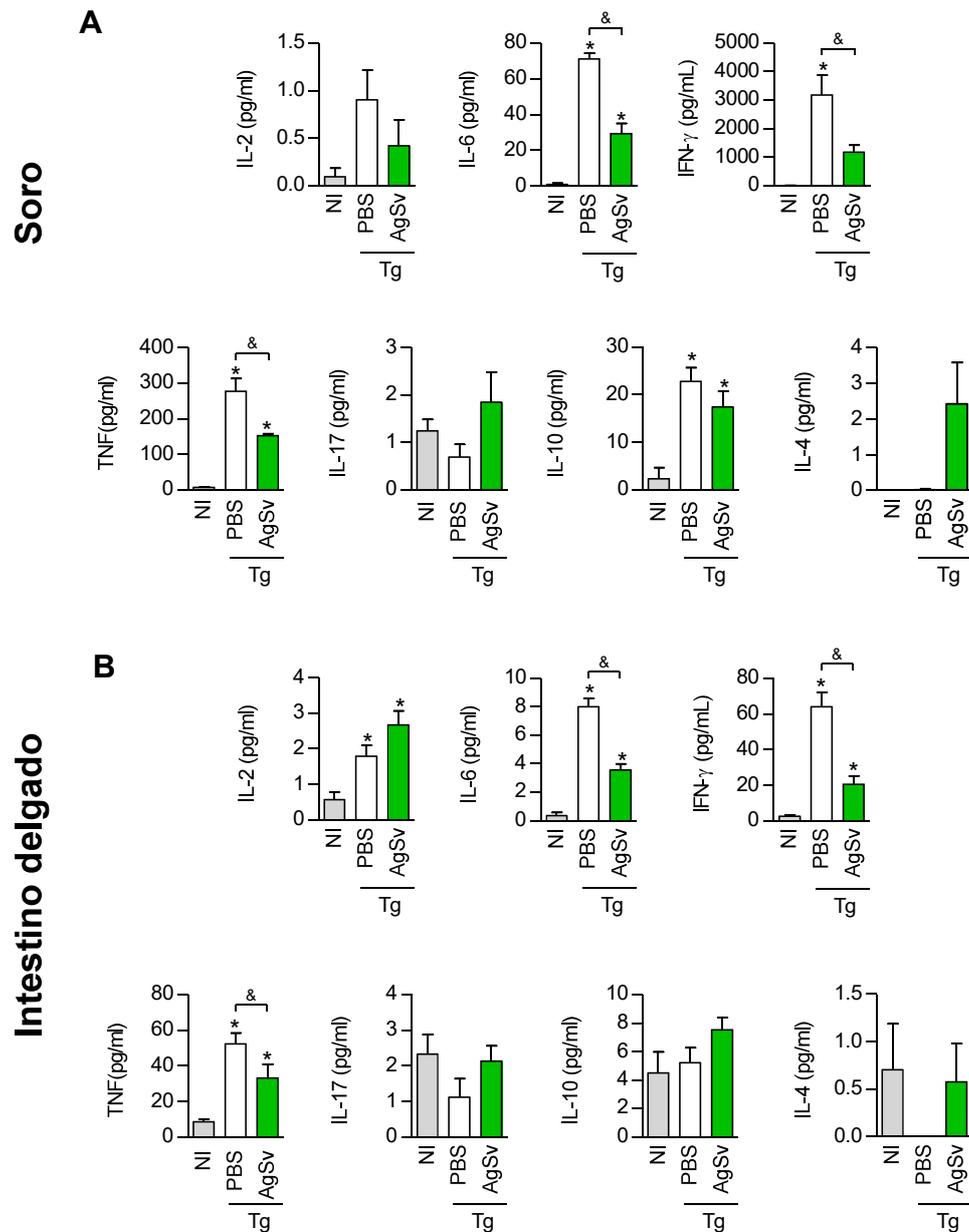


Figura 5. AgSv diminui a produção de citocinas durante a infecção por *T. gondii*. A produção de citocinas foi quantificada no soro (A) e no intestino delgado (B) de camundongos C57BL/6 tratados com PBS ou AgSv (100 μ g/camundongo/dia) durante 3 dias, infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e tratados por mais 3 dias consecutivos. Os níveis de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17, IL-10 e IL-4 foram mensurados por meio de um kit de citocinas CBA™. Os dados mostrados representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de 6 animais por grupo experimental. NI: não infectados. Tg: infectados. * $P < 0,05$ comparado aos camundongos NI. & $P < 0,05$ comparado aos camundongos PBS Tg.

4.4. O tratamento com MK886 ou LTB₄ não altera os parâmetros clínicos ou a sobrevivência de camundongos infectados

Mesmo que a infecção por *T. gondii* seja capaz de diminuir a expressão de 5-LO (Figura 2), os resultados anteriores demonstraram que MK886 é capaz de reduzir ainda mais a expressão dessa enzima no intestino delgado de camundongos infectados (Figura 2D). Embora o tratamento com AgSv induza a expressão de 5-LO, a infecção com *T. gondii* é capaz de diminuir os níveis de mRNA da enzima, mesmo em camundongos tratados (Figura 2C). Assim, com a finalidade de simular uma alta atividade de 5-LO, camundongos C57BL/6 foram tratados com LTB₄, um subproduto da via da enzima.

Desta forma, a influência da diminuição ou do aumento da atividade de 5-LO por meio do tratamento com MK886 ou com LTB₄, respectivamente, foi investigada em camundongos C57BL/6 infectados. Primeiramente, avaliou-se a variação de peso corporal, o escore de morbidade e a sobrevivência dos camundongos infectados e submetidos aos tratamentos. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com MK886 ou LTB₄ não alteraram a perda de peso decorrente da infecção por *T. gondii* (Figura 6A). Embora os camundongos tratados com MK886 apresentaram escores de morbidade menores entre os dias 18 e 32 de infecção (Figura 6B), a sobrevivência desse grupo foi similar ao grupo tratado com LTB₄ ou apenas com o veículo (Figura 6C). Coletivamente, esses resultados sugerem que a inibição farmacológica da via de 5-LO ou altos níveis sistêmicos de LTB₄ não alteram a sobrevivência e morbidade de camundongos infectados com *T. gondii*.

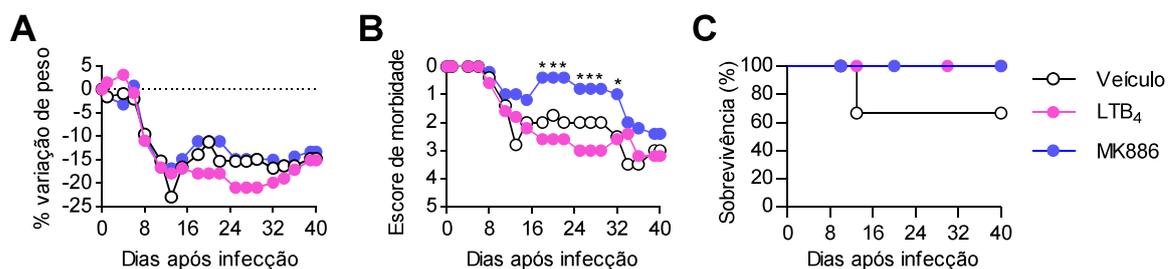


Figura 6. O tratamento com MK886 ou LTB₄ não altera a sobrevivência de camundongos C57BL/6 durante a infecção por *T. gondii*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e foram tratados com veículo (etanol 20%), MK886 (5mg/kg/dia) ou LTB₄ (1 µg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. Os camundongos foram observados diariamente quanto à variação de peso corporal (A), escore de morbidade (B) e sobrevivência (C) durante 40 dias após a infecção. * P < 0.05 comparado aos camundongos tratados com veículo ou LTB₄.

4.5. LTB₄ diminui o parasitismo no intestino delgado durante a infecção por *T. gondii*

Para avaliar a participação da via de 5-LO no intestino delgado durante a infecção oral por *T. gondii*, camundongos C57BL/6 tratados com MK886 e LTB₄ e infectados foram eutanasiados aos 7 dias de infecção.

Quando os camundongos foram tratados com MK886, apresentaram maior quantidade de parasitos no intestino delgado que aqueles tratados apenas com o veículo (Figura 7A). O efeito oposto foi observado em relação ao LTB₄, uma vez que a suplementação exógena desse leucotrieno foi capaz de diminuir a carga parasitária no intestino delgado (Figura 7A).

As alterações histológicas no intestino delgado também foram avaliadas, visto que a infecção oral por *T. gondii* induz inflamação intestinal mesmo quando os animais são infectados com baixa carga parasitária. Como já esperado em uma infecção oral com 10 cistos de *T. gondii*, foi observado que o intestino delgado dos camundongos infectados apresentou, em algumas áreas, um intenso infiltrado inflamatório na lâmina própria, epitélio e submucosa (Figura 7B, 7D). Entretanto, essas alterações histológicas foram observadas em todos os camundongos infectados, independente do tratamento com veículo, MK886 ou LTB₄ (Figura 7B, 7D).

Além disso, a quantificação das células caliciformes no intestino delgado demonstrou que, embora a infecção por *T. gondii* induza uma redução nesse tipo celular, essa não é alterada pelo tratamento com MK886 ou LTB₄ (Figura 7C). Assim, esses resultados indicam que a o bloqueio da via de 5-LO é favorável para a replicação de *T. gondii* e, em contrapartida, a presença de altos níveis de LTB₄ é capaz de controlar a replicação do parasito e os danos histológicos decorrentes da infecção.

