



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA INTERLEUCINA 32 γ HUMANA (IL-32 γ) DURANTE AS
INFECÇÕES AGUDA E CRÔNICA DA TOXOPLASMOSE EM CAMUNDONGOS
TRANSGÊNICOS.**

Jacqueline Pádua de Queiroz

**Uberlândia - MG
Fevereiro - 2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DA INTERLEUCINA 32 γ HUMANA (IL-32 γ) DURANTE AS
INFECÇÕES AGUDA E CRÔNICA DA TOXOPLASMOSE EM CAMUNDONGOS
TRANSGÊNICOS.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas,
como requisito para a obtenção do
título de Mestre.

Mestranda: Jacqueline Pádua de Queiroz

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2018

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

- Q3a
2018
- Queiroz, Jacqueline Pádua de, 1992
Avaliação da função da interleucina 32 γ humana (IL-32 γ) durante as infecções aguda e crônica da toxoplasmose em camundongos transgênicos / Jacqueline Pádua de Queiroz. - 2018.
57 f. : il.
- Orientador: José Roberto Mineo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.714>
Inclui bibliografia.
- I. Imunologia - Teses. 2. Toxoplasmose - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4. *Toxoplasma gondii* - Teses. I. Mineo, José Roberto. 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

Jacqueline Pádua de Queiroz

"Efeito da interleucina 32 γ humana (IL-32 γ) durante as fases aguda e crônica da infecção por *Toxoplasma gondii* em camundongos transgênicos"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.


Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 28 de fevereiro de 2018.


Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira – UFTM


Prof. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa – ICBIM/UFU


Prof. Dr. José Roberto Mineo (orientador) – ICBIM/UFU

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família - meus pais, Wanderley e Ana Maria, e minha irmã Ana Laura - que sempre me guiaram para que eu me tornasse uma pessoa melhor e me impulsionaram para que eu pudesse seguir em frente mesmo com as dificuldades encontradas.

Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço a todos os que me ajudaram de alguma forma a conquistar esse título, principalmente ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, demais professores, técnicos, alunos e amigos do LIP. Agradeço também as parcerias importantes para a realização deste trabalho: Prof. Dra Neide e aos amigos do IMPAT, Prof. Dra. Fátima, Dr. Rodrigo Saar e Prof. Dr. Leo Joosten.

Obrigada a todos pela contribuição!

No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.

(Albert Einstein)

RESUMO

A interleucina-32 γ é uma citocina pró-inflamatória produzida em resposta a microrganismos. Estudos recentes mostram que a IL-32 γ é importante no controle contra infecções em seres humanos, causadas por *Leishmania (V.) braziliensis*, *Mycobacterium tuberculosis* e HIV. Muitos estudos foram realizados para descrever o papel ou função da IL-32 γ em diferentes condições patológicas, incluindo doenças infecciosas. Neste estudo, camundongos transgênicos para IL-32 γ (IL-32 γ TG) foram utilizados para estudar o papel desta citocina na infecção causada por *Toxoplasma gondii*. Os camundongos de tipo selvagem (WT) e IL-32 γ TG foram infectados com 10 cistos de cepa ME49, via oral. Os camundongos foram eutanasiados no oitavo dia pós infecção para análise de infecção aguda e no dia trigésimo para análise de infecção crônica. Os animais IL-32 γ TG apresentaram maior *score* de morbidade do que os WT. Durante a infecção aguda, não foram observadas alterações significativas no *score* de inflamação e na carga de parasitismo entre os camundongos WT e IL-32 γ TG. No entanto, durante a infecção crônica, os camundongos transgênicos IL-32 γ apresentaram elevação do parasitismo. Neste contexto, esses resultados mostram que a interleucina-32 γ humana exerce um papel importante durante a infecção crônica por *T. gondii*, pois sua presença, particularmente no cérebro, leva a um aumento da carga de parasitismo neste tecido.

Palavras-chave: IL-32 γ ; citocinas; toxoplasmose; morbidade; parasitismo; *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Interleukin-32 γ is a proinflammatory cytokine produced in response to microorganisms and it seems to be important to control infections in humans caused by *Leishmania (V.) braziliensis*, *Mycobacterium tuberculosis* and HIV. Many studies have been conducted to describe the role or function of IL-32 γ in different pathological conditions, including infectious diseases. In the present study, transgenic mice for IL-32 γ (IL-32 γ TG) were used to study the role of this cytokine in *Toxoplasma gondii* infection. Wild type (WT) and IL-32 γ TG mice were infected with 10 cysts of ME49 strain, per gavage. Mice were euthanized at day 8 for acute infection analysis and at day 30 for chronic infection analysis. IL-32 γ TG mice displayed higher morbidity score than WT mice. During acute infection, no significant changes were observed in inflammation score and parasitism load between WT and IL-32 γ TG mice. However, during chronic infection, the IL-32 γ transgenic mice showed high parasitism load being the parasitism increase. Taken together, these results are showing that human interleukin-32 γ behave as a critical cytokine during *T. gondii* chronic infection, as its presence, particularly in the brain, leads to an increase of the parasitism load in this tissue.

Keywords: IL-32 γ ; cytokine; toxoplasmosis; morbidity; parasitism; *Toxoplasma gondii*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estágios infecciosos do *T. gondii*.** (A): Taquizoítos de *T. gondii* corados com Giemsa. (B): Cistos de *T. gondii* no tecido cerebral corado com hematoxilina e eosina. (C): Oocisto esporulado não corado. Fonte: Imagens obtidas do centro de controle e prevenção de doenças (*Center for disease control and prevention* – WWW.cdc.gov). 15
- Figura 2: Ciclo biológico do *T. gondii*.** Este parasito possui ciclo heterógeno, diferentes estágios infecciosos e grande diversidade de hospedeiros intermediários. Fonte: imagem adaptada do centro de controle e prevenção de doenças (*Center for disease control and prevention* – www.cdc.gov). 17
- Figura 3: Cinética da produção de Imunoglobulinas G e suas subclasses antígeno específico para *T. gondii*.** (A) Análise da reatividade para anticorpos IgG total dos soros de camundongos WT e TG para controle da infecção. (B) Análise da produção de anticorpos IgG1 em diferentes datas pós-infecção. (C) Análise da produção de anticorpos IgG2a em diferentes datas pós-infecção. 36
- Figura 4: Variação do peso corporal e curva de sobrevivência os animais infectados pelo protozoário *T. gondii*.** (A) Determinação da variação da massa corporal dos animais do grupo de infecção aguda. (B) Determinação da variação da massa corporal dos animais do grupo de infecção crônica. (C) Índice de sobrevivência dos animais do grupo de infecção crônica. Significâncias estatísticas determinadas pelo teste 2-way ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). 38
- Figura 5: Aspectos microscópicos dos tecidos durante a infecção aguda da toxoplasmose.** (A) Scores inflamatórios obtidos por unidades arbitrárias dos tecidos da infecção aguda, foram analisados Intestino delgado, pulmão e fígado, respectivamente. (B) Fotomicrografias representativas do intestino delgado, pulmão e fígado dos grupos WT e IL-32 γ TG durante a infecção aguda. Foi realizada coloração com hematoxilina/eosina. Barra de escala: 100 μ m. Análises estatísticas feitas pelo teste de *Mann Whitney*. 40

Figura 6: Aspectos microscópicos do cérebro durante a infecção crônica da toxoplasmose. (A) Score inflamatório obtido por unidades arbitrárias do cérebro durante a fase crônica da toxoplasmose. (B) Número de cistos contados em 30 campos a partir da coloração de hematoxilina/eosina. (C) Fotomicrografias representativas do cérebro dos grupos WT e IL-32 γ TG durante a infecção crônica. Foi realizada coloração de hematoxilina/eosina. As setas amarelas indicam os cistos e as setas pretas indicam os infiltrados inflamatórios. Barra de escala: 100 μ m. Análises estatísticas feitas pelo teste de *Mann Whitney* (* $p < 0,05$). **41**

Figura 7: Análise do parasitismo tecidual durante as fases aguda e crônica da toxoplasmose. Foi feita a dosagem do parasitismo por qPCR no intestino delgado (A), pulmão (B) e fígado (C), para análise da fase aguda. Análises estatísticas feitas pelo teste de *Mann Whitney*. Para análise do parasitismo na infecção crônica foi feito a dosagem por qPCR do cérebro (D). Análises estatísticas feitas pelo teste de *T Student's*. (E) e (F) Fotomicrografias representativas do cérebro de camundongos WT e IL-32 γ TG, respectivamente, utilizando a técnica de imunohistoquímica. Barra de escala: 100 μ m. **43**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios para composição do Score de morbidade. A tabela demonstra os itens analisados e a pontuação realizada para elaboração do *score* de morbidade de acordo com as diretrizes do Ministério do Interior do Reino Unido. O valor o *score* de cada categoria é somado para a composição do *score* final. **29**

LISTA DE ABREVIações

BSA: Albumina sérica bovina

DAMP: *Damage associated molecular pathogen* (Receptores de padrão molecular associado ao dano)

DO: Densidade ótica

GADPH: proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H&E: Hematoxilina / eosina

HBV: Vírus da hepatite B

HCV: Vírus da hepatite C

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

IE: Índice de reatividade ELISA

IFN- γ : Interferon γ

IL-32 γ : Interleucina 32 γ

IL-32 γ TG: Camundongos transgênicos para interleucina 32 γ humana;

ILs: Interleucinas

Inf.: Infectados

M. avium: *Mycobacterium avium*

M. leprae: *Mycobacterium leprae*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

mRNA: RNA mensageiro

N.I.: Não infectados

NF- κ B - Factor nuclear Kappa B

PAMP: *Pathogen associated molecular pattern* (Receptores de reconhecimento de padrões associados a patógenos)

PBS: Tampão fosfato salino

PBS-T: Tampão fosfato salino *tween*

PBS-TM: Tampão fosfato salino - *tween* molico

q-PCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

STAg: Soluble *Toxoplasma gondii* antigen (Antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*)

T. gondii: *Toxoplasma gondii*

TLR: *Toll like receptor* (Receptores semelhantes à *Toll*)

TNF: Fator de necrose tumoral

WT: *wild type* (selvagem)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	JUSTIFICATIVA	24
3.	OBJETIVOS	26
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
<u>4.1.</u>	ANIMAIS.....	28
<u>4.2.</u>	OBTENÇÃO DA CEPA ME49 DE <i>Toxoplasma gondii</i>	28
<u>4.3.</u>	INFECCÃO.....	28
<u>4.4.</u>	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	29
<u>4.5.</u>	ANÁLISE DA SOBREVIDA E MORBIDADE	29
<u>4.6.</u>	DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS IgG E SUAS SUBCLASSES ESPECÍFICOS PARA <i>T. gondii</i>	30
<u>4.7.</u>	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	31
<u>4.8.</u>	ANÁLISE DO PARASITISMO POR RT-PCR.....	31
<u>4.9.</u>	ANÁLISE DO PARASITISMO POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	32
<u>4.10.</u>	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5.	RESULTADOS	35
6.	DISCUSSÃO	45
7.	CONCLUSÃO.....	49

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, um parasito intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa, com capacidade de invadir e se replicar nas células de diversos hospedeiros, sendo os animais de sangue quente os mais comuns, incluindo o homem (SIBLEY *et al.*, 2009).

