

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Inibição farmacológica da via de sinalização Notch preserva parcialmente as populações de células caliciformes e Paneth no intestino delgado e melhora os aspectos histopatológicos no fígado e pulmão no modelo experimental de toxoplasmose aguda

Marisol Patricia Pallete Briceño

Uberlândia

Julho de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Inibição farmacológica da via de sinalização Notch preserva parcialmente as populações de células caliciformes e Paneth no intestino delgado e melhora os aspectos histopatológicos no fígado e pulmão no modelo experimental de toxoplasmose aguda

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

Discente: M.Sc. Marisol Patricia Pallete Briceño

Orientadora: Profa. Dra. Neide Maria Silva

Uberlândia

Julho de 2019

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

B849i
2019 Briceño, Marisol Patricia Pallette, 1988
Inibição farmacológica da via de sinalização Notch preserva parcialmente as populações de células caliciformes e Paneth no intestino delgado e melhora os aspectos histopatológicos no fígado e pulmão no modelo experimental de toxoplasmose aguda [recurso eletrônico] / Marisol Patricia Pallette Briceño. - 2019.

Orientadora: Neide Maria Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1261>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. *Toxoplasma gondii*. 3. Toxoplasmose. 4. Receptores Notch. I. Silva, Neide Maria, 1961, (Orient.) 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 122 do PPIPA				
Data:	Vinte e seis de julho de dois mil e dezenove	Hora de início:	8 h e 30 min	Hora de encerramento:	12h e 35min
Matrícula do Discente:	11523IPA003				
Nome do Discente:	Marisol Patricia Pallete Briceño				
Título do Trabalho:	Inibição farmacológica da via de sinalização Notch preserva parcialmente as populações de células caliciformes e Paneth no intestino delgado e melhora os aspectos histopatológicos no fígado e pulmão no modelo experimental de toxoplasmose aguda				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunopatologia e Alergia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Alterações imunopatológicas em infecções por protozoários, com ênfase em <i>Toxoplasma gondii</i> , bactérias e helmintos				

Reuniu-se na sala 2B216 do Bloco 2B, presencialmente e por conferência web, Campus Umuarama, na Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas assim composta: Titulares: Prof. Dr. Emerson Soares Bernardes - IPEN (conferência web); Dr. Paulo Victor Czarnewski Barenco - NBIS (conferência web); Dra. Ester Cristina Borges Araujo - ICBIM/UFU (presencial); Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria - ICBIM/UFU (presencial) e Profa. Dra. Neide Maria da Silva - ICBIM/UFU (presencial), orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Neide Maria da Silva apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao (à) discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a).

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Neide Maria da Silva, Professor(a) do Magistério**



Superior, em 26/07/2019, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Rogério de Faria, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/07/2019, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ester Cristina Borges Araujo, Técnico(a) de Laboratório**, em 26/07/2019, às 15:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emerson Soares Bernardes, Usuário Externo**, em 26/07/2019, às 15:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Victor Czarnewski Barenco, Usuário Externo**, em 26/07/2019, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1422091** e o código CRC **C28890F8**.

Dedico este trabajo a mis padres, José y Ruth,
por darme el ejemplo de nunca desistir de mis objetivos
y siempre defender mis ideas

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado forças para cumprir este objetivo tão desejado desde que finalizei a minha graduação.

Agradeço à professora Neide Maria Silva por me aceitar no seu laboratório, por me orientar sabiamente assim como a me incentivar a melhorar cada dia.

Ao pessoal do laboratório de imunopatologia por me ajudar sempre nos meus experimentos e pelo apoio incondicional em todo momento.

A Yusmaris pela amizade verdadeira, pelas conversações fora e dentro do laboratório, pela ajuda desde o início até o fim do doutorado, obrigada por me fazer sentir em casa. A Layane pelos inúmeros conselhos desde que cheguei no Brasil, por me ajudar e me acalmar sempre. A Ester por ter se convertido em uma amiga incrível nestes últimos dois anos, pela paciência nos ensaios de biologia molecular e pela ajuda neste trabalho. Ao Marcos Paulo por ser super detalhista e por me ajudar e auxiliar nos experimentos. A Mariele (ne) pela ajuda desde sempre e a sua paciência incondicional comigo. A Camila por me escutar por horas e pela amizade. Todos vocês foram peças fundamentais para conseguir concluir este período da minha vida acadêmica.

Aos professores da área de Histologia e aos professores do PPIPA por compartilhar os seus conhecimentos desde sempre.

Ao professor Paulo Rogério de Faria por ter me escolhido para fazer o mestrado e por me ajudar desde cheguei no Brasil. Obrigada desde sempre.

Às secretarias do PPIPA, Lucélia e Luceleide, pela paciência e ajuda nestes últimos meses nos tramites e documentação para a conclusão desta etapa.

Aos meus amigos em Uberlândia, Gustavo, Luann, Nayana, Gabi, Luma, Moments e Gabriel, pela convivência, viagens, cumplicidade e amizade verdadeira.

A minha família e amigos no Peru, por sempre estar comigo e torcendo pelo meu sucesso.

Saudades sempre!

Ao Alex por me apoiar nos últimos dois anos e por estar ao meu lado em cada momento.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIACÕES

% - porcentagem

μg - Microgramas

μl – Microlitros

μm - Micras

μM – Micromolar

mM – Milimolar

mg - Miligramas

ng – Nanogramas

AB - Alcian blue

APCs – células apresentadoras de antígeno

BMMs – Macrófagos derivados de medula óssea

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

DAPT - N - [N (3,5) -difluorofenacetil] -L-Alanil] -S-fenilglicina t-butil ester

DBZ - Dibenzazepina

Dll - Delta

DMSO - Dimetilsulfxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DSL – Ligantes transmembrana Delta e Jagged

DSS – Sulfato sdico de dextrana

GSI – Inibidores de gama secretase

GTPases - Guanosina-trifosfatases

H&E - Hematoxilina e eosina

IFN- γ – Interferon gama

IgG – Immunoglobulina G

IL-1 β – Interleucina-1-beta

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL – 6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL – 10 – Interleucina 10

IL – 17A – Interleucina 17A

kDa – Kilodalton

LPS - Lipopolissacarídeo
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
NICD – Domínio intracelular Notch
PAS - Ácido periódico de Schiff
PBS – Solução salina tamponada com fosfatos
qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa
rIFN- γ – Interferon gama recombinante
SDS - Dodecil sulfato de sódio
TACE – Enzima conversora de TNF- α
Tbx21 – Fator de transcrição *box* T 21
TGF- β – Fator transformador de crescimento tipo beta
Th1 – T *helper* 1
Th2 – T *helper* 2
TLR - Receptor tipo Toll
TMCH - Hiperplasia transmissível de cólon murino
TNF – α – Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	9
Figura 2: Elementos da Via de sinalização Notch.	22
Figura 3: Expressão dos genes da via Notch no intestino delgado de camundongos previamente tratados com DBZ e infectados com <i>T. gondii</i>.	38
Figura 4: Características clínicas de animais previamente tratados com DBZ e infectados com <i>T. gondii</i>.	40
Figura 5: Características morfológicas do intestino delgado de camundongos tratados previamente com DBZ infectados com <i>T. gondii</i>.	41
Figura 6: Quantificação do parasitismo tecidual e expressão do mRNA de SAG-1 no intestino delgado de camundongos C57BL/6 tratados com o inibidor da γ-secretase e infectados com <i>T. gondii</i>.	43
Figura 7: Distribuição das células caliciformes produtoras de mucinas ácidas no intestino delgado de camundongos previamente tratados com DBZ e infectados com <i>T. gondii</i>.	45
Figura 8: Quantificação das células caliciformes produtoras de mucinas neutras no intestino delgado de camundongos previamente tratados com DBZ e infectados com <i>T. gondii</i>.	47
Figura 9: Quantificação das células de Paneth e expressão do mRNA de peptídeos antimicrobianos em camundongos C57BL/6 tratados com o inibidor de γ-secretase e infectados com <i>T. gondii</i>.	49
Figura 10: Parâmetros inflamatórios e carga parasitária no pulmão e no fígado relacionados à modulação da via Notch em camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. gondii</i>.	51
Figura 11: Níveis séricos de citocinas de camundongos C57BL/6 tratados com DBZ e infectados com <i>T. gondii</i>.	52
Tabela 1: Grupos experimentais	31
Tabela 2: Sequências de primers	35

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 O agente infeccioso: <i>Toxoplasma gondii</i>	14
1.2 Transmissão e Ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	15
1.3 Aspectos Epidemiológicos da Toxoplasmose	16
1.4 Resposta imune intestinal na infecção por <i>T. gondii</i>	18
1.5 A via de sinalização Notch	21
1.6 O protagonismo da via Notch no desenvolvimento do trato gastrointestinal	23
1.7 Relação entre a via de sinalização Notch e a resposta imunológica	26
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Manutenção e cuidados dos animais de experimentação	30
4.2 Organismo infeccioso	30
4.3 Delineamento experimental	30
4.4 Determinação do encurtamento do intestino delgado	32
4.5 Imuno-histoquímica para detecção de parasitos teciduais e análises histológicas gerais	32
4.6 Avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA)	33
4.7 Mensuração e análises de citocinas no soro de animais experimentais por "Cytometric Beads Array" (CBA)	35
4.8 Análises estatísticas	36
5 RESULTADOS	37
5.1 A infecção por <i>T. gondii</i> modula a expressão dos genes <i>Hes1</i> e <i>Math1</i> no intestino delgado de camundongos C57BL/6	37
5.2 Os parâmetros clínicos são mantidos em animais previamente tratados com DBZ e infectados com <i>T. gondii</i>	39
5.3 O tratamento prévio com o inibidor DBZ preserva o comprimento intestinal em camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	40

5.4	A proliferação de <i>T. gondii</i> é independente da inibição farmacológica da via Notch no intestino delgado de camundongos C57BL/6 tratados previamente com DBZ	42
5.5	O tratamento prévio com DBZ preserva as células caliciformes produtoras de mucinas ácidas em camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	44
5.6	A inibição da via de sinalização Notch preserva o número de células de Paneth durante a infecção oral com <i>T. gondii</i>	48
5.7	A inibição da via de sinalização Notch reduz a infecção sistêmica em camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. gondii</i>	50
5.8	A inibição da via Notch aumenta a produção de citocinas IL-17A e IL-4 e mantém os níveis de IFN-γ, TNF, IL-6, IL-10 e IL-2 em camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÕES	64
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
9.	ANEXOS	77

RESUMO

A via de sinalização Notch desempenha um papel crucial no destino celular entre as espécies mediante a regulação da manutenção, proliferação e diferenciação das células tronco intestinais dando origem às linhagens secretoras ou de absorção. Processos imunológicos como a diferenciação das células T e o processos inflamatórios também estão relacionados com a via Notch. O modelo murino infectado com o protozoário *Toxoplasma gondii* é considerado um protótipo relevante para o estudo da resposta inflamatória e imunológica. Embora a via Notch seja crucial para a resposta imune, sabe-se pouco sobre sua relação com infecções por protozoários, como no caso da toxoplasmose. O objetivo deste estudo foi avaliar a inibição da via Notch pela dibenzazepina (DBZ), um inibidor da γ -secretase, utilizando o modelo experimental de toxoplasmose aguda. Para esta proposta, camundongos C57BL/6 foram tratados com DBZ por 4 dias antes da infecção oral com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e o intestino delgado, fígado e pulmões foram analisados para o estudo do parasitismo, parâmetros imunológicos e histológicos. Ao estudar o intestino delgado, a infecção oral por *T. gondii* diminuiu a expressão de mRNA de *Hes1* e *Math1*, mas não de *Notch1*. Quando os animais foram tratados com DBZ e infectados, o tamanho do intestino delgado foi preservado, os números de células calciformes e de Paneth foram parcialmente preservados quando comparados com o grupo apenas infectados; porém o parasitismo e características histopatológicas não foram alterados entre ambos os grupos. De forma contrária, no fígado e nos pulmões, o tratamento prévio com DBZ diminuiu o parasitismo e as alterações inflamatórias nos animais infectados. A inibição da via Notch não afeta a elevada produção de citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 sistemicamente induzidas pela infecção com *T. gondii* apesar de se observar um aumento de IL-17 e IL-4. Nossos resultados mostraram que a infecção por *T. gondii* afeta a expressão de mRNA do gene alvo da via Notch, *Hes1*, e também afeta o gene *Math1*, porém *Notch1* não é atingido. Além disso, a inibição da via Notch interfere em parâmetros parasitológicos e inflamatórios dependendo do órgão analisado, sendo a inibição do complexo enzimático γ -secretase da via Notch benéfico para os órgãos extra intestinais, tais como pulmão e fígado.

Palavras chaves: *Toxoplasma gondii*, Notch, Gama-secretase

ABSTRACT

Notch signaling pathway plays a crucial role in cellular fate across species by regulating the intestinal stem cell fate for maintenance, proliferation and differentiation to secretory or absorptive lineage. Immune processes as differentiation of Th cell and inflammation process are also related to the Notch pathway. *Toxoplasma gondii* infection mice model is considered a relevant prototype for study inflammatory and immune response. Although Notch pathway is crucial for immune response, little is known about its relation with protozoan infections as toxoplasmosis. The aim of this study was to evaluate the inhibition of Notch pathway by dibenzazepine (DBZ), a γ -secretase inhibitor, using an acute toxoplasmosis mice model. For this purpose, C57BL/6 mice were treated 4 days before oral infection with cysts of ME-49 *T. gondii* strain and the small intestine, liver and lungs were analyzed for parasitism, immunological and histological parameters. By studying the small intestine, *T. gondii* infection impaired the *Hes1* and *Math1*, but not *Notch1* expression. When animals were treated with DBZ and infected with *T. gondii*, small intestine length was preserved, goblet and Paneth cell numbers were partially recovered when compared only with the infected group, however the parasitism and pathology were not altered. On the contrary, in the liver and lungs, the previous DBZ-treatment diminished the parasitism and inflammatory alterations in the infected animals. Inhibition of the Notch pathway did not interfere on the high production of IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 systemically induce by *T. gondii* infection, still IL-17 and IL-4 were increase. Our results highlight that *Hes1* and *Math1* are targets of *T. gondii* infection, without affecting Notch-1 expression in the small intestine. Moreover, Notch pathway inhibition results in different parasitological and inflammatory outcomes depending on the organ analyzed, being beneficial the inhibition of the γ -secretase complex for the extra intestinal organs, like lungs and liver.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Notch, Gamma-secretase

1. INTRODUÇÃO

1.1 O agente infeccioso: *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, protozoário do filo Apicomplexa, é um parasito intracelular obrigatório de distribuição ubiqüitária, sendo responsável por 10 – 50% de infecções humanas (MILLER *et al.*, 2009; EGAN *et al.*, 2012). Neste aspecto, uma das características mais importantes deste protozoário é sua habilidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros intermediários, desde aves até mamíferos, incluindo humanos (PAREDES-SANTOS *et al.*, 2013). Entretanto, apenas os felídeos (gêneros *Felis* e *Lynx*) são os hospedeiros definitivos deste parasito, sendo os únicos que eliminam um dos estágios infecciosos que são os oocistos junto com as fezes. Durante a infecção felina aguda, um gato pode excretar vários milhões de oocistos por dia (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; MONTOYA; ROSSO, 2005).

O ciclo biológico de *T. gondii* inclui três formas infecciosas: taquizoítos, com reprodução assexuada; bradizoítos, que formam cistos teciduais e também apresentam reprodução assexuada e esporozoítos, contidos dentro dos oocistos (DUBEY *et al.*, 1998). Enquanto o ciclo assexuado acontece nos hospedeiros intermediários, o ciclo sexuado de *T. gondii* ocorre exclusivamente nas células do epitélio intestinal do felídeo (FRENKEL *et al.*, 1970). A rápida divisão dos taquizoítos pode ser responsável pelos sinais clínicos da toxoplasmose, favorecendo a disseminação do parasito a quase todos os órgãos e tecidos do hospedeiro (POSSENTI *et al.*, 2013). Essa elevada replicação começa a ser controlada por uma potente resposta imune do hospedeiro que atinge o parasito para que posteriormente se diferencie em bradizoíto (BLADER *et al.*, 2015) Os bradizoítos permanecem dentro de cistos intracelulares, protegidos dos mecanismos de defesa do sistema imune, sendo os principais componentes da fase crônica da toxoplasmose (WEISS; KIM, 2011). Os oocistos, outra forma resistente de *T. gondii*, são altamente infecciosos quando esporulados e podem permanecer viáveis por vários anos contaminando o ambiente (MITTAL; ICHHPUJANI, 2011).

Os aspectos ubiqüitários, infecciosos, epidemiológicos, patológicos e de resposta imune do hospedeiro, caracterizam este parasito como um parasito peculiar e muito importante em termos de saúde pública mundial.

1.2 Transmissão e Ciclo biológico de *T. gondii*

O principal mecanismo de transmissão de *T. gondii* ocorre mediante a ingestão de bradizoítos encistados nos tecidos de hospedeiros cronicamente infectados ou esporozoítos contidos dentro de oocistos esporulados (ALVARADO-ESQUIVEL; CAMPILLO-RUIZ; LIESENFELD, 2013). A partir deste ponto, segue-se um complexo ciclo biológico, englobando tanto reprodução sexuada, que ocorre nas células do epitélio intestinal dos felídeos, quanto reprodução assexuada, que ocorre nos tecidos dos hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000) (Figura 1).

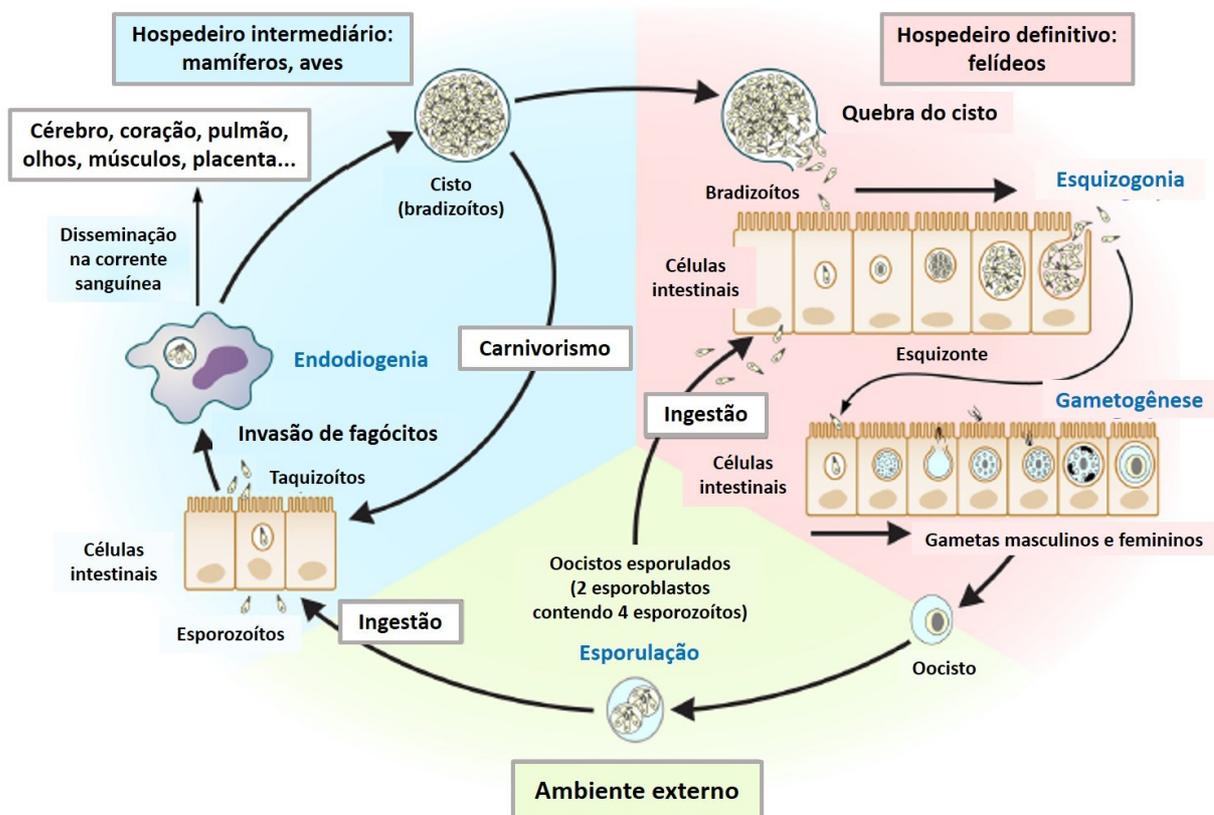


Figura 1: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

Mostram-se as três formas infectantes de *T. gondii*: os bradizoítos contidos nos cistos, os oocistos e os taquizoítos; junto com as formas de infecção e replicação nos hospedeiros definitivos e intermediários. Fonte: ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012, com modificações.

O estágio sexuado inicia-se quando os felídeos ingerem oocistos presentes no meio ambiente ou cistos contendo bradizoítos. Diversas enzimas proteolíticas do estômago e do intestino delgado destroem a parede do oocisto ou cisto, liberando as formas infectantes, os esporozoítos ou bradizoítos respectivamente. Estas invadem os enterócitos do felídeo, onde

passam por um processo de conversão para taquizoítos, caracterizados por uma intensa multiplicação mediante o processo de endodiogenia, e para esquizontes que posteriormente se diferenciam em merozoítos, o primeiro estágio do ciclo sexual de *T. gondii* (DUBEY, 1998).

Em seguida, dentro da célula infectada ocorre a formação dos gametas masculinos e femininos mediante o processo da gametogênese. Com a fertilização, os oocistos formados são liberados pelo rompimento dos enterócitos e excretados como formas não esporuladas nas fezes dos felídeos. O processo de esporulação ocorre alguns dias após liberação no meio externo, levando em conta condições favoráveis de temperatura, oxigenação e umidade. Em um período de um a cinco dias, os oocistos passam a ter dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada e se tornam infectantes no meio ambiente (DUBEY; FRENKEL, 1972). A excreção dos oocistos pelos felídeos começa de três a sete dias após a ingestão dos cistos teciduais e pode se prolongar por mais de 20 dias. Os oocistos podem infectar uma grande variedade de hospedeiros intermediários quando estes ingerem água ou alimentos contaminados. Nesta fase do ciclo, os felídeos também são susceptíveis, porém com uma baixa eficiência infecciosa (JONES; DUBEY, 2010).

Quando um hospedeiro intermediário ingere oocistos, os esporozoítos são liberados, penetram o epitélio intestinal, onde se diferenciam em taquizoítos. Estes, por sua vez, replicando-se rapidamente por endodiogenia dentro de qualquer célula e se disseminam facilmente por todo o organismo. Como resultado da conversão de taquizoítos a bradizoítos, os cistos teciduais se formam entre sete a dez dias após a infecção, e podem permanecer no hospedeiro intermediário indefinidamente, predominando no cérebro, olhos e músculos (MONTROYA; ROSSO, 2005).

A ingestão dos cistos teciduais por outro hospedeiro intermediário se dá por intermédio do consumo de carne crua ou malcozida. A partir disto, a parede dos cistos se rompe quando passa pelo trato digestivo, causando a liberação de bradizoítos. Estes irão infectar o epitélio intestinal do novo hospedeiro, e assim se diferenciam em taquizoítos disseminando-se por todo organismo (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; TURNER *et al.*, 2013).