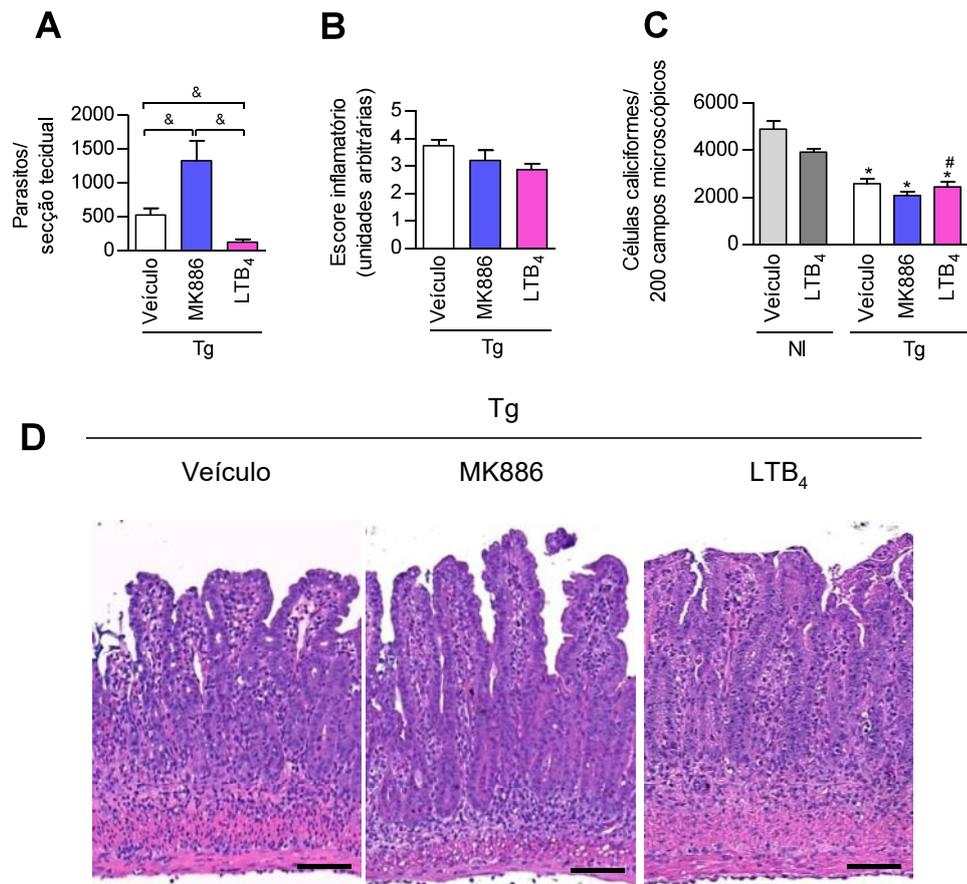


Figura 7. LTB₄ diminui o parasitismo no intestino delgado durante a infecção por *T. gondii*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e foram tratados com veículo (etanol 20%), MK886 (5mg/kg/dia) ou LTB₄ (1 µg/kg/dia) diariamente. Aos 7 dias de infecção, o intestino delgado dos camundongos foi coletado e submetido às análises histológicas. O parasitismo tecidual (A) foi quantificado por imuno-histoquímica. O escore inflamatório intestinal (B) bem como suas fotomicrografias representativas (D) foram obtidos a partir de seções teciduais coradas com H&E. A quantificação das células caliciformes (C) foi realizada em seções teciduais submetidas à coloração de Alcian blue. Barras representam 100 µm. Os dados mostrados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de 6 animais por grupo experimental. NI: não infectados. Tg: infectados. * P < 0.05 comparados aos camundongos Veículo NI. # P < 0.05 comparados aos camundongos LTB₄ NI. & P < 0.05 comparação entre os camundongos Tg.

4.6. A diminuição do número de células de Paneth e da expressão de α-defensina 1 ocasionadas por *T. gondii* é atenuada na presença de altos níveis de LTB₄

As células de Paneth, importantes na homeostase intestinal, são produtoras de diversos peptídeos antimicrobianos (AMPs), como defensinas e lisozimas, importantes na resposta imune a patógenos intestinais (SANTAOLALLA; ABREU, 2012). A fim de verificar se a via de 5-LO teria influência nas células de Paneth e seus AMPs durante a infecção oral por *T. gondii*, foi realizada a quantificação dessas células e mensuração da expressão das α-defensinas 1, 3, 5 e de lisozima no intestino delgado de camundongos infectados e tratados com MK886 ou LTB₄.

A infecção por *T. gondii* diminui o número de células de Paneth no intestino delgado dos camundongos (Figura 8A, 8B). Embora o tratamento com MK886 não alterou essa redução das células de Paneth ocasionada por *T. gondii*, quando os camundongos infectados são tratados com LTB₄, é observado um aumento no número dessas células em relação aos outros grupos infectados (Figura 8A, 8B).

Com relação aos AMPs, LTB₄ é capaz de aumentar a expressão de α -defensinas e lisozima, mesmo que os camundongos estejam saudáveis, como observado no grupo de animais NI e tratados com o leucotrieno (Figura 8C – 8F). Porém, diante da infecção por *T. gondii*, a expressão desses AMPs é reduzida (Figura 8C – 8F). De forma interessante, o tratamento com LTB₄ é capaz de reestabelecer a expressão de α -defensina 1 no intestino delgado durante a infecção (Figura 8C). Embora não seja estatisticamente significativa, efeito semelhante foi observado também nos níveis de mRNA para α -defensina 3. Em conjunto, esses dados sugerem que na presença de altos níveis de LTB₄, *T. gondii* perde parcialmente a capacidade de reduzir a quantidade de células de Paneth e de diminuir a expressão de α -defensina 1.

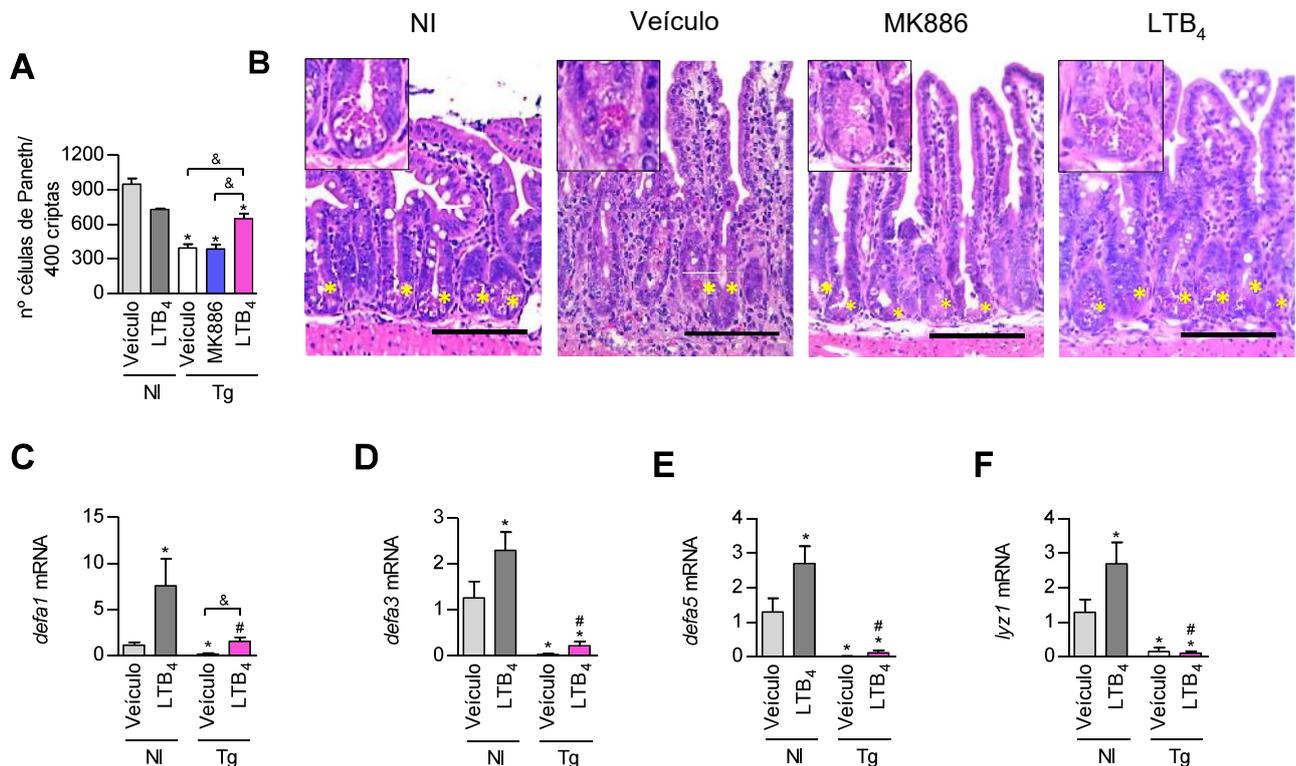


Figura 8. LTB₄ exógeno atenua a diminuição do número de células de Paneth e da expressão de α -defensina 1 no intestino delgado ocasionadas por *T. gondii*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e foram tratados com veículo (etanol 20%), MK886 (5mg/kg/dia) ou LTB₄ (1 μ g/kg/dia) diariamente e eutanasiados aos 7 dias de infecção. Quantificação (A) e fotomicrografias representativas (B) das células de Paneth obtidas a partir de secções teciduais coradas em H&E. Barras representam 100 μ m. Asteriscos indicam criptas intestinais que contem células de Paneth. (C-F) Análise por qPCR da expressão de peptídeos antimicrobianos no íleo de camundongos C57BL/6 tratados ou não com LTB₄. Os dados mostrados representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de 6 animais por grupo experimental. NI: não infectados. Tg: infectados. * P < 0.05 comparados aos camundongos Veículo NI. # P < 0.05 comparados aos camundongos LTB₄ NI. & P < 0.05 comparação entre os camundongos Tg.

4.7. LTB₄ aumenta a quantidade de IgA específica no lúmen intestinal

A IgA secretada nas superfícies mucosas é um mecanismo de proteção importante do sistema imune, impedindo que microrganismos ultrapassem essas superfícies (revisado em LAMM, 1997). Assim, os níveis de IgA anti-*T. gondii* e anti-*E. coli* foram avaliados nas fezes de camundongos aos 7 dias da infecção com *T. gondii* e tratamento com MK886 ou LTB₄.

Embora a infecção por *T. gondii* parece induzir a produção de IgA anti-*T. gondii* e anti-*E. coli* (Figura 9), verificou-se que quando os animais infectados são submetidos ao tratamento com LTB₄, esses apresentam níveis maiores de IgA específica para *T. gondii* (Figura 9A) ou *E. coli* (Figura 9B) que os demais grupos infectados. Assim, altos níveis sistêmicos de LTB₄ favorece a produção de IgA específica no lúmen intestinal durante a infecção por *T. gondii*.

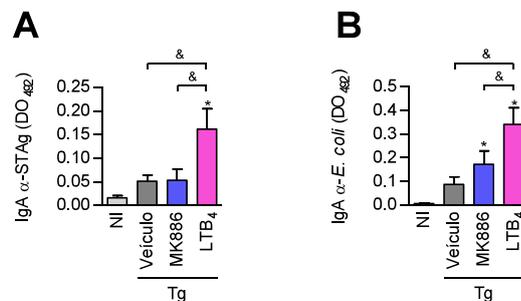


Figura 9. LTB₄ exógeno aumenta a quantidade de IgA específica no lúmen intestinal. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e foram tratados com veículo (etanol 20%), MK886 (5mg/kg/dia) ou LTB₄ (1 μ g/kg/dia) diariamente e as fezes dos animais coletadas aos 7 dias de infecção. Quantificação por ELISA de IgA anti-STAg (A) e anti-*E. coli* (B) solúvel no conteúdo intestinal. Os dados mostrados representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de 6 animais por grupo experimental. NI: não infectados. Tg: infectados. * P < 0.05 comparados aos camundongos Veículo NI. & P < 0.05 comparação entre os camundongos Tg.

4.8. A inibição da via de 5-LO diminui a produção de IL-6, IFN- γ e TNF no intestino delgado de camundongos infectados com *T. gondii*

Com o objetivo de avaliar se a inibição da via de 5-LO ou altos níveis de LTB₄ afetaria a produção de citocinas envolvidas no controle de *T. gondii*, essas foram mensuradas em amostras de soro e de homogenato intestinal de camundongos infectados e tratados com MK886 ou LTB₄.

Nas amostras de soro, foi observado que a infecção por *T. gondii* aumentou os níveis de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF e IL-10 (Figura 10A), independente do tratamento com MK886 ou LTB₄. Com relação a produção sistêmica de IL-17, esta não foi alterada pela infecção (Figura 10A).

No intestino delgado, embora o parasito induza a produção de IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF (Figura 10B), os camundongos tratados com MK886 apresentaram níveis menores de IL-6, IFN- γ e TNF quando comparados aos demais grupos infectados (Figura 10B). Além disso, a produção de IL-17 e IL-10 no intestino delgado foi similar, independente da infecção por *T. gondii* (Figura 10B). Desta forma, esses dados sugerem que a inibição da via de 5-LO leva a uma diminuição na produção de IL-6, IFN- γ e TNF no intestino delgado durante a infecção por *T. gondii*.