O protozoário apresenta ciclo biológico heteroxeno complexo, com uma fase sexuada cujo desenvolvimento ocorre no intestino dos hospedeiros definitivos (Felínos); e uma fase assexuada em hospedeiros intermediários abrangendo diversas espécies de vertebrados, inclusive o ser humano (SIBLEY *et al.*, 2009). O ciclo de vida apresenta três diferentes fases evolutivas: os taquizoítos, forma circulante e de intensa multiplicação (endogenia) do parasito durante a fase de infecção aguda, este estágio do parasito possui diversas organelas responsável por iniciar o processo de invasão (figura 1A); os bradizoítos presentes na forma de cistos nos tecidos e responsáveis por manter a infecção crônica (figura 1B) e os esporozoítos que se encontram disseminados no ambiente dentro dos esporocistos que, por sua vez, ficam dentro do oocisto (figura 1C) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ROBERT-GANGNEUX; DARD, 2012; BICHET *et al.*, 2014).

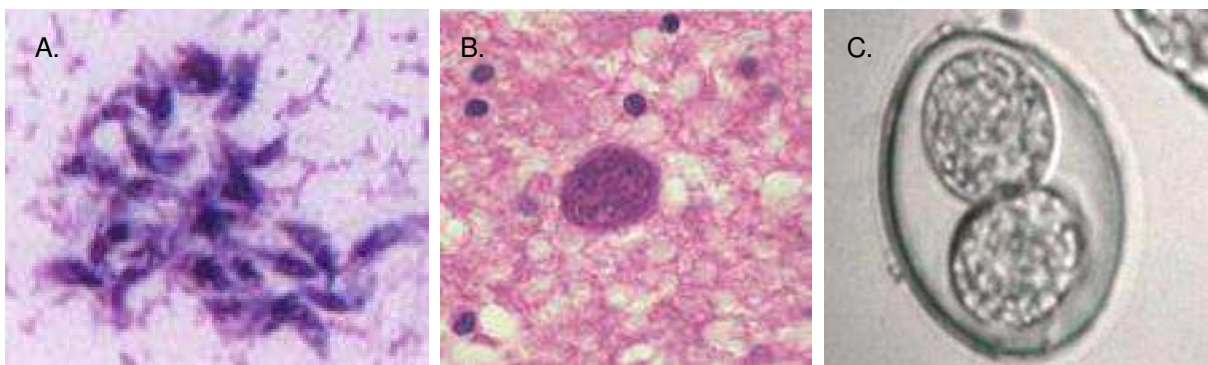


Figura 1: Estágios infecciosos do *T. gondii*. (A): Taquizoítos de *T. gondii* corados com Giemsa. (B): Cistos de *T. gondii* no tecido cerebral corado com hematoxilina e eosina. (C): Oocisto esporulado não corado. Fonte: Imagens obtidas do centro de controle e prevenção de doenças (*Center for disease control and prevention – WWW.cdc.gov*).

A fase sexuada do ciclo ocorre somente dentro dos enterócitos intestinais dos felídeos, e se inicia quando estes realizam a ingestão de cistos contendo bradizoítos presentes no tecido do hospedeiro intermediário. Após a ingestão, a parede dos cistos é degradada pela ação de enzimas proteolíticas do estômago e do intestino

delgado. Os bradizoítos eliminados penetram as células epiteliais do intestino delgado, passam por vários ciclos de desenvolvimento resultando em oocistos esporulados que são eliminados nas fezes e disseminados no ambiente (DUBEY; FRENKEL, 1972).

No hospedeiro intermediário, a fase assexuada do ciclo começa a partir da ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida de animais que atuam como hospedeiros intermediários (porcos, galinhas, carneiros, bovinos, e outros), ou por oocistos presentes no ambiente (consumo de água e alimentos contaminados). Os esporozoítos ou bradizoítos são liberados no aparelho digestivo e infectam células epiteliais do intestino dando origem aos taquizoítos, que por sua vez penetram ativamente a membrana da célula formando um vacúolo parasitóforo capaz de protegê-lo dos mecanismos de defesa do hospedeiro (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). O taquizoíto de *T. gondii* se multiplica por divisões binárias repetidas até a ruptura das células hospedeiras, e após vários ciclos de divisões, os taquizoítos dão origem aos cistos teciduais, definindo a fase crônica da infecção (DUBEY, 2004). Os cistos podem desenvolver-se em órgãos viscerais, incluindo pulmões, fígado, rins, tecidos musculares e neurais, e podem persistir durante toda a vida do hospedeiro sem gerar nenhum tipo de sintomatologia (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

A infecção por *T. gondii* em humanos e animais domésticos também pode ocorrer verticalmente. Quando a infecção primária acontece durante o período gestacional, os taquizoítos podem infectar o feto através da placenta (JONES *et al.*, 1999), ocasionando diversas manifestações clínicas para o feto ou recém-nascido (MOMBRO *et al.*, 2003).

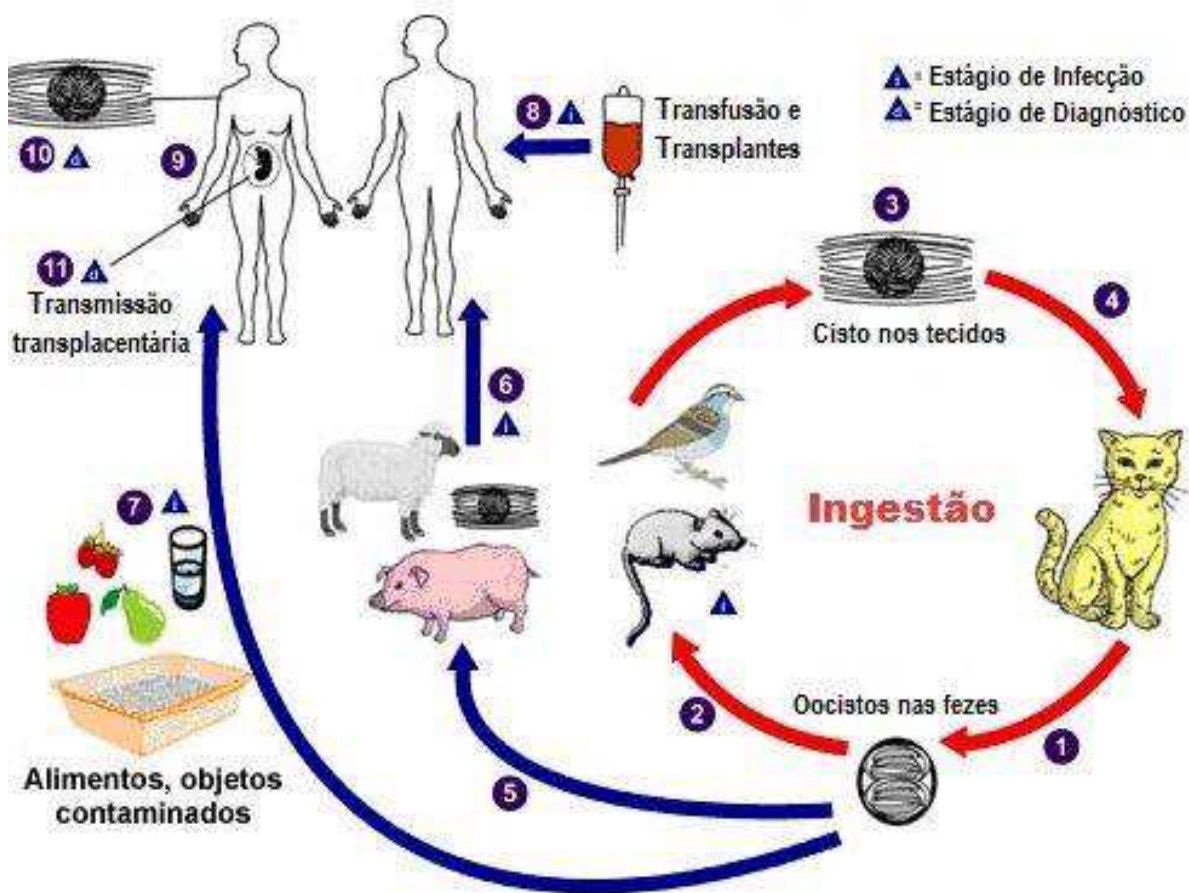


Figura 2: Ciclo biológico do *T. gondii*. Este parasito possui ciclo heteróxico, diferentes estágios infecciosos e grande diversidade de hospedeiros intermediários. Fonte: imagem adaptada do centro de controle e prevenção de doenças (*Center for disease control and prevention* – www.cdc.gov).

Embora as infecções primárias em indivíduos imunocompetentes sejam geralmente limitadas e assintomáticas, podendo apresentar sintomas como febre, mal-estar e linfadenopatia, regredindo espontaneamente (JONES *et al.*, 1999; HO-YEN, 2001), em indivíduos imunodeprimidos e neonatos pode causar encefalite grave, e até à morte (WEISS *et al.*, 1995; JONES *et al.*, 1999; DZIERSZINSKI; NISHI; OUKO, 2004).

A infecção ocorre quando o parasito penetra ativamente na célula e inicia o ciclo proliferativo, promovendo lise celular e dessa forma é capaz de infectar novas células do hospedeiro. O processo de invasão celular ocorre por um conjunto de proteínas de superfície antigenicamente distintas e uma série de proteínas secretadas por organelas específicas do parasito, incluindo roptrias, micronemas e grânulos densos. Essas proteínas são importantes no processo de adesão, invasão

e manutenção do *T. gondii* no interior da célula, e são antígenos importantes reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro (MANGER; HEHL; BOOTHROYD, 1998; JUNG; LEE; GRIGG, 2004).

Os sintomas da toxoplasmose são inespecíficos, de modo que o diagnóstico baseado somente na avaliação clínica do paciente não é satisfatório, assim várias técnicas laboratoriais têm sido desenvolvidas para facilitar o diagnóstico diferencial da toxoplasmose. Atualmente o diagnóstico é realizado utilizando uma combinação de técnicas sorológicas para detectar vários isótipos de anticorpos específicos contra o parasito em diversos fluidos biológicos, como soro sanguíneo, colostro, líquido cefalorraquidiano e urina (KONG *et al.*, 1992; ARAUJO-ANDRADE *et al.*, 2007; PARLOG; SCHLÜTER; DUNAY, 2015; LIU *et al.*, 2015).