1.3 Aspectos Epidemiológicos da Toxoplasmose

T. gondii é um parasito de ampla distribuição geográfica, abrangendo uma grande diversidade de hospedeiros. Isso também se reflete em termos de genótipos. Neste caso, a distribuição de diferentes genótipos apresenta um evidente padrão geográfico no que se refere

às distintas cepas de parasitos encontrados nos hemisférios Norte e Sul. Assim, vem sendo extensamente relatado que as cepas da América do Sul são originadas de recombinações frequentes, sendo, portanto, mais diversificadas em relação à América do Norte e Europa. Nestas regiões, as cepas são agrupadas em três linhagens clonais, ou seja, com baixa heterogeneidade genética, designadas em tipo I, II, III (SIBLEY *et al.*, 2009; SU *et al.*, 2012). Entretanto, cepas clonais podem se expandir para regiões da América do Sul resultando na presença de novas linhagens com elevado potencial patogênico (SIBLEY; AJIOKA, 2008).

Independente da cepa, o hospedeiro humano pode se infectar com *T. gondii* pela ingestão ou manipulação de carne crua ou malcozida. Normalmente a carne suína apresenta um alto índice de contaminação com cistos teciduais, constituindo uma importante fonte de infecção. Água e vegetais também podem ser importantes fontes de contaminação pela presença de oocistos excretados por gatos infectados (JONES; DUBEY, 2010; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

Neste aspecto, um estudo realizado no México demonstrou elevada circulação de *T. gondii* em porcos de fazendas; aproximadamente 50% dos animais estudados apresentou um estado de infecção crônica sugerindo uma constante exposição do homem ao parasito. Dentro deste contexto, a fonte de reinfecção de animais, que são criados para o consumo humano, pode ser causada pelo contínuo contato com oocistos de *T. gondii* presentes em fazendas, tanto em fontes de água, como no solo, os quais são encontrados frequentemente em sistemas de produção suína (ORTEGA-PACHECO *et al.*, 2013). É importante destacar que a expansão da agricultura nos últimos 11 mil anos, influenciou sobre a distribuição biogeográfica de das cepas de *T. gondii* e na virulência delas; estabelecendo um ciclo de transmissão doméstico entre o gato e o camundongo (SHWAB *et al.*, 2018).

Fatores climáticos também podem afetar a viabilidade do oocisto no meio ambiente. Em países tropicais existe uma elevada prevalência de toxoplasmose devido ao clima quente e úmido, o que favorece a sobrevivência prolongada do oocisto. Além dos fatores ambientais, fatores antropomórficos também são relevantes para se entender aspectos epidemiológicos da toxoplasmose. Neste caso, hábitos humanos podem explicar porque existe uma grande variação na soroprevalência da doença no homem, em relação aos hábitos diários: cozimento dos alimentos, hábitos higiênicos, tipos de alimentos consumidos e a higienização dos mesmos. Também incluem os hábitos culturais, sociais e econômicos e interferência em ambientes silvestres, cujo resultado é o contato do hospedeiro com cepas até então desconhecidas

(CARME *et al.*, 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). A este fator, deve ser ressaltada a ampla gama de hospedeiros intermediários de *T. gondii* incluindo hospedeiros silvestres, cujo contato com o homem pode resultar em casos de toxoplasmose (CARME *et al.*, 2009).

Os aspectos socioeconômicos podem se relacionar com uma elevada frequência da infecção por *T. gondii*. Assim, Bahia-Oliveira e colaboradores (2003) constataram que, na cidade de Campos dos Goytacazes, norte do estado do Rio de Janeiro – Brasil, 84% da população de baixo nível socioeconômico apresentou anticorpos IgG anti - *T. gondii*, em comparação com 23% da população soropositivos de elevado nível socioeconômico. No começo deste ano foi publicado um estudo epidemiológico sobre a vulnerabilidade socioeconômica associada à exposição de *T. gondii* no estado Paraná, sudeste do Brasil, onde novamente foi determinado que a distribuição espacial de casos soropositivos para toxoplasmose foi maior em áreas suburbanas de comunidades de baixa renda, ausência de água potável e construções vulneráveis (MAREZE *et al.*, 2019).

Dubey e colaboradores (2012) acreditam que o Brasil, com uma alta prevalência de infecção por *T. gondii* em animais e humanos, seja um espaço de investigação para grupos internacionais pesquisarem a epidemiologia e controle da toxoplasmose. Como foco importante, são necessárias medidas preventivas, tais como higiene, possível imunização com o desenvolvimento de uma vacina para a toxoplasmose e educação sanitária, que deveriam começar nas escolas do ensino fundamental, sabendo-se que 50% das crianças de 10 anos, em várias localidades do Brasil, estão expostas a *T. gondii*.

1.4 Resposta imune intestinal na infecção por *T. gondii*

Quando o hospedeiro tem contato com *T. gondii* via oral, o primeiro encontro do sistema imune do hospedeiro com o parasito é na mucosa intestinal. O sistema imune da mucosa intestinal é composto por uma camada de células epiteliais que separa a lâmina própria do lúmen intestinal (MOWAT, 2003). Neste epitélio, encontra-se uma população heterogênea de células T denominadas linfócitos intraepiteliais. Estes linfócitos contribuem com a homeostase e defesa do ambiente intestinal, mantendo a integridade da barreira epitelial. A lâmina própria é composta por miofibroblastos, células T, células B, macrófagos e células dendríticas. Além dessas células, as placas de Peyer desempenham um importante papel de proteção. Essas placas são agregados dos nódulos linfóides que formam parte do tecido linfóide associado às mucosas, e ajudam no transporte de antígenos e patógenos sendo considerados sensores imunes do

intestino (JUNG; HUGOT; BARREAU, 2010; CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011).

Após a ingestão dos oocistos ou cistos contendo bradizoítos, a parede do oocisto ou cisto é digerida no estômago; os esporozoítos ou bradizoítos atravessam o epitélio do intestino delgado e penetram na lâmina própria, onde estes se diferenciam em taquizoítos em aproximadamente 24 horas (DUBEY, 2007).

Entre 24 a 48 horas, os parasitos disseminam para os sítios extraintestinais onde macrófagos e células dendríticas infectadas pelos parasitos podem ser mediadores dessa disseminação (COURRET *et al.*, 2006; BIERLY *et al.*, 2008). Os macrófagos inflamatórios desempenham um importante papel microbicida nesta etapa de infecção; o recrutamento destas células depende da expressão de receptores de quimiocinas (CCR2), resultando na morte do parasito (DUNAY *et al.*, 2008). Além disso, a destruição do vacúolo parasitóforo depende de enzimas do tipo GTPases, relacionadas com a imunidade dependentes de IFN- γ (FENTRESS *et al.*, 2010).

O início da resposta imune da mucosa intestinal engloba o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) como profilina e glicosil fosfoinositol (EGAN *et al.*, 2009). Em modelos murinos, a ativação de células dendríticas da mucosa mediante receptores do tipo Toll (TLRs: TLR11, TLR2 e TLR4) ocorre após a apresentação de antígeno e ativação de células T nos tecidos linfoides. Entretanto, na ausência de TLR11, a produção de IFN- γ por células T têm um efeito mínimo (BENSON *et al.*, 2009). Por isso, sugere-se que a translocação de bactérias tem um papel importante para iniciar uma resposta imune contra o parasito, atuando como um adjuvante na ativação da resposta imune. Em camundongos, na ausência de flora intestinal, não ocorre produção de citocinas secretadas por células T após infecção com *T. gondii*; mas a administração oral de lipopolissacarídeos bacterianos, reverte este efeito (HEIMESAAT *et al.*, 2006; BENSON *et al.*, 2009).

A via de interação entre células T CD4⁺ da lâmina própria, linfócitos intraepiteliais e enterócitos atua no sentido de manter a homeostase intestinal e promover a proteção durante a infecção por *T. gondii*. Entretanto, em camundongos infectados com o parasito, linfócitos intraepiteliais CD8 $\alpha\beta$ produzem IFN- γ , desencadeando uma atividade citotóxica contra os enterócitos e macrófagos infectados (CHARDÈS *et al.*, 1994).

As populações de linfócitos intraepiteliais também realizam atividades de tipo imunoreguladoras no intestino durante a infecção por *T. gondii*. As células T CD4⁺ da lâmina própria trabalham em conjunto com as células epiteliais do intestino para a produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (MENNECHET *et al.*, 2002). Uma importante função dos linfócitos intraepiteliais é modular a resposta pro-inflamatória para proteger o intestino contra o parasito. Isto ocorre pela produção do fator de crescimento transformador tipo β (TGF- β) pelos linfócitos intraepiteliais CD8 $\alpha\beta$, que regulam negativamente a expressão de IFN- γ pelas células T CD4⁺ da lâmina própria (BUZONI-GATEL *et al.*, 2001, MENNECHET *et al.*, 2004).

Em modelos de infecção oral com cistos de *T. gondii*, após 8 dias de infecção, ocorre uma resposta imune inflamatória de tipo Th1 que é caracterizada por uma produção elevada de IFN- γ , TNF, IL-12, IL-18 e óxido nítrico (NO). Este conjunto de moléculas leva a danos imunopatológicos no intestino delgado com uma necrose massiva (MUÑOZ *et al.*, 2009). Sabe-se que no modelo murino, a neutralização de IL-18 diminui parcialmente a resposta imunopatológica de tipo Th1 no intestino delgado, porém a presença de moderadas quantidades de IFN- γ no soro desses animais foi considerado como uma defesa contra a replicação do patógeno (VOSENKAMPER *et al.*, 2004). Além de promover a produção de IFN- γ , IL-18 é indispensável para a produção de IL-22 no íleo durante a infecção por *T. gondii* (MUÑOZ *et al.*, 2015). O papel fisiológico de IL-18 e IL-22 na defesa do hospedeiro contra *T. gondii* também deve ser considerado essencial em virtude da complexa regulação entre ambas as citocinas durante o controle da infecção intestinal.

A citocina IL-17A é considerada uma molécula importante para o recrutamento de neutrófilos no sítio de infecção em camundongos infectados com cistos de *T. gondii* na fase aguda (KELLY *et al.*, 2005; GUITON *et al.*, 2010; MORODA *et al.*, 2017). Camundongos knockout para IL-17A infectados com um alto inóculo de cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* tiveram uma grave necrose na mucosa do intestino delgado, especificamente no íleo, sendo estas alterações histopatológicas similares ao grupo de camundongos de tipo selvagem (MUÑOZ *et al.*, 2009). Em outro estudo também utilizando camundongos deficientes para IL-17A e infectados com *T. gondii* houve um aumento da expressão de mRNA de IFN- γ no íleo e linfonodos mesentéricos; e aumento de HSP70 de *T. gondii*, uma proteína característica de taquizoítos, no íleo, linfonodos, fígado e baço (MORODA *et al.*, 2017). No mesmo estudo, o tratamento desses camundongos com a citocina recombinante IL-17A diminuiu os níveis de HSP70 e IFN- γ nos mesmos tecidos mencionados (MORODA *et al.*, 2017).

1.5 A via de sinalização Notch

A formação de um organismo a partir de uma única célula até obter uma estrutura tridimensional multicelular com características únicas de tamanho e forma depende da organização de genes que conduzem o desenvolvimento de cada célula desse organismo. A via de sinalização Notch é um sistema de sinalização conhecido por regular o desenvolvimento embrionário e a morfogênese nos metazoários (KOPAN, 2012). Esta via representa um tipo de comunicação direta entre células que é essencial para regular a proliferação, apoptose e para definir o destino das células progenitoras ou células tronco durante o desenvolvimento dos diferentes tecidos do organismo (GRIDLEY, 2007). O primeiro relato sobre a existência genética de Notch foi descrito por John S. Dexter (1914) quem trabalhou com a mosca da fruta da espécie *Drosophila melanogaster* e descreveu uma característica fenotípica hereditária nas asas denominada como "notched wings" ou asas cortadas. Posteriormente, Thomas Morgan descreveu mutações dos alelos do gene Notch em *D. melanogaster* o que levaria à morte do embrião e aprofundou o estudo na característica fenotípica das asas cortadas baseado no trabalho de Dexter (MORGAN, 1917). O gene Notch foi inicialmente clonado em *Drosophila* e posteriormente em *Caenorhabditis elegans* (ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 1981), *Xenopus* (COFFMAN; HARRIS; KINTNER, 1990), camundongo (DEL AMO *et al.*, 1992) e humano (ELLISEN *et al.*, 1991).

O gene Notch codifica um receptor transmembrana de passagem única com um peso molecular de 300 kDa sendo ativado por ligantes transmembrana (revisado por ARTAVANIS, 1995; BIGAS; ESPINOZA, 2012). Na maioria dos vertebrados existem 4 receptores Notch (Notch 1-4) sendo o receptor de tipo 1 e 2 homólogos ao de *Drosophila* (BIGAS; ESPINOZA, 2012). Referente ao nível proteico, Notch está dividido em uma parte extracelular com repetições similares a fatores de crescimento epidérmico (EGF) e uma parte intracelular contendo 7 repetições de tipo anquirina e domínios de ativação variável (revisado por GORDON; ARNETT; BLACKLOW, 2008) (Figura 2B). Notch é transcrito por uma molécula única de RNA mensageiro que se traduz a um polipeptídeo, sendo posteriormente clivado no aparelho de Golgi via uma enzima convertase similar a furina (BLAUMUELLER *et al.*, 1997; LOGEAT *et al.*, 1998).

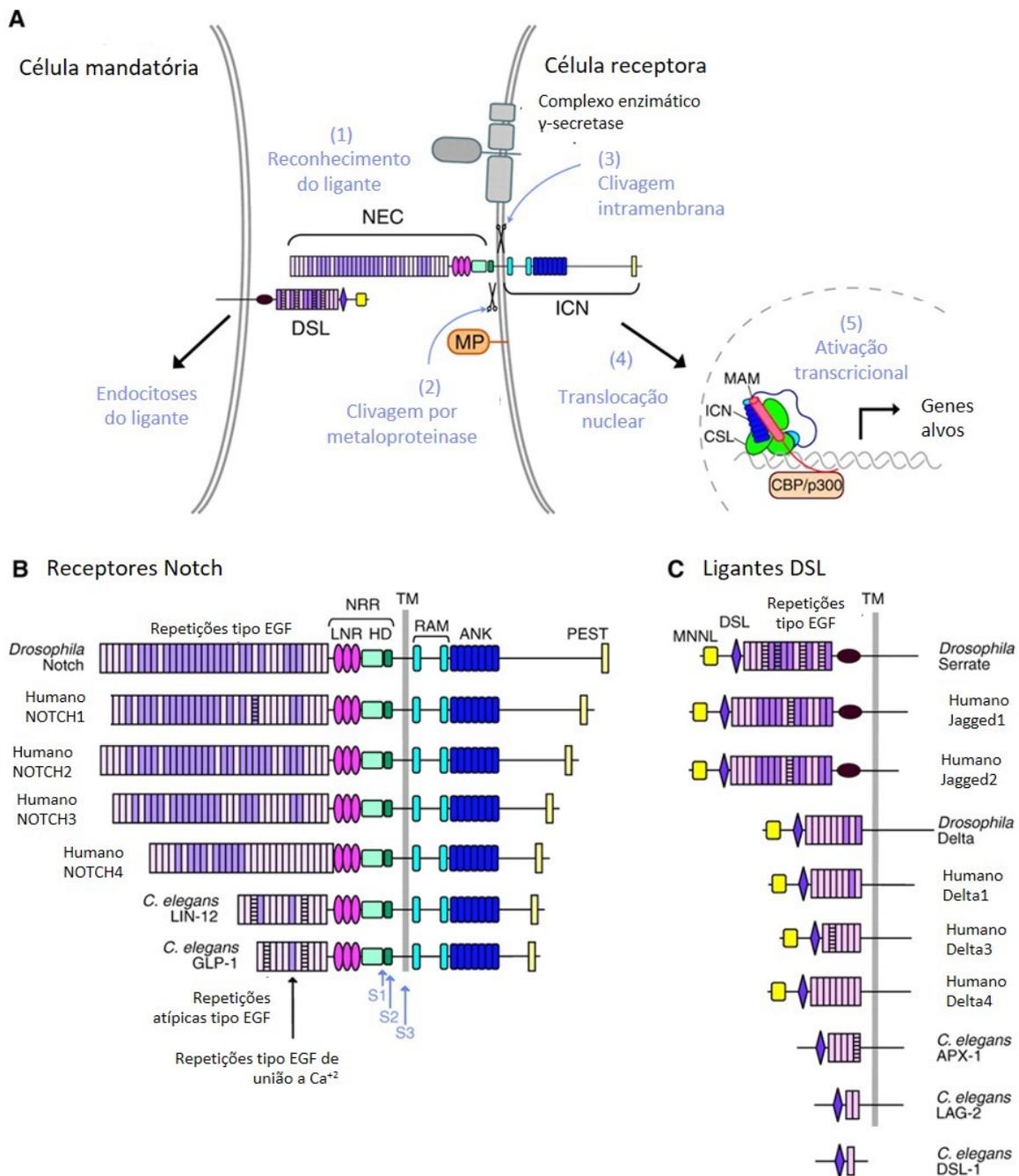


Figura 2: Elementos da Via de sinalização Notch.

(A) Modelo dos principais eventos na via de sinalização Notch. O sinal de ativação da via começa pelo acoplamento do ligante com o receptor (1) e levam à clivagem pela metaloprotease (MP) ADAM10 (TACE-Enzima conversora de TNF- α) no local S2 (2). Este passo proteolítico permite a clivagem do receptor Notch pelo complexo γ -secretase no sítio S3 dentro do domínio transmembrana (3) e a liberação do domínio intracelular (ICN) de membrana. ICN se transloca para o núcleo (4), onde formará parte de um complexo de ativação transcricional junto com as proteínas de união a DNA (CSL) e o coativador *Mastermind* (MAM), induzindo a transcrição de genes alvos (5). (B, C) A organização dos domínios de receptores Notch (B) e ligantes da família DSL (C) na mosca *Drosophila*, humano e ao verme *C. elegans*. TM, domínio transmembrana; NEC, subunidade extracelular de Notch. Fonte: GORDON; ARNETT; BLACKLOW, 2008, com modificações.

O processo final de formação do receptor transmembrana é composto por dois fragmentos: um domínio extracelular e outro domínio que inclui uma parte transmembrana e intracelular, sendo associados ambos os fragmentos por pontes bissulfeto (GORDON; ARNETT; BLACKLOW, 2008). Em mamíferos, a ativação fisiológica dos receptores acontece com a interação com os ligantes transmembrana Delta e Jagged caracterizados pelo domínio DSL (WENG, 2004; revisado por CHILLAKURI *et al.*, 2012) (Figura 2A).

Em mamíferos, foram identificados três genes tipo Delta (Dll), designados Dll-1, -3 e -4. Para os ligantes de tipo Jagged, existem dois genes: Jagged-1 e Jagged-2, os quais foram isolados de humanos, ratos e camundongos (MIYAMOTO; WEINMASTER, 2008; KOPAN, 2012) (Figura 2C).

A união do receptor com seu respectivo ligante implica duas rupturas proteolíticas no receptor Notch. A primeira ruptura é catalisada por uma metaloproteinase ADAM10; e a segunda ruptura é mediante uma γ -secretase, um complexo enzimático que contém várias outras proteínas como presenilina, nicastrina, PEN2 e APH1 (KIMBERLY *et al.*, 2003). Esta segunda ruptura libera o domínio intracelular Notch (NICD), sendo transportada ao núcleo para ligar-se com uma proteína de união ao DNA, chamada CSL, representado pelos fatores de transcrição CBF-1/RBP-J κ em mamíferos, Su(H) em *Drosophila*, e Lag-1 em *Caenorhabditis elegans*; e um coativador *Mastermind* (Mam) para promover a transcrição de genes alvos (JEFFRIES; ROBBINS; CAPOBIANCO, 2002; BRAY, 2006).

1.6 O protagonismo da via Notch no desenvolvimento do trato gastrointestinal

No trato gastrointestinal, a ativação da via Notch é considerada importante para manter a homeostase das células tronco colunares e a formação do tubo digestivo durante o desenvolvimento embrionário (KIM *et al.*, 2011). No estômago, tanto os receptores Notch-1 como Notch-2 têm um papel primordial na manutenção das células tronco, onde a sua inibição com dibenzazepina (DBZ), um inibidor do complexo γ -secretase, ou com anticorpos contra os receptores mostrou uma diminuição da proliferação e favoreceu a diferenciação das células tronco gástricas na área do antro e corpo no estômago (revisado por DEMITRACK; SAMUELSON, 2016; GIFFORD *et al.*, 2017).

Organoides derivados de células gástricas de camundongo mostraram uma baixa eficiência de crescimento celular parasse estabelecer quando a via estava inibida, e teve um aumento da eficiência do crescimento celular com a via ativa (DEMITRACK *et al.*, 2015). Sem

dúvida, a ativação crônica da via Notch pela presença constitutiva de NICD em células progenitoras do corpo e antro do estômago sendo positivas para *Lgr5* levou à formação de pólipos hiperplásicos (KIM; SHIVDASANI, 2011b; DEMITRACK *et al.*, 2015). Isto nos leva a considerar que a via de sinalização Notch é crucial na regulação da proliferação no epitélio estomacal.

A inibição da Notch aumenta a diferenciação celular no antro e corpo do estômago, sendo atingidas as células endócrinas, células mucosas da superfície e no interior da glândula gástrica (DEMITRACK *et al.*, 2015; GIFFORD *et al.*, 2017). Quando se aborda a diferenciação celular no estômago, a via atinge de forma similar em todas as linhagens celulares, o que ocorre de maneira diferente no epitélio intestinal.

No intestino delgado, a via de sinalização Notch também controla a manutenção, proliferação e diferenciação das células tronco intestinais nas linhagens intestinais de absorção ou secreção (YANG *et al.*, 2001; STANGER *et al.*, 2005). Um balanço na via Notch é claramente necessário para a manutenção das células tronco intestinais e a produção de células absorptivas, e sequencialmente para a presença de células com uma baixa ativação da via Notch que adotam um perfil secretor. Sabe-se que o precursor dos enterócitos é independente de *Math1* (YANG *et al.*, 2001) e que a expressão do gene *Hes1* é uma característica importante nessas células com uma atividade alta da via Notch (JENSEN *et al.*, 2000). Por outro lado, as células calciformes, enteroendócrinas e as células de Paneth derivam de um precursor que expressa *Math1* (YANG *et al.*, 2001; ZECCHINI *et al.*, 2005).

Em condições de homeostase, a via Notch é necessária para a manutenção das células tronco intestinais nas criptas (revisado por DEMITRACK; SAMUELSON; 2016). Sabe-se que a presença de diferentes protagonistas da via de sinalização Notch como os ligantes Dll1 e Dll4 são expressos nas células secretoras intestinais para conservar as células tronco intestinais. Nas células de Paneth localizadas na base das criptas do intestino e em células similares às células calciformes no cólon, existe uma expressão significativa do ligante transmembrana Dll4, sendo assim consideradas como suporte para as células tronco gastrointestinais (SATO *et al.*, 2011; ROTHENBERG *et al.*, 2012). Também a presença do ligante transmembrana Dll1 é uma característica das células com perfil secretório e que estas células têm como precursor uma célula tronco intestinal com uma alta expressão do marcador *Lgr5* (VAN ES *et al.*, 2012).

O papel da via de sinalização Notch no controle da diferenciação e proliferação das células intestinais foi também confirmado pela utilização de camundongos transgênicos. A

deleção de *Hes1*, que é o gene alvo mais importante da via Notch, foi associado com um aumento significativo de células epiteliais intestinais de tipo secretoras (JENSEN *et al.*, 2000). Outro ensaio inativando especificamente CSL, o complexo proteico de união ao DNA, teve como resultado a completa perda da proliferação de células progenitoras nas criptas intestinais, de modo que elas continuaram o processo de diferenciação em células calciformes (VAN ES *et al.*, 2005).