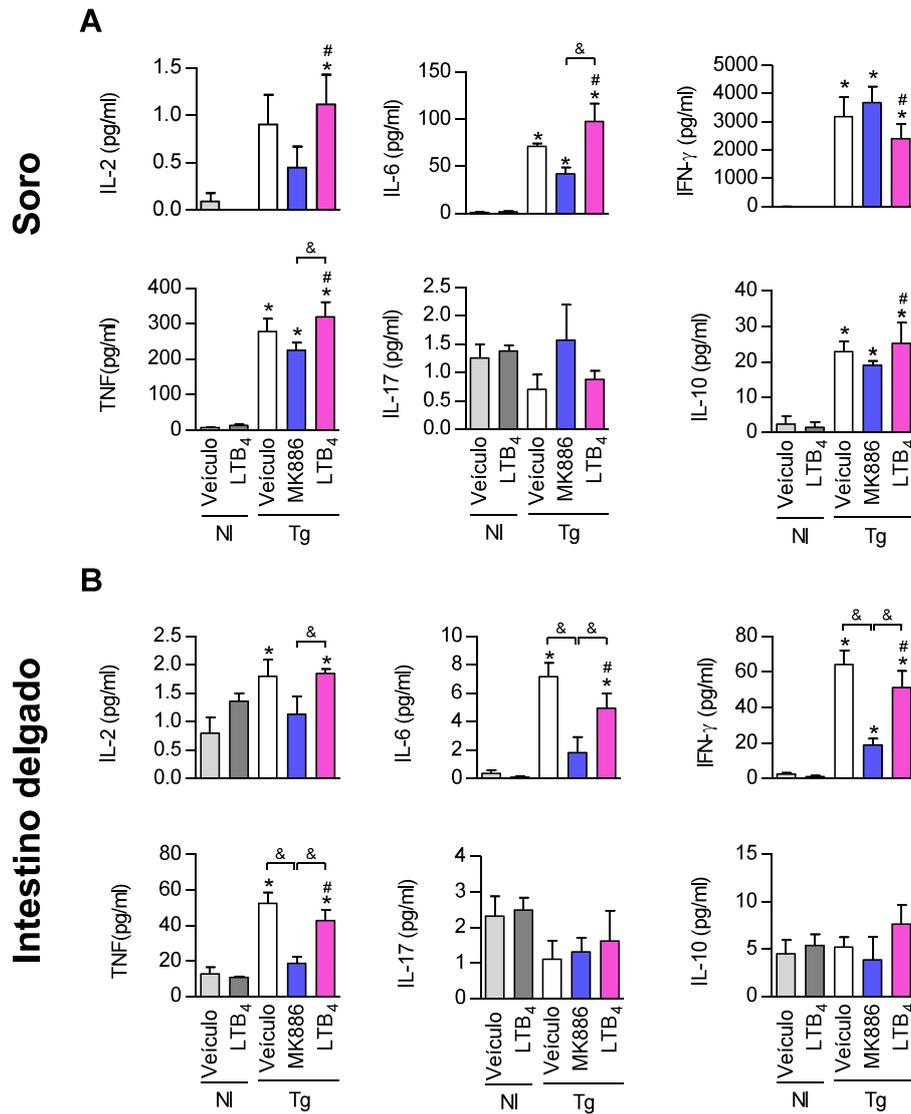


Figura 10. A inibição da via de 5-LO diminui a produção de citocinas durante a infecção por *T. gondii*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e foram tratados com veículo (etanol 20%), MK886 (5mg/kg/dia) ou LTB₄ (1 μ g/kg/dia) diariamente e eutanasiados aos 7 dias de infecção. Os níveis de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17 e IL-10 foram mensurados no soro (A) e intestino delgado (B) por meio de um kit de citocinas CBA™. Os dados mostrados representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de 6 animais por grupo experimental. NI: não infectados. Tg: infectados. * P < 0,05 comparado aos camundongos NI. # P < 0,05 comparados aos camundongos LTB₄ NI. & P < 0,05 comparação entre os camundongos Tg.

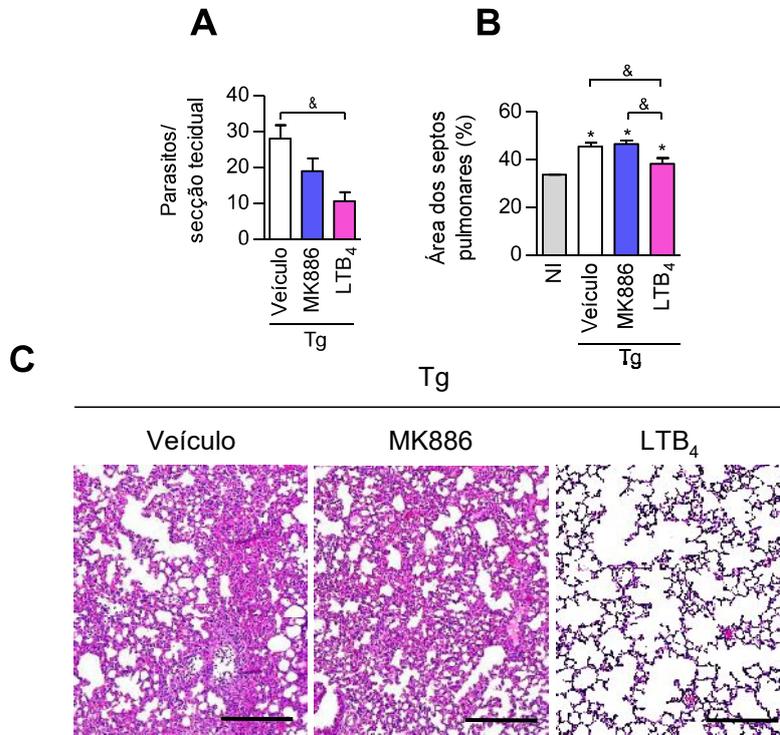
4.9. LTB₄ diminui a inflamação e o parasitismo no pulmão e fígado durante a infecção por *T. gondii*

Com a finalidade de avaliar os efeitos da inibição da via de 5-LO ou suplementação sistêmica de LTB₄ em outros órgãos durante a fase aguda da infecção por *T. gondii*, o pulmão e o fígado dos animais infectados foram analisados aos 7 dias de infecção.

No pulmão dos animais infectados, foi observado que o tratamento com MK886 não alterou o parasitismo tecidual (Figura 11A). A infecção por *T. gondii* aumentou a área dos septos alveolares (Figura 11B, 11C). Contudo, os animais tratados com LTB₄ apresentaram menor carga parasitária (Figura 11A) e uma redução da área dos septos alveolares (Figura 11B, 11C) quando comparados aos demais grupos infectados, indicando uma menor inflamação tecidual nesse órgão.

De forma semelhante, os animais tratados com LTB₄ apresentaram menor replicação de *T. gondii* (Figura 11D) bem como menor número de focos inflamatórios (Figura 11E, 11G) no fígado que os demais grupos infectados. Ainda, a mensuração de TGP no soro dos camundongos demonstrou que a infecção por *T. gondii* aumenta os níveis séricos dessa enzima (Figura 11F), sendo que dentre os animais infectados, os níveis mais altos foram detectados no soro daqueles tratados com MK886 (Figura 11F). Esses resultados sugerem que o efeito benéfico da presença de altos níveis de LTB₄ não está restrito ao intestino delgado, uma vez que a replicação de *T. gondii* e os danos histológicos no pulmão e no fígado são menores nos camundongos tratados com o leucotrieno.

Pulmão



Fígado

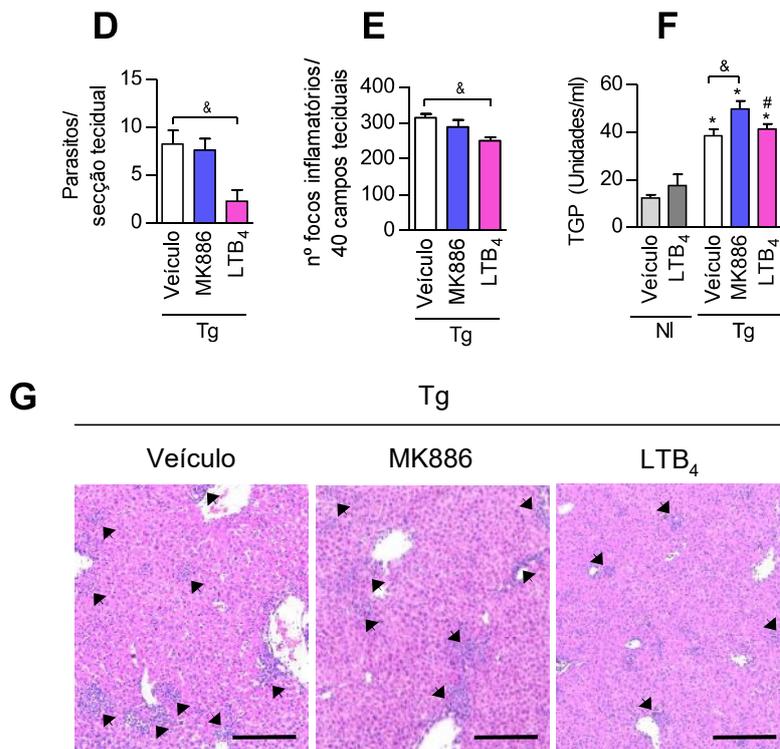


Figura 11. LTB₄ exógeno diminui a inflamação e o parasitismo no pulmão e fígado durante a infecção por *T. gondii*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e foram tratados diariamente com veículo (etanol 20%), MK886 (5mg/kg/dia) ou LTB₄ (1 µg/kg/dia) e eutanasiados aos 7 dias de infecção. Secções teciduais de pulmão (A-C) foram submetidas à reação de imuno-histoquímica para detecção do parasitismo tecidual (A), à coloração de H&E para avaliação quantitativa (B) e obtenção das fotomicrografias representativas (C) do espessamento dos septos pulmonares. Barras representam 200 µm. No fígado (D-G), o parasitismo tecidual foi detectado em secções teciduais submetidas à reação de imuno-histoquímica (I), à coloração de H&E para avaliação quantitativa (E) e obtenção das fotomicrografias representativas (G) dos escores inflamatórios. Setas indicam focos inflamatórios. Barras representam 200 µm. (F) Os níveis séricos de TGP foram mensurados como um indicativo de dano hepático. Os dados mostrados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de 6 animais por grupo experimental. NI: não infectados. Tg: infectados. * P < 0,05 comparado aos camundongos NI. # P < 0.05 comparados aos camundongos LTB₄ NI. & P < 0.05 comparação entre os camundongos Tg.

5. DISCUSSÃO

A enzima 5-LO e seus metabólitos participam da resposta imune durante diferentes processos inflamatórios e doenças infecciosas. No presente estudo, teve-se como objetivo avaliar a participação de 5-LO no intestino delgado durante a infecção oral por *T. gondii*. Já havia sido previamente demonstrado que outros patógenos intracelulares, como *H. capsulatum* (SECATTO *et al.*, 2012) ou *S. pyogenes* (SOARES *et al.*, 2013) são capazes de induzir a produção de LTB₄, um subproduto da via de 5-LO, e camundongos geneticamente deficientes para essa enzima são mais susceptíveis a infecção por esses microrganismos (SECATTO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013). Outro trabalho mostrou que *Brucella abortus* também induz uma alta expressão de 5-LO e a produção de LTB₄ e, por outro lado, camundongos 5-LO^{-/-} são mais resistentes à essa infecção (FAHEL *et al.*, 2015). Além disso, *Plasmodium berghei* ANKA aumenta a expressão de 5-LO no cérebro de camundongos susceptíveis C57BL/6 e a expressão da enzima não é detectada no cérebro de camundongos resistentes BALB/c infectados (BORGES *et al.*, 2017).