Embora não exista droga patenteada capaz de eliminar a forma crônica da doença, a fase aguda da toxoplasmose pode ser tratada por diversos grupos de drogas que agem de forma direta ou indireta sobre o parasito. As drogas que agem de forma indireta no *T. gondii* tiram o acesso dos taquizoítos a nutrientes celulares (INNES, 2010). Um exemplo desta inibição são drogas do grupo dos folatos, que inibe a síntese deste nutriente, resultando na redução da proliferação do parasito. Os grupos de drogas dos macrolídeos e das hidroxinaftoquinonas agem diretamente no parasito. Apresentam efeito tóxico para o mesmo, inibindo moléculas que fazem parte de sua cadeia respiratória. Outra droga utilizada de maneira direta são as drogas do grupo das fluoroquinolonas. Este grupo age inibindo as enzimas envolvidas na replicação do DNA do parasito, desta forma impedem que o mesmo se multiplique (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

A resposta imune do hospedeiro é ativada quando acontece a infecção do hospedeiro. Ao consumir alimentos contaminados com cistos ou oocistos de *T. gondii*, as formas infecciosas do parasito são liberadas no intestino, onde os esporozoítos ou bradizoítos entram em contato com as células do intestino. O reconhecimento inicial do parasito ocorre através de receptores de reconhecimento de padrões associados aos patógenos (*pathogen associated molecule pattern* – PAMP), receptores semelhantes à toll (*toll like receptor* – TLR) e receptores de padrão molecular associado ao dano (*damage associated molecular pattern* – DAMP). O estímulo sofrido pelos TLRs, DAMPs e PAMPs faz com que as células endoteliais infectadas e vizinhas a elas liberem quimiocinas, que atraem células do

sistema imunológico (DEBIERRE – GROCKIEGO *et al.*, 2007; DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012; ANDRADE *et al.*, 2013; STURGE; YAROVINSKY, 2014).

Entre as células atraídas pelas quimiocinas ativadas estão os neutrófilos, células dendríticas, monócitos e células *natural killer* (células NK). Os neutrófilos são importantes na fagocitose dos parasitos durante o estágio extracelular e na produção de interferon γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF) (STURGE; YAROVINSKY, 2014). Os monócitos e célula dendríticas além de realizar a fagocitose, também são responsáveis por secretar a citocina IL-12, uma citocina capaz de ativar outras células do sistema imunológico. Além da fagocitose e secreção de IL-12, as células dendríticas também são responsáveis por apresentar antígenos para as células T, iniciando a fase adaptativa da resposta imune. As células NK possuem ação citotóxica e exercem importante papel em um ciclo de *feedback* positivo. As células NK são ativadas por IL-12 e produzem IFN- γ , por outro lado o IFN- γ liberado pelas células NK estimula uma maior produção de IL-12 pelas células dendríticas e monócitos, que por sua vez estimula o aumento da produção de IFN- γ (DUNAY; SIBLEY, 2010; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; STURGE; YAROVINSKY, 2014).

A resposta imune adaptativa frente à infecção por *T. gondii* envolve mecanismos da imunidade mediada por células e da resposta imune humoral que desempenha um papel importante na neutralização e destruição de taquizoítos extracelulares. A atividade do sistema imunológico promove a destruição de taquizoitos circulantes e o desenvolvimento de bradizoítos (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003), desta forma a imunidade controla a infecção mas não determina o fim da mesma.

A imunidade humoral é específica ao estágio extracelular do parasito, que pode ocorrer quando o taquizoíto sai de uma célula para infectar outra sadia ou em alguma situação que os bradizoítos são liberados dos cistos rompidos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Células apresentadoras de antígenos iniciam a resposta imunológica apresentando porções do antígeno de *T. gondii* para células TCD4+ e TCD8+. A apresentação de antígenos juntamente com a ação de citocinas e moléculas coestimuladoras são responsáveis também pela ativação de linfócitos B dos órgãos linfoides secundários (CORREA *et al.*, 2007).

Nas primeiras semanas de infecção, inicia-se a produção de anticorpos específicos representados pelas imunoglobulinas IgM, IgA e IgE. Em amostras de soros humanos, os anticorpos IgM indicam infecção recente e são encontrados 7 dias após a infecção, entretanto estudos já demonstraram a persistência de IgM na fase crônica em alguns indivíduos, o que torna difícil o diagnóstico diferencial para fase aguda (LIESENFELD, 1997; HEGAB; AL- MUTAWA, 2003). Os anticorpos IgG, por outro lado, são detectados 2 semanas pós-infecção e persistem por tempo indeterminado (LIU *et al.*, 2012). Durante a fase crônica da toxoplasmose, somente os bradizoítos persistem e são responsáveis pela manutenção de títulos sorológicos que podem durar toda a vida do hospedeiro (KAWAZOE, 2002). Os anticorpos produzidos contra o parasito podem: neutralizar fragmentos específicos do parasito para que o mesmo pare de se replicar; opsonizar o patógeno para facilitar a ação de células fagocitárias; ou ativar a via clássica do sistema complemento, resultando na destruição da membrana do parasito (DUPONT *et al.*, 2014).

Por se tratar de um protozoário intracelular obrigatório, ou seja, todo seu ciclo de replicação e as patogenias ocorrem dentro da célula, a resposta mais importante do hospedeiro contra o *T. gondii* é a resposta adaptativa celular. A imunidade celular se inicia com a apresentação de fragmentos fagocitados do parasito à célula T e também a ativação de célula T pela citocina IL-12, resultando na diferenciação de células TCD4+ *naive* (virgem) em células Th1 (*helper*). Células Th1 diferenciadas e ativadas migram dos linfonodos do hospedeiro para os tecidos onde estão secretando citocinas (principalmente IFN- γ). Ao migrarem as células T diferenciadas são responsáveis por amplificar mecanismos da resposta imune inata, como tornar células fagocíticas mais eficientes (SANECKA; FRICKEL, 2012; STURGE; YAROVINSKY, 2014). O IFN- γ possui grande importância na imunidade contra o *T. gondii*. Dentre suas funções é responsável pelo aumento de enzimas fagocíticas; diminuição da oferta de nutrientes para a replicação do parasito, como a depleção de triptofano e L-arginina; produção de enzimas responsáveis por amplificar a resposta imune; ativação de células do sistema imune inato, especialmente macrófagos, os tornando mais eficientes e resistentes, além de estimular essas células a produzir TNF, outro potente estimulador da resposta imune e produção de outras citocinas pró-inflamatórias. (ALIBERTI, 2005; MILLER *et al.*, 2009; DUPONT *et al.*, 2012; STURGE; YAROVINSKY, 2014).

A interleucina-32 (IL-32) é uma citocina pró-inflamatória sem homologia a outras citocinas. A IL-32 esta presente na maioria dos mamíferos, porém não está presente em roedores (KAWAGUCHI *et al.*, 2015). É produzida por células imunes, incluindo células NK, monócitos, macrófagos e linfócitos T, e por células não imunes, como células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e hepatócitos (KHAWAR; ABBASI; SHEIKH, 2016). Diferentes estímulos podem induzir a produção de IL-32. Esta citocina pode ser induzida por IFN- γ , IL-1 β e IL-18 em células epiteliais, bem como por IL-12 e IL-18 em células NK e linfócitos T (KAWAGUCHI *et al.*, 2015).

Desde a sua descoberta, foram descritas nove isoformas de IL-32, a maioria é expressa na forma intracelular. No entanto, a isoforma γ (IL-32 γ), isoforma mais frequente e biologicamente ativa, pode ser encontrada na forma secretada (HEINHUIS *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2014). Dentre suas funções, a IL-32 γ pode realizar *feedback* positivo, por ser capaz de induzir IFN- γ , IL-1 β , IL-18 e IL-6 através da ativação da via NF- κ B (CHOI *et al.*, 2009; NAM *et al.*, 2014). As outras isoformas são derivadas de *splicings* do RNA mensageiro (mRNA) da IL-32 γ (CHOI *et al.*, 2009; KANG *et al.*, 2014). Embora a maioria das isoformas tenha um perfil pró-inflamatório, a isoforma β (IL-32 β) está associada a uma resposta anti-inflamatória. Além disso, a IL-32 β é capaz de regular a produção de IL-10, o que leva a uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias (KANG *et al.*, 2009). Ainda não foi identificado o receptor específico de IL-32 (CHOI *et al.*, 2009; NAM *et al.*, 2014).

Foi proposto que a IL-32 desempenha um papel protetor em várias doenças, porém há relatos que demonstram o efeito oposto, agravando casos clínicos em pacientes devido à alta inflamação. Este estudo é o primeiro na literatura que trás o papel da IL-32 na infecção pelo *Toxoplasma gondii*. Estudos realizados com bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacteria* (*M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. leprae*) mostraram que a IL-32 pode controlar a infecção ou diminuir a carga bacteriana (BAI *et al.*, 2011; SCHENK *et al.*, 2012; NOLD-PETRY *et al.*, 2014). Embora tenha sido demonstrado que a IL-32 foi capaz de controlar a replicação viral de HCV e HBV, a IL-32 estava relacionada à imunopatologia da doença devido ao aumento da inflamação (ZEPP *et al.*, 2011; MOSCHEN *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2012; ZOU *et al.*, 2015). Nas infecções por HIV, esta citocina mostrou um papel protetor, reprimindo a replicação viral (KOBAYASHI *et al.*, 2010). Estudos anteriores

demonstraram que a isoforma γ (IL-32 γ) controla o parasitismo durante a infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* (SANTOS *et al.*, 2017), mas não foi capaz de controlar parasitismo ou estimular a resposta imune na infecção causada por *Leishmania amazonensis* (GOMES *et al.*, 2017). Embora o papel da IL-32 tenha sido descrito na várias infecções, não há estudos relacionados à Toxoplasmose na literatura.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma doença responsável por grande morbidade e mortalidade em gestantes, fetos, neonatos e indivíduos imunocomprometidos. É responsável por perdas econômicas na pecuária, causando aborto e morte em vários animais, cuja prevalência ainda é desconhecida. Em humanos a toxoplasmose atinge cerca de um terço da população. O *Toxoplasma gondii* é um protozoário que além de possuir ciclo heteróxico, diversas cepas e hospedeiros intermediários acidentais, é capaz de escapar e empregar vários mecanismos de evasão para se evadir da resposta imunológica.

Estudos anteriores propõem que a IL-32 desempenha um papel protetor em várias doenças, porém há relatos que demonstram o efeito oposto, agravando casos clínicos em pacientes devido à alta inflamação. Embora o papel da IL-32 tenha sido descrito para várias infecções, não há estudos relacionados à Toxoplasmose na literatura. Considerando que a infecção por *T. gondii* induz a resposta pró-inflamatória e a IL-32 ser uma citocina pró-inflamatória envolvida na defesa do hospedeiro e imunopatogênese causada por vários agentes patogênicos, incluindo protozoários como *Leishmania* sp, o presente estudo propõe investigar o papel da IL-32 humana durante as infecções aguda e crônica da toxoplasmose em modelo murino de experimentação.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da interleucina 32 γ humana nas infecções aguda e crônica por *Toxoplasma gondii* em camundongos transgênicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o índice de sobrevivência de camundongos WT infectados em comparação com os animais IL-32 γ TG;
- ✓ Analisar o *score* de morbidade dos animais infectados durante toda a infecção;
- ✓ Avaliar os efeitos inflamatórios teciduais causados durante a infecção por *T. gondii* em diferentes tempos da infecção;
- ✓ Analisar a carga parasitária tecidual de animais WT e IL-32 γ TG em diferentes fases da infecção por *T. gondii*.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Camundongos transgênicos para IL-32 humana foram desenvolvidos por Choi *et. al.*, 2005 e foram doados ao nosso grupo através da colaboração com a Dra. Fátima Ribeiro Dias (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil). A IL-32 humana foi introduzida no gene do camundongo associada a β -actina de galinha. A IL-32 humana é expressa, em diferentes concentrações, em todos os tecidos dos camundongos transgênicos. Os camundongos C57BL/6 foram obtidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Celular, Histologia e Embriologia, em condições padronizadas de criação. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), que foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia sob Protocolo CEUA-UFU No. 120/16.