A inibição farmacológica mediante o uso de inibidores do complexo enzimático γ -secretase ou emprego de inativação gênica da via Notch leva a uma perda completa da proliferação das células tronco intestinais nas criptas, sendo diferenciadas a células calciformes pós mitóticas, ou seja, essas células perdem a capacidade de divisão celular (VAN ES *et al.*, 2010). O impacto de altas doses de DBZ, sobre aspectos histológicos e diferenciação celular do intestino delgado de ratos da linhagem Wistar demonstra um cenário dose depende; com o intestino delgado e grosso distendido, apoptoses das células nas criptas do intestino, metaplasia das células calciformes, perda da estrutura das vilosidades intestinais e aumento da secreção de muco no lúmen intestinal (SEARFOSS *et al.*, 2003; MILANO *et al.*, 2004).

A administração de DBZ em camundongos foi associado com a diminuição da expressão de mRNA de *Hes1* (VAN ES *et al.*, 2010; AHMED *et al.*, 2018) e um aumento da expressão de *Math1* (SEARFOSS *et al.*, 2003; MILANO *et al.*, 2004). Um estudo relevante sobre a inibição da via Notch utilizando DBZ tem descrito as consequências da inibição em aspectos de diferenciação e proliferação das células tronco intestinais da base das criptas (VANDUSSEN *et al.*, 2012). *Olfm 4*, um marcador característico de células tronco teve uma diminuição da expressão após o tratamento com DBZ, sugerindo ser dependente da via Notch. Além disso, houve um acúmulo de células duplamente positivas para marcadores *Muc2* e *Mmp7*, característicos de células calciformes e de Paneth, respectivamente. Isto indica que a via de sinalização Notch tem um papel crucial no término da diferenciação celular e da manutenção das células calciformes e de Paneth (VANDUSSEN *et al.*, 2012).

Por outro lado, os níveis de expressão da via Notch têm que ser adequados para uma ótima proliferação das células tronco gastrointestinais. Kim e colaboradores (2011), identificaram defeitos graves no desenvolvimento de fibroblastos subepiteliais e uma diminuição do comprimento do intestino em camundongos com uma deleção do gene RBP-Jk. Além disso, a atividade constitutiva de Notch também produz uma rápida perda de células

mesenquimatosas e da organogênese. Isto sugere que é necessária uma atividade balanceada da via Notch para ter uma organização apropriada das células intestinais.

1.7 Relação entre a via de sinalização Notch e a resposta imunológica

Diversos estímulos podem induzir uma resposta de tipo Th1 como por exemplo vírus da dengue (LI *et al.*, 2015), vírus sincicial respiratório (RUDD *et al.*, 2007), lipopolissacarídeo (LPS) (AMSEN *et al.*, 2004) e CpG (SUN; KRAWCZYK. PEARCE, 2008); assim provocando um aumento da expressão dos ligantes Dll4 e Dll1 nas células apresentadoras de antígenos (APCs). Sabe-se que as APCs estimuladas utilizam a via Notch para dar começo à diferenciação das células T CD4+ *naive* em células T *helper* 1 (Th1) caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Tbx21 e produção da citocina IFN- γ (MINTER *et al.*, 2005; BAILIS *et al.*, 2013), e T *helper* 2 (Th2) caracterizados pela produção de IL-4 e do fator de transcrição Gata3 (AMSEN *et al.*, 2007; FANG *et al.*, 2007).

Camundongos geneticamente modificados em células T, as quais são deficientes do receptor Notch-1 e Notch-2 tiveram células Th1 com baixa produção de IFN- γ durante a infecção com *Leishmania major* (AUDERSET *et al.*, 2012). Sem dúvida, camundongos transgênicos knockout para o fator de transcrição RBPjk demonstraram que a atividade e produção de citocinas das células Th1 não foi atingida (AMSEN *et al.*, 2007). Estes estudos sugerem que os mecanismos que regulam a diferenciação das células Th1 são independentes da via Notch com relação ao fator de transcrição RBPjk.

No modelo experimental de encefalite autoimune, camundongos C57BL/6 foram tratados com GSI antes da indução da encefalite e durante o percurso da doença e foi observado que a diferenciação das células Th1 foi prejudicada (MINTER *et al.*, 2005). Existem alguns trabalhos onde foi relatado que a inibição da via de sinalização Notch está envolvida com o desenvolvimento de inflamação intestinal crônica (ROBINSON *et al.*, 2017), colite crônica (OBATA *et al.*, 2012) e morte por apoptose das células-tronco na base das criptas no intestino delgado (VANDUSSEN *et al.*, 2012; TAKADA *et al.*, 2016).

Agonistas de TLR2 (Pam3Cys), TLR4 (LPS) e TLR7-TLR8 (R848) induzem de forma efetiva a expressão de genes alvos canônicos da via Notch, *HES1* e *HEY1* em macrófagos (HU *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2012); sendo que TLR4 aumenta a ativação da via Notch no epitélio do intestino delgado (SODHI *et al.*, 2012). Além disso, os mecanismos mediados por Notch-1 em mastócitos derivados da medula óssea induzem a expressão de genes relacionados com

MHC de classe II (NAKANO *et al.*, 2011) e a morte de tipo autofágica em macrófagos (LI *et al.*, 2016).

Embora existam trabalhos com resultados diversos, é necessário destacar a importância dos ligantes Dll1 e Dll4 na indução da resposta imune de tipo Th1. Contudo, acredita-se que o papel da via de sinalização Notch ainda não é completamente claro em termo de diferenciação celular de tipo Th1 e a resposta imune Th1 propriamente dita.

Baseando-nos na revisão bibliográfica do presente trabalho, até o momento, os poucos trabalhos relacionando processos inflamatórios causados por patógenos e o protagonismo da via de sinalização Notch abrem uma porta para o estudo do protozoário *T. gondii* e a toxoplasmose de fase aguda para assim ter uma melhor compreensão da infecção e sua relação com a via de sinalização Notch.

2 JUSTIFICATIVA

A indução e modulação da via Notch durante um processo de infecção já foi descrita para alguns poucos patógenos gastrointestinais como *Citrobacter rodentium*, *Lawsonia intracellularis* e *Ehrlichia chaffeensis*. Além disso, existem trabalhos descrevendo que a via de sinalização Notch está envolvida na resposta imune contra patógenos como *Cryptococcus neoformans* e *Leishmania major*.

A toxoplasmose é uma zoonose importante, de elevada transmissão e prevalência mundial causada pelo protozoário *T. gondii* cuja infecção ocorre inicialmente no intestino delgado, levando à quebra da barreira epitelial intestinal. No intestino delgado, as células epiteliais desempenham um papel fundamental de absorção de nutrientes e manutenção da homeostase intestinal. Considerando que a via Notch é necessária tanto para a homeostase, diferenciação celular e renovação do epitélio intestinal, no presente trabalho foi estudado, pela primeira vez, a relação da via de sinalização Notch na infecção oral com cistos de *T. gondii*. Além disso, as consequências do bloqueio farmacológico da via mediante o uso de dibenzazepina (DBZ), um inibidor do complexo enzimático γ -secretase, foram avaliadas no modelo murino de toxoplasmose aguda induzida por infecção oral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a influência da via de sinalização Notch na infecção oral por *T. gondii* em camundongos da linhagem C57BL/6 mediante o uso de dibenzazepina, um inibidor do complexo enzimático γ -secretase.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a expressão gênica pela quantificação de RNA mensageiro (mRNA) dos genes *Notch1*, *Hes1*, *Math1*, *Lyz1*, *Defa3*, *Def5* e *SAG1* em camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii* previamente tratados ou não com dibenzazepina.

Avaliar os parâmetros clínicos de camundongos C57BL/6 infectados oralmente com cistos de *T. gondii* tratados previamente com dibenzazepina.

Verificar o papel da dibenzazepina no comprimento do intestino delgado em camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii*.

Verificar o papel da dibenzazepina na quantidade de células caliciformes produtoras de mucinas neutras e ácidas, e de células de Paneth em camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii*.

Quantificar o parasitismo tecidual no intestino delgado, pulmão e fígado de camundongos C57BL/6 infectados oralmente com cistos de *T. gondii* tratados previamente com dibenzazepina.

Avaliar as características histopatológicas do intestino delgado, pulmão e fígado de camundongos C57BL/6 infectados oralmente com cistos de *T. gondii* tratados previamente com dibenzazepina.

Analisar e quantificar as citocinas séricas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , e IL-17A de camundongos C57BL/6 infectados oralmente com cistos de *T. gondii* tratados previamente com dibenzazepina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Manutenção e cuidados dos animais de experimentação

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com 8 a 10 semanas de idade, provenientes da Rede de Biotérios e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR). Durante todo o procedimento experimental, os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos específicos, com temperatura, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados, com livre acesso a água e ração.

Todos os procedimentos experimentais nos animais assim como os protocolos deste trabalho foram aprovados pelo Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo N° 088/15).

4.2 Organismo infeccioso

A cepa ME-49 de *T. gondii* foi utilizada para a infecção experimental neste trabalho. A manutenção da cepa foi feita via intraperitoneal em camundongos da linhagem Swiss utilizando 10 cistos. Um mês após a inoculação, o cérebro foi coletado, macerado em 1 mL de PBS para posterior quantificação dos cistos a fresco no microscópio de luz. Para os ensaios experimentais do presente trabalho, camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 ou 20 cistos de *T. gondii* em um volume final de 200 µl de PBS.

4.3 Delineamento experimental

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com 5µMol/kg/dia de dibenzazepina (DBZ - Calbiochem® EMD Millipore, Burlington, MA, EUA), inibidor do complexo enzimático γ -secretase, ou com o veículo [DMSO 0,001% em solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7.4)] durante 4 dias por via intraperitoneal (ip). Para analisar os efeitos do inibidor no animal logo após a finalização do tratamento e aos 8 dias após finalizado o tratamento, dois grupos de camundongos foram eutanasiados em diferentes tempos; sendo um primeiro grupo eutanasiado exatamente após a finalização do tratamento (4 dias), e um segundo grupo foi eutanasiado após 8 dias da finalização do tratamento com DBZ.

Fragmentos de íleo do intestino delgado de ambos os grupos mencionados acima foram processados para ensaios de qPCR. Estes grupos em particular foram considerados como controle para conhecer os níveis de expressão dos genes da via Notch, *Hes1*, *Math1* e *Notch1*,

antes de prosseguir com a avaliação dos grupos experimentais infectados oralmente com cistos de *T. gondii*.

Uma vez concluído o tratamento com DBZ por 4 dias, os camundongos foram infectados por via oral com 10 ou 20 cistos, dependendo dos ensaios (Tabela 1). Com 8 dias de infecção, os camundongos foram anestesiados com cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil) / xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) por via ip.

Tabela 1: Grupos experimentais

<i>Grupo experimental</i>	<i>Descrição</i>
<i>Não infectado (Veículo)</i>	Camundongos saudáveis, não infectados e tratados com o veículo
<i>Infectado (Veículo + T. gondii)</i>	Camundongos tratados com veículo por 4 dias e infectados
<i>Tratado com inibidor (DBZ)</i>	Camundongos tratados com o inibidor da γ -secretase por 4 dias
<i>Tratado com inibidor e infectado (DBZ + T. gondii)</i>	Camundongos tratados com o inibidor da γ -secretase por 4 dias e infectados

Para a obtenção do soro, amostras de sangue foram coletadas por meio de punção do plexo retro-orbital seguido de uma centrifugação a 500 x g durante 5 minutos e armazenadas a -80 °C para análise de citocinas. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para a coleta dos órgãos. O comprimento do intestino delgado foi mensurado e logo foi dividido em quatro porções (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo); e processado como "rolo suíço" para as análises histológicas. O fígado, os pulmões e o intestino delgado coletados foram fixados em formol tamponado a 10%, processados para inclusão em parafina e foram feitos cortes histológicos com uma espessura de 4 μ m no micrótomo RM 2125 (Reichert, Leica, Wetzlar, Alemanha). Além disso, separadamente, outro grupo de animais foi monitorado diariamente até o dia 30 após infecção para a avaliação da perda de peso, a taxa de sobrevivência e o escore de morbidade (BARTLEY *et al.*, 2006).

4.4 Determinação do encurtamento do intestino delgado

A porcentagem de encurtamento do intestino delgado (E) foi calculado de acordo com Muñoz e colaboradores (2009) seguindo a formula na qual \bar{X} representa a média do comprimento dos intestinos delgados de camundongos não infectados e L indica a média do comprimento dos intestinos delgados de camundongos infectados com 8 dias após infecção, multiplicado por 100 e dividido pela média do comprimento dos intestinos delgados não infectados (MUÑOZ *et al.*, 2009).

$$E = \frac{\bar{X} - L}{\bar{X}} \times 100$$

4.5 Imuno-histoquímica para detecção de parasitos teciduais e análises histológicas gerais

As porções de pulmão, fígado e intestino delgado fixadas em formol tamponado a 10% foram processadas para a inclusão em parafina e cortados no micrótomo para a sua posterior coloração dependendo da análise e tipo celular a ser avaliado. As células de Paneth foram contadas em 100 campos microscópicos por porção intestinal (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) em cortes corados com hematoxilina e eosina (H&E), totalizando 400 campos microscópicos por camundongo. Para a quantificação das células caliciformes foi usada a coloração com Alcian blue (AB - pH 2,5) e a coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) para diferenciar as células produtoras de mucinas ácidas e neutras respetivamente (SCHNEIDER *et al.*, 2017). As células caliciformes foram contadas por vilosidade intestinal em 10 campos microscópicos por porção intestinal, obtendo um total de 40 campos por camundongo. As análises foram feitas às cegas utilizando uma objetiva de 40 X de aumento no microscópio de luz.

O escore inflamatório foi avaliado em toda a seção tecidual do intestino delgado em cortes de tecido corados com H&E, como descrito anteriormente (BENEVIDES *et al.*, 2013) sendo representado como unidades arbitrárias: 0-2, leve; 2-4 moderado; 4-6 grave; e acima de 6, muito grave. As análises do escore inflamatório foram realizadas às cegas com objetiva de 10 X no microscópio de luz.

Os cortes histológicos dos pulmões e fígado foram corados com H&E para analisar a características histopatológicas dos órgãos. Imagens digitais do tecido pulmonar foram adquiridas mediante o microscópio Leica DM500 usando o programa Leica Application Suite

/ Versão 3.4.0. A porcentagem de área dos septos alveolares foi avaliada pela medida da área de espessamentos dos septos alveolares mediante o programa NIH ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). De cada pulmão, 10 campos representativos não-sobrepostos foram avaliados usando objetiva de 10 X. O número de focos inflamatórios no fígado foi quantificado em cortes histológicos, totalizando 40 campos por corte observados no microscópio de luz com uma objetiva de 10 X. Ambas das análises foram realizadas às cegas com o mínimo de cinco camundongos para cada grupo experimental.

Os parasitos teciduais foram detectados pela técnica de imuno-histoquímica seguindo o protocolo descrito anteriormente com algumas modificações (BARENCO *et al.*, 2014). Resumidamente, as lâminas com os cortes de tecidos desparafinados foram colocadas em uma câmara úmida e incubadas com peróxido de hidrogênio a 3% para bloquear a atividade da enzima peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito no micro-ondas por 7 minutos com tampão citrato (11mM - 0,21% em água destilada, pH 6). Para bloquear os sítios de ligação não específicos, os cortes foram incubados com leite desnatado a 0,3% (Molico; Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) em PBS a temperatura ambiente. Para a detecção dos parasitos, os cortes foram incubados com soro anti - *T. gondii* (1:100) proveniente de camundongos Swiss infectados com cistos da cepa ME-49 diluído em 0,01% de saponina e sendo incubados os cortes *overnight* a 4°C. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo IgG biotilado anti - camundongo (1:500) produzido em cabra (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) a 37°C por 1 hora. A sensibilidade da reação foi amplificada com o complexo avidina-biotina-peroxidase (1:100) (kit ABC, PK-4000 Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) a 37°C durante 30 minutos. A reação foi revelada com 0,03% de H₂O₂ junto com 3,3'-diaminobenzidina-tetracloridrato (DAB; Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Os cortes de tecido foram contra corados com hematoxilina de Harris, montados com lamínula e examinados no microscópio de luz usando uma objetiva de 40 X às cegas. O parasitismo tecidual foi avaliado pela contagem dos cistos e vacúolos parasitóforos em toda a secção de tecido dos pulmões, fígado e intestino delgado.

4.6 Avaliação da expressão de RNA mensageiro (mRNA)

A extração de RNA total foi realizada usando fragmentos congelados de íleo. Estas amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido para assim ser homogeneizadas em 1000 µL do reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 300 µL de clorofórmio e as amostras

foram agitadas por inversão durante 15 segundos, incubadas durante 3 minutos e centrifugadas a $12,000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . Logo, a fase aquosa (transparente) foi transferida para um tubo novo e foram adicionados $500 \mu\text{L}$ de isopropanol para a precipitação do RNA sendo incubada esta solução durante 10 minutos para depois ser centrifugada a $12,000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados $1000 \mu\text{L}$ de etanol a 75% diluído em água Mili-Q. Após agitação manual por 10 segundos, as amostras foram centrifugadas a $10,000 \times g$ por 5 minutos a 4°C . Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o pellet de RNA foi ressuscitado em $50 \mu\text{l}$ de água de injeção e as amostras foram acondicionadas a -80°C .

A concentração de RNA total foi mensurada no espectrofotômetro GeneQuant (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). Para a eliminação de resto de fitas simples ou duplas de DNA, cada amostra foi tratada com a enzima DNase I seguindo a instruções do fabricante (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando $1\mu\text{g}$ de RNA junto com o primer oligo (dT) diluído em água de injeção. A mistura foi aquecida a 70°C durante 5 minutos no termociclador Arktik Thermal Cycler (Thermo Scientific), colocados no gelo por 5 minutos e depois foram adicionados $11,5\mu\text{l}$ de uma solução contendo tampão de reação ImProm-II 1x, MgCl_2 3mM, mix de dNTPs 0,5 mM, a enzima transcriptase reversa ImProm-II TM (Promega, Madison, WI, EUA) e foi completado com água de acordo com as concentrações recomendadas pelo fabricante. Em seguida, a solução seguiu um ciclo de 5 minutos a 25°C , 60 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C no mesmo termociclador. Por fim, o cDNA foi diluído a uma concentração de $6\text{ng}/\mu\text{l}$ e as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Finalmente, o cDNA foi amplificado e quantificado no aparelho de PCR em tempo real ABI PRISM-7500 (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), utilizando o Master Mix SYBR® Green PCR (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, EUA) e primers específicos seguindo as instruções do fabricante (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências de primers

<i>Genes</i>	<i>Sequências</i>
<i>Notch1</i>	Fw - AGCAAGAAGAAGCGGAGAGAGC
	Rv - TGTCGTCCATCAGAGCACCATC
<i>Hes1</i>	Fw - GGAGAGGCTGCCAAGGTTTT
	Rv - GCAAATTGGCCGTCAGGA
<i>Math1</i>	Fw - ACATCTCCCAGATCCCACAG
	Rv - ACAACGATCACCACAGACCA
<i>Lisozima 1(Lyz1)</i>	Fw - GCCAAGGTCTACAATCGTTGTGAGTTG
	Rv - CAGTCAGCCAGCTTGACACCACG
<i>Defensina 3 (Defa3)</i>	Fw - CAGGCTGTGTCTGTCTCTTTTG
	Rv - TCAGCGACAGCAGAGTGTGTA
<i>Defensina 5 (Defa5)</i>	Fw - TTGTCCTCCTCTCTGCCCTTGT
	Rv - ATGAAGAGCAGACCCTTCTTGG
<i>Sag1</i>	Fw - TTTCCGAAGGCAGTGAGACG
	Rv - CCATAACGCCACATCGCA
<i>GAPDH</i>	Fw - GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG
	Rv - CAGTGTAGCCCAAGATGCCC

4.7 Mensuração e análises de citocinas no soro de animais experimentais por "Cytometric Beads Array" (CBA)

Amostras de sangue foram centrifugadas e o soro foi coletado e armazenado a -80°C até o uso. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , e IL-17A foram quantificadas pelo método CBA (BD Company, San Diego, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de soro foram analisadas pelo aparelho de citometria de fluxo FACSCanto-II (BD Company, San Diego, CA, USA) e os valores obtidos foram analisados com o software FACSDiva (BD Company, San Diego, CA, USA).

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (SEM). A taxa de sobrevivência foi analisada pelo teste do Chi-quadrado; a perda de peso e o escore de morbidade foram analisados pelo teste *Two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Para comparações entre dois grupos foram utilizados o teste *t* de *Student* ou teste de Mann-Whitney para dados paramétricos e não paramétricos respectivamente. Para comparações múltiplas entre mais de dois grupos foi usado o teste *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni, ou teste de Kruskal-Wallis com a teste de múltiplas comparações de Dunn para dados paramétricos e não paramétricos respectivamente. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 A infecção por *T. gondii* modula a expressão dos genes *Hes1* e *Math1* no intestino delgado de camundongos C57BL/6

Uma das formas de estudar a via de sinalização Notch é mediante a inativação da clivagem do domínio intracelular do receptor Notch mediada pelo complexo enzimático γ -secretase. Para que tal inativação aconteça, o uso prévio do inibidor dibenzazepina (DBZ) foi utilizado na linhagem murina C57BL/6 para após o término do tratamento, dar continuidade a nossa investigação com o intuito de entender se a via participa ou não na toxoplasmose aguda.

Antes de começar com os modelos de infecção, avaliamos o efeito de DBZ no animal a respeito da expressão de mRNA de *Hes1*, *Math1* e *Notch1* no intestino delgado dos camundongos. Para isto dois grupos de camundongos C57BL/6 foram tratados com o inibidor da γ -secretase e eutanasiados em dois tempos diferentes: no término do tratamento por 4 dias com DBZ, e 8 dias após o término do tratamento com DBZ (Figura 3A). Para o caso da expressão de *Notch1*, houve uma diminuição da expressão deste gene ao finalizar o tratamento, e essa redução foi ainda maior com 8 dias após ter finalizado o tratamento quando comparamos com o grupo veículo ($p < 0,05$). A expressão de *Hes1* foi diminuída ao finalizar o tratamento ($p < 0,05$) sendo ainda menor a expressão de mRNA após 8 dias ($p < 0,01$) novamente quando comparado com o grupo veículo. Sobre o efeito de DBZ na expressão de mRNA de *Math1*, não houve diferenças entre os grupos. Estes resultados se correlacionam com vários estudos relacionados aos efeitos farmacológicos de DBZ em camundongos (SEARFOSS *et al.*, 2003; MILANO *et al.*, 2004; VAN ES *et al.*, 2010).

Para analisar se a infecção pelo protozoário *T. gondii* poderia interferir na via de sinalização Notch no intestino delgado de camundongos da linhagem C57BL/6, analisamos o perfil de expressão de genes importantes envolvidos na via de sinalização Notch usando fragmentos de íleo de camundongos infectados com 10 ou 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*; sem o uso de DBZ (Figura 3B). A infecção por *T. gondii* não interferiu na expressão do gene *Notch1* em ambas as doses de cistos testados (Figura 3C). Continuando, a expressão dos mRNAs de *Hes1* e *Math1* tiveram uma diminuição significativa no órgão quando os animais foram infectados com 10 ($p < 0,001$) e 20 ($p < 0,0001$) cistos em comparação com o grupo veículo (Figura 3D, E). No geral, a infecção altera a expressão do perfil de RNA mensageiro de *Hes1* e *Math1*, sendo o primeiro o gene alvo da via de sinalização Notch.