Com relação a *T. gondii*, estudos anteriores demonstraram que, em macrófagos humanos, formas viáveis do parasito inibem a liberação de LTB₄ induzida por ionóforo de cálcio e que LTB₄ exógeno é capaz de controlar a replicação de *T. gondii* nessas células (YONG; CHI; HENDERSON, 1994). Um outro estudo mostrou que os níveis de LTB₄ no líquido cefalorraquidiano de pacientes HIV positivos com encefalite toxoplásmica apresentam-se abaixo do limite de detecção (MAYATEPEK *et al.*, 1999). Com base nesses dados da literatura, neste trabalho, primeiramente, foi avaliada a expressão de 5-LO no intestino delgado durante a infecção por *T. gondii* em camundongos C57BL/6 e BALB/c, os quais são susceptíveis ou resistentes à toxoplasmose, respectivamente (SUZUKI; YANG; REMINGTON, 1995), e seus congênicos. Os resultados demonstraram que a infecção por *T. gondii* diminui a expressão de 5-LO e BLT-1 no intestino delgado dos camundongos C57BL/6

ou BALB/c infectados e suas referentes linhagens congênicas, sugerindo que a infecção por esse parasito diminui a produção de LTB₄ nesse órgão, independente do *background* genético ou do haplotipo do MHC. Uma vez que a infecção por *T. gondii* diminui os níveis de mRNA para 5-LO, o próximo objetivo deste estudo foi investigar o efeito da indução de 5-LO em camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*.

Baseado em estudos anteriores que mostraram que os leucotrienos desempenham papel importante na infecção por *S. venezuelensis* (MACHADO *et al.*, 2005), levantou-se a hipótese que o extrato do antígeno de *S. venezuelensis* – AgSv poderia induzir a expressão de 5-LO. De fato, os camundongos não infectados tratados com AgSv apresentaram níveis maiores de mRNA para 5-LO no intestino delgado do que os animais tratados apenas com PBS. Contudo, mesmo os camundongos sendo submetidos ao tratamento com AgSv, a infecção por *T. gondii* reduz a expressão de 5-LO. Ainda assim, o tratamento com AgSv tem um papel benéfico para os camundongos durante a toxoplasmose experimental, visto que os animais tratados com esse antígeno apresentavam menor carga parasitária no intestino delgado e pulmão. Além disso, o tratamento com AgSv diminuiu a produção de IL-6, IFN- γ e TNF durante a infecção por *T. gondii*. Ainda, o tratamento com AgSv apresentou uma tendência em aumentar os níveis de IL-4 no soro dos camundongos infectados em relação aos camundongos infectados tratados com PBS. Estudos anteriores demonstraram que IL-4 é uma citocina importante envolvida no controle da infecção por *T. gondii*, uma vez que camundongos *knockout* para IL-4 (IL-4^{-/-}) são mais susceptíveis à infecção oral com a cepa ME49 que os animais controles, apresentando maiores alterações inflamatórias e replicação do parasito (SUZUKI *et al.*, 1996). Durante a infecção por *S. venezuelensis*, é observada uma produção de citocinas do tipo Th2, tais como IL-3, IL-4 e IL-5 (MACHADO *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2011) e esse helminto induz uma discreta produção de IFN- γ e TNF (MACHADO *et al.*, 2005). Estudos anteriores mostraram que a infecção por *Strongyloides stercoralis* modula o perfil sistêmico de citocinas, uma vez que pacientes infectados apresentam baixos níveis séricos de IFN- γ , TNF e IL-1 β , enquanto os níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-27 e IL-37 são aumentados (ANURADHA *et al.*, 2015) e que *Strongyloides ratti* é capaz de produzir uma proteína semelhante ao fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), o qual tem a capacidade de aumentar a produção de IL-10, mas não de TNF, em macrófagos (YOUNIS *et al.*, 2012). Os dados obtidos na presente investigação demonstram que AgSv é capaz de modular a produção de citocinas durante a infecção por *T. gondii*, corroborando com trabalhos anteriores que demonstram a capacidade desse helminto em alterar o perfil sistêmico

de citocinas. Já foi previamente mostrado que IL-6, IFN- γ e TNF, são citocinas importantes para diminuição da replicação de *T. gondii* durante a infecção (JEBBARI *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*, 1997; SUZUKI *et al.*, 1988; DECKERT-SCHLUTER *et al.*, 1995; DECKERT-SCHLUTER *et al.*, 1998). Apesar de AgSv diminuir a produção de IFN- γ , TNF e IL-6 em relação aos animais infectados e não tratados, os animais tratados apresentaram menor parasitismo, portanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos protetores de AgSv durante a toxoplasmose experimental.

Anteriormente, foi demonstrado que camundongos 5-LO^{-/-} são mais susceptíveis a infecção por *T. gondii* do que os seus controles (B6, 129S F2/J ou 129/SvEv Tac) quando infectados com 20 ou 100 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* por via intraperitoneal ou oral, respectivamente (ALIBERTI; SERHAN; SHER, 2002; BENEVIDES *et al.*, 2013). Além disso, os camundongos 5-LO^{-/-} (*background* B6, 129S F2/J) apresentam menor carga parasitária e um aumento de infiltração de leucócitos no cérebro (ALIBERTI; SERHAN; SHER, 2002). De forma contrária, nossos resultados mostraram que a inibição farmacológica da via de 5-LO por meio do tratamento com MK886 aumentou o parasitismo no intestino delgado e induziu alterações histopatológicas nesse órgão similares àquelas presentes nos camundongos infectados tratados apenas com o veículo. A discrepância dos resultados observados comparados ao de Aliberti e colaboradores (2002) pode ser explicada pelas diferenças nas condições experimentais entre as duas investigações. Embora a cepa ME49 tenha sido utilizada em ambos os estudos, a via de infecção, os órgãos analisados, a fase da infecção assim como as linhagens de camundongos utilizadas foram diferentes. Os camundongos C57BL/6 são susceptíveis à proliferação do parasito e à inflamação intestinal durante a toxoplasmose experimental. Ainda, camundongos 129/SvEvTac são mais resistentes à infecção oral pela cepa ME49 de *T. gondii* quando comparados aos C57BL/6, mesmo quando infectados com alta carga parasitária (BENEVIDES *et al.*, 2013). Ressaltando essa diferença entre essas linhagens de camundongos, outro trabalho demonstrou que macrófagos peritoneais de camundongos 129/Sv apresentam maior expressão de 5-LO do que camundongos C57BL/6; e quando essas células são infectadas com *H. capsulatum*, foi detectada uma produção mais alta de LTB₄ nos camundongos resistentes 129/Sv do que nos susceptíveis C57BL/6 (SECATTO *et al.*, 2014).

Semelhantes aos nossos resultados obtidos durante o tratamento com MK886, a administração do inibidor da via de 5-LO aumenta a replicação de outros patógenos, tais como *M. tuberculosis* (PERES *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2010), *H. capsulatum* (MEDEIROS *et al.*, 2004) e *S. venezuelensis* (MACHADO *et al.*, 2005) em modelos murinos. De forma semelhante, camundongos 5-LO^{-/-} infectados com *T. cruzi* apresentam um aumento transitório

da parasitemia (PAVANELLI *et al.*, 2010; PANIS *et al.*, 2011) e maior carga parasitária durante a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* (SANTOS *et al.*, 2013) ou *Leishmania infantum* (SACRAMENTO *et al.*, 2014). Ainda, esses estudos já demonstraram que a inibição de 5-LO por meio do tratamento com MK886 ou a deleção genética da enzima resultam na diminuição da produção de LTB₄ (MACHADO *et al.*, 2005; PERES *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2004; PAVANELLI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2013). Os resultados aqui apresentados mostraram que quando a biossíntese de LTB₄ é prejudicada, por meio do tratamento com MK886, a proliferação de *T. gondii* é aumentada. De forma interessante, ressaltando a importância de LTB₄ no controle da replicação de *T. gondii*, os camundongos tratados com esse leucotrieno apresentam menor parasitismo tecidual no intestino delgado, pulmão e fígado. Em concordância com os resultados aqui obtidos, o papel benéfico de LTB₄ em controlar a replicação de *T. gondii* e outros parasitos já foi observado. Estudos *in vitro* mostraram que LTB₄ exógeno promove a eliminação intracelular de *T. gondii* por meio da indução de citotoxicidade em taquizoítas (YONG; CHI; HENDERSON, 1994). Estudos prévios também relataram que LTB₄ exógeno reestabelece a fagocitose de *H. capsulatum* opsonizados com IgG por macrófagos peritoneais de camundongos 5-LO^{-/-} (SECATTO *et al.*, 2012), aumenta a atividade antimicrobiana de macrófagos alveolares infectados com *Candida albicans* (MORATO-MARQUES *et al.*, 2011) e *Klebsiella pneumoniae* (SEREZANI *et al.*, 2005), melhora o controle da infecção por *L. amazonensis* *in vitro* e *in vivo* (SEREZANI *et al.*, 2006), aumenta a eliminação de *Streptococcus pneumoniae* no pulmão quando administrado por via intranasal (MANCUSO *et al.*, 2010) e garante maior sobrevivência de camundongos infectados com Citomegalovírus murino (GOSSELIN; BORGEAT; FLAMAND, 2005) ou vírus Influenza (LE BEL; GOSSELIN, 2015).

Além do aumento da proliferação do parasito no intestino delgado, os camundongos tratados com MK886 apresentaram menores níveis de IL-6, IFN- γ e TNF, as quais são importantes para o controle do parasitismo durante a infecção por *T. gondii* (SUZUKI *et al.*, 1988; DECKERT-SCHLUTER *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 1997; DECKERT-SCHLUTER *et al.*, 1998; JEBBARI *et al.*, 1998). Assim, esses resultados sugerem que, pelo menos em parte, o aumento da replicação de *T. gondii* nos camundongos tratados com MK886 poderia estar associado a menor produção dessas citocinas decorrente da diminuição da biossíntese de leucotrienos.

Além disso, no presente trabalho não foi observada nenhuma diferença na produção de IL-10 no intestino delgado, independente do tratamento com MK886 ou LTB₄. Semelhante a esses resultados, durante a infecção por *M. tuberculosis*, camundongos tratados com MK886

apresentam maior crescimento micobacteriano no pulmão associado a baixos níveis de TNF e IFN- γ , enquanto que não há alteração na produção de IL-10 (PERES *et al.*, 2007). Contudo, durante a infecção por *T. cruzi*, apesar dos baixos níveis de TNF e IFN- γ e altos níveis de IL-10 no tecido cardíaco, camundongos 5-LO^{-/-} foram capazes de controlar a carga parasitária (PAVANELLI *et al.*, 2010), sugerindo as consequências da modulação da via de 5-LO é inerente a cada parasito. Mesmo em doenças não parasitárias, utilizando um inibidor específico para 5-LO, Zileuton, foi observado uma redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que camundongos tratados com o inibidor apresentaram menores níveis de IL-1 β , TNF e IL-17 em um modelo de polipose intestinal (GOUNARIS *et al.*, 2015) ou menor produção de TNF em esplenócitos tratados com outro inibidor de 5-LO, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), em um modelo murino de asma (KIM *et al.*, 2008). De forma similar, camundongos 5-LO^{-/-} apresentam menores níveis de TNF em lesões de pele em comparação com os camundongos controles (GUIMARÃES *et al.*, 2017). Embora IFN- γ e TNF sejam citocinas cruciais no controle da toxoplasmose, a produção excessiva das mesmas contribui para o desenvolvimento de lesões intestinais (LIESENFELD *et al.*, 1996). Além disso, essas citocinas estão relacionadas ao desenvolvimento de necrose no íleo de camundongos infectados com *T. gondii* e, a diminuição da ação de TNF confere uma maior sobrevivência aos animais, devido à diminuição da inflamação (LIESENFELD *et al.*, 1999). Sendo assim, a partir dos nossos resultados do perfil de citocinas, esperava-se uma diminuição das alterações histológicas em paralelo com níveis mais baixos de IL-6, IFN- γ e TNF no intestino delgado dos camundongos infectados tratados com MK886 em relação aos animais apenas infectados e não tratados. Porém, as alterações histopatológicas em decorrência da infecção por *T. gondii* não foram alteradas mediante o tratamento com MK886, sugerindo que a diminuição dos níveis dessas citocinas não foram suficientes para melhorar a inflamação nesse órgão.