4.2. OBTENÇÃO DA CEPA ME49 DE *Toxoplasma gondii*

A cepa de ME49 de *T. gondii* foi mantida em camundongos Swiss Webster. Os camundongos Swiss foram inoculados por via oral com 20 cistos de *T. gondii*, pelo menos um mês antes da coleta do cisto do cérebro. O cérebro foi homogeneizado em tampão fosfato-salino e os cistos foram contados e utilizados para infecção dos animais.

4.3. INFECÇÃO

Para o estudo das infecções aguda e crônica da toxoplasmose, foi utilizado camundongos fêmeas de tipo selvagem C57BL/6 e IL-32 γ TG, de 8-12 semanas. Os camundongos foram divididos em 2 grupos principais (grupo de fase aguda e grupos de fase crônica) compostos por WT não infectado (n=3); IL-32 γ TG não infectado (n=3); WT infectado (n=5) e IL-32 γ TG infectado (n=5) em cada grupo. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Os camundongos dos grupos infectados (WT inf. e IL-32 γ TG inf.) foram infectados com 10 cistos de *T. gondii* da cepa ME49 via oral. Os quatro grupos foram avaliados durante a toxoplasmose. Os

animais dos grupos para análise da fase aguda foram devidamente eutanasiados no oitavo dia da infecção, enquanto que os animais para análise da fase crônica foram eutanasiados no trigésimo dia.

4.4. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A obtenção das amostras foi realizada nos oitavo (análise da fase aguda da infecção) e trigésimo (análise da fase crônica da infecção) dias após a infecção. Para obtenção do soro, os animais foram submetidos à sangria parcial no quarto e décimo quinto dia e à sangria total antes da eutanasia. Posteriormente, foram coletados intestino delgado, fígado e pulmões no oitavo dia, e cérebro no trigésimo pós- infecção. Para análise da expressão gênica, os cérebros foram armazenados em Trizol e submetidos a um congelamento rápido em nitrogênio líquido. Ainda, para análise histológica, uma porção dos órgãos citados anteriormente foi armazenada em formalina e a outra submetida a um congelamento rápido em nitrogênio líquido para análises imunológicas.

4.5. ANÁLISE DA SOBREVIDA E MORBIDADE

Para análise de sobrevida e morbidade os animais foram acompanhados e pesados em um intervalo de dois dias para análise do *score* de morbidade, realizado como previamente descrito (BARTLEY *et al.*, 2006), demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Critérios para composição do Score de morbidade. A tabela demonstra os itens analisados e a pontuação realizada para elaboração do *score* de morbidade de acordo com as diretrizes do Ministério do Interior do Reino Unido. O valor o *score* de cada categoria é somado para a composição do *score* final.

Categoria	Descrição	Score
A. Resposta febril	Normal	0
	Pelo arrepiado	1
	Rígido	2
B. Desidratação	Manutenção / Ganho de peso	0
	10% de perda de peso	1
	20% de perda de peso	2
C. Comportamento	Ativo	0
	Arqueado	1
	Arqueado + Mover com toque	2
	Arqueado + Relutante em mover	3

4.6. DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS IgG E SUAS SUBCLASSES ESPECÍFICOS PARA *T. gondii*

A produção de anticorpos IgG para confirmação da infecção dos camundongos pelo *T. gondii* assim como a cinética da produção de suas subclasses foram analisadas por ELISA indireto em soros de camundongos WT e transgênicos, como descrito anteriormente (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1986; CARVALHO et al., 2008), com algumas modificações.

Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporates Costar, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas por 18 horas a 4°C com STAg (10µg/mL) diluído em tampão carbonato de sódio 0,06 M (pH 9,6). As placas foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP) (PBS-TM5%) para IgG total e PBS-T adicionado de 1% de albumina sérica bovina (BSA – Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) para IgG1 e IgG2a, por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram incubadas a 37°C com as amostras dos soros dos camundongos a serem testadas, diluídas na razão de 1:50 em PBS-TM a 1 hora para detecção de IgG total e em PBS-T-BSA1% por 2 horas para IgG1 IgG2a. Após incubação com as amostras, conjugados específicos para imunoglobulina anti IgG (1:1000) de camundongo marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) diluídas em PBS-TM a 1%, anti-IgG1 (1:4000) e anti IgG2a (1:2000) de camundongo marcado com biotina diluídas em PBS-T+BSA1% foram adicionados e incubados por 1 hora a 37°C. Para a detecção das isoformas de IgG (IgG1 e IgG2a) as placas foram incubadas com streptavidina/peroxidase (1:100) por 30 minutos a temperatura ambiente. Entre cada etapa da reação as placas foram lavadas com PBS-T por cinco vezes. A reação foi desenvolvida com 2,2-azino-bis-(ácido 3-etil-benzotiazolína-6-sulfônica).

A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitor de placas (*SpectraMax M2e*, Molecular Devices, EUA). Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O limite de positividade (*cut off*) da reação foi determinado pela média da DO dos soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Os resultados foram expressos em índices de reatividade ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$, sendo que os valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos, para a exclusão de valores de reatividade próximos a $IE = 1,0$.

4.7. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A análise histológica foi realizada conforme descrito anteriormente (SILVA *et al.*, 2009). Amostras do intestino delgado, fígado, pulmões e cérebro foram fixadas em 5% de formalina, posteriormente foram embebidos em parafina e cortadas em seções de 5µm. Os cortes foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e examinados por microscopia de luz. *Scores* inflamatórios foram representados como unidades arbitrárias: 0-2: leve; 2-4: moderada; 4-6 grave e >6: muito grave. Para a indicação desses *scores* foi analisada a presença e extensão de infiltrados inflamatórios nos tecidos, preservação da estrutura tecidual e presença de necrose. Foram realizadas análises duplo-cegas por dois pesquisadores utilizando o microscópio Olympus FSX100 com objetiva de 40 ×.

4.8. ANÁLISE DO PARASITISMO POR RT-PCR

O parasitismo em amostras de tecidos dos animais infectados com 10 cistos de *T. gondii* foi quantificado pela amplificação específica de cópias de DNA por meio da técnica de *Real-time* PCR (RT-PCR) e normalização com GAPDH. Os tecidos escolhidos para a dosagem do parasitismo durante a fase aguda foram intestino delgado, fígado e pulmão, e para fase crônica, o cérebro. Primeiramente, para extração do DNA das amostras, os tecidos foram macerados (50 mg por órgão) e foram adicionados em tubos de 1,5 mL juntamente com 250 µL de tampão NLB (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM Na₂EDTA, pH 8.2), 8 µl de dodecilsulfato de sódio (SDS) 10% e 4 µl de solução da proteinase k. Estas amostras foram incubadas em banho seco *overnight*. Em seguida, foram adicionados às amostras 150 µl de cloreto de sódio (NaCl) 6M, agitadas em vortex por 15 segundos, incubadas em gelo por 10 minutos e centrifugadas a 15200 xg por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi recolhido em um novo tubo de 1,5 ml estéril e foi adicionado 800 µL de solução de etanol absoluto. Nesta etapa o DNA já pôde ser visualizado e, ainda assim as amostras foram centrifugadas a 15200 xg por 15 minutos à 4° C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 ml de solução de etanol 75%. Os tubos de 1,5 ml foram novamente centrifugados a 15200 xg por 5 minutos, na mesma temperatura citada anteriormente, e o sobrenadante foi descartado. Após secos, os *pellets* foram ressuspensos com 50 µl de dH₂O. A quantidade de DNA total extraído foi

determinada por absorbâncias em NanoDrop (ND1000 Spectrophotometer) no comprimento de onda 260 e 280 nm e ajustada para 40 ng/μL com água estéril livre de DNase.

A quantificação da carga parasitária foi realizada utilizando o equipamento de PCR em tempo real (7500 Real time PCR System, Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA) com *primers* específicos para o gene Tg529 de *T. gondii* (forward, 5'-CACAGAAGGGACAGAAGT-3'; reverse, 5'-TCGCCTTCATCTACAGTC-3') e um máster mix com o sistema de detecção *SYBR Green*. A carga parasitária foi estimada por meio da extrapolação do número de cópias de DNA de *T. gondii* nas amostras comparados com a curva padrão com quantidades de DNA conhecidas usando o *software* Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os resultados foram expressos em picogramas de DNA do parasito / μg de DNA total.

4.9. ANÁLISE DO PARASITISMO POR IMUNOHISTOQUÍMICA

O parasitismo cerebral dos camundongos também foi avaliado pela técnica de imunohistoquímica como anteriormente descrito (SILVA *et al.*, 2009). Primeiramente, foi realizado o bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nos cortes parafinizados. Em sequência, foi realizado o resgate antigênico em tampão citrato (pH 6,0) aquecido em forno microondas durante 7 min. Feito isso, as ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS acrescido de leite desnatado a 3% durante 3 min e então os cortes foram incubados *overnight* com soro coelho anti *T. gondii* produzido no nosso laboratório, o qual foi diluído em saponina 0,01%. O anticorpo IgG de cabra biotinilado anti-camundongo (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA) foi utilizado como anticorpo secundário. A reação foi amplificada pela utilização do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) e revelada com 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma Chemical Co., St . Louis, MO, EUA). Por fim, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e montados com lamínulas para avaliação em microscópio de luz. As lâminas foram avaliadas para a presença de vacúolos parasitóforos e estruturas semelhantes a cisto em todo corte utilizando objetiva de 40x.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os testes foram selecionados de acordo com a sua aplicabilidade. O *score* de morbidade foi analisado com o teste não paramétrico *2-way ANOVA*. O *score* inflamatório, o parasitismo tecidual da fase aguda e o a contagem de cistos foram analisados utilizando o teste não paramétrico *Mann Whitney*. O parasitismo cerebral realizado pelo RT PCR foi calculado pelo teste *T Student's*. A curva de sobrevivência foi calculada com o teste *log-rank*. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 CONTROLE DA INFECÇÃO VIA ORAL E PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G E SUAS SUBCLASSES.