Para avaliar os efeitos *in vivo* da inibição da γ -secretase na expressão dos genes *Notch1*, *Math1* e *Hes1* no intestino delgado em conjunto com a infecção por *T. gondii*, DBZ foi administrada diariamente por 4 dias antes da infecção nos camundongos C57BL/6 de acordo com a Figura 3B.

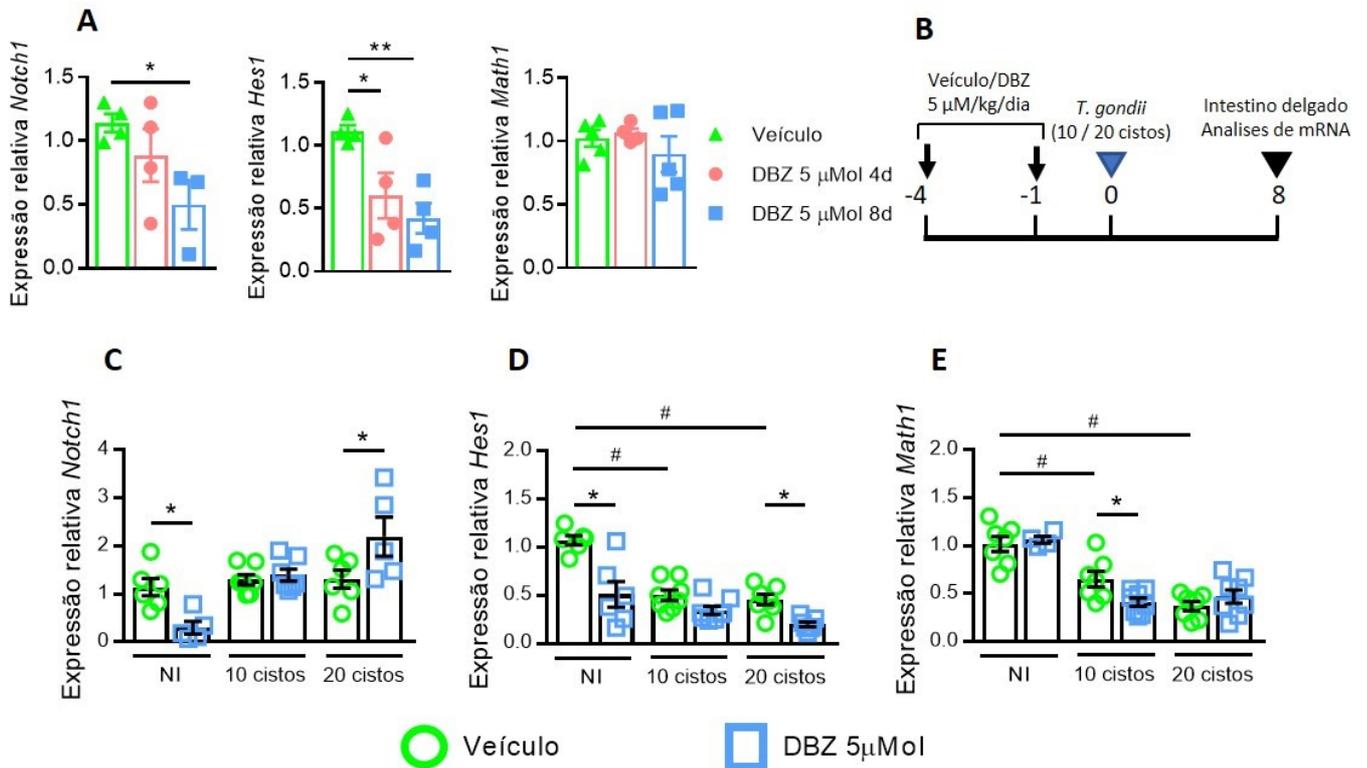


Figura 3: Expressão dos genes da via Notch no intestino delgado de camundongos previamente tratados com DBZ e infectados com *T. gondii*.

(A) Camundongos C57BL/6 tratados com veículo (0,001% de DMSO em PBS) ou DBZ (5 μ Mol/kg/dia) durante 4 dias, e eutanasiados em dois tempos diferentes: no momento exato do término do tratamento com DBZ (4d, círculo rosa) e após 8 dias do término do tratamento com DBZ (8d, quadrado azul claro). Tudo para comparar a expressão do mRNA de *Notch1*, *Math1* e *Hes1* nesses dois tempos. (B) Camundongos C57BL/6 foram tratados com veículo (0,001% de DMSO em PBS) ou com DBZ (5 μ Mol/kg/dia) durante 4 dias. Em seguida, foram infectados com 10 ou 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. A expressão de mRNA foi analisada a partir de fragmentos de íleo com 8 dias de infecção. A expressão relativa dos genes *Notch1* (C), *Hes1* (D) e *Math1* (E) foram calculados com referência ao gene GAPDH em cada amostra. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com cinco animais por grupo e estão apresentados como a média de cada grupo \pm erro padrão da média. *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni foram utilizados para as análises estatísticas. Diferenças significativas entre os grupos foram representadas com $*p < 0,05$ (A). Diferenças significativas entre os grupos não infectados e infectados foram representadas com $\#p < 0,05$, e entre os grupos tratados com veículo ou DBZ com ou sem infecção foram representadas com $*p < 0,05$ (C, D, E). NI: não infectado.

Os camundongos tratados previamente com DBZ e infectados com 10 cistos de *T. gondii* apresentam uma redução na expressão de *Math1* ($p < 0,01$), e com uma expressão semelhante de *Notch1* e *Hes1* quando são comparados com grupo apenas infectado. Por outro lado, os animais previamente tratados com DBZ e infectados com o inóculo de 20 cistos exibiram um aumento na expressão do RNA mensageiro de *Notch1* ($p < 0,01$), enquanto que a expressão de *Hes1* diminuiu ($p < 0,01$), e o mRNA de *Math1* se manteve, tudo isto quando comparado apenas com o grupo infectado. Com estes resultados, podemos observar que no nosso modelo murino tratado com DBZ, a expressão de *Notch1* aumenta na presença da infecção por *T. gondii* com um inoculo de 20 cistos apenas. Para o caso de *Hes1*, o alvo da via Notch, no nosso modelo murino tratado com DBZ e infectado com 20 cistos de *T. gondii*, houve uma diminuição significativa da expressão; mantendo a expressão de mRNA de *Math1*.

Para os seguintes experimentos, decidimos usar o modelo de infecção com 20 cistos, pois, de modo interessante, este inóculo induziu um aumento da expressão do RNA mensageiro do receptor Notch-1.

5.2 Os parâmetros clínicos são mantidos em animais previamente tratados com DBZ e infectados com *T. gondii*

Com a finalidade de investigar se a inibição da enzima γ -secretase atinge os parâmetros clínicos na infecção por *T. gondii* em nosso modelo murino (Figura 4A), avaliamos a perda de peso, o escore de morbidade e a taxa de sobrevivência (Figura 4B-D), bem como as alterações morfológicas no intestino delgado (Figura 5).

Ao longo dos 30 dias após a infecção, a dose de DBZ utilizada no tratamento não foi tóxica para os animais pois eles apresentaram peso, escore de morbidade e taxa de sobrevivência normais. Para o caso do grupo apenas infectado, os camundongos começaram a perder peso no dia 6 após a infecção. Após 12 dias de infecção, os camundongos conseguiram ter um peso estável até o final do experimento (~ 80-85%) porém o escore de morbidade foi aumentando (Figura 4B). No entanto, os camundongos tratados com DBZ e infectados com *T. gondii* apresentaram uma perda de peso menor no dia 9 após infecção ($p=0,0008$) comparado com o grupo apenas infectado (Figura 4B).

Em relação ao escore de morbidade, os animais infectados demonstraram sinais de doença desde o dia 6 após infecção. Os camundongos tratados com DBZ e infectados com *T. gondii* apresentaram menor escore de morbidade quando comparados com o grupo apenas

infectado até o final do experimento (Figura 4C). Essa redução foi estatisticamente significativa nos dias 15 ($p=0,0263$) e 21 ($p=0,0470$) após infecção. Os animais infectados começaram a sucumbir entre os dias 11 e 13 após infecção e mantiveram uma taxa de sobrevivência semelhante até ao dia 30 após infecção (Figura 4D).

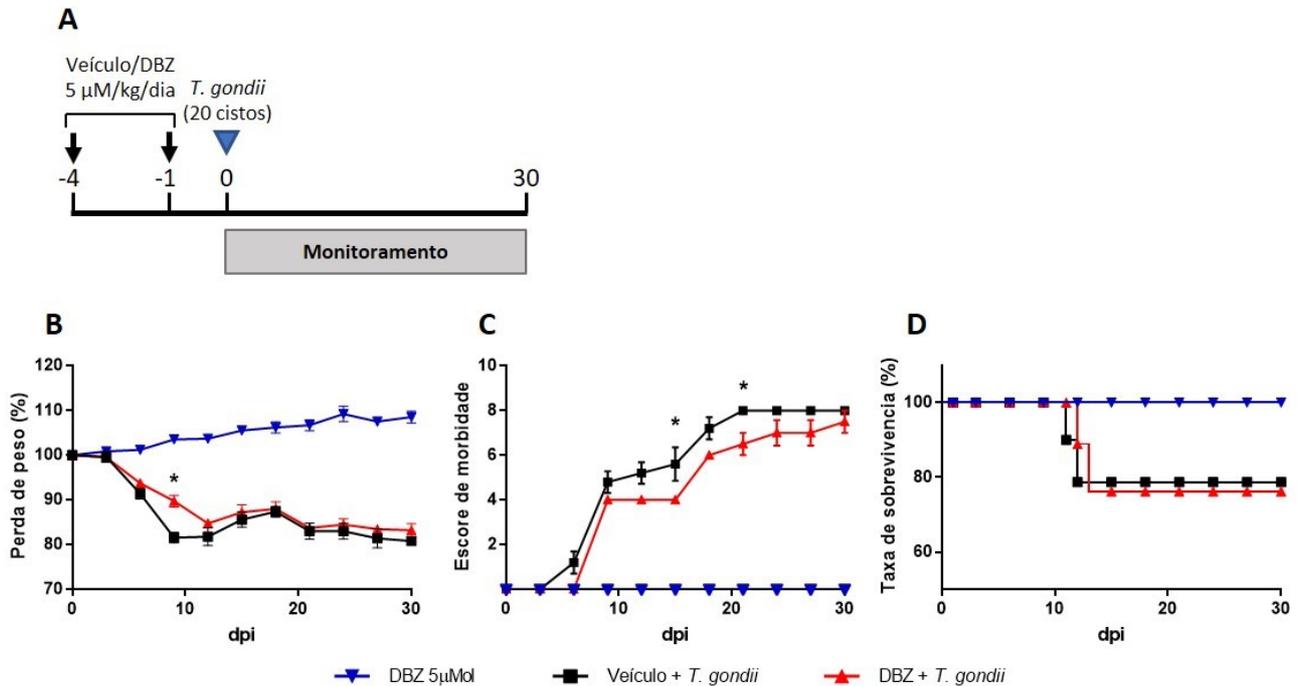


Figura 4: Características clínicas de animais previamente tratados com DBZ e infectados com *T. gondii*. (A) Camundongos C57BL/6 foram inoculados com veículo (DMSO 0,001% em PBS) ou DBZ (5 μMol/kg/dia) por 4 dias antes da infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. (B) Perda de peso, (C) escore de morbidade e (D) taxa de sobrevivência dos animais, os quais foram monitorados diariamente por 30 dias após infecção (dpi). A taxa de sobrevivência foi analisada pelo teste do Chi-quadrado; a perda de peso e escore de morbidade por *Two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

5.3 O tratamento prévio com o inibidor DBZ preserva o comprimento intestinal em camundongos infectados com *T. gondii*

Seguindo com as análises morfológicas do intestino delgado (Figura 5), a infecção oral com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* resultou em uma redução do comprimento do intestino delgado ($p < 0,001$) (Figura 5A, B). Entretanto o intestino delgado dos camundongos tratados previamente com DBZ e infectados com *T. gondii* tiveram um comprimento maior quando comparados com os camundongos apenas infectados ($p < 0,005$), ou seja, houve uma recuperação do tamanho do órgão (Figura 5A, B). Para o caso da avaliação da porcentagem de

encurtamento do intestino delgado, foi observada uma redução da porcentagem nos animais tratados previamente com DBZ e infectados com *T. gondii* (Figura 5C).

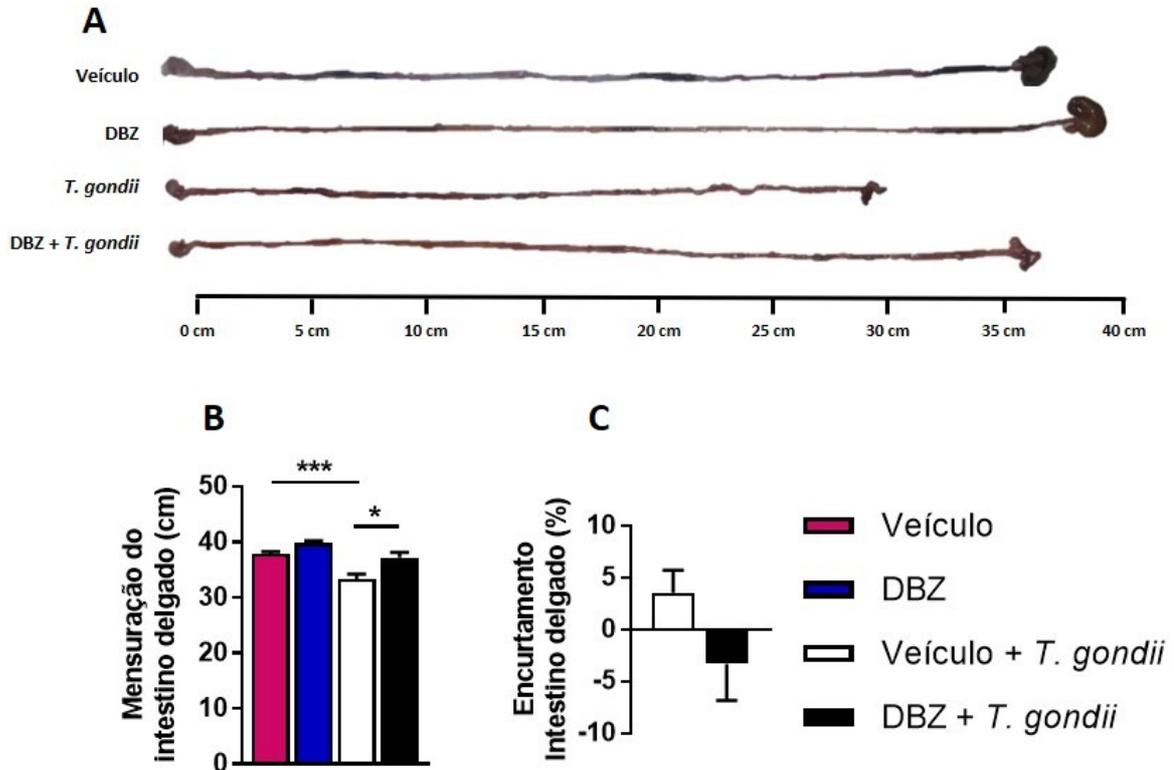


Figura 5: Características morfológicas do intestino delgado de camundongos tratados previamente com DBZ infectados com *T. gondii*.

Camundongos C57BL/6 foram inoculados com veículo (DMSO a 0,001% em PBS) ou DBZ (5 μ Mol/kg/dia) por quatro dias antes da infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. (A) Imagens macroscópicas representativas do intestino delgado de cada grupo experimental. (B) Gráfico do comprimento e (C) porcentagem de encurtamento do intestino delgado foram analisados. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi usado para a análise estatística do comprimento do órgão e teste *t* não pareado para porcentagem de encurtamento. Os dados são representativos de dois experimentos independentes de cinco animais por grupo e estão apresentados como a média de cada grupo \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$.

5.4 A proliferação de *T. gondii* é independente da inibição farmacológica da via Notch no intestino delgado de camundongos C57BL/6 tratados previamente com DBZ

Como houve um aumento do comprimento intestinal nos animais infectados quando foi inibida a atividade da enzima γ -secretase em comparação com o grupo apenas infectado, levantamos a hipótese de que a quantidade de parasitos no intestino delgado poderia ser alterada, e por esse motivo procedemos à quantificação do parasito pela técnica de imunohistoquímica e analisamos a expressão do gene *SAG1* no intestino delgado. Com 8 dias após infecção, o número de parasitos em todo o intestino delgado foi similar entre o grupo apenas infectado e o grupo previamente tratado com DBZ infectado com *T. gondii* (Figura 6A, D). Este resultado corroborou com os níveis de expressão do RNA mensageiro de *SAG1* (Figura 6B) e o escore inflamatório (Figura 6C) dos animais de ambos os grupos mencionados. Até o momento, nossos resultados sugerem que a proliferação de *T. gondii* no intestino delgado é independente da inibição com DBZ sobre a via Notch.

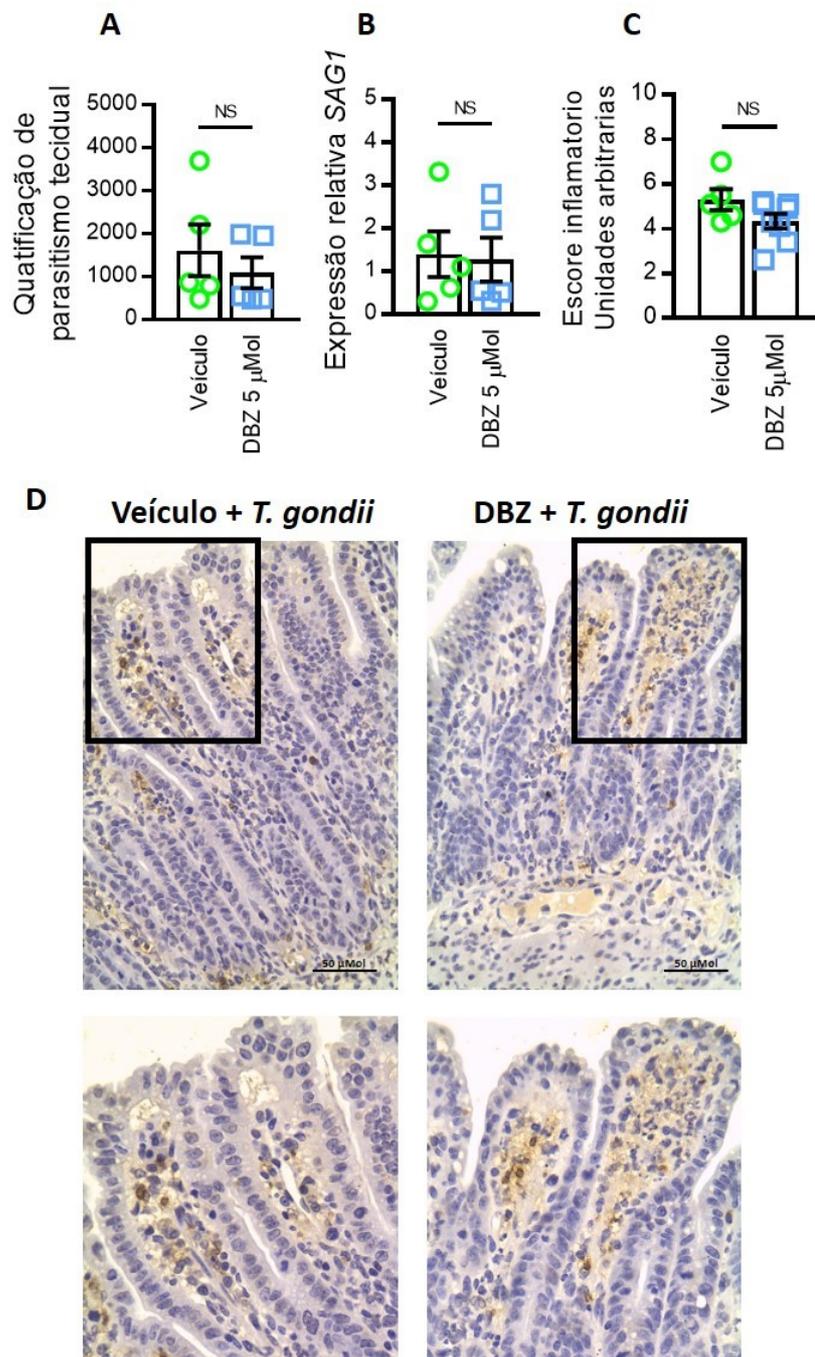


Figura 6: Quantificação do parasitismo tecidual e expressão do mRNA de *SAG1* no intestino delgado de camundongos C57BL/6 tratados com o inibidor da γ -secretase e infectados com *T. gondii*.

(A) Os camundongos foram tratados com DBZ (5 μ Mol/kg/dia) ou veículo (DMSO 0,001% em PBS) por 4 dias antes da infecção com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49), eutanasiados com 8 dpi e o intestino delgado foi manuseado como rolo suíço para detecção de parasitos pela técnica de imuno-histoquímica. (B) Fragmentos de íleo foram coletados e analisados por qPCR em tempo real para quantificar o mRNA do gene *SAG1* que é uma proteína de membrana do parasita. (C) O escore inflamatório do intestino delgado foi representado como unidades arbitrárias. (D) Fotomicrografias de cortes histológicos de intestino delgado usados para a quantificação de parasitos, sendo as duas imagens inferiores ampliações da área demarcada pelo quadrado preto das imagens superiores. Os dados são representativos de dois experimentos independentes tendo cinco animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo \pm erro padrão da média. O teste *t* não pareado foi usado para as análises estatísticas do parasitismo tecidual junto com o escore inflamatório; e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para as análises estatísticas da expressão de mRNA de *SAG1*. * $p < 0,05$. NS: não estatisticamente significativo. Escala de barra: 50 μ m.

5.5 O tratamento prévio com DBZ preserva as células caliciformes produtoras de mucinas ácidas em camundongos infectados com *T. gondii*

Dada a diminuição significativa da expressão de *Hes1* e o aumento da expressão de *Notch1* no grupo de animais infectados e previamente tratados com DBZ em relação aos camundongos apenas infectados (Figura 3C, E), e sabendo do impacto de DBZ sobre as células de perfil secretório no intestino delgado, aprofundamos as nossas análises em relação ao perfil das células caliciformes tanto as produtoras de mucinas ácidas coradas com Alcian blue (AB) com as produtoras de mucinas neutras coradas com PAS (Figura 7, 8), e das células de Paneth nesse órgão, bem como a expressão de RNA mensageiro de peptídeos antimicrobianos (Figura 9).

O tratamento dos camundongos por 4 dias com DBZ usando uma concentração de 5 μ Mol aumentou as células caliciformes produtoras de mucinas ácidas coradas com AB (pH 2,5) no intestino delgado ($p < 0,05$) (Figura 7B, E), apresentando um aumento significativo nas porções do duodeno e jejuno proximal ($p < 0,05$) (Figura 7F). Os camundongos previamente tratados com DBZ infectados mostraram um aumento significativo do número de células caliciformes no órgão como um todo quando comparado com os camundongos apenas infectados ($p < 0,05$) (Figura 7C-E). Na quantificação das células caliciformes por porções do intestino delgado, o aumento foi significativo nas porções do duodeno ($p < 0,05$), jejuno proximal ($p < 0,05$) e íleo ($p < 0,01$) dos camundongos tratados previamente com DBZ infectados em relação aos camundongos apenas infectados (Figura 7F). Considerando a distribuição das células caliciformes produtoras de mucinas ácidas em todo o órgão, a inibição da enzima γ -secretase leva ao aumento da quantidade dessas células caliciformes no intestino delgado de camundongos infectados oralmente com cistos *T. gondii*.

Outro grupo de células do intestino delgado pertencentes às células secretoras e produtoras de muco são as células caliciformes coradas com PAS para a detecção de mucinas neutras (Figura 8). A infecção oral com cistos de *T. gondii* diminui o número de células coradas com PAS quando comparado com o grupo veículo ($p < 0,05$) (Figura 8A, B). Adicionalmente, o grupo previamente tratado com DBZ e infectado apresenta quantidades similares de células caliciformes coradas com PAS quando comparado com o grupo apenas infectado ($p = 0,9987$) (Figura 8B). Os camundongos tratados apenas com DBZ, ou seja, com a via Notch inibida, apresentam um número maior de células caliciformes coradas com PAS quando comparados com os camundongos previamente tratados com DBZ e infectados com cistos de *T. gondii* ($p < 0,05$). Portanto, considerando os nossos dados, a inibição da enzima γ -secretase levando ao bloqueio da via Notch, não influencia na diferenciação de células caliciforme produtoras de mucinas neutras em animais saudáveis. Entretanto, a infecção oral com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* atinge as células caliciformes produtoras de mucinas neutras.

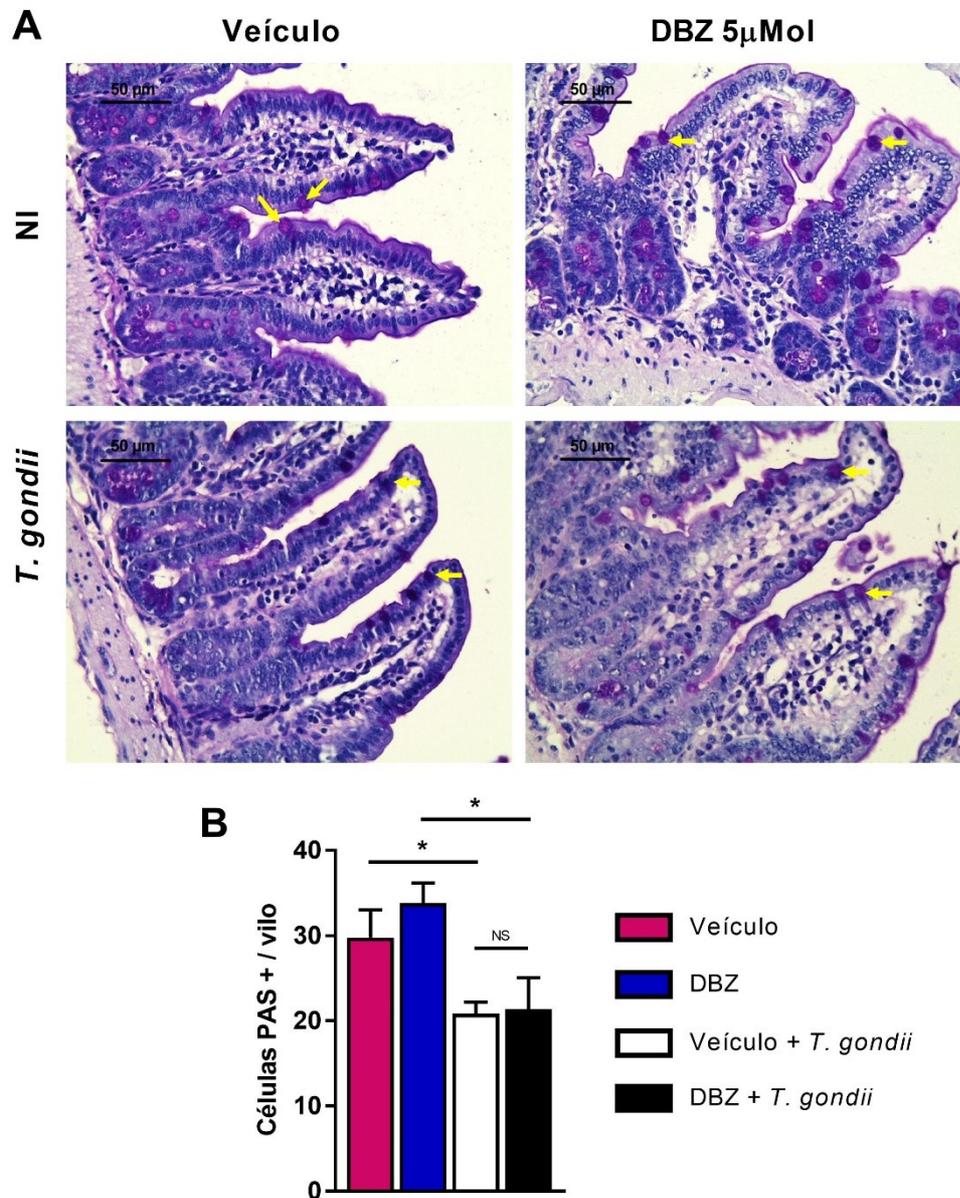


Figura 8: Quantificação das células caliciformes produtoras de mucinas neutras no intestino delgado de camundongos previamente tratados com DBZ e infectados com *T. gondii*.

(A) Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do intestino delgado de camundongos C56BL/6. As lâminas contendo os cortes histológicos foram coradas com PAS e foram quantificadas as células caliciformes nas seguintes condições experimentais: animais que receberam veículo (0,001% DMSO em PBS), tratados com DBZ apenas (5 μ M/kg/dia), infectados com 20 cistos de *T. gondii* e tratados com DBZ e infectados. (B) As células foram contadas por vilosidade em um total de 40 campos por animal. Setas amarelas indicam as células caliciformes produtoras de mucinas neutras. As análises foram realizadas em pelo menos cinco camundongos por grupo e os resultados estão apresentados como a média de cada grupo \pm erro padrão da média. *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni foram utilizados para análises estatísticas. * $p < 0,05$. Escala de barra: 50 μ m. NI: não infectado. NS: não estatisticamente significativo.

5.6 A inibição da via de sinalização Notch preserva o número de células de Paneth durante a infecção oral com *T. gondii*

As células de Paneth junto com uma adequada degranulação das mesmas são protagonistas importantes para uma atividade antimicrobiana adequada no intestino delgado para conseguir controlar a infecção por *T. gondii* (WILSON *et al.*, 1999; AYABE *et al.*, 2000; CADWELL *et al.*, 2008; BURGER *et al.*, 2018). Nas nossas análises de quantificação deste grupo celular (Figura 9A, B), observamos que animais infectados oralmente com cistos de *T. gondii* tiveram uma depleção das células de Paneth comparado com o grupo veículo ($p < 0,0001$). Assim como animais previamente tratados com DBZ mostraram um aumento nas células de Paneth quando comparado com o grupo veículo ($p < 0,05$), o grupo previamente tratado com DBZ e infectado também mostrou um aumento significativo das células de Paneth quando comparado com o grupo apenas infectado ($p < 0,05$) (Figura 9A, B).

Quando analisamos os mRNAs dos peptídeos antimicrobianos produzidos pelas células de Paneth, lisozima 1, defensina-3 e defensina-5, a infecção com 20 cistos de *T. gondii* diminuiu a expressão dos três genes ($p < 0,0001$) (Figura 9C-E). Apesar do aumento de células de Paneth nos animais tratados com DBZ e uma preservação parcial nos animais infectados e previamente tratados, a inibição da via de sinalização Notch não alterou a expressão de genes referentes aos peptídeos antimicrobianos em animais infectados (Figura 9C-E). O grupo tratado com DBZ apresentou níveis mais elevados da expressão de defensina-5 ($p < 0,05$) sem alterações na expressão de RNA mensageiro de defensina-3 e lisozima 1 em relação ao grupo veículo (Figura 9C-E). Nossos resultados reforçam que a diferenciação de células tronco da cripta do intestino delgado às células de perfil secretor como as células caliciformes produtoras de mucinas ácidas e Paneth depende da via de sinalização Notch. Entretanto, em relação à infecção por *T. gondii*, a inibição da via Notch que preserva parcialmente as células caliciformes e Paneth, não é um fator suficiente para controlar a infecção.

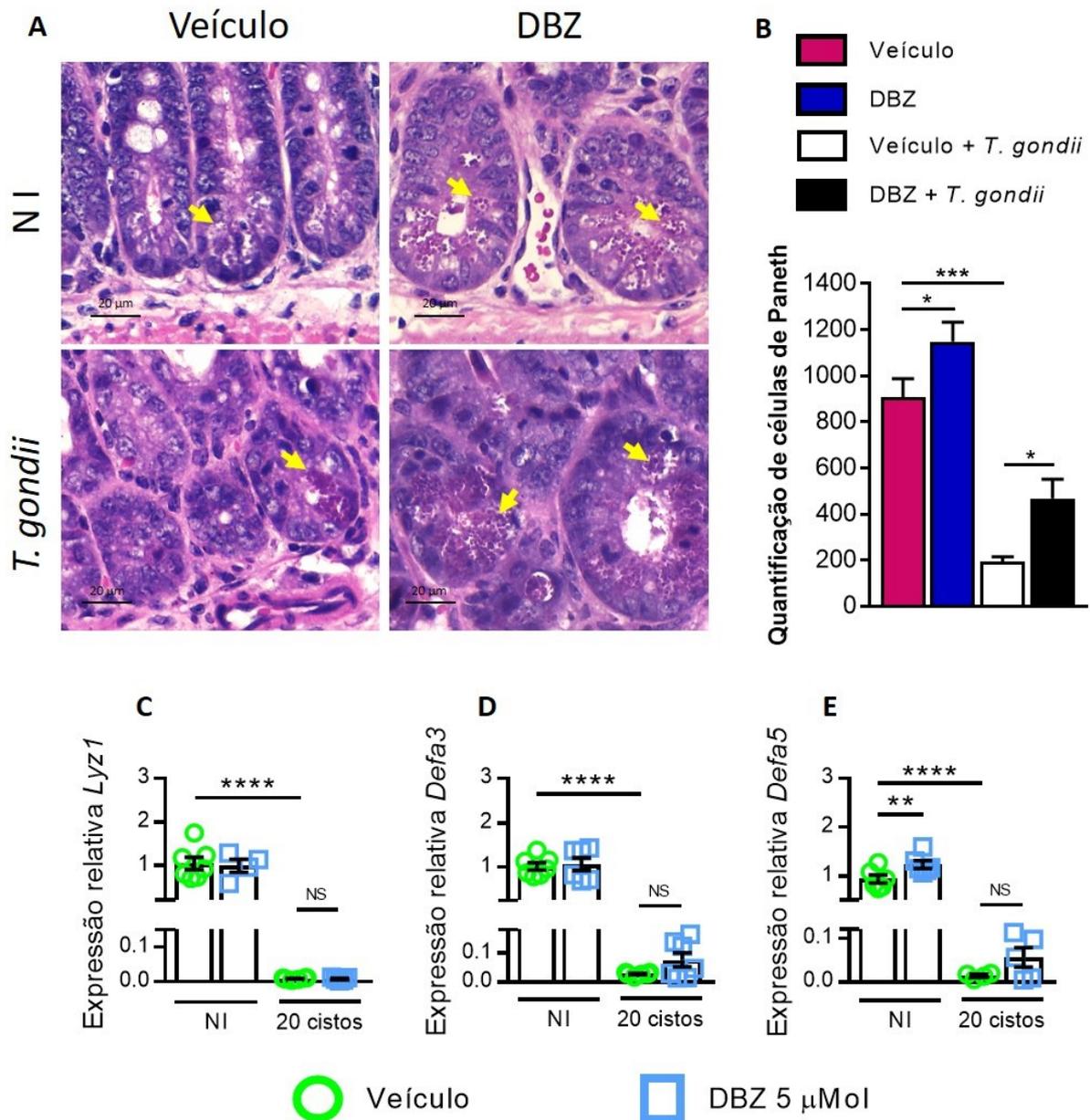


Figura 9: Quantificação das células de Paneth e expressão do mRNA de peptídeos antimicrobianos em camundongos C57BL/6 tratados com o inibidor de γ -secretase e infectados com *T. gondii*.

Os camundongos foram tratados com DBZ (5 μ Mol/kg/dia) ou veículo (DMSO a 0,001% em PBS) durante 4 dias antes da infecção com 20 cistos de *T. gondii* e eutanasiados aos 8 dias de infecção. (A) Fotomicrografias representativas das células de Paneth localizadas na base das criptas do intestino delgado e (B) quantificação das células de Paneth pela coloração por H&E. Os níveis de expressão de (C) lisozima 1 (*Lyz1*), (D) defensina 3 (*Defa3*) e (E) defensina 5 (*Defa5*) foram analisados por qPCR em fragmentos de íleo. Os níveis de mRNA foram normalizados com o gene GAPDH. Setas amarelas apontam as células de Paneth com seus grânulos. Os dados são representativos de dois experimentos independentes tendo cinco animais por grupo, e estão apresentados como a média de cada grupo \pm erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$. Escala de barra: 20 μ m. NI: não infectado. NS: não estatisticamente significativo.

5.7 A inibição da via de sinalização Notch reduz a infecção sistêmica em camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*

Além do intestino delgado ser um órgão importante para a entrada, invasão e proliferação de *T. gondii* no hospedeiro, este parasito atinge outros tecidos como pulmões, fígado e cérebro (DJURKOVIC-DJAKOVIC *et al.*, 2012). Os seguintes experimentos foram conduzidos para saber se a inibição da via Notch poderia interferir na proliferação de *T. gondii* e nas alterações inflamatórias em compartimentos extra intestinais, como pulmões e fígado. Verificamos que os animais previamente tratados com DBZ infectados com cistos de *T. gondii* apresentaram menores alterações inflamatórias nos pulmões ($p < 0,05$) e no fígado ($p < 0,001$) quando comparados com os camundongos apenas infectados (Figura 10A, B, D, F). Da mesma forma, a quantificação de parasitos nesses dois órgãos foi diminuída nos camundongos infectados e previamente tratados com DBZ ($p < 0,05$) (Figura 10C, E).

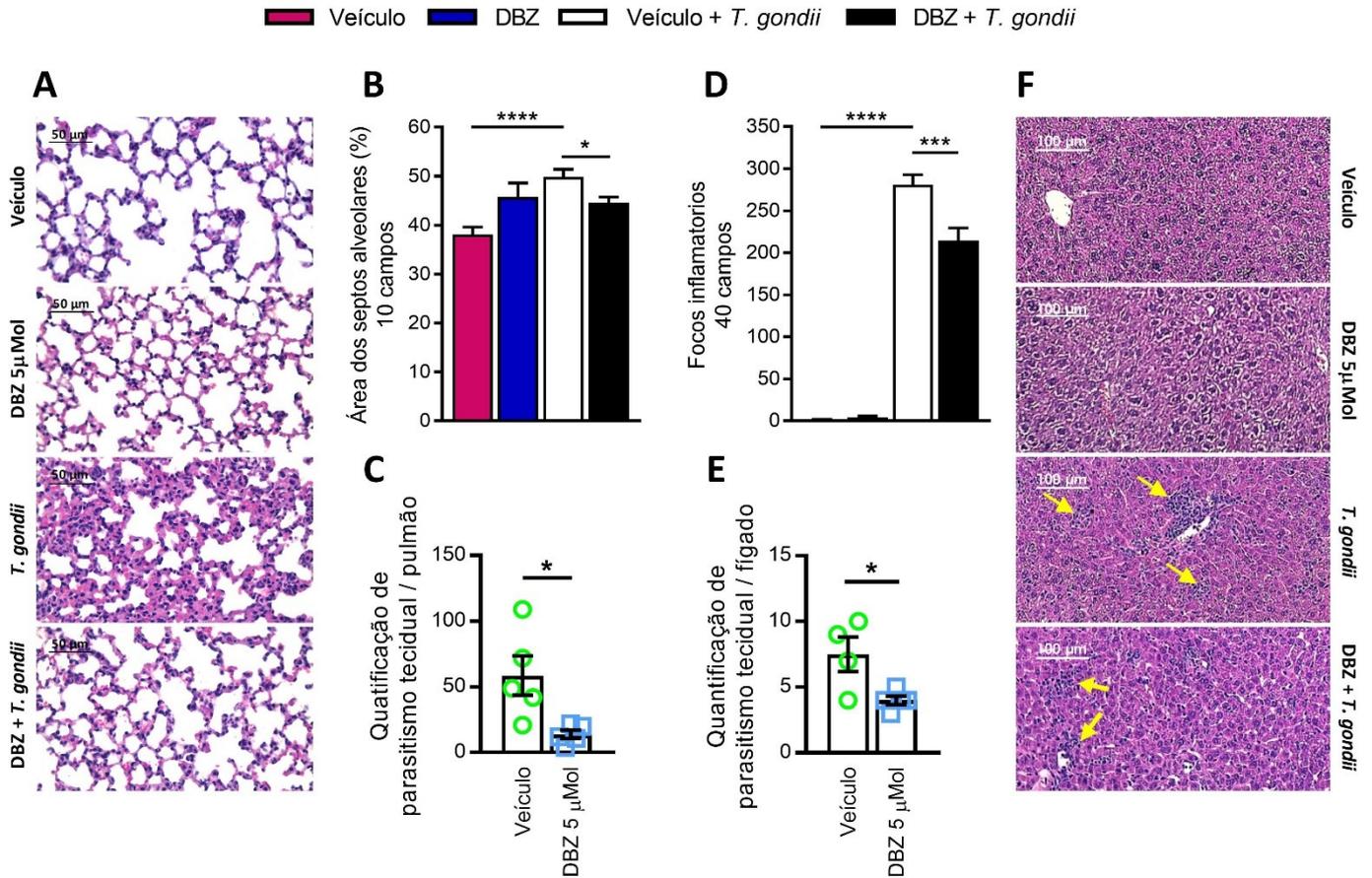


Figura 10: Parâmetros inflamatórios e carga parasitária no pulmão e no fígado relacionados à modulação da via Notch em camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*.

Os camundongos foram tratados com DBZ (5 µMol/kg/dia) ou veículo (DMSO a 0,001% em PBS) durante 4 dias antes da infecção com 20 cistos de *T. gondii*, e eutanasiados aos 8 dias de infecção. Fotomicrografias representativas de alterações histológicas de (A) pulmão e (F) fígado. (B) A porcentagem da área dos septos alveolares foi mensurada por imagens digitais de cortes histológicos de pulmão corados com H&E usando o programa NIH ImageJ. Um mínimo de 10 campos representativos e não sobrepostos de cada pulmão foram avaliados. (D) O número de focos inflamatórios no fígado foi calculado pela quantificação do infiltrado de células inflamatórias na seção do tecido em 40 campos. A quantificação de parasitos no (C) pulmão e (E) fígado foi realizada pela técnica de imuno-histoquímica. Setas amarelas indicam os focos inflamatórios no fígado. As análises foram realizadas em pelo menos cinco camundongos de cada grupo e os resultados estão apresentados como a média de cada grupo ± erro padrão da média. Para as análises estatísticas do parasitismo tecidual foi utilizado o teste *t* não pareado; e para as análises estatísticas da área dos septos alveolares nos pulmões e os focos inflamatórios no fígado foi utilizado *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$. Escala de barra: 50 µm e 100 µm.

5.8 A inibição da via Notch aumenta a produção de citocinas IL-17A e IL-4 e mantém os níveis de IFN- γ , TNF, IL-6, IL-10 e IL-2 em camundongos infectados com *T. gondii*

Por último, avaliamos o perfil de citocinas em amostras de soro de camundongos infectados e não infectados, tratados ou não com DBZ (Figura 11). Nossos resultados mostraram que a infecção por *T. gondii* induziu uma forte resposta imune de tipo Th1 com aumento de IFN- γ ($p=0,01041$) e TNF ($p<0,0001$) (Figura 11A, B). Também foram observados níveis elevados de IL-6 ($p<0,0001$) e IL-2 ($p=0,0397$) (Figura 11C, G), mas sem alteração nos níveis de IL-17A (Figura 10D) e IL-4 (Figura 11E). Além disso verificamos que IL-10, uma citocina de perfil anti-inflamatório, aumentou após a infecção ($p=0,0003$) (Figura 11F).

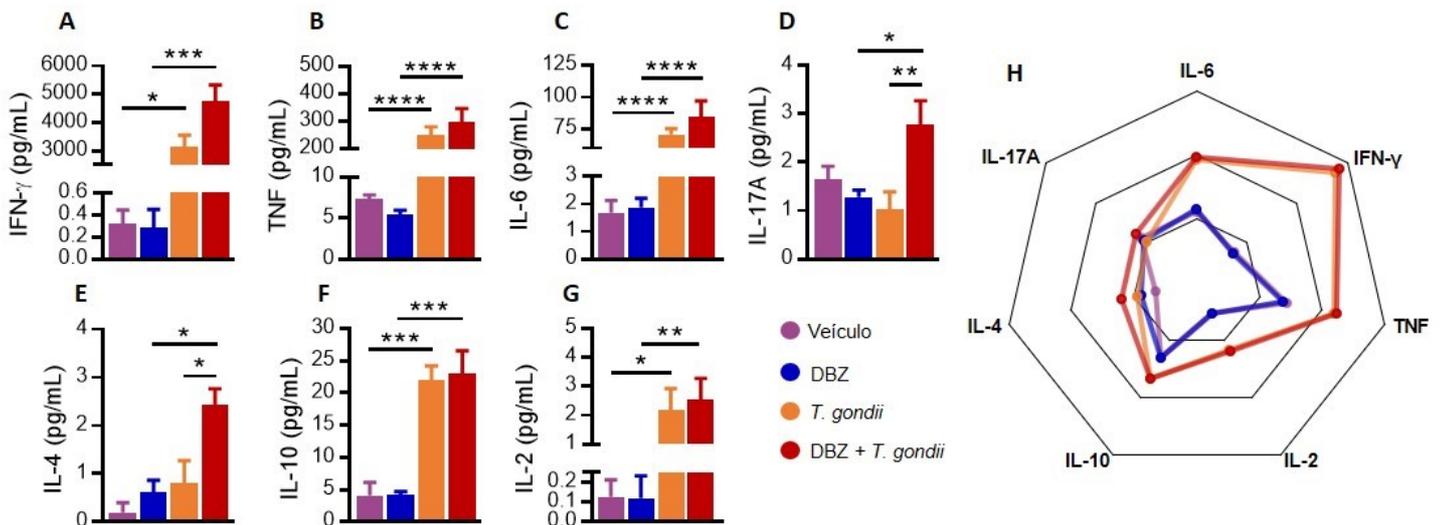


Figura 11: Níveis séricos de citocinas de camundongos C57BL/6 tratados com DBZ e infectados com *T. gondii*.

Os animais foram tratados com DBZ (5 $\mu\text{Mol/kg/dia}$) ou veículo (DMSO a 0,001% em PBS) durante 4 dias antes da infecção com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e eutanasiados com 8 dias de infecção. O soro foi coletado para dosagem de (A) IFN- γ , (B) TNF, (C) IL-6, (D) IL-17A, (E) IL-4, (F) IL-10 e (G) IL-2 usando o kit CBA. Os dados são expressos como pg/mL e as concentrações foram obtidas de acordo com a curva padrão de cada citocina. (H) O gráfico de radar é uma representação de todas as citocinas analisadas. As análises foram realizadas em pelo menos cinco camundongos de cada grupo e os resultados estão apresentados como a média de cada grupo \pm erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizado *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis com o teste de múltiplas comparações de Dunn. * $p < 0,05$.

Camundongos infectados que foram previamente tratados com DBZ apresentaram níveis maiores em todas as citocinas avaliadas quando foram comparados com os grupos

correspondentes apenas tratados com o inibidor: IFN- γ ($p=0,0004$), TNF ($p<0,0001$), IL-6 ($p<0,0001$), IL-17A ($p=0,0416$), IL-4 ($p=0,0106$), IL-10 ($p=0,0002$) e IL-2 ($p=0,0095$) (Figura 11H). Apesar dos níveis sistêmicos baixos de IL-17A e IL-4 no grupo apenas infectados (Figura 11D, E, H), os animais tratados previamente com DBZ infectados apresentaram maiores níveis de IL-17A ($p=0,007$) e IL-4 ($p=0,0439$) em comparação com os camundongos apenas infectados (Figura 11D, E, H).

6 DISCUSSÃO

A via de sinalização Notch mostrou exercer efeitos importantes sobre várias doenças infecciosas relacionadas com respostas imunes de tipo Th1 e Th2 (AUDERSET *et al.*, 2012; FERMINO *et al.*, 2013; LINA *et al.*, 2016; NEAL *et al.*, 2017). Portanto, esperava-se que o emprego de inibidores do complexo enzimático γ -secretase poderiam alterar características específicas das populações celulares que foram estudadas e cuja arquitetura é governada pela via Notch. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi explorar as características da modulação da via de sinalização Notch na toxoplasmose aguda em camundongos da linhagem C57BL/6 utilizando DBZ, um inibidor do complexo enzimático γ -secretase.

Observou-se na presente investigação que animais administrados com DBZ por 4 dias com uma concentração de 5 μ Mol/kg/dia apresentaram uma diminuição na expressão do mRNA de *Notch1* e *Hes1*, ou seja, houve uma inibição ou modulação da via Notch. Estes dados se correlacionam com vários estudos relacionados aos efeitos farmacológicos de DBZ em camundongos (SEARFOSS *et al.*, 2003; MILANO *et al.*, 2004; VAN ES *et al.*, 2010).

Após verificar o papel de DBZ no camundongo saudável, avaliamos o impacto da infecção por *T. gondii* sobre os genes da via Notch no intestino delgado de camundongos C57BL/6 suscetíveis ao parasito. Pela primeira vez, verificou-se que a infecção por *T. gondii* regula negativamente a expressão do mRNA do gene alvo da via Notch, *Hes1*. Além disso diminuiu a expressão de *Math1*.

Poucos estudos demonstram quais são as consequências de um patógeno e o processo de infecção sobre a expressão de mRNA de *Notch1*. Usando um modelo de infecção *in vitro* de células tronco neurais infectadas com citomegalovírus humano, foi avaliada a expressão de mRNA de *Notch1*. Verificou-se observando que nas primeiras 8 horas de infecção não houve diferenças nos níveis de expressão quando comparado com o grupo não infectado; entretanto a partir das 24 horas após infecção, as células infectadas mostraram níveis baixos do mRNA de *Notch1* comparados com o grupo controle (LI *et al.*, 2015). Um estudo *in vitro* com uma linhagem de monócitos humanos (THP-1) infectada com *E. chaffeensis*, uma bactéria intracelular obrigatória causadora da erliquiose humana, observou-se um acréscimo da expressão de mRNA de *Notch1* após 2 e 72 horas de infecção (LINA *et al.*, 2016). Uma pesquisa envolvendo pacientes infectados com o vírus da hepatite B (VHB) na fase aguda e crônica da infecção, avaliou a expressão de mRNA de *Notch1* em células mononucleares de sangue periférico CD4+, sendo que o grupo de pacientes em fase aguda teve níveis similares da

expressão de *Notch1* quando comparado com o grupo de pacientes saudáveis; porém, o grupo de pacientes em fase crônica apresentou um aumento da expressão de *Notch1* (WEI *et al.*, 2016).

Trabalhos publicados relacionando a via Notch com infecções patogênicas gastrointestinais são escassos. Suínos infectados com *L. intracellulares*, uma bactéria intracelular obrigatória que invade as células da cripta intestinal e causa enteropatia proliferativa, mostraram um aumento progressivo do domínio intracelular do receptor Notch-1 (NICD) até o 14º dia após infecção, sendo este considerado o pico da infecção; logo a expressão proteica de NICD diminuiu no 28º dia após a infecção (HUAN *et al.*, 2017). Outro estudo onde os pesquisadores utilizaram o modelo de hiperplasia transmissível de cólon murino (siglas em inglês TMCH) causada pela bactéria extracelular *C. rodentium* em camundongos da linhagem NIH: Swiss, os níveis proteicos de NICD das criptas do cólon mostraram um comportamento particular ao longo da infecção, onde nos dias 6 e 12 após a infecção o nível proteico aumentou e começou a diminuir no dia 20 até o dia 34 após infecção em comparação com camundongos não infectados (AHMED *et al.*, 2012). Os resultados variáveis das investigações citadas mostram que a expressão gênica de *Notch1* depende do tipo de modelo infeccioso a ser estudado. Contudo, o nosso trabalho é o primeiro a demonstrar que a infecção oral com cistos de *T. gondii* não altera os níveis de mRNA de *Notch1* no intestino delgado na fase aguda (8 dias) da infecção de camundongos C57BL/6.

Em relação ao gene alvo da via Notch, o presente trabalho demonstra pela primeira vez que camundongos C57BL/6 infectados com cistos de *T. gondii* tem uma baixa expressão de *Hes1*, e de *Math1* no intestino delgado. Trabalhos similares ao nosso, no que se refere ao aspecto de doença gastrointestinal, apresentam resultados diversos. Em camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com *C. rodentium*, a expressão de mRNA de *Hes1* e *Math1* não foram alterados no ceco e cólon (CHAN *et al.*, 2013). Ahmed e colaboradores (2012) empregando um modelo murino (linhagem NIH: Swiss) com TMCH induzida também por *C. rodentium* apresentaram diferentes níveis de mRNA de *Hes1* ao longo da infecção; mostrando um aumento do gene no dia 6 e 12, seguido por uma diminuição até o dia 34 após a infecção. No mesmo trabalho, o mRNA de *Math1* apresentou um comportamento oposto ao do *Hes1* nos dias indicados (AHMED *et al.*, 2012). Em infecções bucais cujos agentes infecciosos foram as bactérias patogênicas *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) e *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), e a bactéria comensal *Streptococcus gordonii* (*Sg*), foi testada a capacidade de ativar a via Notch em células epiteliais orais pela detecção de mRNA de *Hes1* e a co-localização da proteína NICD

no núcleo das células (AL-ATTAR *et al.*, 2018). Os pesquisadores observaram que a expressão de *Hes1* e os níveis nucleares de NICD aumentaram pela infecção com a bactéria patogênica *Pg* de modo inóculo depende; mas *Fn* e *Sg*, sendo bactérias patogênica e comensal respectivamente, não causaram alterações do ponto de vista gênico ou proteico.

Os estudos supramencionados demonstram que os genes *Hes1* e *Math1* não são alvos obrigatórios no decorrer do processo da infecção avaliado em cada trabalho citado. Além disso, a alteração da via Notch por microrganismos e suas consequências no hospedeiro podem ser diferentes ao longo do curso da infecção. Sobre nosso modelo experimental apenas infectado com *T. gondii*, acreditamos ser importante analisar a expressão dos genes estudados em uma cinética de dias de infecção ou considerar outros receptores da via Notch para uma melhor compreensão dessa via na toxoplasmose aguda.

Os mecanismos celulares de como a via de sinalização de Notch é relevante para a proliferação de *T. gondii* no hospedeiro ainda não foram elucidados. No presente trabalho, investigou-se a modulação da via Notch na infecção oral por *T. gondii* utilizando um inibidor do complexo enzimático γ -secretase, e como esta modulação pode influenciar no epitélio intestinal de camundongos da linhagem C57BL/6. Neste trabalho mostramos que na infecção oral com 20 cistos de *T. gondii*, a expressão de mRNA de *Notch1* é regulada positivamente em camundongos inibidos farmacologicamente com DBZ.

Foi descrito que a ativação da via pelo receptor Notch-1 é necessária para a manutenção apropriada das células epiteliais intestinais em condições de homeostase e que o *knockdown* do receptor Notch-1 incrementa as características patológicas no modelo de colite experimental induzido por sulfato sódico de dextrana (DSS) (MATHERN *et al.*, 2014). Usando previamente inibidores da γ -secretase em macrófagos murinos estimulados com LPS, complexos imunes ou IFN- γ recombinante (rIFN- γ), vários estudos relataram resultados distintos sobre a expressão proteica do receptor Notch-1 total e seu correspondente domínio intracelular NICD (PALAGA *et al.*, 2008; SANGPHECH *et al.*, 2014; WONGCHANA *et al.*, 2018). Macrófagos derivados da medula óssea (BMMS) tratados com altas concentrações de IL-CHO, um inibidor da γ -secretase semelhante a DBZ, e estimulados com LPS e rIFN- γ mostraram uma diminuição da clivagem de NICD e um baixo nível proteico de Notch-1 total (PALAGA *et al.*, 2008). Após a inibição da via Notch com IL-CHO, foi avaliada a cinética de ativação da via Notch em células CD4⁺ isoladas de camundongos C57BL/6 ao longo de um período de estimulação com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, resultando na diminuição da clivagem de NICD do receptor

Notch-1 (DONGRE *et al.*, 2014). Por outro lado, macrófagos da linhagem celular RAW2647 e BMMs foram tratados com N - [N (3,5) -difluorofenacetil) -L-Alanil] -S-fenilglicina t-butil ester (DAPT), outro inibidor da γ -secretase como DBZ e IL-CHO, seguido da estimulação com LPS ou complexos imunes e apresentaram um nível proteico de Notch-1 total semelhante ao nível detectado em macrófagos estimulados sem tratamento com o inibidor (SANGPHECH *et al.*, 2014; WONGCHANA *et al.*, 2018).

Os trabalhos utilizando os inibidores farmacológicos que atingem a enzima γ -secretase para impedir a clivagem do NICD demonstram que os níveis proteicos do receptor Notch-1 e do NICD dependem do tipo de célula estudada e do estímulo utilizado, do mesmo modo que os trabalhos previamente citados avaliando a expressão de mRNA de *Notch1*. Ao nosso entender, a infecção oral por *T. gondii* com uma potente resposta imune do hospedeiro, se sobrepõe à inibição da via Notch tendo como consequência o aumento da expressão de mRNA de *Notch1*, sugerindo um mecanismo de *feedback* positivo.

Nossos resultados mostram a diminuição da expressão do mRNA de *Hes1* e os níveis mantidos da expressão do mRNA de *Math1* em camundongos C57BL/6 infectados com 20 cistos de *T. gondii* tratados previamente com DBZ. Isto se correlaciona com o aumento de células do tipo secretoras como as células calciformes e as células de Paneth quantificados no intestino delgado do grupo de animais mencionado. A depleção de células de Paneth é uma consequência da infecção por *T. gondii* que envolve a ativação de uma forte resposta Th1 e uma alta produção de IFN- γ nos epitélios intestinais (RAETZ *et al.*, 2013; VILLERET *et al.*, 2013). Vários estudos mostraram que a inibição da via Notch com diferentes inibidores do complexo enzimático γ -secretase traz um impacto na conversão de células tronco em células de perfil secretor no intestino delgado (MILANO *et al.*, 2004; VAN ES *et al.*, 2010; DROY - DRUPÉ *et al.*, 2012).

Assim, inicialmente hipotetizamos que o aumento do comprimento intestinal, o aumento do número de células de Paneth junto com a produção de peptídeos antimicrobianos e as células calciformes como consequência da inibição da via Notch poderia ter um papel protetor no controle da infecção e melhorar a taxa de sobrevivência, apesar de que o papel das células calciformes na infecção por *T. gondii* não seja claro (TREVIZAN *et al.*, 2016; SCHNEIDER *et al.*, 2017). Supreendentemente, os parâmetros clínicos e a análise histopatológica junto com o parasitismo tecidual no intestino delgado mostraram resultados semelhantes em camundongos

tratados previamente com DBZ infectados com cistos de *T. gondii* quando comparados com o grupo de camundongos apenas infectados.

Poucos estudos têm avaliado o impacto da modulação da via Notch em células de perfil secretor relacionadas às infecções por patógenos. Camundongos C57BL/6 tratados com DBZ durante a infecção por *C. rodentium* tiveram um aumento das células caliciformes e surpreendentemente, também obtiveram uma taxa de sobrevivência baixa (CHAN *et al.*, 2013).

O modelo *ex vivo* de epitélio intestinal humano, denominado enteroide, vem sendo empregado para o estudo da fisiologia, fisiopatologia de infecções gastrointestinais do intestino humano (SAXENA *et al.*, 2016). Drummond e colaboradores (2017) trabalharam com o modelo de enteroide humano fetal previamente tratado com DBZ por 4 dias obtendo um grande aumento de células caliciformes positivas para mucina de tipo 2 (*Muc2*) e de células enteroendócrinas positivas para cromogranina de tipo A, ambos marcadores característicos de cada grupo celular mencionado. Além disso, observou-se um aumento da expressão de marcadores como *Muc2* característicos das células caliciformes, e de marcadores característicos das células de Paneth como *Reg3A* e defensinas-5 e -6. No mesmo estudo, ensaios com enteroides previamente expostos a DBZ foram infectados com o enterovirus E11, onde após 24 horas de infecção foi observado que o patógeno teve uma predisposição em invadir e se replicar nas células enteroendócrinas, e não nas células caliciformes (DRUMMOND *et al.*, 2017).

Nossos dados sugerem que a inibição da expressão do mRNA dos peptídeos antimicrobianos poderia explicar o parasitismo tecidual inalterado no intestino delgado em nossos resultados. Sabe-se que a administração de DBZ em camundongos C56BL/6 produz células transdiferenciadas com características morfológicas de células produtoras de muco e de células de Paneth com presença de grânulos nas criptas do intestino delgado (GASSLER, 2017). Em camundongos da linhagem C57BL/6 tratados com DBZ mediante uma análise ultraestrutural por microscopia eletrônica, demonstrou-se uma estrutura desorganizada das células de Paneth nas criptas intestinais, mostrando-as preenchidas com muco e pequenos grânulos eletrodensos (VANDUSSEN *et al.*, 2012).

Por tanto, acreditamos que essa diferenciação de células tronco às células de perfil secretor, possivelmente com atividade alterada, não foi suficiente para controlar o protozoário *T. gondii* no intestino delgado. Acreditamos que DBZ favoreceu a produção de mucinas levando ao aumento da camada de muco, porém esta hipótese deve ser ainda analisada mediante ensaios

específicos para mucinas com o fim de saber se a produção destas glicoproteínas é uma vantagem ou desvantagem para *T. gondii*.

Nosso trabalho é o primeiro a estudar os efeitos da via de sinalização Notch na infecção oral por *T. gondii* e demonstrou que a proliferação do parasito é independente da via Notch no intestino delgado do modelo murino C57BL/6 tratados previamente com DBZ. Até o dia de hoje, poucos trabalhos têm sido publicados usando inibidores do complexo enzimático γ -secretase ou mediante as ferramentas genéticas para deleção de genes dos membros da via em menção, e tendo como finalidade avaliar o impacto sobre o controle do parasitismo.

Em células Huh7 provenientes de hepatocarcinoma humano tratadas com DAPT antes e depois da infecção com esporozoítos de *Plasmodium berghei* ANKA houve similar porcentagem de células infectadas ao serem comparadas com células infectadas sem tratamento com DAPT; sugerindo que a replicação do parasito é independente da inibição da γ -secretase e da via Notch (PARVANOVÁ *et al.*, 2018). A deleção específica dos receptores Notch-1 e Notch-2 na superfície de células T de camundongos C57BL/6, resistentes à infecção por *L. major*, induziu uma elevada suscetibilidade à infecção mostrando assim um aumento do tamanho da lesão na pele dos animais e o parasitismo (AUDERSET *et al.*, 2012). O desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni* tratados com DAPT foi estudado e revelou anormalidades morfológicas tais como a diminuição do tamanho dos ovos, formato pouco comum deles e a perda da espícula lateral (MAGALHÃES *et al.*, 2016).

Os trabalhos acima mencionados juntamente com os nossos resultados demonstram que a via Notch influencia de modo diferente o processo de infecção por patógenos diferentes. Certamente, o desenho experimental é importante uma vez que a deleção ou super expressão de receptores ou ligantes em uma determinada linhagem celular ou animal abordaria outros aspectos de investigação da via Notch quando comparada com o uso de inibidores do complexo enzimático da γ -secretase. No entanto, os métodos mencionados no levantamento bibliográfico e o método usado neste trabalho são importantes para a compreensão da via de sinalização Notch no contexto da infecção por *T. gondii*.

O protozoário *T. gondii* também atinge rapidamente outros órgãos importantes do hospedeiro, como cérebro, fígado e pulmões (SILVA *et al.*, 2010). Além disso, a cinética de distribuição do parasito em diferentes tecidos do hospedeiro depende do tipo de cepa e dos dias de infecção (DJURKOVIC-DJAKOVIC *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2010). Diferente dos nossos dados obtidos no intestino delgado, nossos achados demonstraram que a inibição da via Notch

por DBZ diminuiu a infiltração de células inflamatórias e o número de parasitos no pulmão e no fígado quando os camundongos foram infectados com *T. gondii*.

Poucos relatos mencionando a via Notch e patógenos na inflamação hepática e pulmonar foram descritos, os quais tiveram resultados contraditórios. Um estudo prévio utilizando um modelo *in vivo* com VHB encontrou que a inibição da via Notch reduziu o recrutamento de células inflamatórias, linfócitos T citotóxicos e células T *natural killer* ao fígado, e melhorou a inflamação local acompanhada por uma diminuição da expressão de mRNA de IL-22 no órgão (WEI *et al.*, 2016). A citocina IL-22 já foi relacionada com doenças hepáticas por ter propriedades pró-inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2011) e anti-inflamatórias (ALAM *et al.*, 2010), e sabe-se que a ativação da via Notch aumenta sua produção nas células T CD4⁺ (ALAM *et al.*, 2010). No entanto, células T CD4⁺ isoladas de PBMC de pacientes infectados com VHB e tratados ou não com DAPT mostraram valores semelhantes referentes à expressão de mRNA de IL-22 e a sua presença a nível sérico (WEI *et al.*, 2016).

Camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com o vírus influenza H1N1 e posteriormente tratados com um inibidor da γ -secretase ou com anticorpo neutralizante específico para o ligante Delta-1 apresentaram uma carga viral alta com inflamação excessiva nos pulmões (ITO *et al.*, 2011). Por outro lado, camundongos transgênicos que expressam um domínio intracelular negativo considerado inibidor da via Notch em células T CD4⁺ e CD8⁺ com criptococose pulmonar apresentaram um menor acúmulo de leucócitos inflamatórios nos pulmões em comparação com camundongos controles após 3 e 4 semanas após infecção (NEAL *et al.*, 2017).

Parece que a inibição da via Notch no fígado e no pulmão induz uma resposta diferente em tais órgãos. A inibição da via Notch por DBZ foi benéfica no pulmão e fígado de animais infectados oralmente por *T. gondii*. Acreditamos que a avaliação da expressão de mRNA de *Notch1*, *Math1* e *Hes1*, e de outros receptores ou ligantes da via em questão, no pulmão e fígado dos animais dos grupos experimentais utilizados neste trabalho seria importante para a compreensão do papel da via Notch na infecção por *T. gondii*.

O papel da via Notch no sistema imunológico é obscuro, uma vez que a via está envolvida na diferenciação e regulação das células T, mas dependente do estímulo de citocinas (TU *et al.*, 2005; RUTZ *et al.*, 2008). Em nosso modelo experimental, a infecção oral com 20 cistos de *T. gondii* não interferiu na expressão do mRNA de *Notch1* no intestino delgado,

entretanto, diminuiu a expressão dos genes *Hes1* e *Math1*; e o tratamento com DBZ antes da infecção aumentou a expressão *Notch1* e diminuiu a expressão do mRNA de *Hes1*.

O aumento da expressão do mRNA de *Notch1* no intestino delgado de camundongos previamente tratados com DBZ sugere um *feedback* positivo devido à presença do parasito no hospedeiro. Por outro lado, a expressão de mRNA de *Math1* e *Hes1* podem ser influenciadas diretamente pela infecção, já que camundongos infectados e tratados ou não com DBZ apresentaram níveis de expressão baixos apesar de que o mRNA de *Notch1* não foi alterado.

No presente trabalho observou-se que os níveis das citocinas IL-4 e IL-17A foram alterados sistemicamente em camundongos previamente tratados com DBZ e infectados com cistos de *T. gondii*, e que IFN- γ , uma citocina chave na infecção pelo protozoário, teve um aumento sem ser significativo nas mesmas condições. Tudo isto demonstrando que a infecção oral com cistos de *T. gondii* e sua forte resposta imune Th1 se sobrepõem à inibição farmacológica da via de sinalização de Notch, pelo menos em amostras de soro.

Uma das funções mais importantes da via Notch no sistema imune é a diferenciação e ativação das células T *naive* (revisado por TANIGAKI; HONJO, 2007; BAILIS *et al.*, 2013). Nas APCs a expressão de ligantes Jagged ou Delta estaria regulando a diferenciação de células T nos subgrupos de células Th1 e Th2 (MAEKAWA *et al.*, 2003; AMSEN *et al.*, 2004; RUTZ *et al.*, 2005). As células Th1 são caracterizadas pela produção de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico para controlar a proliferação de *T. gondii*, mas como consequência dessa alta produção de citocinas acontece uma grave inflamação do íleo assim como necroses das vilosidades intestinais e destruição tecidual (revisto por SCHREINER; LIESENFELD, 2009).

Alguns estudos correlacionam o papel da via Notch na infecção por patógenos e a produção de citocinas. Monócitos humanos tratados com DAPT e estimulados com LPS ou infectados com *Escherichia coli* mostraram uma redução na produção de TNF- α e IL-6, mas IL-12p40 foi mantida (HILDEBRAND *et al.*, 2018). Durante a infecção por *C. neoformans*, leucócitos isolados de pulmões de camundongos geneticamente modificados para expressar um domínio negativo similar ao fator *Mastermind* (DNMAML) (camundongos CCD) que interfere com a via Notch de forma canônica, mostraram uma redução de IFN- γ , IL-5 e IL-3 mas a produção de IL-17 é mantida em células T CD4⁺, que denota a supressão das respostas imunes Th1 e Th2, e a persistência da resposta imune Th17; e conseqüentemente, este cenário leva à queda do controle fúngico (NEAL *et al.*, 2017).

Na infecção por *L. major*, as células dos linfonodos poplíteos de camundongos CCD foram isoladas e reestimuladas *in vitro* com antígeno solúvel de *L. major* mostrando altas quantidades de IFN- γ e níveis indetectáveis de IL-4 o que permite um controle eficiente do parasitismo; demonstrando que neste modelo de infecção por *L. major*, a resposta imune Th1 é conservada na ausência da via Notch (TU *et al.*, 2005). Por outro lado e no mesmo estudo, camundongos CCD infectados com *Trichuris muris* tiveram uma alta carga parasitária, mostrando que a via Notch é necessária para uma eficiente resposta Th2 (TU *et al.*, 2005).

No entanto, a deleção do receptor Notch-1 e Notch-2 na superfície das células T de camundongos da linhagem C57BL/6, considerada uma inibição não canônica, aumenta a suscetibilidade à infecção por *L. major* (AUDERSET *et al.*, 2012). Curiosamente, Fermino e colaboradores (2013) observaram um perfil diferente de expressão do mRNA de *Notch1* e Notch-3 em células T reguladoras de camundongos selvagens infectados com *L. major* quando comparados com camundongos deficientes para galectina 3 (*Lgals3^{-/-}*) também infectados. No mesmo trabalho, a infecção por *L. major* no camundongo *Lgals3^{-/-}*, a expressão de mRNA de Notch-3 é diminuída; e nesses animais observou-se uma alta expressão de *Hes1* sugerindo que a via Notch está ativa, o que justificaria um aumento da produção de IL-10 (FERMINO *et al.*, 2013). De modo diferente, Coutaz e colaboradores (2016) descreveram que células T CD4⁺ isoladas de nódulos linfáticos mesentéricos do intestino delgado de camundongos, com deleção dos genes para *Notch1* e Notch-2, aumentaram a sua diferenciação em células de perfil imune Th17 junto com o aumento da expressão de mRNA para IL-17A e a sua secreção.

Bailis e colaboradores (2013) trazem uma perspectiva nova e diferente da via de sinalização Notch, descrevendo-a como uma via amplificadora universal que atua de forma sinérgica e imparcial sob as respostas imunes Th1, Th2 e Th17. Ensaio *in vitro* utilizando células T CD4⁺ sobre fortes condições de polarização usando coquetéis de citocinas para estimular cada tipo de resposta mencionada, demonstraram que a via Notch simultaneamente induz a expressão de IFN- γ , IL-4 e IL-17A; e de seus correspondentes fatores de transcrição Tbx21, Gata3 e Rorc, relacionados com as respostas Th1, Th2 e Th17 respectivamente (BAILIS *et al.*, 2013; revisado por TINDEMANS; PEETERS; HENDRIKS, 2017).

Os trabalhos citados acima descrevendo diferentes modelos de inflamação juntamente com nossos resultados, sugerem que a via de sinalização Notch modula as respostas imunes dependendo do ambiente da infecção, ou seja, modelo *in vitro* ou *in vivo*; e do patógeno. Contudo, o aumento da expressão do mRNA de *Notch1* no grupo previamente tratado com DBZ

infectado com *T. gondii*, o que poderia sugerir um aumento da expressão da proteína, poderia influenciar diretamente na alta produção de citocinas como IL-17A e IL-4; e em manter os níveis de IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-6.

A presente investigação demonstra pela primeira vez que a inibição farmacológica da via de sinalização Notch em animais oralmente infectados com *T. gondii* apresenta efeitos diferentes dependendo do órgão de estudo. Com este cenário, observou-se que o protozoário *T. gondii* induz uma resposta imunológica no hospedeiro se sobrepondo à inibição da via Notch mediante o uso de DBZ. Modelos diferentes de inibição poderiam esclarecer ainda mais o papel desta importante via de sinalização na toxoplasmose aguda induzida por infecção oral.

7 CONCLUSÕES

Pela primeira vez, verificou-se que a infecção por *T. gondii* regula negativamente a expressão do mRNA do gene alvo da via Notch, *Hes1*, assim como de *Math1*. Com isto, a infecção pelo protozoário estaria intervindo diretamente sobre ambos os genes mencionados, sem modificar a expressão do mRNA de *Notch1* no intestino delgado. Por outro lado, acreditamos que a expressão gênica de *Notch1* depende do tipo de modelo infeccioso a ser estudado. O presente estudo é o primeiro em demonstrar que a infecção oral com cistos de *T. gondii* não altera os níveis de expressão do mRNA de *Notch1* aos 8 dias de infecção. Nesse sentido seria interessante verificar o perfil de expressão em uma cinética de dias de infecção.

Observamos que a inibição da via Notch pela administração de DBZ em camundongos C57BL/6 não infectados induziu uma diminuição da expressão do mRNA de *Notch1* e *Hes1* o que nos mostra que nosso protocolo experimental foi favorável. Além disso, DBZ favorece o aumento do comprimento do intestino delgado e do número de células caliciformes e células de Paneth em camundongos C57BL/6.

A infecção oral com *T. gondii* induz uma potente resposta imune no hospedeiro, a qual se sobrepõe à inibição da via Notch por DBZ, tendo como consequência um *feedback* positivo da expressão de mRNA de *Notch1* no intestino delgado dos animais infectados, onde as lesões inflamatórias induzidas pela infecção oral são exacerbadas.

A inibição da via Notch com DBZ manteve os parâmetros clínicos, histológicos, assim como o parasitismo tecidual no intestino delgado de camundongos infectados com 20 cistos de *T. gondii*, apesar de preservar ao menos parcialmente as células caliciformes e células de Paneth, em paralelo a uma diminuição do mRNA de peptídeos antimicrobianos, o que poderia sugerir que essas células de Paneth, apesar de presentes, não foram eficientes em controlar o parasito *in situ* e consequentemente as alterações inflamatórias.

Concluimos que a proliferação do parasito *T. gondii* é independente da inibição da γ -secretase e da via Notch no intestino delgado em camundongos C57BL/6 tratados previamente com DBZ.

A inibição prévia da via Notch por DBZ afeta de forma diferente os órgãos periféricos tais como pulmão e fígado na infecção por *T. gondii*, sendo que a inibição da via diminui o parasitismo e alterações inflamatórias nesses órgãos dos animais infectados.

Concluimos que a inibição previamente com DBZ em camundongos infectados oralmente com *T. gondii* aumentou a produção de citocinas como IL-17A e IL-4; e manteve os níveis de IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-6.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, I.; CHANDRAKESAN, P.; TAWFIK, O.; XIA, L.; ANANT, S.; UMAR, S.; PAYNE, S. Critical Roles of Notch and Wnt/ β -Catenin Pathways in the Regulation of Hyperplasia and/or Colitis in Response to Bacterial Infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 9, p. 3107–3121, 2012. <https://doi.org/10.1128/IAI.00236-12>
- AHMED, I.; ROY, B.C.; RAACH, R.T.; OWENS, S.; XIA, L.; ANANT, S.; SAMPATH, V.; UMAR, S.; HAN, X. Enteric infection coupled with chronic Notch pathway inhibition alters colonic mucus composition leading to dysbiosis, barrier disruption and colitis. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0206701, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206701>
- ALAM, M. S.; MAEKAWA, Y.; KITAMURA, A.; TANIGAKI, K.; YOSHIMOTO, T.; KISHIHARA, K.; YASUTOMO, K. Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4⁺ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 13, p. 5943–5948, 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911755107>
- AL-ATTAR, A.; ALIMOVA, Y.; KIRAKODU, S.; KOSAL, A.; NOVAK, M.; STROMBERG, A.; ORRACA, L.; GONZALEZ-MARTINEZ, J.; MARTINEZ, M.; EBERSOLE, J.; GONZALEZ, O. Activation of Notch-1 in oral epithelial cells by *P. gingivalis* triggers the expression of the antimicrobial protein PLA2-IIA. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 4, p. 1047–1059, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0014-7>
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; CAMPILLO-RUIZ, F.; LIESENFELD, O. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in migrant agricultural workers living in poverty in Durango, Mexico. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 113, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-113>
- AMO, F.; SMITH, D.E.; SWIATEK, P.J.; GENDRON, M.; GREENSPAN, R.; MCMAHON, A.; GRIDLEY, T. Expression pattern of Motch, a mouse homolog of Drosophila Notch, suggests an important role in early postimplantation mouse development. **Development**, v. 115, n. 9, p. 737-744, 1992.
- AMSEN, D.; ANTOV, A.; JANKOVIC, D.; SHER, A.; RADTKE, F.; SOUABNI, A.; BUSSLINGER, M.; MCCRIGHT, B.; GRIDLEY, T.; FLAVELL, R. Direct Regulation of Gata3 Expression Determines the T Helper Differentiation Potential of Notch. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 89–99, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.021>
- AMSEN, D.; BLANDER, J.M.; LEE, G.R.; TANIGAKI, K.; HONJO, T.; FLAVELL, R. Instruction of Distinct CD4 T Helper Cell Fates by Different Notch Ligands on Antigen-Presenting Cells. **Cell**, v. 117, n. 4, p. 515–526, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00451-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00451-9)
- ANDERSON, C.F.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.J.; SACKS, D. CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 285–297, 2007. <https://doi.org/10.1084/jem.20061886>
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. **Science**, v. 284, n. 5415, p. 770–776, 1999. <https://doi.org/10.1126/science.284.5415.770>
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; MUSKAVITCH, M. A.; YEDVOBNICK, B. Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 7, p. 1977–1981, 1983. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.7.1977>
- AUDERSET, F.; SCHUSTER, S.; COUTAZ, M.; KOCH, U.; DESGRANGES, F.; MERCK, E.; MACDONALD, H.; REDTKE, F.; TACCHINI-COTTIER, F.; SACKS, D. Redundant Notch1 and Notch2 Signaling Is Necessary for IFN γ Secretion by T Helper 1 Cells During Infection with *Leishmania major*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002560, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002560>
- AYABE, T.; SATCHELL, D.P.; WILSON, C.L.; PARKS, W.; SELSTED, M.; OUELLETTE, A. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. **Nature Immunology**, v. 1, n. 2, p. 113–118, 2000. <https://doi.org/10.1038/77783>
- BAHIA-OLIVEIRA, L.; JONES, J.L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C.; OREFICE, F.; ADDISS, D. Highly

Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55–62, 2003. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020160>

BAILIS, W.; YASHIRO-OHTANI, Y.; FANG, T.C.; HATTON, R.; WEAVER, C.; ARTIS, D.; PEAR, W. Notch Simultaneously Orchestrates Multiple Helper T Cell Programs Independently of Cytokine Signals. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 148–159, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.006>

BARENCO, P.; LOURENÇO, E.V.; CUNHA-JÚNIOR, J.P.; ALMEIDA, K.C.; ROQUE-BARREIRA, M.; SILVA, D.A.; ARAÚ, E.C.; COUTINHO, L.; OLIVEIRA, M.C.; MINEO, T.W.; MINEO, J.R.; SILVA, N.M. *Toxoplasma gondii* 70 kDa Heat Shock Protein: Systemic Detection Is Associated with the Death of the Parasites by the Immune Response and Its Increased Expression in the Brain Is Associated with Parasite Replication. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96527, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096527>

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. 04, p. 421, 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000539>

BENEVIDES, L.; CARDOSO, C.R.; MILANEZI, C.M.; CASTRO-FELICE, L.; BARENCO, P.; SOUSA, R.O.; RODRIGUES, R.; 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>

BENSON, A.; PIFER, R.; BEHRENDT, C.L.; HOOPER, L.V.; YAROVINSKY, F. Gut Commensal Bacteria Direct a Protective Immune Response against *Toxoplasma gondii*. **Cell Host & Microbe**, v. 6, n. 2, p. 187–196, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.06.005>

BIERLY, A.L.; SHUFESKY, W.J.; SUKHUMAVASI, W.; MORELLI, A.E.; DENKERS, E.Y. Dendritic Cells Expressing Plasmacytoid Marker PDCA-1 Are Trojan Horses during *Toxoplasma gondii* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 12, p. 8485–8491, 2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8485>

BIGAS, A.; ESPINOSA, L. Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. **Blood**, v. 119, n. 14, p. 3226–3235, 2012. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-355826>

BLADER, I.J.; COLEMAN, B.I.; CHEN, C.; GUBBELS, M. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii* : 15 Years Later. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 463–485, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

BLAUMUELLER, C.M.; QI, H.; ZAGOURAS, P.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Intracellular Cleavage of Notch Leads to a Heterodimeric Receptor on the Plasma Membrane. **Cell**, v. 90, n. 2, p. 281–291, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80336-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80336-0)

BURGER, E.; ARAUJO, A.; LÓPEZ-YGLESIAS, A.; RAJALA, M.W.; GENG, L.; LEVINE, B.; HOOPER, L.; 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.e4, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.001>

BUZONI-GATEL, D.; DEBBABI, H.; MENNECHET, F.J.; MARTIN, V.; LEPAGE, A.; SCHWARTZMAN, J.; KASPER, L. Murine Ileitis After Intracellular Parasite Infection Is Controlled by TGF- β Producing Intraepithelial Lymphocytes. **Gastroenterology**, v. 120, p. 914–924, 2001. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.22432a>

CADWELL, K.; LIU, J.; BROWN, S.L.; MIYOSHI, H.; LOH, J.; LENNERZ, J.; KISHI, C.; CARRERO, J.; STONE, C.; BRUNT, E.; XAVIER, R.; SLECKMAN, B.; LI, E.; MIZUSHIMA, N.; STAPPENBECK, T.; VIRGIN, H. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg1611 in mouse and human intestinal Paneth cells. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 259–263, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature07416>

CARME, B.; DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L. Severe Acquired Toxoplasmosis Caused by Wild Cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 656–658, 2009. <https://doi.org/10.3201/eid1504.081306>

- CHAN, J.M.; BHINDER, G.; SHAM, H.; RYZ, N.; HUANG, T.; BERGSTROM, K.; VALLANCE, B.; BAUMLER, A.J. CD4⁺ T Cells Drive Goblet Cell Depletion during *Citrobacter rodentium* Infection. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 12, p. 4649–4658, 2013. <https://doi.org/10.1128/IAI.00655-13>
- CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 7, p. 445–456, 2011. <https://doi.org/10.1038/nri3007>
- CHILLAKURI, C.R.; SHEPPARD, D.; LEA, S.M.; HANDFORD, P.A. Notch receptor–ligand binding and activation: Insights from molecular studies. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 23, n. 4, p. 421–428, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.009>
- COFFMAN, C.; HARRIS, W.; KINTNER, C. Xotch, the xenopus homolog of *Drosophila* Notch. **Science**, v. 249, p. 1438–1441, 1990. <https://doi.org/10.1126/science.2402639>
- COURRET, N.; DARCHE, S.; SONIGO, P.; MILON, G.; BUZONI-GATEL, D.; TARDIEUX, I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309–316, 2006. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0666>
- COUTAZ, M.; HURRELL, B.P.; AUDERSET, F.; WANG, H.; SIEGERT, S.; EBERL, S.; HO, P.; RADTKE, F.; TACCHINO-COTTIER, F. Notch regulates Th17 differentiation and controls trafficking of IL-17 and metabolic regulators within Th17 cells in a context-dependent manner. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep39117>
- DEMITRACK, E. S.; GIFFORD, G. B.; KEELEY, T. M.; CARULLI, A.J.; VANDUSSE, K.L.; THOMAS, D.; GIORDANO, T.J.; LIU, Z.; KOPAN, R.; SAMUELSON, L.C. Notch signaling regulates gastric antral LGR5 stem cell function. **The EMBO Journal**, v. 34, n. 20, p. 2522–2536, 2015. <https://doi.org/10.15252/embj.201490583>
- DEMITRACK, E.S.; SAMUELSON, L.C. Notch regulation of gastrointestinal stem cells: Notch regulates GI stem cells. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 17, p. 4791–4803, 2016. <https://doi.org/10.1113/JP271667>
- DEXTER, John S. The Analysis of a Case of Continuous Variation in *Drosophila* by a Study of Its Linkage Relations. **The American Naturalist**, v. 48, n. 576, p. 712–758, 1914. <https://doi.org/10.1086/279446>
- DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; DJOKIĆ, V.; VUJANIĆ, M.; ŽIVKOVIĆ, T.; BOBIC, B.; NIKOLIC, A.; SLAVIC, K.; KLUN, I.; IVOVIC, V. Kinetics of parasite burdens in blood and tissues during murine toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 3, p. 372–376, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.05.006>
- DONGRE, A.; SURAMPUDI, L.; LAWLOR, R.G.; FAUQ, ABDUL, MIELE, L.; GOLDE, T.; MINTER, L.; OSBORNE, B. Non-Canonical Notch Signaling Drives Activation and Differentiation of Peripheral CD4⁺ T Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00054>
- DROY-DUPRE, L.; VALLEE, M.; BOSSARD, C.; LABOISSE, C.L.; JARRY, A. A multiparametric approach to monitor the effects of -secretase inhibition along the whole intestinal tract. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 1, p. 107–114, 2012. <https://doi.org/10.1242/dmm.007591>
- DRUMMOND, C.G.; BOLOCK, A.M.; MA, C.; LUKE, C.; GOOD, M.; COYNE, C. Enteroviruses infect human enteroids and induce antiviral signaling in a cell lineage-specific manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 7, p. 1672–1677, 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617363114>
- DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155–177, 1972. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1972.tb03431.x>
- DUBEY, J.P.; MILLER, N.L.; FRENKEL, J.K. The *toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, n. 4, p. 636–662, 1970. <https://doi.org/10.1084/jem.132.4.636>
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan: perspectives and methods. 1st ed. Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic Press, 2007.

- DUBEY, J. P.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; MCLEOD, R. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. **Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 1–13, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001673>
- 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>
- EGAN, C.E.; CRAVEN, M.D.; LENG, J; MACK, M.; SIMPSON, K.; DENKERS, E. CCR2-dependent intraepithelial lymphocytes mediate inflammatory gut pathology during *Toxoplasma gondii* infection. **Mucosal Immunology**, v. 2, n. 6, p. 527–535, 2009. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.105>
- EGAN, C.E.; COHEN, S.B; DENKERS, E.Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, n. 7, p. 668–675, 2012. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.93>
- ELLIESEN, L. W.; JEFFREY, B.; WEST, D.C.; SORENG, L.A.; REYNOLDS, T.C.; SMITH, S.D.; SKIAR, J. TAN-1 the human homolog of the *Drosophila* Notch gene, is broken by chromosomal translocations on T lymphoblastic neoplasms. **Cell**, v. 66, p. 649–661, 1991. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90111-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90111-B)
- FANG, T.C.; YASHIRO-OHTANI, Y.; DEL BIANCO, C.; KNOBLOCK, D.; PEAR, W. Notch Directly Regulates Gata3 Expression during T Helper 2 Cell Differentiation. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 100–110, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.018>
- FERMINO, M.L.; DIAS, F.C; LOPES, C.D.; SOUZA, M.A.; CRUZ, A.K.; LIU, F.; CHAMMAS, R.; ROQUE-BARREIRA, M.; RABINOVICH, G.; BERNARDES, E. Galectin-3 negatively regulates the frequency and function of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells and influences the course of *Leishmania major* infection: Immunomodulation. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 7, p. 1806–1817, 2013. <https://doi.org/10.1002/eji.201343381>
- FRENKEL, J K; DUBEY, J. P.; MILLER, N L. *Toxoplasma gondii* in Cats: Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts. p. 5, 1970. <https://doi.org/10.1126/science.168.3929.353-a>
- GASSLER, Nikolaus. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 8, n. 4, p. 150–160, 2017. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i4.150>
- GIFFORD, G.B.; DEMITRACK, E.S.; KEELEY, T.M.; TAM, A.; LA CUNZA, N.; DEDHIA, P.H.; SPENSE, J.; SIMEONE, D.M.; SAOTOME, I.; LOUVI, A.; SIEBEL, C.; SAMUELSON, L.C. Notch1 and Notch2 receptors regulate mouse and human gastric antral epithelial cell homeostasis. **Gut**, v. 66, n. 6, p. 1001–1011, 2017. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310811>
- GORDON, W. R.; ARNETT, K. L.; BLACKLOW, S. C. The molecular logic of Notch signaling - a structural and biochemical perspective. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 19, p. 3109–3119, 2008. <https://doi.org/10.1242/jcs.035683>
- GRIDLEY, T. Notch signaling in vascular development and physiology. **Development**, v. 134, n. 15, p. 2709–2718, 2007. <https://doi.org/10.1242/dev.004184>
- GUITON, R.; VASSEUR, V.; CHARRON, S.; ARIAS, M.T., VAN LANGEN, N.; BUZONI-GATEL, D.; RYFFEL, B.; DIMIER-POISSON, I. Interleukin 17 Receptor Signaling Is Deleterious during *Toxoplasma gondii* Infection in Susceptible BL6 Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 3, p. 427–435, 2010. <https://doi.org/10.1086/653738>
- HEIMESAAT, M.M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; FUCHS, D.; STRUCK, D.; NIEBERGALL, J.; JAHN, H.; DUNAY, I.; MOTER, A.; GESCHER, D.; SCHUMANN, R.; GOBEL, U.; LIESENFELD, O. Gram-Negative Bacteria Aggravate Murine Small Intestinal Th1-Type Immunopathology following Oral Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8785–8795, 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8785>

- HILDEBRAND, D.; UHLE, F.; SAHIN, D.; KRAUSER, U.; WEIGAND, M.; HEEG, K. The Interplay of Notch Signaling and STAT3 in TLR-Activated Human Primary Monocytes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 2018. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00241>
- HU, X.; CHUNG, A.Y.; WU, I.; FOLDI, J.; CHEN, J.; JI, J.; TATEYA, T.; KANG, Y.; HAN, J.; GESSLER, M.; KAGEYAMA, R.; IVASHKIV, L. Integrated Regulation of Toll-like Receptor Responses by Notch and Interferon- γ Pathways. **Immunity**, v. 29, n. 5, p. 691–703, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.016>
- HUAN, Y.W.; BENGTTSSON, R.J.; MACINTYRE, N.; GUTHRIE, J.; FINLAYSON, H.; SMITH, S.; ARCHIBALD, A.; AIT-ALI, T.; ANANT, S. *Lawsonia intracellularis* exploits β -catenin/Wnt and Notch signalling pathways during infection of intestinal crypt to alter cell homeostasis and promote cell proliferation. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173782, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173782>
- ITO, T.; ALLEN, R.M.; CARSON, W.F.; SCHALLER, M.; CAVASSANI, K.; HOGABOAM, C.; LUKACS, N.; MATSUKAWA, A.; KUNKEL, S.; HEISE, M. The Critical Role of Notch Ligand Delta-like 1 in the Pathogenesis of Influenza A Virus (H1N1) Infection. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002341, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002341>
- JEFFRIES, S.; ROBBINS, D. J.; CAPOBIANCO, A. J. Characterization of a High-Molecular-Weight Notch Complex in the Nucleus of Notch-Transformed RKE Cells and in a Human T-Cell Leukemia Cell Line. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 11, p. 3927–3941, 2002. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.11.3927-3941.2002>
- JENSEN, J.; PEDERSEN, E.E.; GALANTE, P.; HALD, J.; HELLER, R.; ISHIBASHI, M.; KAGEYAMA, R.; GUILLEMOT, F.; SERUP, P.; MADSEN, O. Control of endodermal endocrine development by *Hes1*. **Nature Genetics**, v. 24, n. 1, p. 36–44, 2000. <https://doi.org/10.1038/71657>
- JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10–25, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>
- JUNG, C.; HUGOT, J.; BARREAU, F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. **International Journal of Inflammation**, v. 2010, p. 1–12, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/823710>
- KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I.A. Interleukin-17/Interleukin-17 Receptor-Mediated Signaling Is Important for Generation of an Optimal Polymorphonuclear Response against *Toxoplasma gondii* Infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 617–621, 2005. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.617-621.2005>
- KIM, T.; SHIVDASANI, R.A. Notch signaling in stomach epithelial stem cell homeostasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 4, p. 677–688, 2011. <https://doi.org/10.1084/jem.20101737>
- KIM, T.H.; KIM, B.M.; MAO, J.; ROWAN, S.; SHIVDASANI, R.A. Endodermal Hedgehog signals modulate Notch pathway activity in the developing digestive tract mesenchyme. **Development**, v. 138, n. 15, p. 3225–3233, 2011. <https://doi.org/10.1242/dev.066233>
- KIMBERLY, W. T.; LAVOIE, M. J.; OSTASZEWSKI, B. L.; YE, W.; WOLFE, M.S.; SELKOE, D.J. Gamma-Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 11, p. 6382–6387, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1037392100>
- KOPAN, R. Notch Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 10, p. a011213–a011213, 2012. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011213>
- KOPAN, R.; ILAGAN, M. X.G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. **Cell**, v. 137, n. 2, p. 216–233, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>
- LI, X.; LIU, F.; ZHANG, X.; SHI, G.; REN, J.; DING, L.; FAN, H.; DOU, H.; HOU, Y. Notch-Hes1 axis controls TLR7-mediated autophagic death of macrophage via induction of P62 in mice with lupus. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 8, p. e2341–e2341, 2016. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.244>

LI, Y.; WU, S.; PU, J.; HUANG, X.; ZHANG, P. Dengue virus up-regulates expression of notch ligands Dll1 and Dll4 through interferon- β signalling pathway. **Immunology**, v. 144, n. 1, p. 127–138, 2015.

<https://doi.org/10.1111/imm.12357>

LIESENFELD, O. 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>

LIESENFELD, O. Oral Infection of C57BL/6 Mice with *Toxoplasma gondii*: A New Model of Inflammatory Bowel Disease? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. s1, p. S96–S101, 2002.

<https://doi.org/10.1086/338006>

LIESENFELD, O.; KANG, H.; PARK, D.; NGUYEN, T.; PARKHE, C.; WATANABE, H.; ABO, T.; SHER, A.; REMINGTON, J.; SUZUKI, Y. TNF- α , nitric oxide and IFN- γ 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. 12, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00237.x>

LINA, T.T.; DUNPHY, P.S.; LUO, T.; MCBRIDE, J. *Ehrlichia chaffeensis* TRP120 Activates Canonical Notch Signaling To Downregulate TLR2/4 Expression and Promote Intracellular Survival. **mBio**, v. 7, n. 4, 2016.

<https://doi.org/10.1128/mBio.00672-16>

LOGEAT, F.; BESSIA, C.; BROU, C.; LEBAIL, O.; JARRIAULT, S.; SEIDAH, N.G.; ISRAEL, A. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 14, p. 8108–8112, 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8108>

MAEKAWA, Y.; TSUKUMO, S.; CHIBA, S.; HIRAI, H.; HAYASHI, Y.; OKADA, H.; KISHIHARA, K.; YASUTOMO, K. Delta1-Notch3 Interactions Bias the Functional Differentiation of Activated CD4+ T Cells. **Immunity**, v. 19, n. 4, p. 549–559, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00270-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00270-X)

MAGALHÃES, L.G.; MORAIS, E.R.; MACHADO, C.B.; GOMES, M.S.; CABRAL, F.; SOUZA, J.; SOARES, C.; SÁ, R.G.; CASTRO- BORGES, W.; RODRIGUES, V. Uncovering Notch pathway in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 115, n. 10, p. 3951–3961, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s00436-016-5161-8>

MAREZE, M.; BENITEZ, A.N.; BRANDÃO, A.; PINTO-FERRERIRA, F.; MIURA, A.C.; MARTINS, F.D.; CALDART, E.T.; BIONDO, A.; FREIRE, R.; MITSUKA, R.; NAVARRO, I.T.; CARVALHO, L.H. Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0212375, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212375>

MATHERN, D.R.; LAITMAN, L.E.; HOVHANNISYAN, Z.; DUNKIN, D.; FARSIO, S.; MALIK, T.; RODA, G.; CHITRE, A.; IUGA, A.C.; YERETSSIAN, G.; BERIN, M.C.; DAHAN, S. Mouse and human Notch-1 regulate mucosal immune responses. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 4, p. 995–1005, 2014.

<https://doi.org/10.1038/mi.2013.118>

MENNECHET, F.J.D.; KASPER, L.H.; RACHINEL, N.; LI, W.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. Lamina Propria CD4+ T Lymphocytes Synergize with Murine Intestinal Epithelial Cells to Enhance Proinflammatory Response Against an Intracellular Pathogen. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 6, p. 2988–2996, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.6.2988>

MENNECHET, F.J.D.; KASPER, L.H.; RACHINEL, N.; MINNS, L.; LUANGSAY, S.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 4, p. 1059–1067, 2004. <https://doi.org/10.1002/eji.200324416>

MILANO, J.; MCKAY, J.; DAGENAIS, C.; FOSTER, L.; POGNAN, F.; GADIENT, R.; JACOBS, R.T.; ZACCO, A.; GREENBERG, B.; CIACCIO, P.J. Modulation of Notch Processing by γ -Secretase Inhibitors Causes Intestinal Goblet Cell Metaplasia and Induction of Genes Known to Specify Gut Secretory Lineage Differentiation. **Toxicological Sciences**, v. 82, n. 1, p. 341–358, 2004. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh254>

MILLER, C.M.; BOULTER, N.R.; IKIN, R.J.; SMITH, N.C. The immunobiology of the innate response to

Toxoplasma gondii. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 23–39, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.002>

MINTER, L.M.; TURLEY, D.M.; DAS, P.; SHIN, H.; JOSHI, I.; LAWLOR, R.; CHO, O.H.; PALAGA, T.; GOTTIPATI, S.; TELFER, J.C.; KOSTURA, L.; FAUQ, A.H.; SIMPSON, K.; SUCH, MIELE, L.; GOLDE, T.; MILLER, S.D.; OSBORNE, B.A. Inhibitors of γ -secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. **Nature Immunology**, v. 6, n. 7, p. 680–688, 2005.
<https://doi.org/10.1038/ni1209x>

MITTAL, V.; ICHHPUJANI, R.L. Toxoplasmosis – An update. **Tropical Parasitology**, v. 1, n. 1, p. 6, 2011.
<https://doi.org/10.4103/2229-5070.72109>

MIYAMOTO, A.; WEINMASTER, G. Notch Signal Transduction: Molecular and Cellular Mechanisms. *In: Encyclopedia of Neuroscience*. [s.l.]: Elsevier, 2009, p. 1259–1268. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01026-3>

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The 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)

MONTOYA, J.G.; ROSSO, F. Diagnosis and Management of Toxoplasmosis. **Clinics in Perinatology**, v. 32, n. 3, p. 705–726, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2005.04.011>

MORGAN, T.H. The Theory of the Gene. **THE AMERICAN NATURALIST**, n. 609, p. 513–544, 1917.
<https://doi.org/10.1086/279629>

MORODA, M.; TAKAMOTO, M.; IWAKURA, Y.; NAKAYAMA, J.; AOSAI, F.; ADAMS, J.H. Interleukin-17A-Deficient Mice Are Highly Susceptible to *Toxoplasma gondii* Infection Due to Excessively Induced T. gondii HSP70 and Interferon Gamma Production. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 12, 2017.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00399-17>

MOWAT, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 4, p. 331–341, 2003. <https://doi.org/10.1038/nri1057>

MUÑOZ, M.; EIDENSCHENK, C.; OTA, N.; WONG, K.; LOHMANN, U.; KUHL, A.A.; WANG, X.; MANZANILLO, P.; LI, Y.; RUTZ, S.; ZHENG, Y.; DIEHL, L.; KAYAGAKI, N.; VAN LOOKERE-CAMPAGNE, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M.; OUYANG, W. Interleukin-22 Induces Interleukin-18 Expression from Epithelial Cells during Intestinal Infection. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 321–331, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.011>

MUÑOZ, M.; HEIMESAAT, M.M.; DANKER, K.; STRUCK, D.; LOHMANN, U.; PLICKERT, R.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; DUNAY, I.R.; WOLK, K.; LODDENKEMPER, C.; KREEL, H.; LIBERT, C.; LUND, L.; FREY, O.; HOLSCHER, C.; IWAKURA, Y.; GHILARDI, N.; OUYANG, W.; KAMRADT, T.; SABAT, R.; LIESENFELD, O. Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii* –induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 13, p. 3047–3059, 2009. <https://doi.org/10.1084/jem.20090900>

NAKANO, N.; NISHIYAMA, C.; YAGITA, H.; KOYANAGI, A.; OGAWA, H.; OKUMURA, K. Notch1-mediated Signaling Induces MHC Class II Expression through Activation of Class II Transactivator Promoter III in Mast Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 14, p. 12042–12048, 2011.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.138966>

NEAL, L.M.; QIU, Y.; CHUNG, J.; XING, E.; CHO, W.; MALACHOWSKI, A.; SANDY-SLOAT, A.; ASTERHOLZER, J.; MAILLARD, I.; OLSZEWSKI, M. T Cell–Restricted Notch Signaling Contributes to Pulmonary Th1 and Th2 Immunity during *Cryptococcus neoformans* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 2, p. 643–655, 2017. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601715>

NOAH, T.K.; SHROYER, N.F. Notch in the Intestine: Regulation of Homeostasis and Pathogenesis. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 263–288, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183741>

OBATA, Y.; TAKAHASHI, D.; EBISAWA, M.; KAKIGUCHI, K.; YONEMURA, S.; JINNOHARA,

- KANAYA, T.; FUJIMURA, Y.; OHMAE, M.; HASE, K.; OHNO, H. Epithelial Cell-Intrinsic Notch Signaling Plays an Essential Role in the Maintenance of Gut Immune Homeostasis. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 5, p. 2427–2436, 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101128>
- ORTEGA-PACHECO, A.; ACOSTA V.K.Y.; GUZMÁN-MARÍN, E.; SEGURA-CORREA, J.; ALVAREZ, M.; JIMENEZ, M.C. Prevalence and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* in Fattening Pigs Farm from Yucatan, Mexico. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–6, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/231497>
- PALAGA, T.; BURANARUK, C.; RENGPIPAT, S.; FAUQ, A.H.; GOLDE, T.E.; KAUFMANN, S.; OSBORNE, B.A. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 1, p. 174–183, 2008. <https://doi.org/10.1002/eji.200636999>
- PAREDES-SANTOS, T.C.; MARTINS-DUARTE, E.S.; VITOR, R.W.A.; DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Spontaneous cystogenesis in vitro of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, v. 62, n. 2, p. 181–188, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.12.003>
- PARVANOVA, I.; EPIPHANIO, S.; FAUQ, A.; GOLDE, T.E.; PRUDENCIO, M.; MOTA, M.M.; LANGSLEY, GORDON. A Small Molecule Inhibitor of Signal Peptide Peptidase Inhibits *Plasmodium* Development in the Liver and Decreases Malaria Severity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. e5078, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005078>
- POSSENTI, A.; FRATINI, F.; FANTOZZI, L.; POZIO, E.; DUBEY, J.P.; PONZI, M.; PIZZI, E.; SPANO, F. Global proteomic analysis of the oocyst/sporozyte of *Toxoplasma gondii* reveals commitment to a host-independent lifestyle. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 183, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-183>
- RAETZ, M.; HWANG, S.; WILHELM, C.L.; KIRKLAND, D.; BENSON, A.; STURGEN C.; MIRPURI, J.; VAISHNAVA, S.; HOU, B.; DEFRANCO, A.; GILPIN, C.; HOOPER, L.; YAROVINSKY, F. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. **Nature Immunology**, v. 14, n. 2, p. 136–142, 2013. <https://doi.org/10.1038/ni.2508>
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M.L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- ROBINSON, S.C.; KLOBUCAR, K.; PIERRE, C.C.; ANSARI, A.; ZHENILO, S.; PROKHORTCH, E.; DANIEL, J. Kaiso differentially regulates components of the Notch signaling pathway in intestinal cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 15, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0178-x>
- ROTHENBERG, M.E.; NUSSE, Y.; KALISKY, T.; LEE, J.; DALERBA, P.; SCHEEREN, F.; LOBO, N.; KULKARMI, S.; SIM.; SOPHEAK.; QIAN, DALONG.; BEACHY, P.; PASRICHA, P.; QUAKE, S.; CLARKE, M. Identification of a cKit⁺ Colonic Crypt Base Secretory Cell That Supports Lgr5⁺ Stem Cells in Mice. **Gastroenterology**, v. 142, n. 5, p. 1195-1205.e6, 2012. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.006>
- RUDD, B.D.; SCHALLER, M.A.; SMIT, J.J.; KUNKEL, S.; NEUPANE, R.; KELLEY, L.; BERLIN, A.; LUKACS.; N. MyD88-Mediated Instructive Signals in Dendritic Cells Regulate Pulmonary Immune Responses during Respiratory Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 9, p. 5820–5827, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5820>
- RUTZ, S.; JANKE, M.; KASSNER, N.; HOHNSTEIN, T.; KRUEGER, M.; SCHEFFOLD, A. Notch regulates IL-10 production by T helper 1 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 9, p. 3497–3502, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712102105>
- RUTZ, S.; MORDMÜLLER, B.; SAKANO, S.; SCHEFFOLD, A. Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 8, p. 2443–2451, 2005. <https://doi.org/10.1002/eji.200526294>
- SANGPHECH, N.; OSBORNE, B.A.; PALAGA, T. Notch signaling regulates the phosphorylation of Akt and survival of lipopolysaccharide-activated macrophages via regulator of G protein signaling 19 (RGS19). **Immunobiology**, v. 219, n. 9, p. 653–660, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.03.020>
- SATO, T.; VAN ES, J.H.; SNIPPET, H.J.; STANGE, D.; VRIES, R.; VAN DEN BORN, M.; BARKER, N.;

SHROYER, N.; VAN DE WET.; CLEVERS, H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 415–418, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature09637>

SAXENA, K.; BLUTT, S.E.; ETTAYEBI, K.; ZENG, X.; BROUGHMAN, J.; CRAWFORD, S.; KARANDIKAR, U.; SASTRI, N.; CONNER, M.; OPEKUN, A.; GRAHAM, D.; QUERESHI, W.; SHERMAN, V.; FOULKE, J.; IN, J.; KOVBASNJUK, O.; ZACHOSM N.; DONOWITZ, M.; ESTES, M.; SANDRI-GOLDIN, R. Human Intestinal Enteroids: a New Model To Study Human Rotavirus Infection, Host Restriction, and Pathophysiology. **Journal of Virology**, v. 90, n. 1, p. 43–56, 2016. <https://doi.org/10.1128/JVI.01930-15>

SCHNEIDER, L. C. L.; DO NASCIMENTO, J. C. P.; TREVIZAN, A. R.; GOIS, M.B.; BORGES, S.C.; BERALDI, E.J.; GARCIA, J.L.; SANT-ANA, D.; 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**, v. 30, n. 5, p. e13264, 2018. <https://doi.org/10.1111/nmo.13264>

SCHREINER, M.; LIESENFELD, O. Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: review of 70 reports from the literature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 221–233, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200015>

SEARFOSS, G.H.; JORDAN, W.H.; CALLIGARO, D.O.; GALBREATH, E.; SCHIRTZINGER, L.; BERRIDGE, B.; GAO, HONG, HIGGINS, M.; MAY, P.C.; RYAN, T. Adipsin, a Biomarker of Gastrointestinal Toxicity Mediated by a Functional γ -Secretase Inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 46107–46116, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307757200>

SHWAB, E.K.; SARAF, P.; ZHU, X.; ZHOU, DO.; MCFERRIN, B.; AJZENBERG, D.; SCHARES, G.; HAMMOND, K.; VAN HELDEN, P.; HIGGINS, S.; GERHOLD, R.; ROSENTHAL, B.; ZHAO, X.; DUBEY, J.; SU, C. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 29, p. E6956–E6963, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722202115>

SIBLEY, L. D.; AJIOKA, J.W. Population Structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal Expansion Driven by Infrequent Recombination and Selective Sweeps. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 329–351, 2008. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162925>

SIBLEY, L.D.; KHAN, A.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B. 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>

SILVA, N. M.; MANZAN, R.M.; CARNEIRO, W.P.; MILANEZI, C.; 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>

SODHI, C.P.; NEAL, M.D.; SIGGERS, R.; SHO, S.; MA, C.; BRANCA, M.; PRINDLE, T.; RUSSO, A.; AFRAZI, A.; GOOD, M.; BROWER-SINNING, R.; FIREK, B.; MOROWITZ, M.; OZOLEK, J.; GITTES, G.; BILLIAR, T.; HACKAM, D. Intestinal Epithelial Toll-Like Receptor 4 Regulates Goblet Cell Development and Is Required for Necrotizing Enterocolitis in Mice. **Gastroenterology**, v. 143, n. 3, p. 708–718.e5, 2012. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.05.053>

STANGER, B. Z.; DATAR, R.; MURTAUGH, L. C.; MELTON, D. Direct regulation of intestinal fate by Notch. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 35, p. 12443–12448, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505690102>

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

SUN, J.; KRAWCZYK, C.J.; PEARCE, E.J. Suppression of Th2 Cell Development by Notch Ligands Delta1 and Delta4. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 3, p. 1655–1661, 2008.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1655>

TAKADA, Y.; FUKUDA, A.; CHIBA, T.; SENO, H. Brg1 plays an essential role in development and homeostasis of the duodenum through regulation of Notch signaling. **Development**, v. 143, n. 19, p. 3532–3539, 2016. <https://doi.org/10.1242/dev.141549>

TANIGAKI, K.; HONJO, T. Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. **Nature Immunology**, v. 8, n. 5, p. 451–456, 2007. <https://doi.org/10.1038/ni1453>

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

TINDEMANS, I.; PEETERS, M.J.W.; HENDRIKS, R.W. Notch Signaling in T Helper Cell Subsets: Instructor or Unbiased Amplifier? **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00419>

TREVIZAN, A.R.; VICENTINO-VIEIRA, S.L.; DA SILVA WATANABE, P.; GOIS, M.; DE MELO, G.; GARCIA, J.L.; DE ALMEIDA, E.; SANT-ANA, D. 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>

TU, L.; FANG, T.C.; ARTIS, D.; SHESTOVA, O.; PROSS, S.E.; MAILLARD, I.; PEAR, W.S. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 8, p. 1037–1042, 2005. <https://doi.org/10.1084/jem.20050923>

TURNER, M.; LENHART, S.; ROSENTHAL, B.; ZHAO, X. Modeling effective transmission pathways and control of the world’s most successful parasite. **Theoretical Population Biology**, v. 86, p. 50–61, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2013.04.001>

VAN ES, J.H.; DE GEEST, N.; VAN DE BORN, M.; CLEVER, H.; HASSAN, B. Intestinal stem cells lacking the *Math1* tumour suppressor are refractory to Notch inhibitors. **Nature Communications**, v. 1, n. 2, p. 1–5, 2010. <https://doi.org/10.1038/ncomms1017>

VAN ES, J.H.; SATO, T.; VAN DE WETERING, M.; LYUBIMOVA, A.; YEE NEE, A.; GREGORIEFF, A.; SASAKI, N.; ZEINSTR, L.; VAN DEN BORN, M.; KORVING, J.; MARTENS, A.; BARKERS, N.; VAN OUDENAARDE, A.; CLEVERS, H. *Dll1*⁺ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 10, p. 1099–1104, 2012. <https://doi.org/10.1038/ncb2581>

VANDUSSEN, K. L.; CARULLI, A. J.; KEELEY, T. M.; PATEL, S.R.; PUTHOFF, B.J.; MAGNESS, S.T.; TRAN, I.T.; MAILLARD, I.; SIEBEL, C.; KOLTERUD, A.; GROSSE, A.; GUMUCIO, D.; ERNST, S.; TSAI, Y.; DEMPSEY, P.; SAMUELSON, L.C. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. **Development**, v. 139, n. 3, p. 488–497, 2012. <https://doi.org/10.1242/dev.070763>

VILLERET, B.; BRAULT, L.; COUTURIER-MAILLARD, A.; ROBINET, P.; VASSEUR, V.; DIMIER-POISSON, I.; JACOBS, M.; ZHENG, S.; QUESNIEAUX, V. 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.

VOSENKÄMPER, A.; STRUCK, D.; ALVARADO-ESQUIVEL, C.; WENT, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; PFEFFER, KLAUS, ALBER, G.; LOCHNER, M.; FORSTER, I.; LIESENFELD, O. Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 11, p. 3197–3207, 2004. <https://doi.org/10.1002/eji.200424993>

WEI, X.; WANG, J.; HAO, C.; YANG, X.; WANG, L.; HUANG, C.; BAI, X.; LIAN, J.; ZHANG, Y. Notch Signaling Contributes to Liver Inflammation by Regulation of Interleukin-22-Producing Cells in Hepatitis B Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, 2016. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00132>

WEISS, L.M.; KIM, K. THE DEVELOPMENT AND BIOLOGY OF BRADYZOITES OF TOXOPLASMA

GONDII. *Frontiers Bioscience*, v. 5, p. 391-405, 2011. <https://doi.org/10.2741/A521>

WENG, A. P. Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science*, v. 306, n. 5694, p. 269–271, 2004. <https://doi.org/10.1126/science.1102160>

WILSON, C. L. Regulation of Intestinal α -Defensin Activation by the Metalloproteinase Matrilysin in Innate Host Defense. *Science*, v. 286, n. 5437, p. 113–117, 1999. <https://doi.org/10.1126/science.286.5437.113>

WONGCHANA, W.; KONGKAVITON, P.; TANGTANATAKUL, P.; SITTPLANGKON, C.; BUTTA, P.; CHAWALITPONG, S.; PATTARAKANKUL, T.; OSBORNE, B.; PALAGA, T.; KARPURAPU, M. Notch signaling regulates the responses of lipopolysaccharide-stimulated macrophages in the presence of immune complexes. *PLOS ONE*, v. 13, n. 6, p. e0198609, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198609>

YANG, Q. Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. *Science*, v. 294, n. 5549, p. 2155–2158, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1065718>

ZECCHINI, V. Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells. *Genes & Development*, v. 19, n. 14, p. 1686–1691, 2005. <https://doi.org/10.1101/gad.341705>

ZHANG, Q.; WANG, C.; LIU, Z.; LIU, X.; HAN, C.; CAO, X.; LI, N. Notch Signal Suppresses Toll-like Receptor-triggered Inflammatory Responses in Macrophages by Inhibiting Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2-mediated Nuclear Factor κ B Activation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 9, p. 6208–6217, 2012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310375>

ZHANG, Y.; COBLEIGH, M.A.; LIAN, J.; HUANG, C.; BOOTH, C.; BAI, X.; ROBEK, M. A Proinflammatory Role for Interleukin-22 in the Immune Response to Hepatitis B Virus. *Gastroenterology*, v. 141, n. 5, p. 1897–1906, 2011. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.051>

9. ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Influencia da via de sinalização Notch de ativação celular na diferenciação de células calciformes em infecção oral por *Toxoplasma gondii*.”, protocolo nº 088/15, sob a responsabilidade de Neide Maria da Silva – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de 04/09/2015.

(We certify that the project entitled " Influencia da via de sinalização Notch de ativação celular na diferenciação de células calciformes em infecção oral por *Toxoplasma gondii*.", protocol 088/15, under the responsibility of Neide Maria da Silva - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of 04/09/2015).

Vigência do Projeto	Início: 01/12/2015 - Término: 01/08/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>Mus musculus</i>
Número de animais	Swiss: 5 machos / C57BL/6: 50 Fêmeas
Peso / Idade	Swiss: 8-12 semanas e 22 g - C57BL/6: 8-12 semanas e 22 g
Sexo	Machos + Fêmeas
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal – CBEA
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 16 de setembro de 2015

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