Em contrapartida, o tratamento com LTB₄ aumenta os níveis de MCP-1 (HUANG *et al.*, 2004), IL-8 (AOKI *et al.*, 1998), IL-1 (ROLA-PLESZCZYNSKI; LEMAIRE, 1985), IL-6 (ROLA-PLESZCZYNSKI; STANKOVÁ, 1992), IL-2, IFN- γ (ROLA-PLESZCZYNSKI; CHAVAILLAZ; LEMAIRE, 1986) e a produção de TNF dependente de IL-2 (STANKOVÁ *et al.*, 1993) *in vitro* por células humanas e aumenta a produção de IFN- β , IL-6 e TNF em camundongos infectados com o vírus Influenza (LE BEL; GOSELIN, 2015). Assim, foi presumido que o tratamento com LTB₄, simulando uma alta atividade da enzima 5-LO, durante a infecção com *T. gondii* aumentaria a produção de citocinas relacionadas à inflamação. Surpreendentemente, os resultados obtidos demonstraram que o LTB₄ exógeno não alterou o

perfil de citocinas durante a infecção por *T. gondii*. Porém, a presença de altos níveis sistêmicos de LTB₄ diminuiu as alterações histopatológicas no pulmão, bem como reduziu o número de focos inflamatórios no fígado dos animais infectados. A diminuição do parasitismo mediada pelo tratamento com LTB₄ poderia ter levado a menores alterações inflamatórias induzidas pela infecção, embora, nas condições experimentais utilizadas neste estudo, os níveis sistêmicos de citocinas induzidas pela carga parasitária não foram alterados.

Além da análise do perfil de citocinas durante a infecção por *T. gondii* e sua relação com a via de 5-LO, outros fatores envolvidos na resposta imune ao parasito também foram avaliados. Assim, no presente estudo foi demonstrado que a infecção por *T. gondii* reduziu o número das células de Paneth, localizadas na porção basal das criptas de Lieberkühn do intestino delgado. Esses dados estão de acordo com trabalhos anteriores, os quais observaram que a infecção por *T. gondii* resulta na depleção das células de Paneth no intestino delgado (RAETZ *et al.*, 2013; VILLERET *et al.*, 2013). De forma interessante, embora a infecção por *T. gondii* reduza a quantidade de células de Paneth no intestino delgado, essa perda é menos significativa quando os camundongos são submetidos ao tratamento com LTB₄.

As células de Paneth são responsáveis pela produção de AMPs, tais como α -defensinas, lisozima, lectinas do tipo C e fosfolipase A2 (revisado em KURASHIMA; KIYONO, 2017). Outro importante efeito observado após a suplementação com LTB₄, foi a sua capacidade em induzir a expressão de AMPs, tais como defensinas 1, 3 e 5 e lisozima no intestino delgado de camundongos não infectados. De forma semelhante, o tratamento *in vivo* com LTB₄ aumenta os níveis plasmáticos de α -defensinas em macacos e o plasma obtido desses animais possui atividade antimicrobiana *ex vivo* e aumenta a liberação de α -defensinas, catepsina G, elastase, lisozima C e catelicidina por leucócitos polimorfonucleares humanos *in vitro* (FLAMAND; TREMBLAY; BERGEAT, 2007). Ainda, neutrófilos humanos tratados com LTB₄ são capazes de liberar catelicidina de maneira dose dependente (GAUDREAU; GOSSSELIN, 2008). Com efeito oposto ao do tratamento com LTB₄, a infecção por *T. gondii* reduziu significativamente a expressão das α -defensinas analisadas e de lisozima no intestino delgado dos camundongos. Outros trabalhos já haviam relatado essa habilidade do parasito em diminuir diversos AMPs produzidos no intestino delgado, tais como lisozima (RAETZ *et al.*, 2013, LÓPEZ-YGLESIAS *et al.*, 2018), α -defensina 1 (RAETZ *et al.*, 2013) e criptidina 2 (BURGER *et al.*, 2018; LÓPEZ-YGLESIAS *et al.*, 2018). Nossos resultados mostraram que o tratamento com LTB₄ aumentou os níveis de mRNA para α -defensina 1 nos camundongos infectados com *T. gondii* em relação aos animais infectados não tratados, sugerindo que parte dos efeitos protetores desse leucotrieno

podem estar envolvidos com a indução desse AMP. A relação entre indução de AMPs por meio de LTB₄ e controle de microrganismos também foi demonstrada durante outras infecções. Camundongos infectados com o vírus Influenza, quando tratados com LTB₄, apresentam uma diminuição na replicação desse vírus por meio de uma regulação positiva da produção de β -defensina 3 e peptídeos semelhantes a catelicidina (GAUDREAULT; GOSSELIN, 2008). Outro estudo comprovou que a melhoria observada na eliminação da bactéria *Achromobacter xylosoxidans* em camundongos tratados com LTB₄ é dependente da atividade de α -defensina 1 (PRADO *et al.*, 2017).

Recentemente, durante a infecção por *T. gondii*, foi demonstrado que o controle dos danos imunopatológicos intensos, como destruição do epitélio intestinal e resposta imune exacerbada contra a microbiota intestinal, é dependente da autofagia basal das células de Paneth, a qual é mantida pela produção de níveis basais de IFN- γ pela microbiota (BURGER *et al.*, 2018). Sendo assim, o fato do tratamento com LTB₄ aumentar o número de células de Paneth e a produção de α -defensina 1 durante a infecção por *T. gondii*, levanta a hipótese de que esses efeitos do leucotrieno poderiam estar relacionados a um menor desequilíbrio da microbiota intestinal. Contudo, estudos posteriores são necessários para avaliação desse mecanismo.

A desregulação da microbiota durante a infecção por *T. gondii* permite a expansão de bactérias Gram-negativas patogênicas, tais como *E. coli*, *Shigella* spp e *Bacteroides/Prevotella* spp (HEIMESAAT *et al.*, 2006; RAETZ *et al.*, 2013). Em estudos anteriores do nosso grupo, foi demonstrado que os altos níveis de IgA anti-*E. coli* estão diretamente associados a menores níveis dessas bactérias na composição da microbiota intestinal durante a infecção por *T. gondii* (BARENCO, 2015). Além disso, outros estudos demonstraram que IgA anti-*E. coli* de alta afinidade é capaz de inibir a proliferação dessa bactéria e, camundongos que não produzem IgA, apresentam maiores lesões patológicas no intestino (OKAI *et al.*, 2016; OKAI *et al.*, 2017). Assim, os efeitos positivos da produção de IgA específica para *E. coli* também foram demonstrados neste estudo, pois, nossos resultados demonstraram que o tratamento com LTB₄ é capaz de aumentar os níveis de IgA específica para *E. coli* no lúmen intestinal e esse tratamento apresentou melhoras em relação ao parasitismo intestinal.

Além disso, os níveis de IgA anti-*T. gondii* no lúmen intestinal também foram aumentados nos camundongos submetidos ao tratamento com LTB₄. Anteriormente, foi demonstrado que camundongos infectados oralmente com *T. gondii* apresentam anticorpos IgA

secretada específicos para o parasito no intestino (McLEOD; MACK, 1986; CHARDES *et al.*, 1990; MINEO *et al.*, 1993). Ainda, a produção de IgA específica para *T. gondii* tem um caráter protetor, uma vez que IgA obtida do leite materno de mulheres com toxoplasmose é capaz de diminuir a replicação *in vitro* de *T. gondii* em enterócitos de ratos (MACK; MCLEOD, 1992). Sendo assim, nossos resultados também sugerem que o tratamento com LTB₄ induz uma maior produção de IgA anti-*T. gondii*, diminuindo os danos ocasionados pela infecção com esse parasito.

Uma vez que as células caliciformes também são importantes para a homeostase intestinal, foi verificado se a via de 5-LO teria a capacidade de alterar o número dessas células durante a infecção por *T. gondii*. Os resultados aqui apresentados mostraram que a infecção pelo parasito diminui o número de células caliciformes no intestino delgado. Atualmente, os dados da literatura relacionados às células caliciformes e à infecção oral por *T. gondii* são controversos. Um estudo anterior mostrou que ratos infectados oralmente com oocistos da cepa ME49 de *T. gondii* possuem um número reduzido de células caliciformes que secretam mucinas neutras ou sialomucinas no íleo durante a fase aguda (SCHNEIDER *et al.*, 2017). Por outro lado, outro estudo mostrou que ratos infectados sob as mesmas condições apresentam um aumento do número de células caliciformes secretoras de mucinas ácidas e neutras no duodeno (TREVIZAN *et al.*, 2016) e camundongos C57BL/6 infectados com cistos de ME49 de *T. gondii* não apresentam alteração na quantificação desse tipo celular no intestino delgado aos 7 dias de infecção (LIESENFIELD *et al.*, 2004). No presente estudo, foi demonstrado que a infecção por *T. gondii* diminui o número de células caliciformes no intestino delgado, independente do tratamento com MK886, AgSv ou LTB₄, sugerindo que a via de 5-LO não interfere no dano causado nessas células durante toxoplasmose experimental.

Em conclusão, os resultados aqui apresentados demonstram que *T. gondii* diminui a expressão de 5-LO no intestino delgado de camundongos infectados como uma maneira de evadir do sistema imune para a sua manutenção no hospedeiro. Embora AgSv seja capaz de aumentar a expressão de 5-LO, a infecção por *T. gondii* é capaz de diminuir a expressão da enzima, mesmo nos camundongos tratados com o antígeno. Ainda assim, AgSv é capaz de diminuir o parasitismo tecidual durante a toxoplasmose experimental, mesmo que de forma independente de 5-LO. Além disso, a suplementação com LTB₄ tem a habilidade de diminuir a replicação de *T. gondii*, e parte dessa proteção está relacionada a fatores importantes da resposta imune intestinal, como manutenção das células de Paneth e seus AMPs e produção de IgA. Em conjunto, esses dados demonstram como o parasito é capaz de modular a via de 5-LO durante a infecção oral por *T. gondii* em camundongos susceptíveis, sugerindo que o uso dos seus

subprodutos, como LTB_4 , ou outras ferramentas que alterem a atividade da enzima podem interferir no tratamento e desenvolvimento da toxoplasmose.