Os camundongos foram infectados via oral, com 10 cistos de *T. gondii* da cepa ME49, obtidos do cérebro de animais Swiss que foram homegeinizados em tampão fosfato-salino. Para controle do homogenato e da infecção foi realizado a mensuração de anticorpos da classe de IgG total nos soros dos camundongos do grupo crônico, no trigésimo dia da infecção. Os resultados foram expressos em índices de reatividade ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$, sendo que os valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos, para a exclusão de valores de reatividade próximos a $IE = 1,0$ (Fig. 3A). É possível observar a produção da Imunoglobulina G em um índice ELISA maior que 1,2 ($IE > 1,2$) nos animais infectados, indicando que houve uma produção de IgG antígeno específica para *T. gondii*, sendo assim houve uma infecção ativa. Foi possível observar também, que não houve uma produção de anticorpos IgG nos animais não infectados, indicando que a inoculação de PBS, somente, ocorreu de maneira adequada nos grupos controle, não ocorrendo infecção dos mesmos.

Adicionalmente foi analisado se houve alguma diferença na produção de Imunoglobulinas G e suas subclasses (IgG1 e IgG2a) (Fig. 3B e 3C, respectivamente), em diferentes datas pós-infecção, foi analisado durante a fase aguda e crônica. Foi observado que a IL-32 γ não influenciou na produção de IgG e suas subclasses. Os níveis de IgG1 (Fig. 3B) e IgG2a (Fig. 3C) permanecem em níveis similares, em todas as datas mensuradas.

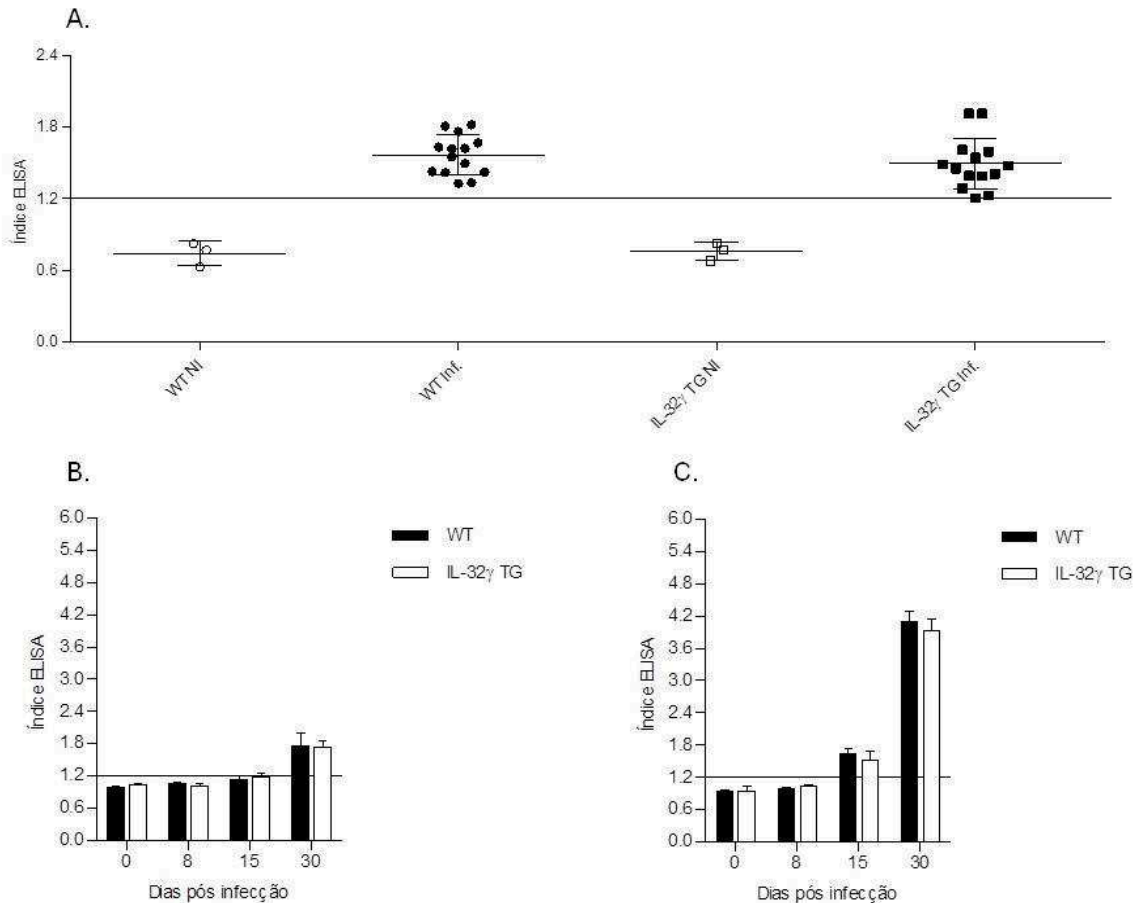


Fig. 3: Cinética da produção de Imunoglobulinas G e suas subclasses antígeno específico para *T. gondii*. (A) Análise da reatividade para anticorpos IgG total dos soros de camundongos WT e TG para controle da infecção. (B) Análise da produção de anticorpos IgG1 em diferentes datas pós-infecção. (C) Análise da produção de anticorpos IgG2a em diferentes datas pós-infecção.

5.2 INFLUÊNCIA DE IL-32 γ NA MORBIDADE E SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *T. gondii*.

Os animais foram analisados quanto à tabela descrita anteriormente e pesados durante toda a infecção. Os camundongos foram divididos em dois grupos: grupo de fase aguda, grupo no qual os animais foram eutanasiados no oitavo dia de infecção, e grupo de fase crônica eutanasiados no dia trigésimo dia de infecção. As amostras de soro, intestino delgado, pulmão, fígado e cérebro foram coletadas para análises histológicas e imunológicas. Ao comparar o grupo WT com IL-32 γ TG, na toxoplasmose aguda, o grupo IL-32 γ TG apresentou maior perda de peso do que o grupo WT. Essa perda de peso foi significativa nos 4^o, 6^o e 8^o dias pós-infecção (Fig. 4A). Na infecção crônica, a diferença de perda de peso entre os grupos WT e IL-32 γ TG está presente no décimo dia, e foi novamente observada nos 28^o e 30^o dias

pós-infecção (Fig. 4B). Avaliando a mortalidade entre os dois grupos, os animais sucumbiram à infecção entre o dia oitavo e o décimo segundo dia pós-infecção, mas não houve diferença significativa entre os grupos TG e WT (Fig. 4C).

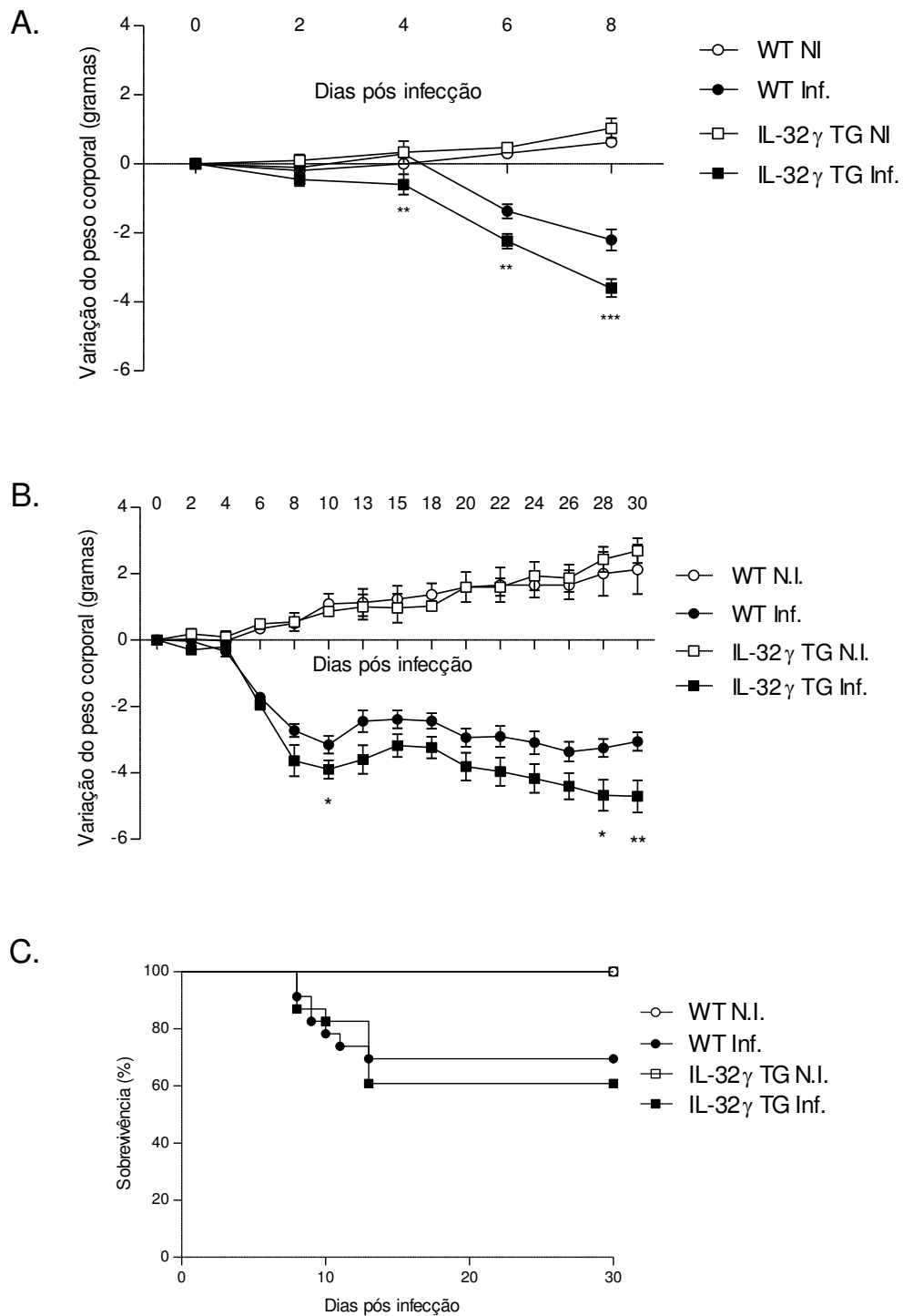


Figura 4: Variação do peso corporal e curva de sobrevivência os animais infectados pelo protozoário *T. gondii*. (A) Determinação da variação da massa corporal dos animais do grupo de infecção aguda. (B) Determinação da variação da massa corporal dos animais do grupo de infecção crônica. (C) Índice de sobrevivência dos animais do grupo de infecção crônica. Significâncias estatísticas determinadas pelo teste 2-way ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3 ASPECTOS MICROSCÓPICOS DOS TECIDOS DURANTE A TOXOPLASMOSE AGUDA E CRÔNICA.

Observou-se que Il-32 γ influenciou o escore de morbidade durante as fases aguda e crônica; No entanto, não houve diferença significativa no escore arbitrário de inflamação no intestino delgado, fígado e pulmão durante a toxoplasmose aguda (Fig. 5). Na toxoplasmose crônica, os animais foram analisados no trigésimo dia de infecção. Embora não tenha sido encontrada uma diferença estatística significativa entre os camundongos WT e TG infectados quanto ao *score* inflamatório (Fig. 6A), foi encontrado um maior número de cistos nos cérebros dos animais IL γ TG (Fig. 6B; 6C).

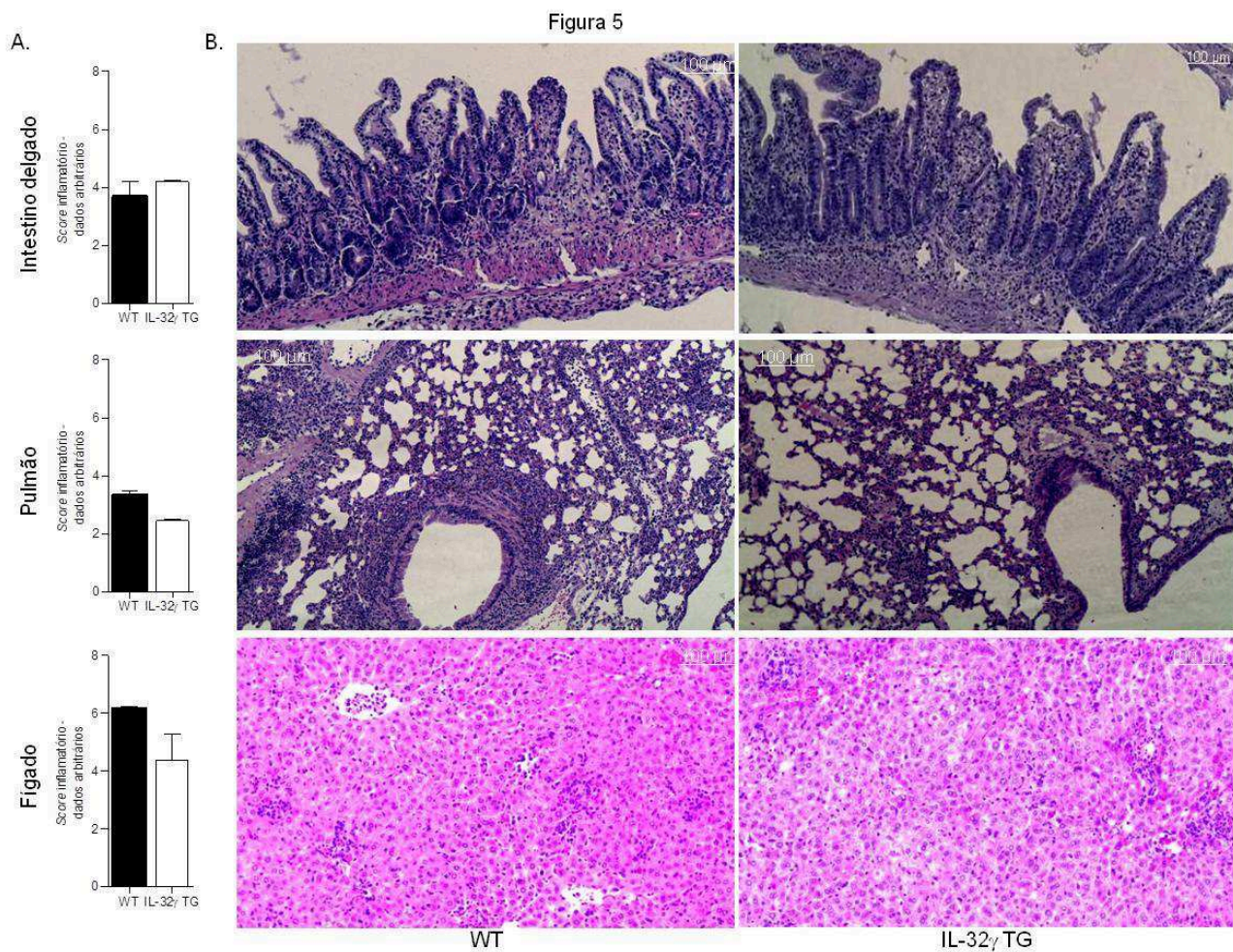


Fig. 5: Aspectos microscópicos dos tecidos durante a infecção aguda da toxoplasmose. (A) Scores inflamatórios obtidos por unidades arbitrárias dos tecidos da infecção aguda, foram analisados Intestino delgado, pulmão e fígado, respectivamente. **(B)** Fotomicrografias representativas do intestino delgado, pulmão e fígado dos grupos WT e IL-32 γ TG durante a infecção aguda. Foi realizada coloração com hematoxilina/eosina. Barra de escala: 100 μ m. Análises estatísticas feitas pelo teste de *Mann Whitney*.

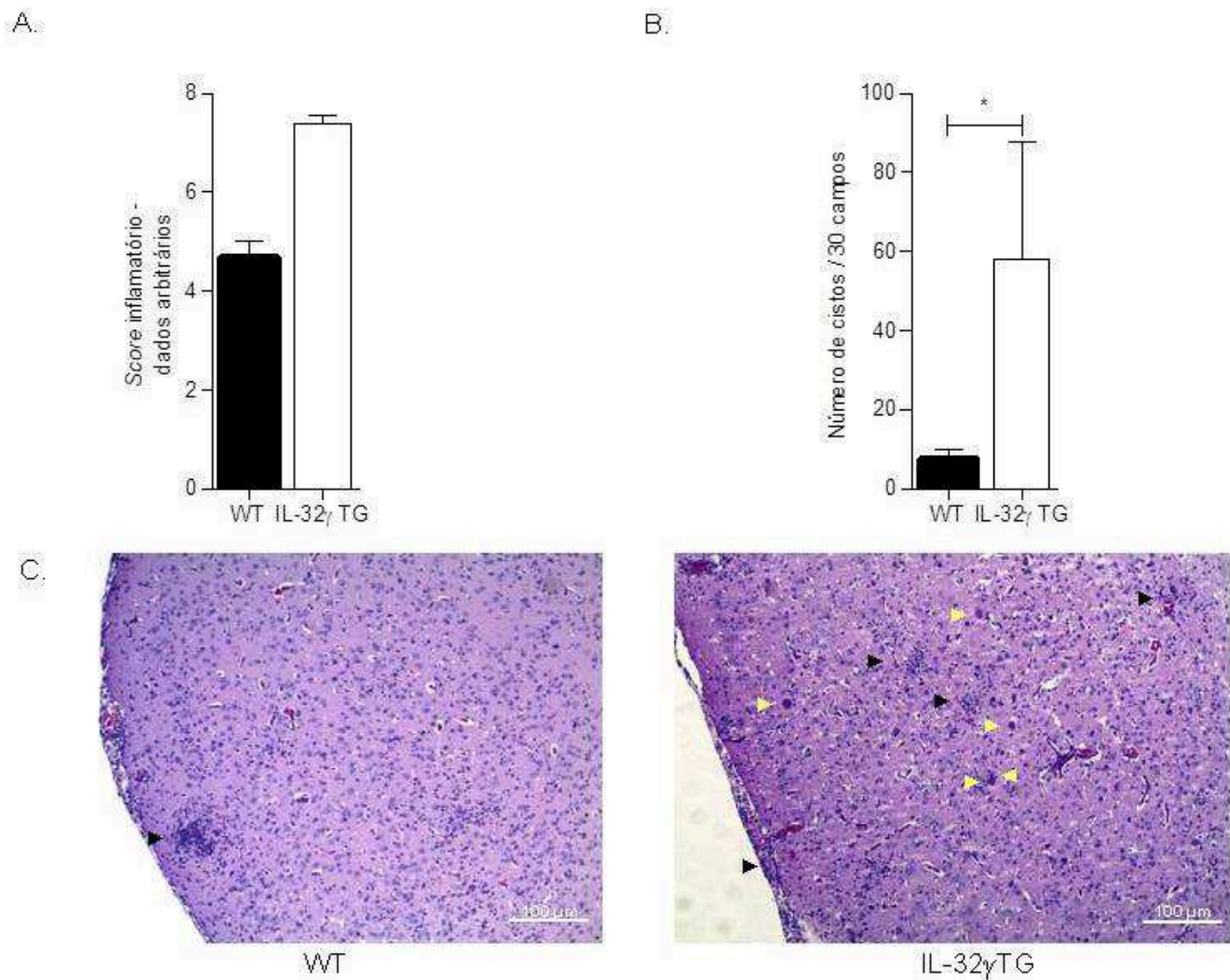


Fig. 6: Aspectos microscópicos do cérebro durante a infecção crônica da toxoplasmose. (A) Score inflamatório obtido por unidades arbitrárias do cérebro durante a fase crônica da toxoplasmose. **(B)** Número de cistos contados em 30 campos a partir da coloração de hematoxilina/eosina. **(C)** Fotomicrografias representativas do cérebro dos grupos WT e IL-32 γ TG durante a infecção crônica. Foi realizada coloração de hematoxilina/eosina. As setas amarelas indicam os cistos e as setas pretas indicam os infiltrados inflamatórios. Barra de escala: 100 μ m. Análises estatísticas feitas pelo teste de *Mann Whitney* (* $p < 0,05$).

5.4 IL-32 γ ATUA SOBRE O PARASITISMO DURANTE A TOXOPLASMOSE CRÔNICA.

Para verificar se a IL-32 γ tem influência no parasitismo durante a toxoplasmose aguda e crônica, cópias de DNA genômico de *T. gondii* foram quantificadas em diferentes tecidos no oitavo e trigésimo dia de infecção. Não foram observadas diferenças significativas no parasitismo entre os camundongos WT e IL-32 γ TG durante a fase aguda da infecção por *T. gondii* (8 dias). Os tecidos analisados foram intestino delgado (Fig. 7A), pulmão (Fig. 7B) e fígado (Fig. 7C). No entanto, os camundongos IL-32 γ TG foram mais suscetíveis durante a fase crônica. Os camundongos transgênicos apresentaram uma carga parasitária maior do que os camundongos WT no cérebro (30 dias após a infecção) (Fig. 7D). Esta diferença entre o parasitismo no cérebro dos animais transgênicos e WT também pode ser observada na fotomicrografia da imuno-histoquímica no cérebro (Fig. 8E e 8F).

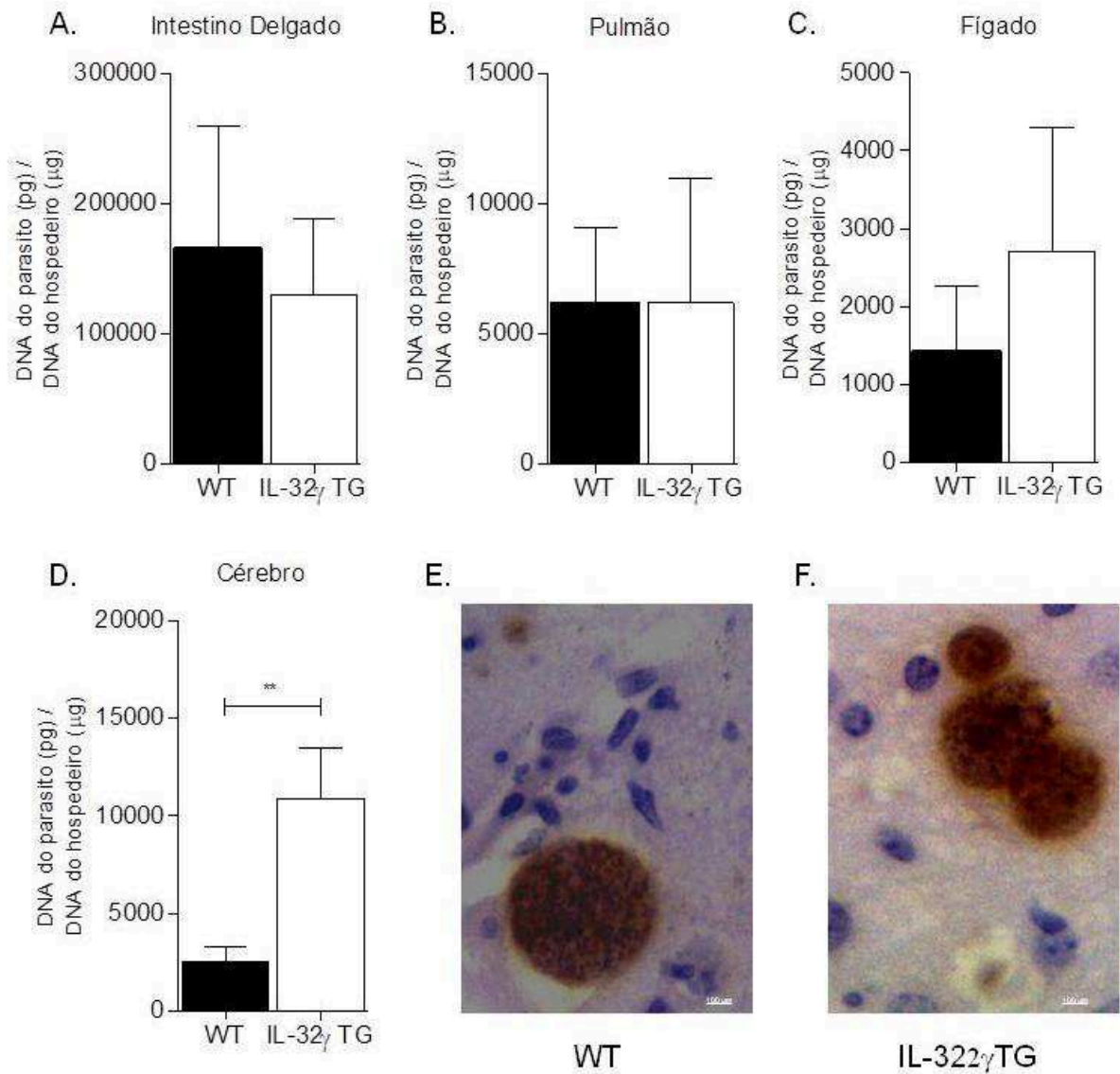


Fig. 7: Análise do parasitismo tecidual durante as fases aguda e crônica da toxoplasmose. Foi feita a dosagem do parasitismo por qPCR no intestino delgado (A), pulmão (B) e fígado (C), para análise da fase aguda. Análises estatísticas feitas pelo teste de *Mann Whitney*. Para análise do parasitismo na infecção crônica foi feito a dosagem por qPCR do cérebro (D). Análises estatísticas feitas pelo teste de *T Student's*. (E) e (F) Fotomicrografias representativas do cérebro de camundongos WT e IL-32 γ TG, respectivamente, utilizando a técnica de imunohistoquímica. Barra de escala: 100 μ m.

Discussão



6. DISCUSSÃO

A toxoplasmose é causada pelo protozoário intracelular *Toxoplasma gondii*. As infecções primárias em indivíduos imunocompetentes geralmente são limitadas e assintomáticas, podendo apresentar sintomas como febre, mal-estar e linfadenopatia, regressando espontaneamente (JONES *et al.*, 1999). Em indivíduos imunocomprometidos e neonatos, este parasita podem causar encefalite graves e até a morte (WEISS *et al.*, 1995). Com o objetivo de prevenir a propagação da infecção é crucial compreender a modulação da resposta imune gerada pelo parasita, assim como a participação de moléculas do hospedeiro na resistência à infecção (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Considerando que a IL-32 γ foi descrita como uma interleucina que desempenha um papel na imunidade do hospedeiro e age como possível mediador no controle de lesões tegumentares causadas por *Leishmania (V.) braziliensis* (GALDINO *et al.*, 2014), e também influencia a imunidade e o controle de outras infecções causadas por microorganismos intracelulares como o HIV (RASOOL *et al.*, 2008) e *Mycobacterium tuberculosis* (BAI *et al.*, 2015), este estudo teve como objetivo investigar o papel da IL-32 γ humana durante a infecção aguda e crônica pelo *T. gondii*.

A interleucina humana 32 γ é uma citocina pró-inflamatória que induz outras citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-8 e IL-6) e aumenta a produção de iNOS e NO via ativação de NF-kB (NAM *et al.*, 2014). Em camundongos, as células dendríticas da medula óssea tratadas com rhIL-32 γ induzem a produção de IL-12 e IL-6 contribuindo para os perfis Th1 e Th17 (JUNG *et al.*, 2011). Estudos demonstraram a importância das citocinas pró-inflamatórias na morbidade e controle da infecção por *T. gondii*. Apesar de controlar a infecção pelo *T. gondii*, um estudo realizado com ratos mostrou que a superprodução de TNF, IFN- γ e IL-12 aumentou o *score* de morbidade dos animais (GAZZINELLI *et al.*, 1996). Sugerimos no nosso trabalho que a presença de IL-32 γ induziu outras citocinas pró-inflamatórias, o que justifica o aumento da morbidade de animais transgênicos durante as infecções aguda e crônica.

Nossos resultados sugerem que a IL-32 γ não interferiu a infecção durante a fase aguda uma vez que não foram observadas alterações no *score* inflamatório e parasitismo nos tecidos durante a infecção aguda de *T. gondii*. Embora o

parasitismo não tenha apresentado diferença significativa durante a infecção aguda, houve aumento do parasitismo no cérebro, durante a fase crônica. Os mecanismos de formação de cistos foram descritos anteriormente e está relacionado à capacidade do parasita evadir a resposta imune do hospedeiro, migrando para os tecidos esqueléticos e cardíacos ou sistema nervoso central (SNC). Nesses tecidos, os taquizoítos invadem as células hospedeiras e se diferenciam em cistos contendo bradizoítos, mantendo uma replicação lenta, determinando a fase crônica da infecção (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). O alto parasitismo cerebral observado nos camundongos IL-32 γ TG pode estar relacionado a uma migração maior ou mais rápida do parasita para o cérebro, na tentativa de evadir o sistema imunológico (GAZZINELLI *et al.*, 1996).

Outro importante fator que pode estar relacionado à um maior parasitismo cerebral durante a fase crônica, pode ser explicada pelo fato de que os camundongos transgênicos não possuem expressão de IL-32 γ de maneira homogênea em todos os tecidos. Há uma menor expressão de IL-32 γ no cérebro do que nos outros tecidos estudados (CHOI *et al.*, 2009), analisando por este lado a IL-32 γ pode estar controlando o parasitismo tecidual nos camundongos transgênicos e como mecanismo de evasão o parasito pode ter migrado de maneira mais rápida ou maior para o cérebro.

Na presença de IL-32 γ , há um aumento nos números de cistos no SNC de camundongos. Recentemente, os distúrbios neurais causados por *Toxoplasma gondii* ganharam importância no cenário científico. Estudos têm demonstrado que a presença de *T. gondii* no SNC está relacionada a vários transtornos de saúde mental, incluindo depressão, esquizofrenia, outros distúrbios neurais e até tentativas de suicídio (YOLKEN; DICKERSON; FULLER TORREY, 2009; HSU; GROER; BECKIE, 2014; COCCARO *et al.*, 2016). Em humanos, a presença do parasita e os distúrbios mentais foram relacionados pelo aumento da citocina IFN- γ . Apesar de ser importante no controle da infecção crônica, o IFN- γ diminui a produção de serotonina no cérebro através da depleção de triptofano (HSU; GROER; BECKIE, 2014). Outros estudos trazem que níveis de imunoglobulina G (IgG) contra *T. gondii* estão relacionados a um alto nível de agressividade em humanos (COCCARO *et al.*, 2016). Pesquisas de ratos mostram evidências de que o parasita pode mudar o comportamento de roedores infectados, aumentando o risco de predação. Isso

favorece o ciclo de vida completo de *T. gondii* permitindo a transmissão do hospedeiro intermediário para o hospedeiro felino definitivo (GONZALEZ *et al.*, 2007; VYAS *et al.*, 2007; LAMBERTON; DONNELLY; WEBSTER, 2008).

Por modular uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IFN- γ e TNF, a IL-32 γ também pode atuar sobre a imunidade adquirida, uma vez que essas citocinas são responsáveis também pela quimiotaxia de linfócitos TCD4+ e TCD8+ (SON *et al.*, 2014). Esse presente estudo nos mostra que embora a IL-32 γ possa atuar sobre a imunidade adquirida, modulando a produção de anticorpos, não houve uma diferença durante a produção de IgG total e suas subclasses para antígenos específicos do *Toxoplasma gondii*, mostrando que a IL-32 γ não exerce função na imunidade adaptativa na toxoplasmose.

O presente estudo propõe que a interleucina 32 γ humana desempenhe um importante papel na infecção pelo *Toxoplasma gondii*, aumentando a morbidade dos camundongos ao longo da infecção e atuando sobre o aumento do parasitismo cerebral na infecção crônica.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos no presente estudo a partir do uso de animais IL-32 γ TG conclui-se que:

- ✓ A IL-32 γ atua na morbidade dos camundongos durante a toxoplasmose;
- ✓ A IL-32 γ propicia o parasitismo cerebral durante a infecção crônica pelo *T. gondii*;
- ✓ Não houve uma diferença na sobrevivência dos animais IL-32 γ comparados com os animais WT;
- ✓ A IL-32 γ não atuou no parasitismo tecidual durante a infecção aguda;
- ✓ Não houve diferença na inflamação e na produção de anticorpos entre os animais IL-32 γ e os animais WT.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a interleucina 32 γ humana propicia o aumento da morbidade durante toda a infecção e do parasitismo cerebral durante a infecção crônica da toxoplasmose.

REFERÊNCIAS:

ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 162-170, 2005.

<https://doi.org/10.1038/nri1547> PMID:15662369

ANDRADE, W. A. et al. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Cell Host & Microbe**, v. 13, n. 1, p. 42-53, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.003> PMID:23290966 PMCid:PMC3552114

ARAUJO-ANDRADE, C. et al. Detection of the presence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in human colostrum by Raman spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 12, n. 3, 2007.

<https://doi.org/10.1117/1.2749740> PMID:17614714

BAI, X. et al. Human IL-32 expression protects mice against a hypervirulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 16, p. 5111-5116, 2015.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1424302112> PMID:25820174 PMCid:PMC4413346

BAI, X. et al. IL-32 expression in the airway epithelial cells of patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease. **International immunology**, v. 23, n. 11, p. 679-691, 2011.

<https://doi.org/10.1093/intimm/dxr075> PMID:22033195 PMCid:PMC3203680

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. 133, n. Pt 4, p. 421-432, 2006.

<https://doi.org/10.1017/S0031182006000539> PMID:16762097

BICHET, M et al. The toxoplasma-host cell junction is anchored to the cell cortex to sustains parasite invasive force. **BioMed Central Biology**, v. 12, n. 1, p. 773, 2014.

<https://doi.org/10.1186/s12915-014-0108-y>

CARVALHO, F. R. et al. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 8, p. 1265-1271, 2008.

<https://doi.org/10.1128/CVI.00069-08> PMID:18562566 PMCid:PMC2519308

CHOI, J. et al. Identification of the most active interleukin-32 isoform. **Immunology**, v. 126, n. 4, p. 535-542, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02917.x> PMID:18771438 PMCid:PMC2673365

COCCARO, E. F. et al. *Toxoplasma gondii* infection: relationship with aggression in psychiatric subjects. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 77, n. 3, p. 334-341, 2016.

<https://doi.org/10.4088/JCP.14m09621> PMID:27046307

CORREA, D. et al, Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 651-660, 2007.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00982.x> PMID:18042171

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **The journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1129-1137, 2007.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1129> PMID:17617606

DOS SANTOS, J. C. et al. Cytokines and microbicidal molecules regulated by IL-32 in THP-1-derived human macrophages infected with New World *Leishmania* species. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005413, 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005413> PMID:28241012 PMCid:PMC5344527

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

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005> PMID:15567579

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-Induced Toxoplasmosis in Cats. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 155-177, 1972.

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

<https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267> PMID:9564564 PMCid:PMC106833

DUNAY, I. R.; SIBLEY, L. D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 461-466, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.04.008> PMID:20537517 PMCid:PMC2922417

DUPONT, C. D. et al. Parasite fate and involvement of infected cells in the induction of CD4+ and CD8+ T cell responses to *Toxoplasma gondii*. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 4, p. E1004047, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004047> PMID:24722202 PMCid:PMC3983043

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, p. 791-813, 2012.

<https://doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3> PMID:22955326 PMCid:PMC3498595

DZIERSZINSKI, F.; NISHI, M.; OUKO, D. S. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 4, p. 992-1003, 2004.

<https://doi.org/10.1128/EC.3.4.992-1003.2004> PMID:15302832 PMCid:PMC500887

GALDINO, H. et al. Interleukin 32 γ (IL-32 γ) is highly expressed in cutaneous and mucosal lesions of American Tegumentary Leishmaniasis patients: association with tumor necrosis factor (TNF) and IL-10. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 249, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-249> PMID:24884781 PMCid:PMC4026597

GAZZINELLI, R. T. et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 2, p. 798-805, 1996.

PMid:8752931

GOMES, R. S. et al. IL-32 γ promotes the healing of murine cutaneous lesions caused by *Leishmania braziliensis* infection in contrast to *Leishmania amazonensis*. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 336, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2268-4> PMID:28709468 PMCid:PMC5513196

GONZALEZ, L. E. et al. *Toxoplasma gondii* infection lower anxiety as measured in the plus-maze and social interaction tests in rats: a behavioral analysis. **Behavioural brain research**, v. 177, n. 1, p. 70-79, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.012> PMID:17169442

HEGAB, S. M; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 3, n. 2, p. 84-105, 2003.

<https://doi.org/10.1007/s10238-003-0011-2> PMID:14598184

HEINHUIS, B. et al. Inflammation-dependent secretion and splicing of IL-32 γ in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 12, p. 4962-4967, 2011.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1016005108> PMID:21383200 PMCID:PMC3064318

HO-YEN, D. O. Infection in the immunocompetent. In **Toxoplasmosis: A Comprehensive Clinical Guide** (eds Joynson D. H. M., Wreghitt T. G.), Cambridge, 2001.

<https://doi.org/10.1017/CBO9780511527005.006>

HSU, P.; GROER, M.; BECKIE, T. New findings: Depression, suicide, and *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of the American Association of Nurse Practitioners**, v. 26, n. 11, p. 629-637, 2014.

<https://doi.org/10.1002/2327-6924.12129> PMID:24715687

INESS, E. A. et al. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 246-251, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200018>

JONES, J. L. et al. Surveillance for AIDS-defining opportunistic illnesses, 1992-1997. **Archives of Dermatology**, v. 135, n. 8, p. 897-902, 1999.

<https://doi.org/10.1001/archderm.135.8.897>

JUNG, C.; LEE, C. Y.; GRIGG, M. E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 285-296, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.004> PMID:15003490

JUNG, M. Y. et al. IL-32 γ induces the maturation of dendritic cells with Th1- and Th17-polarizing ability through enhanced IL-12 and IL-6 production. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 12, p. 6848-6859, 2011.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003996> PMID:21551364

KANG, J. et al. A pro-inflammatory cytokine interleukin-32 β promotes the production of an anti-inflammatory cytokine interleukin-10. **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 2, 2009.

KANG, J. et al. Interaction network mapping among IL-32 isoforms. **Biochimie**, v. 101, p. 248-251, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.01.013> PMID:24472437

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, p. 149-156, 2002.

KHAWAR, M. B.; ABBASI, M.H.; SHEIKH, N. IL-32: a novel pluripotent inflammatory interleukin, towards gastric inflammation, gastric cancer, and chronic rhino sinusitis. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.

- KIM, S. J. et al. Interleukin-32 γ transgenic mice resist LPS-mediated septic shock. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 24, n. 8, p. 1133-1142, 2014.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1404.04012> PMID:24743568
- KOBAYASHI, H. et al. Interleukin-32 β propagates vascular inflammation and exacerbates sepsis in a mouse model. **PLoS one**, v. 5, n. 3, p. e9458, 2010.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009458> PMID:20221440 PMCid:PMC2832764
- KONG, Y. et al. Detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid to *Toxoplasma gondii* by indirect latex agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Kisaengchunghak Chapchi**, v. 30, n. 2, p. 83-90, 1992.
<https://doi.org/10.3347/kjp.1992.30.2.83>
- LAMBERTON, P. H. L.; DONNELLY, C. A.; WEBSTER, J. P. Specificity of the *Toxoplasma gondii* - altered behaviour to definitive versus non-definitive host predation risk. **Parasitology**, v. 135, n. 10, p. 1143-1150, 2008.
<https://doi.org/10.1017/S0031182008004666> PMID:18620624
- LIESENFELD, O. et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 174-178, 1997.
 PMID:8968902 PMCid:PMC229533
- LIU, L. et al. rROP2(186-533): A novel peptide antigen for detection of IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. **Foodborne Pathogens Diase**, v. 9, n. 1, p. 7-12, 2012;
- LIU, Q. et al. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 292, 2015.
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6> PMID:26017718 PMCid:PMC4451882
- MANGER, I. D.; HEHL, A. B.; BOOTHROYD, J. C. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 6, p. 2237-2244, 1998.
 PMID:9573113 PMCid:PMC108187
- MILLER, C. M. et al. The Immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 23-39, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.002> PMID:18775432
- MINEO, J. R. et al. Research on IgM anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by using a reverse immunoenzymatic technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 6, 1986.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46651986000100002> PMID:3489972
- MOMBRO, M. et al. Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection. **European Journal Pediatrics**, v. 162, n. 10, p. 703-706, 2003.
<https://doi.org/10.1007/s00431-003-1248-1> PMID:12856175
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- MOSCHEN, A. R. et al. Interleukin-32: A new pro-inflammatory cytokine involved in hepatitis C virus-related liver inflammation and fibrosis. **Hepatology**, v. 53, n. 6, p. 1819-1829, 2011.

<https://doi.org/10.1002/hep.24285> PMID:21381070

NAM, S. et al. Inhibition of IL-32 signaling by bamboo salt decreases pro-inflammatory responses in cellular models of allergic rhinitis. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 9, p. 939-948, 2014.

<https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2996> PMID:25089715 PMCID:PMC4152781

NOLD-PETRY, C. A. et al. IL-32 promotes angiogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 2, p. 589-602, 2014.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202802> PMID:24337385 PMCID:PMC4007307

OTA, K. et al. Synthetic double-stranded RNA induces interleukin-32 in bronchial epithelial cells. **Experimental lung research**, v. 41, n. 6, p. 335-343, 2015.

<https://doi.org/10.3109/01902148.2015.1033569> PMID:26151454

PARLOG, A.; SCHLÜTER, D.; DUNAY, I. R. *Toxoplasma gondii*-induced neuronal alterations. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 3, p. 159-170, 2015.

<https://doi.org/10.1111/pim.12157> PMID:25376390

RASOOL, S. T. et al. Increased level of IL-32 during human immunodeficiency virus infection suppresses HIV replication. **Immunology letters**, v. 117, n. 2, p. 161-167, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.01.007> PMID:18329725

ROBERTT- GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264- 296, 2012.

PMid:22491772 PMCID:PMC3346298

SANECKA, A. FRICKEL, E. M. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 678-689, 2012.

<https://doi.org/10.4161/viru.22833> PMID:23221473 PMCID:PMC3545950

SCHENK, M. et al. NOD2 triggers an interleukin-32–dependent human dendritic cell program in leprosy. **Nature medicine**, v. 18, n. 4, p. 555, 2012.

<https://doi.org/10.1038/nm.2650> PMID:22447076 PMCID:PMC3348859

SIBLEY, L. D. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2749-2761, 2009.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0087> PMID:19687043 PMCID:PMC2865090

SILVA, N. M.; VIEIRA, J. C. M.; 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> PMID:19501090

SON, M. H. et al. IL-32 γ induces chemotaxis of activated t cells via dendritic cell-derived ccl5. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 450, n. 1, p. 30-35, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.052> PMID:24882804

STURGE, C. R. YAROVINSKY, F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 8, p. 3090-3097, 2014.

<https://doi.org/10.1128/IAI.01722-14> PMID:24866795 PMCID:PMC4136216

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022> PMID:20303872

VYAS, A. et al. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 15, p. 6442-6447, 2007.

WEISS, L. M. et al. A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 150–157, 1995.

<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1995.tb01556.x> PMID:7757057

XU, Q. et al. Increased interleukin-32 expression in chronic hepatitis B virus-infected liver. **Journal of Infection**, v. 65, n. 4, p. 336-342, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.05.009> PMID:22687868

YOLKEN, R. H.; DICKERSON, F. B.; FULLER TORREY, E. *Toxoplasma* and schizophrenia. **Parasite immunology**, v. 31, n. 11, p. 706-715, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01131.x> PMID:19825110

ZEPP, J. A. et al. Protection from RNA and DNA viruses by IL-32. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 7, p. 4110-4118, 2011.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000081> PMID:21346229

ZOU, Y. et al. NKP30-B7-H6 interaction aggravates hepatocyte damage through up-regulation of interleukin-32 expression in hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0134568, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134568> PMID:26241657 PMCID:PMC4524618