6. CONCLUSÕES

- *T. gondii* é capaz de reduzir a expressão de 5-LO e BLT-1 no intestino delgado de camundongos susceptíveis (C57BL/6) ou resistentes (BALB/c), independente do haplotipo do MHC;
- AgSv induz a expressão de 5-LO no intestino delgado de camundongos C57BL/6, porém, a capacidade de *T. gondii* em reduzir a expressão da enzima prevalece mesmo nos camundongos tratados com o antígeno;
- O tratamento com AgSv é capaz de diminuir o parasitismo no intestino delgado e no pulmão de camundongos infectados com *T. gondii*, ainda que esse efeito seja independente de 5-LO.
- Os efeitos positivos de AgSv no intestino delgado durante a infecção por *T. gondii* podem estar parcialmente relacionados a modulação do perfil de citocinas, como diminuição dos níveis de IL-6, IFN- γ e TNF e aumento da produção de IL-4;
- A proteção ocasionada por AgSv durante a infecção por *T. gondii* não está relacionada às células caliciformes ou de Paneth, as quais têm seus números reduzidos durante a infecção;
- A inibição da via de 5-LO ou a suplementação exógena de LTB₄ não altera a sobrevivência ou os parâmetros clínicos de camundongos infectados com *T. gondii*;
- O tratamento com MK886 aumenta o parasitismo no intestino delgado de camundongos C57BL/6 durante a fase aguda da toxoplasmose e diminui a produção de IL-6, IFN- γ e TNF nesse órgão;
- A presença de maiores níveis sistêmicos de LTB₄ mostrou-se benéfica, uma vez diminui o parasitismo no intestino delgado, pulmão e fígado e os danos histológicos no pulmão e fígado de camundongos infectados com *T. gondii*;
- No intestino delgado, o mecanismo protetor de LTB₄ durante a infecção por *T. gondii* pode estar relacionado ao aumento do número de células de Paneth e de α -defensina 1 produzida por essas células, assim como o aumento de IgA específica para *T. gondii* e *E. coli* no lúmen intestinal.

REFERÊNCIAS*

ADAMS, L.B.; HIBBS, J.B.; TAINTOR, J.R.R.; KRAHENBUHL, J.L. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 7, p. 2725–2729, 1990.

AJZENBERG D. 1995-2015: it is time to celebrate 20 years of (intensive) genotyping of *Toxoplasma gondii* strains. **Future Microbiology**, v. 10, p. 5, p. 689-691, 2015.
<https://doi.org/10.2217/fmb.15.23>

ALIBERTI, J.; SERHAN, C. N.; SHER, A. Parasite-induced Lipoxin A₄ is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 9, p. 1253-1262, 2002.
<https://doi.org/10.1084/jem.20021183>

ANURADHA, R.; MUNISANKAR, S.; BHOOTRA, Y.; JAGANNATHAN, J.; DOLLA, C.; KUMARAN, P.; SHEN, K.; NUTMAN, T.B.; BABU, S. Systemic cytokine profiles in *Strongyloides stercoralis* infection and alterations following treatment. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 2, p. 425-431, 2015. <https://doi.org/10.1128/IAI.01354-15>

AOKI, Y.; QIU, D.; ZHAO, G. H.; KAO, P. N. Leukotriene B₄ mediates histamine induction of NF-κB and IL-8 in human bronchial epithelial cells. **Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 274, p. 1030-1039, 1998.

APPLEFORD, P.J.; SMITH, J.E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1187-1191, 2000.

ARAÚJO, 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.V.; SILVA, D.A.O.; 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>

BANNENBERG, G. L.; ALIBERTI, J.; HONG, S.; SHER, A.; SERHAN, C. Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A₄ biosynthesis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 4, p. 515-523, 2004.
<https://doi.org/10.1084/jem.20031325>

BARENCO, P.V.C. **Mecanismos de proteção induzidos pela imunização com TgHSP70 e de controle da inflamação pelo tratamento com STAg na infecção por *Toxoplasma gondii***. 2015. 88 F Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia. 2015.

* Segundo as normas da ABNT 2002.

BARTLEY, P.M.; WRIGHT, S.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E.A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. **Parasitology**, v.135, n. 4, p.421-432, 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000539>

BENEVIDES, L.; CARDOSO, C.R.; MILANEZI, C.M.; CASTRO-FILICE, L.S.; BARENCO, P.V.; SOUSA, R.O.; RODRIGUES, R.M.; MINEO, J.R.; SILVA, J.S.; SILVA, N.M. *Toxoplasma gondii* soluble tachyzoite antigen triggers protective mechanisms against fatal intestinal pathology in oral infection of C57BL/6 mice. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75138, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075138>

BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607–623, 2000.

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. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 4, p. 2081-2088, 1999.

BORGES, C.; CECCHINI, R.; TATAKIHARA, V. L. H.; MALVEZI, A. P. D.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. 5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease. **Immunology Letters**, v. 123, p. 38–45, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.02.002>

BORGES, T.K.; ALVES, É.A.; VASCONCELOS, H.A.; CARNEIRO, F.P.; NICOLA, A.M.; MAGALHÃES, K.G.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I. Differences in the modulation of reactive species, lipid bodies, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and PPAR- γ in cerebral malaria-susceptible and resistant mice. **Immunobiology**, v. 222, n. 4, p. 604-619, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.11.010>

BRASH, A. R. Arachidonic acid as a bioactive molecule. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 11, p. 1339-1345, 2001.

BROWN, C.R.; McLEOD, R. Class I MHC genes and CD8⁺ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Immunology**, v.145, n. 10, p. 3438-3441, 1990.

BRUMPT, E. **Précis de Parasitologie**. 6th ed. Masson et Cie. Paris, 1947. 1.042 p.

BURGER, E.; ARAUJO, A.; LÓPEZ-YGLESÍAS, 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**, v. 23, n. 2, p. 177-190, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.001>

CHAVES, M.M.; MARQUES-DA-SILVA, C.; MONTEIRO, A.P.; CANETTI, C.; COUTINHO-SILVA, R. Leukotriene B4 modulates P2X7 receptor-mediated *Leishmania*

amazonensis elimination in murine macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 10, p. 4765-4773, 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301058>

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.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança**, Uberlândia: EDUFU (editora UFU). p.55, 1997.

CHEN, H.; QIN, J.; WEI, P.; ZHANG, J.; LI, Q.; FU, L.; LI, S.; MA, C.; CONG, B. Effects of leukotriene B4 and prostaglandin E2 on the differentiation of murine Foxp3+ T regulatory cells and Th17 cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 80, n. 4, p. 195-200, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.01.006>

COUTINHO, L.B.; GOMES, A.O.; ARAUJO, E.C.B.; BARENCO, P.V.C.; SANTOS, J.L.; CAIXETA, D.R.; SILVA, D.A.O.; CUNHA-JÚNIOR, J.P.; FERRO, E.A.V.; SILVA, N.M. The impaired pregnancy outcome in murine congenital toxoplasmosis is associated with a pro-inflammatory immune response, but not correlated with decidual inducible nitric oxide synthase expression. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 341-352, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.01.006>

CZARNEWSKI, P.; ARAÚJO, E.C.B.; OLIVEIRA, M.C.; MINEO, T.W.P.; SILVA, N.M. Recombinant TgHSP70 immunization protects against *Toxoplasma gondii* brain cyst formation by enhancing inducible nitric oxide expression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 142, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00142>

DECKERT-SCHLÜTER, M.; BLUETHMANN, H.; RANG, A.; HOF, H.; SCHLÜTER, D. Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3427-3436, 1998.

DECKERT-SCHLÜTER, M.; RANG, A.; WEINER, D.; HUANG, S.; WIESTLER, O.D.; HOF, H.; SCHLÜTER, D. Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. **Laboratory Investigation**, v. 75, n. 6, p. 827-841, 1995.

DENKERS, E. Y. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**. v. 1, p. 699-708, 1999. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)80071-9](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(99)80071-9)

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.

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

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57–72, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1257–1278, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007>

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.

ELMORE, A.; JONES, J.L.; CONRAD, P.A.; PATTON, S.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190–196, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.009>

FAHEL JS, DE SOUZA MB, GOMES MT, CORSETTI PP, CARVALHO NB, MARINHO FA, DE ALMEIDA, L.A.; CALIARI, M.V.; MACHADO, F.S.; OLIVEIRA, S.C. 5-Lipoxygenase negatively regulates Th1 response during *Brucella abortus* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 1210-1216, 2015. <https://doi.org/10.1128/IAI.02592-14>

FERGUSON, D.J.P. *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)

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.

FLAMAND, L.; TREMBLAY, M.J.; BORGEAT, P. Leukotriene B4 triggers the in vitro and in vivo release of potent antimicrobial agents. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, p. 8036-8045, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.8036>

FOUREAU, D. M.; MIELCARZ, D. W.; MENARD, L. C.; SCHULTHESS, J.; WERTS, C.; VASSEUR, V.; RYFFEL, B.; KASPER, L. H.; BUZONI-GATEL, D. TLR9-dependent induction of intestinal alpha-defensins by *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 7022-7029, 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901642>

FRANCO, L.H.; PAULA, M.O.; WOWK, P.F.; FONSECA, D.M.; SÉRGIO, C.A.; FEDATTO, P.F.; GEMBRE, A.F.; RAMOS, S.G.; SILVA, C.L., MEDEIROS, A.I.; FACCIOLI, L.H.; BONATO, V.L. Leukotrienes are not essential for the efficacy of a heterologous vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Brazilian Journal of**

Medical and Biological Research, v. 43, n. 7, p. 645-650, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500053>

FRANCO, P.S.; RIBEIRO, M.; LOPES-MARIA, J.B.; COSTA, L.F.; SILVA, D.A.O.; BARBOSA, B.F.; GOMES, A.O.; MINEO, J.R. Experimental infection of *Calomys callosus* with atypical strains of *Toxoplasma gondii* shows gender differences in severity of infection. **Parasitology Research**, v. 113, n.7, p2655-2664, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3920-y>

FREHN, L.; JANSEN, A.; BENNEK, E.; MANDIC, A. D.; TEMIZEL, I.; TISCHENDORF, S.; VERDIER, J.; TACKE, F.; STREETZ, K.; TRAUTWEIN, C.; SELLEGE, 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, p. e106750, 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106750>

GAUDREAULT E, GOSSELIN J. Leukotriene B4 induces release of antimicrobial peptides in lungs of virally infected mice. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 6211-6221, 2008.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.6211>

GAZZINELLI, R.T.; HAKIM, F.T.; HIENY, S.; SHEARER, G.M.; SHER, A. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 1, p. 286–292, 1991.

GAZZINELLI, R.T.; HAYASHI, S.; WYSOCKA, M.; CARRERA, L.; KUHN, R.; MULLER, W.; ROBERGE, F.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Role of IL-12 in the initiation of cell mediated immunity by *Toxoplasma gondii* and its regulation by IL-10 and nitric oxide. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 41, n.5, p. 9, 1994.

GAZZINELLI, R.T.; HU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A.; SHER, A. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactive chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 1, p. 175–180, 1992.

GAZZINELLI, R.T.; MENDONÇA-NETO, R.; LILUE, J.; HOWARD, J.; SHER, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 2, p. 132-138, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.004>

GLASNER, P.D.; SILVEIRA, C.; KRUSZON-MORAN, D.; MARTINS, M.C.; BURNIER JÚNIOR, M.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M.E.; NUSSENBLATT, R.B.; KASLOW, R.A.; BELFORT JÚNIOR, R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, n. 2, p. 136-144, 1992.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)73976-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)73976-5)

GONZAGA, H.T.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JÚNIOR, J.P.; UETA, M.T.; COSTA-CRUZ, J.M. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides venezuelensis* larvae

to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, p. 78–84, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.016>

GOODARZI, K.; GOODARZI, M.; TAGER, A.M.; LUSTER, A.D.; VON ANDRIAN, U.H. Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. **Nature Immunology**, v. 4, n. 10, p. 965-973, 2003. <https://doi.org/10.1038/ni972>

GOSSELIN, J.; BORGEAT, P.; FLAMAND, L. Leukotriene B4 protects latently infected mice against murine cytomegalovirus reactivation following allogeneic transplantation. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 3, p. 1587-1593, 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.3.1587>

GOUNARIS, E.; HEIFERMAN, M.J.; HEIFERMAN, J.R.; SHRIVASTAV, M.; VITELLO, D.; BLATNER, N.R.; KNAB, L.M.; PHILLIPS, J.D.; CHEON, E.C.; GRIPPO, P.J.; KHAZAI, K.; MUNSHI, H.G.; BENTREM, D.J. Zileuton, 5-lipoxygenase inhibitor, acts as a chemopreventive agent in intestinal polyposis, by modulating polyp and systemic inflammation. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0121402, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121402>

GUIMARÃES, F.R.; SALES-CAMPOS, H.; NARDINI, V.; COSTA, T.A.; FONSECA, M.T.C.; JÚNIOR V.R.; SORGI, C.A.; SILVA, J.S.; CHICA, J.E.L.; FACCIOLI, L.H.; CARDOSO, C.R.B. The inhibition of 5-lipoxygenase (5-LO) products leukotriene B4 (LTB4) and cysteinyl leukotrienes (cysLTs) modulates the inflammatory response and improves cutaneous wound healing. **Clinical Immunology**, v. S1521-6616, n. 16, p. 30576-30579, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.08.022>

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>

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HUANG, L.; ZHAO, A.; WONG, F.; AYALA, J. M.; STRUTHERS, M.; UJJAINWALLA, F.; WRIGHT, S. D.; SPRINGER, M. S.; EVANS, J.; CUI, J. Leukotriene B4 strongly increases monocyte chemoattractant Protein-1 in human monocytes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 1783-1788, 2004. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000140063.06341.09>

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>

JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Waterborne toxoplasmosis – recent developments. **Experimental Parasitology**, v.124, p. 10–25, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>

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, p. 2629-2634, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2629>

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A.L.; RIZZO, L.V.; BELFORT JR, R.; VITOR, R.W.A.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L.D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KIM, S.Y.; KIM, T.B.; MOON, K.A.; KIM, T.J.; SHIN, D.; CHO, Y.S.; MOON, H.B.; LEE, K.Y. Regulation of pro-inflammatory responses by lipoxygenases via intracellular reactive oxygen species in vitro and in vivo. **Experimental & Molecular Medicine**. V. 40, n. 4, p. 461-476, 2008. <https://doi.org/10.3858/emm.2008.40.4.461>

KURASHIMA, Y.; KIYONO, H. Mucosal ecological network of epithelium and immune cells for gut homeostasis and tissue healing. **Annual Review of Immunology**, v. 35, p. 119-147, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052424>

LAMM, M.E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. **Annual Review in Microbiology**, v. 51, p. 311-40, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.311>

LANGERMANS, J.A.; HULST, M.E.; NIBBERING, P.H.; 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.

LE BEL, M.; BRUNET, A.; GOSSELIN, J. Leukotriene B₄, an endogenous stimulator of the innate immune response against pathogens. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n.2, p. 159-168, 2014. <https://doi.org/10.1159/000353694>

LE BEL, M.; GOSSELIN, J. Leukotriene B₄ Enhances NOD2-Dependent Innate Response against Influenza Virus Infection. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139856, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139856>

LIESENFELD, O.; DUNAY, I.R.; ERB, K.J. Infection with *Toxoplasma gondii* reduces established and developing Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 7, p. 3812-3822, 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3812-3822.2004>

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>

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*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 2, p. 597-607, 1996. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.597>

LIU, Q.; WANG, Z.D.; HUANG, S.Y.; ZHU, X.Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 292, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6>

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, p. 402–408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

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>

LÓPEZ-YGLESÍAS, A.H.; BURGER, E.; ARAUJO, A.; MARTIN, A.T.; YAROVINSKY, F. T-bet-independent Th1 response induces intestinal immunopathology during *Toxoplasma gondii* infection. **Mucosal Immunology**, 2018. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.102>

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent, **Journal of Biological Chemistry**, v. 29, p. 265–275, 1951.

MACHADO, E.R.; CARLOS, D.; SORGI, C.A.; RAMOS, S.G.; SOUZA, D.I.; SOARES, E.G.; COSTA-CRUZ, J.M.; UETA, M.T.; ARONOFF, D.M.; FACCIOLI, L.H. Dexamethasone effects in the *Strongyloides venezuelensis* infection in a murine model. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 84, n. 6, p. 957-966, 2011. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0490>

MACHADO, E.R.; UETA, M.T.; LOURENÇO, E.V.; ANIBAL, F.F.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; FACCIOLI, L.H. Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 11, p. 549-557, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00974.x>

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.

Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 3892-3899, 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3892>

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

MAENZ, M.; D. SCHLÜTER, D.; LIESENFELD, O.; SCHARES, G.; GROSS, U.; PLEYER, U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 39, p. 77-106, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.12.005>

MANCUSO, P.; LEWIS, C.; SEREZANI, C.H.; GOEL, D.; PETERS-GOLDEN, M. Intrapulmonary administration of leukotriene B4 enhances pulmonary host defense against pneumococcal pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 2264-2271, 2010. <https://doi.org/10.1128/IAI.01323-09>

MAYATEPEK, E.; FLOCK, B.; ZELEZNY, R.; KREUTZER, K.; VON GIESEN, H.J. LTB4 and LTC4 are absent in the cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus type 1-seropositive persons with toxoplasmic encephalitis: evidence for inhibition of 5-lipoxygenase by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 3, p. 714-716, 1999. <https://doi.org/10.1086/314619>

MCLEOD, R.; MACK, D.G. Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2640-2643, 1986.

MCLEOD, R.; SKAMENE, E.; BROWN, C.; EISENHAUER, P.B.; MACK, D.; MACK, D.G. Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *Toxoplasma gondii* infection of AxB/BxA recombinant inbred and B10 congenic mice. **Journal of Immunology**, v. 143, n. 9, p.3031–3034, 1989.

MEDEIROS, A.I.; SÁ-NUNES, A.; SOARES, E.G.; PERES, C.M.; SILVA, C.L.; FACCIOLI, L.H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1637-1644, 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1637-1644.2004>

MILLER DK, GILLARD JW, VICKERS PJ, SADOWSKI S, LÉVEILLÉ C, MANCINI JA; CHARLESON, P.; DIXON, R.A.F.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; FORTIN, R.; GAUTHIER, J.Y.; RODKEY, J.; ROSEN, R.; ROUZER, C.; SIGAL, I.S.; STRADER, C.D.; EVANS, J.F. Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. **Nature**, v. 343, n. 6255, p. 278-281, 1990. <https://doi.org/10.1038/343278a0>

MINEO, J.R.; MCLEOD, R.; MACK, D.; SMITH, J.; KHAN, I.A.; ELY, K.H.; KASPER, L.H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 9, p. 3951-3964, 1993.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lacert**, v. 363, p. 1965–76, 2004.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MORATO-MARQUES, M.; CAMPOS, M.R.; KANE, S.; RANGEL, A.P.; LEWIS, C.; BALLINGER, M.N.; KIM, S.H.; PETERS-GOLDEN, M.; JANCAR, S.; SEREZANI, C.H. Leukotrienes target F-actin/cofilin-1 to enhance alveolar macrophage anti-fungal activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 33, p. 28902-28913, 2011.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.235309>

NEVES, D. P. Meios de cultura. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; ALMEIDA VITOR, R. W. **Parasitologia humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

NEWCOMER, M.E.; GILBERT, N.C. Location, location, location: compartmentalization of early events in leukotriene biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n.33, p. 25109-25114, 2010. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.125880>

NOHGAWA, M.; SASADA, M.; MAEDA, A.; ASAGOE, K.; HARAKAWA, N.; TAKANO, K.; YAMAMOTO, K.; OKUMA, M. Leukotriene B4-activated human endothelial cells promote. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 62, p. 203-209, 1997.
<https://doi.org/10.1002/jlb.62.2.203>

OKAI, S.; USUI, F.; OHTA, M.; MORI, H.; KUROKAWA, K.; MATSUMOTO, S.; KATO, T.; MIYAUCHI, E.; OHNO, H.; SHINKURA, R. Intestinal IgA as a modulator of the gut microbiota. **Gut Microbes**, v. 8, n. 5, p. 486-492, 2017.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1310357>

OKAI, S.; USUI, F.; YOKOTA, S.; HORI-I, Y.; HASEGAWA, M.; NAKAMURA, T.; KUROSAWA, M.; OKADA, S.; YAMAMOTO, K.; NISHIYAMA, E.; MORI, H.; YAMADA, T.; KUROKAWA, K.; MATSUMOTO, S.; NANNO, M.; NAITO, T.; WATANABE, Y.; KATO, T.; MIYAUCHI, E.; OHNO, H.; SHINKURA, R. High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 9, p. 16103, 2016. <https://doi.org/10.1038/NMICROBIOL.2016.103>

OTT, V. L.; CAMBIER, J. C.; KAPPLER, J.; MARRACK, M.; SWANSON, B. J. Mast cell-dependent migration of effector CD8⁺ T cells through production of leukotriene B4. **Nature Immunology**, v. 4, n. 10, p. 974-981, 2003. <https://doi.org/10.1038/ni971>

PANIS, C.; MAZZUCO, T.L.; COSTA, C.Z.; VICTORINO, V.J.; TATAKIHARA, V.L.; YAMAUCHI, L.M.; YAMADA-OGATTA, S.F.; CECCHINI, R.; RIZZO, L.V.; PINGE-FILHO, P. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 127, n.1, p. 58-65, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.030>

PAVANELLI, W.R.; GUTIERREZ, F.R.; MARIANO, F.S.; PRADO, C.M.; FERREIRA, B.R.; TEIXEIRA, M.M.; CANETTI, C.; ROSSI, M.A.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. 5-lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 587-597, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.016>

PERES, C. M.; PAULA, L.; MEDEIROS, A. I.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G.; CARLOS, D.; PETERS-GOLDEN, M.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infection**, v. 9, p.483-489, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.01.006>

PETERS-GOLDEN, M.; CANETTI, C.; MANCUSO, P.; COFFEY, M.J. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. **Journal of Immunology**, v. 174, n.2, p. 589-594, 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.589>

PRADO, M.K.B.; LOCACHEVIC, G.A.; ZOCCAL, K.F.; PAULA-SILVA, F.W.G.; FONTANARI, C.; FERREIRA, J.C.; PEREIRA, P.A.T.; GARDINASSI, L.G.; RAMOS, S.G.; SORGI, C.A.; DARINI, A.L.C.; FACCIOLI, L.H. Leukotriene B4 is essential for lung host defence and alpha-defensin-1 production during *Achromobacter xylosoxidans* infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17658, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17993-9>

RÅDMARK, O.; SAMUELSSON, B. Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 1, p. 105-110, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.173>

RÅDMARK, O.; WERZ, O.; STEINHILBER, D.; SAMUELSSON, B. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 331-339, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.08.012>

RAETZ, M.; HWANG, S. H.; WILHELM, C. L.; KIRKLAND, D.; BENSON, A.; STURGE, C. R.; MIRPURI, J.; VAISHNAVA, S.; HOU, B.; DEFRANCO, A. L.; GILPIN, C. J.; HOOPER, L. V.; YAROVINSKY, F. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN-gamma-dependent elimination of Paneth cells. **Nature Immunology**, v. 14, p. 136-142, 2013. <https://doi.org/10.1038/ni.2508>

RESENDE, M.G.; FUX, B.; CAETANO, B.C.; MENDES, E.A.; SILVA, N.M.; FERREIRA, A.M.; MELO, M.N.; VITOR, R.W.; GAZZINELLI, R.T. The role of MHC haplotypes H2d/H2b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 80, n.1, p. 85-99, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652008000100005>

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 856p.

ROCCA, B.; FITZGERALD, G. A.. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 603–630, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00204-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00204-1)

ROCHA, P. N.; PLUMB, T. J.; COFFMAN, T. M. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 25, p. 215-227, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00281-003-0132-4>

ROLA-PLESZCZYNSKI, M.; CHAVAILLAZ, P.A.; LEMAIRE, I. Stimulation of interleukin 2 and interferon gamma production by leukotriene B4 in human lymphocyte cultures. **Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine**, v. 23, n. 2-3, p. 207-210, 1986.

ROLA-PLESZCZYNSKI, M.; LEMAIRE, I. Leukotrienes augment interleukin 1 production by human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 6, p. 3958-3961, 1985.

ROLA-PLESZCZYNSKI, M.; STANKOVÁ, J. Leukotriene B4 enhances interleukin-6 (IL-6) production and IL-6 messenger RNA accumulation in human monocytes in vitro: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **Blood**, v. 80, n. 4, p. 1004-1011, 1992.

ROMANO, M. Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins. **Scientific World Journal**, v. 2, n. 10, p. 1048-1064, 2010. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.113>

ROUZER, C.A.; MATSUMOTO, T.; SAMUELSSON, B. Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. **PNAS**, v. 83, n. 4, p. 857-861, 1986. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.4.857>

ROUZER, C.A.; SAMUELSSON, B. The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase. **FEBS Letters**, v. 204, n. 2, p. 293-296, 1986. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80831-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80831-6)

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRIZOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes, modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 8, p.5–8, 1954.

SACRAMENTO, L.A.; CUNHA, F.Q.; ALMEIDA, R.P.; SILVA, J.S.; CARREGARO, V. Protective role of 5-lipoxygenase during *Leishmania infantum* infection is associated with Th17 subset. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 264270, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/264270>

SAMUELSSON, B.; DAHLÉN, S.E.; LINDGREN, J.A.; ROUZER, C.A.; SERHAN, C.N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, v. 237, n. 4819, p. 1171-1176, 1987. <https://doi.org/10.1126/science.2820055>

SAMUELSSON B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**, v. 220, n. 4597, p. 568-575, 1983.

<https://doi.org/10.1126/science.6301011>

SANTAOLALLA, R.; ABREU, M. T. Innate immunity in the small intestine. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 28, p. 124-129, 2012.

<https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3283506559>

SANTOS, P.C.; SANTOS, D.A.; RIBEIRO, L.S.; FAGUNDES, C.T.; DE PAULA, T.P.; AVILA, T.V.; BALTAZAR, L. M., MADEIRA, M.M.; CRUZ, R.C.; DIAS, A.C.; MACHADO, F.S.; TEIXEIRA, M.M.; CISALPINO, P.S.; SOUZA, D.G. The pivotal role of 5-lipoxygenase-derived LTB₄ in controlling pulmonary paracoccidioidomycosis. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 8, p. e2390, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002390>

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

<https://doi.org/10.1093/intimm/dxy004>

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, p. 1026-1033, 2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1026-1033.2000>

SCHLÜTER, D.; LÖHLER, J.; DECKERT, M.; HOF, H.; SCHWENDEMANN, G. *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. **Journal of Neuroimmunology**, v. 31, n. 3, p. 185-198, 1991.

[https://doi.org/10.1016/0165-5728\(91\)90040-E](https://doi.org/10.1016/0165-5728(91)90040-E)

SCHNEIDER, L.C.L.; NASCIMENTO, J.C.P.; TREVIZAN, A.R.; GÓIS, M.B.; BORGES, S.C.; BERARDI, 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 & Motility**, 2017. <https://doi.org/10.1111/nmo.13264>

SECATTO, A.; RODRIGUES, L.C.; SEREZANI, C.H.; RAMOS, S.G.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L.H.; MEDEIROS, A.I. 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e31701, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031701>

SECATTO, A.; SOARES, E.M.; LOCACHEVIC, G.A.; ASSIS, P.A.; PAULA-SILVA, F.W.; SEREZANI, C.H.; DE MEDEIROS, A.I.; FACCIOLI, L.H. The leukotriene B₄/BLT₁ axis is a key determinant in susceptibility and resistance to histoplasmosis. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85083, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085083>

SEREZANI, C. H. C.; ARONOFF, D. M.; JANCAR, S.; MANCUSO, P.; PETERS-GOLDEN, M. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. **Blood**, v. 106, n. 3, p. 1067-1075, 2005. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3323>

SEREZANI, C. H.; PERRELA, J. H.; RUSSO, M.; PETERS-GOLDEN, M.; JANCAR, S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 3201–3208, 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3201>

SFORCIN, J.M.; NUNES, G.A.; MISSIMA, F.; SÁ-NUNES, A.; FACCIOLI, L.H. Effect of a leukotriene inhibitor (MK886) on nitric oxide and hydrogen peroxide production by macrophages of acutely and chronically stressed mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 9, p. 1249-1254, 2007. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.9.0009>

SHIMIZU T, RÅDMARK O, SAMUELSSON B. Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A₄ synthesis from arachidonic acid. **PNAS**, v. 81, n. 3, p. 689-693, 1984. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.3.689>

SILVA, N.M.; MANZAN, R.M.; CARNEIRO, W.P.; MILANEZI, C.M.; SILVA, J.S.; FERRO, E.A.; MINEO, J.R. *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 167–177, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.019>

SILVA, N.M.; RODRIGUES, C.V.; SANTORO, M.M.; REIS, L.F.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; GAZZINELLI, R.T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 859-868, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.859-868.2002>

SILVA, N.M.; VIEIRA, J.C.; CARNEIRO, C.M.; TAFURI, W.L. *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 65-72, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.011>

SKARIAH, S.; MCINTYRE, K.M.; MORDUE, D.G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v. 107, p. 253-260, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>

SOARES, E.M.; MASON, K.L.; ROGERS, L.M.; SEREZANI, C.H.; FACCIOLI, L.H.; ARONOFF, D.M. Leukotriene B₄ enhances innate immune defense against the puerperal sepsis agent *Streptococcus pyogenes*. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 4, p. 1614-1622, 2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202932>

STANKOVÁ, J.; DUPUIS, G.; GAGNON, N.; THIVIERGE, M.; TURCOTTE, S.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Priming of human monocytes with leukotriene B4 enhances their sensitivity in IL-2-driven tumor necrosis factor- α production. Transcriptional and post-transcriptional up-regulation of IL-2 receptors. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 9, p. 4041-4051, 1993.

STANKOVÁ, J.; GAGNON, N.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Leukotriene B4 augments interleukin-2 receptor-beta (IL-2R beta) expression and IL-2R beta-mediated cytotoxic response in human peripheral blood lymphocytes. **Immunology**, v. 76, n. 2, p. 258-263, 1992.

STURGE, C.R.; YAROVINSKY, F. Complex immune cell interplay in the IFN- γ response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 8, p. 3090-3097, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01722-14>

SU, C.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMDAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; ZHU, X.Q.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; DUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **PNAS**, v. 109, n. 15, p. 5844-5849, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203190109>

SUZUKI, Y.; CONLEY, F.K.; REMINGTON, J.S. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 4, p. 790-793, 1989.

SUZUKI Y.; JOH, K.; KWON, O.C.; YANG, Q.; CONLEY, F.K.; REMINGTON, J.S. MHC class I gene(s) in the D/L region but not the TNF- α gene determines development of toxoplasmic encephalitis in mice. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 10, p. 4649-4654, 1994.

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.; 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.; MADELINE 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*. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 5375–5382, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5375>

SUZUKI, Y.; YANG, Q.; REMINGTON, J.S. Genetic resistance against acute toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 1032-1034, 1995.

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.

TAGER, A. M.; BROMLEY, S. K.; MEDOFF, B. D.; ISLAM, S. A.; BERCURY, S. D.; FRIEDRICH, E. B.; CARAFONE1, A. D.; GERSZTEN, R. E.; LUSTER, A. D. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. **Nature Immunology**, v. 4, n. 10, p. 982-990, 2003. <https://doi.org/10.1038/ni970>

TAGER, A.M.; LUSTER, A.D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 69, n.2-3, p. 123-134, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(03\)00073-5](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(03)00073-5)

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

TREVIZAN, A.R.; VICENTINO-VIEIRA, S.L.; WATANABE, P.S.; GÓIS, M.B.; MELO, G.A.N.; GARCIA, J.L.; ARAÚJO, E.J.A.; SANT'ANA, D.M.G. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 22-29, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.015>

VILLERET, B.; BRAULT, L.; COUTURIER-MAILLARD, A.; ROBINET, P.; VASSEUR, V.; SECHER, T.; DIMIER-POISSON, I.; JACOBS, M.; ZHENG, S.G.; QUESNIAUX, V.F.; RYFFEL, B. Blockade of IL-1R signaling diminishes Paneth cell depletion and *Toxoplasma gondii* induced ileitis in mice. **American Journal of Clinical and Experimental Immunology**, v. 2, n. 1, p. 107-116, 2013.

YAMAOKA, K.A.; KOLB, J.P. Leukotriene B4 induces interleukin 5 generation from human T lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 10, p. 2392-2398, 1993. <https://doi.org/10.1002/eji.1830231003>

YAP, G.S.; SHER, A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α -dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 7, p. 1083-1091, 1999. <https://doi.org/10.1084/jem.189.7.1083>

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**, v.14, n. 2, p. 109-121, 2014. <https://doi.org/10.1038/nri3598>

YOKOMIZO, T. Leukotriene B4 receptors: Novel roles in immunological regulations. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 51, p. 59-64, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2010.08.002>

YOKOMIZO, T.; KATO, K.; TERAWAKI, K.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 3, p. 421-432, 2000.
<https://doi.org/10.1084/jem.192.3.421>

YONG, E. C.; CHI, E. Y.; HENDERSON W. R. JR. *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced antitoxoplasma activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 5, p. 1637-1648, 1994 <https://doi.org/10.1084/jem.180.5.1637>

YOUNIS, A.E.; SOBLIK, H.; AJONINA-EKOTI, I.; ERTTMANN, K.D.; LUERSEN, K.; LIEBAU, E.; BRATTIG, N.W. Characterization of a secreted macrophage migration inhibitory factor homologue of the parasitic nematode *Strongyloides* acting at the parasite-host cell interface. **Microbes and Infection**, v. 14, n.3, p.279-289, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.09.006>

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 147/14 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 078/14

Projeto Pesquisa: "A participação do leucotrieno B₄ durante a infecção experimental por *Toxoplasma gondii*"

Pesquisador Responsável: 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. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

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, 13 de outubro de 2014

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU