

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

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE NOX-2 EM CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Neospora caninum***

Juliana Izidoro Lucas

Uberlândia – MG
Maio– 2023

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

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE NOX-2 EM CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Neospora caninum***

Juliana Izidoro Lucas
Discente

Tiago Wilson Patriarca Mineo
Orientador

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte dos
Requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Uberlândia – MG
Maio – 2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

L933 2023	<p>Lucas, Juliana Izidoro, 1996- Avaliação do papel de Nox-2 em camundongos experimentalmente infectados com Neospora caninum [recurso eletrônico] / Juliana Izidoro Lucas. - 2023.</p> <p>Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.303 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca, 1979- , (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada

Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado nº 287				
Data:	26/05/2023	Hora de início:	09h00	Hora de encerramento:	10h45
Matrícula do Discente:	12112IPA004				
Nome do Discente:	Juliana Izidoro Lucas				
Título do Trabalho:	Avaliação do papel de NOX-2 em camundongos experimentalmente infectados com <i>Neospora caninum</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunologia e Biologia Celular de Patógenos Causadores de Doenças Infecciosas e Parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação dos mecanismos de reconhecimento imunes frente a infecção pelos Protozoários <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>				

No dia 26 de maio de 2023, às 09h00, reuniu-se, por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelo Presidente: Prof. Tiago Wilson Patriarca Mineo, ICBIM/UFU (orientador da candidata); Prof. Luiz Daniel de Barros, CCA/UFLA; Profa. Caroline Martins Mota, IBTEC/UFU.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente, a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da 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). Ultimeada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADA

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

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 **Tiago Wilson Patriarca Mineo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/05/2023, às 10:46, 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 **Caroline Martins Mota, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/05/2023, às 10:48, 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 **Luiz Daniel de Barros, Usuário Externo**, em 26/05/2023, às 10:48, 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 **4486806** e o código CRC **597BDA3C**.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do <i>Neospora caninum</i>	11
Figura 2. Topologia transmembranar e estrutura de domínio das enzimas NOX.....	14
Figura 3. Cinética da expressão de genes de ROS ao longo do tempo da infecção por <i>N. caninum</i>	25
Figura 4. NOX-2 está relacionado com a variação de peso corporal na infecção por <i>N. caninum</i>	27
Figura 5. NOX-2 não influencia a replicação do parasita durante a infecção por <i>N. caninum</i>	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação de primers utilizados.....	22
---	----

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1.INTRODUÇÃO	8
1.1 <i>Neospora caninum</i> e hospedeiros.....	8
1.2 Morfologia e ciclo biológico	9
1.3 Patogênese e patogenia	11
1.4 Resposta imune	12
1.5 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e NADPH oxidase.....	13
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivos gerais.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Animais.....	18
4.2 Cultivos de células e parasitos.....	18
4.3 Protocolos de infecção.....	19
4.4 Extração de RNA.....	19
4.5 Biblioteca de cDNA.....	20
4.6 Quantificação de mRNA por qPCR.....	20
4.7 Determinação da carga parasitária.....	23
4.8 Análise estatística.....	23
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÃO	31
8. REFERÊNCIAS	32
9. ANEXO	36

RESUMO

Neosporose é uma infecção parasitária causada por *Neospora caninum*, um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, e que tem grande impacto na produção bovina. As NADPH oxidases dos fagócitos pertencem à família NOX de complexos multiproteicos que geram espécies reativas de oxigênio (ROS), que são geradas em resposta à infecção por diferentes patógenos, por meio da inflamação tecidual e liberação de sinais de perigo pela resposta imune inata nos estágios iniciais de infecção. NOX-2, o protótipo da NADPH oxidase tem sido amplamente estudado, bem como sua importância na manutenção da infecção por diferentes patógenos. Para investigar o papel desta via na infecção por *N. caninum* e a relação de NOX-2 com parasitismo em diferentes tecidos e períodos de infecção, utilizamos murinos geneticamente deficientes para NADPH oxidase subunidade 2 gp91 phox (Nox2^{-/-}). Os animais foram infectados com *Neospora caninum* via intraperitoneal utilizando 1x10⁶ (dose não letal) e 1x10⁷ (dose subletal) taquizoítos por animal. A expressão de genes da via de ROS e o parasitismo em células do peritônio, fragmentos de baço, pulmão, fígado e cérebro foram analisados por PCR quantitativo nas fases hiperaguda, aguda e crônica da infecção. A curva de sobrevivência e morbidade foram analisadas através do acompanhamento da variação de peso dos animais, durante a fase crônica da infecção. Nossos resultados demonstram que a via de ROS está envolvida na resposta à infecção contra *N. caninum*, NOX-2 foi diferencialmente expresso ao longo do período de infecção. Em relação à curva de sobrevivência e a morbidade dos animais, observamos que camundongos Nox2^{-/-} tiveram maior perda de peso, na fase crônica da infecção, a partir do vigésimo dia, porém essa diferença não apresentou relação com o parasitismo dos tecidos avaliados. Portanto, NOX-2 tem participação na resposta à infecção aguda por *N. caninum* mas não apresenta relação com a resistência à infecção de acordo com replicação parasitária nos tecidos pesquisados.

Palavras-chave: *Neospora caninum*; NOX-2; infecção in vivo; parasitismo

ABSTRACT

Neosporosis is a parasitic infection caused by *Neospora caninum*, an obligate intracellular protozoan belonging to the phylum Apicomplexa, which greatly impacts bovine production. The NADPH oxidases of phagocytes belong to the NOX family of multiprotein complexes that generate reactive oxygen species (ROS), which are generated in response to infection by different pathogens, through tissue inflammation and release of danger signals by the innate immune response in the stages initial infection. NOX-2, the prototype of NADPH oxidase, has been widely studied, as well as its importance in maintaining infection by different pathogens. To investigate the role of this pathway in *N. caninum* infection and the relationship between NOX-2 and parasitism in different tissues and periods of infection, we used mice genetically deficient for NADPH oxidase subunit 2 gp91 phox (Nox2 $-/-$). Expression of ROS pathway genes and parasitism in peritoneum cells, spleen, lung, liver and brain fragments were analyzed by quantitative PCR. The survival and morbidity curves were analyzed by monitoring the weight variation of the animals, in different phases of the infection, from the hyperacute phase to the chronic phase. Our results demonstrate that the ROS pathway is involved in the response to infection against *N. caninum*, NOX-2 was differentially expressed over the period of infection. Regarding the survival curve and the morbidity of the animals, we observed that Nox2 $-/-$ mice had greater weight loss, in the chronic phase of the infection, from the twentieth day onwards, however this difference was not related to the parasitism of the evaluated tissues. Therefore, NOX-2 participates in the response to acute infection by *N. caninum* but is not related to resistance to infection according to parasitic replication in the investigated tissues.

Keywords: *Neospora caninum*; NOX-2; *in vivo* infection; parasitism

INTRODUÇÃO

1.1 *Neospora caninum* e hospedeiros

Neospora caninum, agente etiológico da neosporose, é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa. Este parasito infecta uma ampla gama de hospedeiros, sendo denominados hospedeiros definitivos quando hospedam o parasita durante sua fase de reprodução sexuada, e intermediários quando o hospedam durante a fase de reprodução assexuada.

Os cães são hospedeiros definitivos de *N. caninum*, mas também podem se comportar como hospedeiros intermediários (DUBEY, J.P, 2003). Nos canídeos infectados as deficiências neuromusculares, como paralisia ascendente, ataxia e outros sinais neurológicos representam maior casuística, contudo, outras manifestações clínicas como distúrbios pulmonares, miocárdicos, dermatológicos e reprodutivos também podem estar presentes. Em um estudo avaliando a soroprevalência deste parasita em cães no período entre 1990-2018 o resultado foi de 17,14% global e 15,15% nas Américas (ANVARI et al., 2020).

Dentre os hospedeiros intermediários estão os bovinos, caprinos, ovinos, búfalos, cavalos, muares, cervídeos e aves (JOKAR et al., 2022). A soroprevalência da neosporose é variável de acordo com a atividade pecuária exercida, representando entre 2,5 e 14,9% para bovinos de corte e de 14,1 a 34,8% para bovinos de leite (REICHEL et al., 2013). A presença de anticorpos específicos contra *N. caninum* também foram relatadas como altas em búfalos e ovinos (GENNARI et al., 2005; FILHO et al., 2017).

O impacto da neosporose nas produções de bovinos é marcante, sendo considerada a principal causa de aborto em bovinos, além de outras perdas reprodutivas relacionadas ao nascimento de bezerros fracos ou cronicamente infectados, possível perda na produção de leite e infertilidade dos machos (DUBEY, 2003; NAYERI et al., 2022).

1.2 Morfologia e ciclo biológico

O ciclo biológico de *N. caninum* é heteroxeno, consistindo em duas formas distintas de reprodução nos hospedeiros. A fase sexuada ocorre nos canídeos, que são considerados hospedeiros definitivos do parasita, e a fase assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários.

Durante o ciclo o parasita pode se apresentar de três principais formas evolutivas, os taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos, em todos os estágios o parasita pode transmitir a infecção por diferentes meios.

Os taquizoítos são responsáveis por disseminar a infecção, representando a forma parasitária proliferativa, capaz de invadir e se replicar em diferentes tipos celulares, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O formato pode ser ovoide, redondo ou meia-lua, com o núcleo na posição central ou terminal, medem aproximadamente 6x2µm, dependendo do estágio de crescimento e divisão, e do plano de corte nos tecidos (LINDSAY; DUBEY, 2020).

A manutenção da infecção nesta fase é dependente da efetividade de invasão celular e modulação do sistema imune do hospedeiro, que ocorre através do reconhecimento de antígenos de superfície e secreção de proteínas provenientes de diversas organelas do parasito (CESBRON-DELAUW, 1994). Estas proteínas estão intimamente relacionadas à fixação, penetração e formação do vacúolo parasitóforo e se originam principalmente de grânulos densos, roptrias e micronemas (CESBRON-DELAUW et al., 1996; YANG et al., 2021; GRIFFITH et al., 2022).

Visando a sobrevivência do parasito e a continuidade do ciclo, uma medida de adaptação importante é a conversão de taquizoítos em bradizoítos, normalmente mediada por estímulos fisiológicos e imunológicos do hospedeiro. Os bradizoítos são a forma evolutiva encontrada principalmente em tecidos musculares, nervosos e na retina, medem cerca de 8 x 2µm apresentam forma alongada (DUBEY; THULLIEZ, 2005). Estes ficam inclusos em cistos teciduais contendo vários bradizoítos, cerca de 20 a 100, e geralmente são redondos ou ovais, podendo medir até 100 µm de comprimento com uma parede dupla de até 4 µm. (AGUADO-MARTINEZ; MULLER, 2016; LINDSAY; DUBEY, 2020).

Esta forma possui uma reprodução assexuada lenta, caracterizando a forma crônica da infecção, e é responsável pela transmissão do parasita aos hospedeiros definitivos, através da ingestão de cistos presentes nos tecidos dos hospedeiros intermediários. Após a ingestão, os cistos passam pelo estômago e os bradizoítos presentes nos cistos são liberados e invadem as células do intestino iniciando a fase sexuada, após várias modificações formam oocistos não esporulados que são eliminados através das fezes dos hospedeiros definitivos.

Os oocistos medem de 10 a 12 μm de diâmetro, contêm dois esporocistos (medindo cada um 8,4 x 6,1 μm) cada um com quatro esporozoítos. E após três dias no ambiente, sob condições adequadas de oxigenação, temperatura e umidade, tornam-se esporulados (DUBEY et al., 2002). Os oocistos esporulados são responsáveis pela transmissão horizontal de *N. caninum* ao serem ingeridos através de água ou alimentos contaminados pelos bovinos e demais hospedeiros intermediários (DONAHOE et al., 2015).

Outra forma de transmissão também pode ocorrer, a transmissão vertical, considerada a forma de infecção mais importante em rebanhos bovinos. A transmissão transplacentária pode ocorrer através de via exógena ou endógena. A primeira ocorre por ingestão de oocistos em alimentos contaminados por fêmeas gestantes, a segunda ocorre pela reativação de bradizoítos latentes durante a gestação, ambas resultando em infecção fetal (GOODSWEN et al., 2013; REGIDOR-CERRILLO et al., 2015).

Outras formas de infecção já foram relatadas, porém estudos adicionais são necessários para comprovação da efetividade das vias, como por exemplo, lactogênica e venérea. O ciclo do parasita biológico do parasita, assim como suas formas evolutivas e alguns hospedeiros envolvidos estão ilustrados na figura 1.

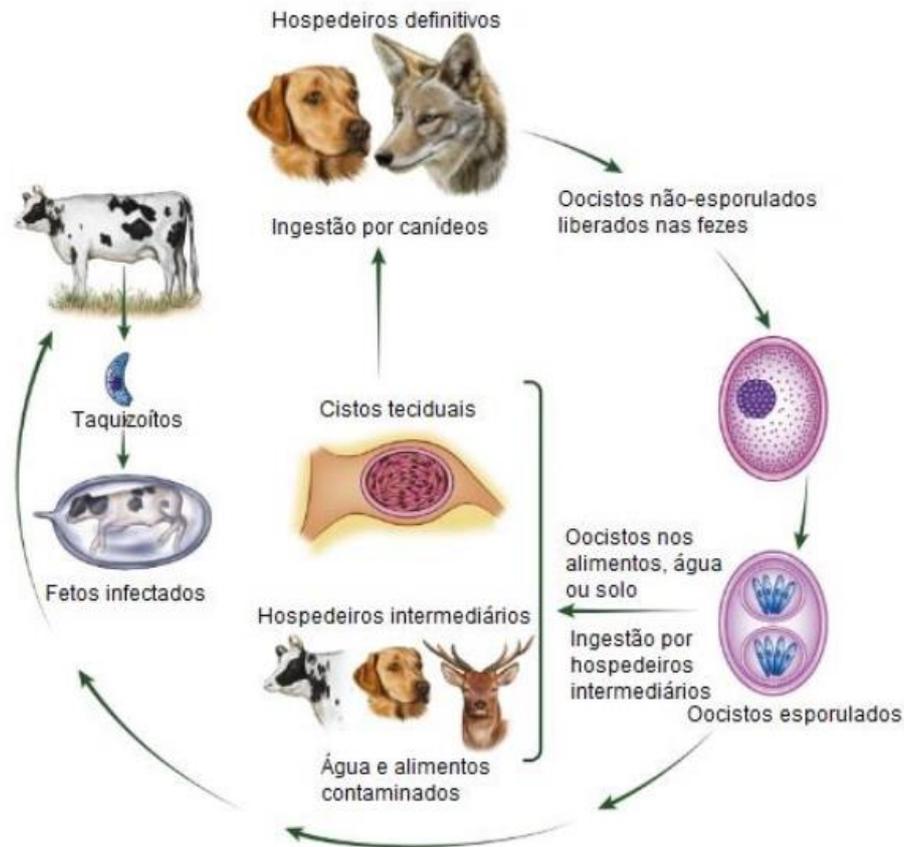


Figura 1: Ciclo biológico de *Neospora caninum*. O ciclo de vida é heteroxeno, inclui tanto a replicação sexuada quanto assexuada. A transmissão horizontal ocorre através de oocistos e cistos teciduais, os canídeos são infectados por comer carne contaminada. Os oocistos são excretados e persistem no ambiente por período desconhecido. O hospedeiro intermediário é infectado pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados. Na transmissão vertical: taquizoítos podem ser transmitidos via transplacentária. (Adaptado de Lindsay e Dubey, 2020).

1.3 Patogênese e patogenicidade

Como parasita intracelular obrigatório, a patogênese de *N.caninum* está relacionada a invasão celular bem sucedida, assim como sua rápida multiplicação no meio intracelular e disseminação por vários tecidos através da corrente sanguínea e vasos linfáticos. A invasão celular envolve a ação de proteínas de superfície, invaginação de membrana para a formação do vacúolo parasitóforo e de uma junção do tipo irreversível. E após essa junção, ocorre a invasão através do envolvimento do taquizoíto pelo vacúolo parasitóforo.

Posteriormente a invasão, a membrana do vacúolo é modificada pelas proteínas de grânulos densos, que contribuem para a maturação do vacúolo parasitóforo e formação

de uma rede de membrana metabolicamente ativa, que promove o crescimento e sobrevivência do parasito no interior do vacúolo. No interior do vacúolo o parasita se multiplica por endodiogenia, até causar a lise celular e liberar vários taquizoítos, que infectam células e tecidos (LEINEWEBER et al., 2017; FERREIG; NISHIKAWA, 2020).

Os alvos de multiplicação e latência do parasito correspondem aos sistemas com maiores consequências clínicas, sendo assim os tecidos neuromusculares, os mais afetados. Nos canídeos são observadas desordens neuromusculares, como encefalomielite em filhotes caninos e em bovinos e outros hospedeiros intermediários foram relatadas deformidades congênitas em membros (DUBEY et al., 2002; DUBEY, 2006; GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2013).

1.4 Resposta imune

Os mecanismos de controle frente a infecção por *N. caninum* relatados estão relacionados à resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. As respostas são predominantemente do tipo Th1, com produção de IL-12, IFN- γ e respostas celulares para controle do parasitismo (FERREIG; NISHIKAWA, 2020; MONNEY; HEMPHILL, 2014).

A resposta imune inata é induzida após o reconhecimento dos padrões associados ao patógenos (PAMPs), presentes em parasitos, por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes em células da imunidade inata e desencadeiam respostas inflamatórias (HOU et al., 2011; MANSILLA; CAPOZZO, 2017; THAISS et al., 2016).

Os PRRs mais bem caracterizados são os receptores do tipo Toll (TLRs), os quais são encontrados na superfície celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) e no endossoma (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13) (DE NARDO, 2015; VIJAY, 2018). Estes receptores desempenham um papel importante na ativação do sistema imune inato durante a infecção por *N. caninum*, por meio das moléculas adaptadoras MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88) e TRIF (molécula indutora de interferon β com domínio TIR).

Inicialmente, o parasitismo é controlado pela produção de IFN- γ e IL-12p40, derivados da sinapse imunológica entre células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos T auxiliares (TCD4+). IL-12 em conjunto com IFN- γ , criam um ambiente pró-

inflamatório essencial para combater o parasito impedindo sua replicação, destruindo as células infectadas, neutralizando os parasitos extracelulares e induzindo a formação de cistos teciduais (DONAHOE et al., 2015; MINEO et al., 2009; MONNEY; HEMPHILL, 2014).

Os receptores do tipo NOD (NLRs) também estão envolvidos resposta imune contra o *N. caninum*, sendo que a via de sinalização ativada por NOD-2, que colocaliza com o vacúolo parasitóforo, atua no controle da replicação do parasito *N. caninum*, entretanto, intensifica a inflamação, gerando grave patogênese e morte do hospedeiro (DAVOLI-FERREIRA et al., 2016).

Outros receptores citosólicos também têm sido estudados, como NLRP3, parte de um complexo multiproteico importante na detecção de patógenos, denominado inflamassoma. Em estudos *in vitro* este receptor foi ativado em macrófagos peritoneais derivados da medula óssea de camundongos infectados com taquizoítos de *N. caninum* e associados com a liberação de IL-1 β e IL-18, clivagem de caspase-1 e morte celular (WANG et al., 2018; MOTA et al., 2020).

1.5 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e NADPH oxidase

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são compostos quimicamente instáveis, derivadas de pequenas moléculas de oxigênio, incluindo radicais de oxigênio e certos não radicais que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais. A geração de ROS é geralmente uma cascata de reações que começam com a produção de superóxido (BEDARD et al., 2007). No aspecto fisiológico, as ROS atuam como segundos mensageiros, comportando-se como sinais intracelulares para ativação celular (SUGAMURA et al., 2011).

Existem diferentes vias enzimáticas envolvidas na formação de ROS, entre elas, NADPH oxidase (Nox), mieloperoxidase, xantina oxidase e óxido nítrico desacoplado. A produção de ROS relacionada a Nox pode ser uma resposta a infecções causadas por microrganismos. A NADPH oxidase é um sistema enzimático complexo responsável pela geração de ROS. Esta enzima é capaz de transferir elétrons, utilizando o oxigênio como acceptor de elétrons e o produto da reação é o ânion superóxido (O_2^-). Diferentes

formas e localizações da NADPH oxidase foram descritas (BABIOR et al., 2002; LAMBETH et al., 2004; PASTORI et al., 2015).

A NADPH oxidase foi inicialmente descrita em neutrófilos e macrófagos onde, após ativação, a NADPH oxidase produz superóxido extracelular, fundamental na defesa do hospedeiro contra infecções microbiana, em um processo denominado explosão respiratória (KELLER et al., 2021).

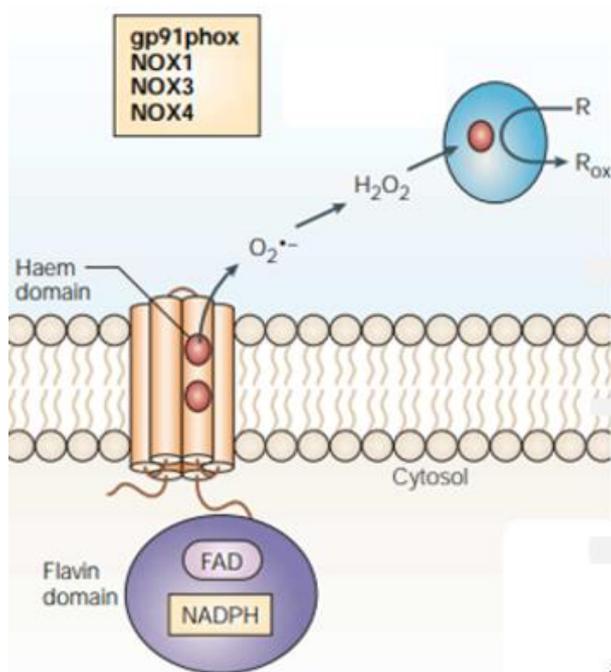


Figura 2: Topologia transmembranar e estrutura de domínio das enzimas NOX. NADPH oxidase 1 (NOX1), NOX3 e NOX4 são semelhantes em tamanho e estrutura de domínio ao bem estudado gp91phox, também conhecido como NOX2 (Adaptado de LAMBETH, 2004).

Os componentes centrais do complexo multiproteico NADPH oxidase são o CYBB/NOX2 e CYBA/p22 phox codificados no cromossomo X que formam um heterodímero estável, mas inativo, ligado à membrana durante o estado de equilíbrio. Após a ativação, o heterodímero e as subunidades reguladoras citosólicas do complexo NADPH oxidase (NCF4/p40^{phox}, NCF1/p47^{phox}, NCF2/p67^{phox}) translocam para o fagossomo em formação na membrana plasmática e auxiliam na montagem do complexo com a pequena GTPase RAC1, que é necessária para desencadear totalmente a atividade geradora de ROS do complexo (HAN, CHANG-

HOON et al., 1998; NAUSEEF, W.M., 2004; GROEMPING, YVONNE; RITTINGER, KATRIN, 2005).

NOX2, também conhecido como gp91phox, é o protótipo NADPH oxidase. Suas características bioquímicas têm sido amplamente estudadas. NOX2 foi descrito pela primeira vez em neutrófilos e macrófagos e é muitas vezes referido como o fagócito NADPH oxidase, ainda é amplamente considerado como tendo um efeito muito expressão tecidual limitada, essencialmente específica de fagócitos (BEDARD et al., 2007).

Quando a distribuição tecidual do mRNA total de vários órgãos é investigada, NOX2 parece estar entre as mais amplamente distribuídas isoformas de NOX. É descrito em um grande número de tecidos, incluindo timo, intestino delgado, cólon, baço, pâncreas, ovário, placenta, próstata e testículo (CHENG et al., 2001).

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel fundamental no controle de patógenos intracelulares, pois induzem a produção de agentes antimicrobianos como peróxido de hidrogênio, superóxido, ozônio ou ácido hipocloroso (LAMBETH, 2004; KOHCHI et al., 2009).

Além disso, a ativação dessas proteínas durante infecções parasitárias também contribui para a ativação do inflamassoma, que também contribui para a contenção do parasita (MOTA et al., 2020). No entanto, o papel das ERO na defesa do hospedeiro contra protozoários, bem como seus mecanismos parasiticidas em diferentes tecidos ainda não são totalmente conhecidos (SHRESTHA et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

A investigação da interação de *Neospora caninum* com seus hospedeiros é de suma importância para um melhor entendimento da patogenia da infecção e reconhecimento de alvos para medidas terapêuticas e profiláticas. Desta forma, a depleção de genes envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro após a infecção por *N. caninum*, representa um caminho alternativo para avaliação da interação parasito hospedeiro. As NADPH oxidases dos fagócitos pertencem à família NOX de complexos multiproteicos geradores de espécies reativas de oxigênio (ROS), conhecidas por sua atividade bactericida dentro de neutrófilos e macrófagos. NOX-2, é o protótipo NADPH oxidase, suas características bioquímicas têm sido amplamente estudadas, assim como sua importância na manutenção da infecção por diferentes patógenos em diversos tecidos. Para investigar o papel dessa via na infecção *N. caninum*, bem como a relação de NOX-2 com o parasitismo em diferentes tecidos e períodos de infecção a utilização de murinos geneticamente deficientes para subunidade NADPH oxidase 2 gp91 phox (Nox2^{-/-}) representa um bom modelo experimental.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel de NOX-2 em camundongos infectados com *Neospora caninum*

3.2. Objetivos específicos

- a. Verificar a expressão dos genes alvos da via de ROS em células esplênicas provenientes de murinos infectados por *N. caninum*;
- b. Avaliar a curva de sobrevivência e morbidade de animais geneticamente deficientes da proteína NOX-2 (Nox2^{-/-}) frente à infecção por *N. caninum*;
- c. Analisar a carga parasitária em diferentes órgãos dos camundongos infectados por diferentes períodos de infecção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) e geneticamente deficientes para subunidade NADPH oxidase 2 gp91^{phox} (*Nox2*^{-/-}; Pollock et al., 1995), fêmeas, com 6-8 semanas de idade, foram divididos em grupos de 5 animais pareados e mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em ambiente com temperatura controlada (22-25°C) e alimento e água *ad libitum*. Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) sob o protocolo de número 109/16.

4.2 Cultivo de células e parasitos

Para o cultivo do parasita, fibroblastos murinos NIH/3T3 (ATCC, EUA) foram cultivados em frascos de cultura celular de 75cm² contendo meio RPMI 1640 (Life Technologies Corporation, Carlsbad-CA, EUA) suplementado com L-glutamina 2mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), penicilina 100 U/mL (Gibco), estreptomicina 100 ug/mL (Gibco) e soro fetal bovino 10% (FBS) (Gibco), a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, até atingir a confluência.

Posteriormente, as células foram infectadas com taquizoítos de *N. caninum* com inserção randômica no genoma da proteína fluorescente mCherry, mantidas nas condições previamente descritas para células, exceto pela adição de FBS ao meio. Resumidamente, os taquizoítos foram colhidos por raspagem da monocamada celular após 48-72 h de infecção contendo principalmente parasitas extracelulares (pelo menos 70%).

O sobrenadante contendo a suspensão do parasita foi coletado e peletizado (800 × g, 10 min, 4°C). Os taquizoítos foram contados em uma câmara de hemocitômetro (câmara de Neubauer) usando corante vital azul de tripan a 0,4% e imediatamente utilizados para os experimentos.

4.3 Protocolos de infecção

Para realização dos procedimentos experimentais, os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais, identificados por marcação numerada e infectados via intraperitoneal com uma dose subletal (potencialmente capaz de ocasionar mortalidade de cinquenta por cento dos animais), correspondente a 1×10^7 taquizoítos de *N. caninum*, para análise da curva de sobrevivência e uma dose não-letal (incapaz de ocasionar mortalidade aos animais), correspondente a 1×10^6 taquizoítos de *N. caninum* para os demais experimentos. Após o período de infecção, de 1 e 3 dias para infecções hiperagudas, 7 dias para infecções agudas e 30 dias para infecções crônicas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. As células peritoneais foram removidas por lavagem das cavidades com PBS gelado, e posteriormente utilizadas para quantificação da carga parasitária. Fragmentos de pulmão, baço, fígado e cérebro também foram coletados, de acordo com a predileção de parasitismo para cada fase da infecção, e submetidos a extração de RNA/DNA e qPCR para quantificação parasitária.

4.4 Extração de RNA.

Foram coletadas amostras de baços dos animais um e sete dias após a infecção, assim como dos animais não infectados, em frascos contendo 500 μ l de TRIzol (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA, transportados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados no freezer a -80°C .

As amostras foram descongeladas e adicionado 300 μ l de clorofórmio, sendo agitadas em vortex por 15 segundos, incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e levadas a centrifugação a 10000 x g por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante das amostras foi coletado e foi adicionado 600 μ l de isopropanol gelado, agitando-se por inversão e centrifugando a 10000 x g por 15 minutos, posteriormente o sobrenadante foi descartado e o pellet mantido a temperatura ambiente por 5 minutos e ressuspenso em H_2O livre de DNase e RNase. Após isso, foi realizada a quantificação do RNA em

espectrofotômetro (NanoDrop™ Lite, ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA) a 260nm.

As amostras foram preparadas para posterior síntese de cDNA. Primeiramente, foram ajustados em 3 µg de RNA em 50 µl de suspensão. Foram adicionados 5 µl de MgCl₂ e 1 µl de DNase e incubados a 37°C por 15 minutos, em seguida foram adicionados 25 µl de TRIzol (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA) e 25 µl de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas a 10000 xg por 15 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e 20 µl de 3M C₂H₃NaO₂ pH 5,3, 1 µl de glicogênio e 150 µl de etanol ultrapuro foram adicionados. As amostras foram centrifugadas a 10000 xg por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi mantido em temperatura ambiente para secagem. Por fim, os pellets foram ressuspensos em 50 µl de H₂O livre de DNase e RNase, e as concentrações foram medidas por espectrofotômetro.

4.5 Biblioteca de cDNA

As amostras contendo RNA extraído foram ajustadas para 1 µg de RNA em 4 µl. Um kit comercial de sistema de transcrição reversa (GoScript™, Promega, Madison, EUA) foi utilizado para a síntese de cDNA. Resumidamente, 1 µl de Primer Oligo (dT) foi adicionado e incubado a 75°C por 5 minutos, imediatamente as amostras foram condicionadas em banho de gelo por 10 minutos. Posteriormente, 15 µl do kit Master Mix (4 µl Go Script 5X Buffer, 3,5 µl MgCl₂, 1 µl PCR nucleotide Mix, 1 µl Transcriptase Reverse RT, 0,5 µl RNA sin e 5 µl H₂O) foram adicionados e as amostras foram condicionadas em termociclador (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Thermo) na programação para RT-PCR com os seguintes tempos de reação e temperaturas: 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 10 minutos. Após esse processo, as amostras foram diluídas com H₂O livre de nuclease e armazenadas em freezer a -20°C.

4.6 Quantificação de mRNA por qPCR

Para a análise de qPCR, foi utilizado um kit comercial SYBr master mix, seguindo as recomendações do fabricante (PowerUp SYBR Green Master Mix, ThermoFisher

Scientific, Wilmington, EUA). Resumidamente, 5 μ l da mistura principal [2X], 0,5 μ l Forward Primer 10 μ M, 0,5 Reverse Primer 10 μ M (Tabela 1) e 4 μ l de 10 ng de cDNA foram adicionados em placas de 96 poços adequadas para qPCR. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em sistema Real-Time PCR (StepOnePlus™, ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA) e submetidas às seguintes condições de ciclagem: ativação a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento de primers a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 15 segundos (desnaturação, anelamento e extensão por um total de 40 ciclos), e finalmente a curva de fusão realizada a 95°C por 15 segundos e 60°C.

Tabela 1. Primers para quantificação de mRNA por qPCR. Fwd: Forward Rvs: Reverse

Abreviação	Gene	Identificador	Sequência
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_008084	Fwd 5'ggagaaacctgccaaactatgatg 3' Rvs 5' cagtgtagcccaagatgcc 3
NOX1	NAPDH oxidase 1	NM_172203.2	Fwd 5' attcttgggactgccttggc 3' Rvs 5' atggctttctcagtgtacggtt 3'
NOX3	NAPDH oxidase 3	NM_198958.2	Fwd 5'acaggetcaaatggacggaaag 3' Rvs 5'caaccacgaaggaccactc 3'
NOX4	NAPDH oxidase 4	NM_001285833.1	Fwd 5'gcctccagactcagtacagc 3' Rvs 5' ccgaaaggagcgatcagtgg 3'
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	NM_011434.2	Fwd 5'ggaagcatggcgatgaaagc 3' Rvs 5'gcttgccttctgctcgaagt 3'
SOD3	superoxide dismutase3, extracellular	NM_011435.3	Fwd 5' ggcttcttgttctacggct 3' Rvs 5'gctaggtcgaagctggactc 3'
MPO	myeloperoxidase	NM_010824.2	Fwd 5' gttacagatgtgtgacacct 3' Rvs 5'gatacttgcattcgggtggc 3'

Os dados obtidos ao final da reação foram analisados por Cycle Threshold (Ct) em um software dedicado (StepOne™ 2.3, ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA) usando o método de expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001) e com GAPDH como o gene *Housekeeping* de referência e para o *fold change* foram comparados com amostras de animais não infectados.

4.7 Determinação da carga parasitária

A carga parasitária foi determinada nas células recuperadas do lavado peritoneal (1, 3 e 7 dias após a infecção), fragmentos de fígado e pulmão (7 dias após a infecção) e cérebro (30 dias após a infecção) pela técnica de PCR em tempo real (StepOne Plus Applied Biosystems, EUA) através do sistema detecção SYBR green. A reação foi realizada utilizando primers específicos para o gene Nc-5 de *N. caninum* (Forward: 3'-GCT GAA CAC CGT ATG TCG TAA A-5'; Reverse: 3' AGA GGA ATG CCA CAT AGA- 5').

Inicialmente a extração de DNA foi realizada a partir de 100 mg de cada tecido analisado acrescido de 500 μ L e tampão NLB (10mM Tris Hcl, 400 nM NaCl e 2mM Na₂ EDTA, pH 8,2), 16 μ L de SDS 10% e 8 μ L de Solução proteinase K (20mg/mL) incubados a 50°C overnight. Após incubação, 150 μ L de tampão NaCl 6M foi adicionado as amostras, seguido pela incubação em gelo por 10 minutos e posterior centrifugação a 12000 \times g durante 15 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado, transferido para outro tubo e foi acrescentado 800 μ L de etanol absoluto. O DNA foi coletado e ressuspenso com 150- 200 μ l de água livre de nuclease.

As concentrações de DNA foram determinadas por espectrofotometria (260nm; Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, EUA) ajustadas para 4 ng/ μ L com água livre de DNase (água DEPC). A carga parasitária foi calculada por interpolação de uma curva padrão com quantidades equivalentes de DNA extraído de taquizoítos de *N. caninum* que foram incluídos em cada análise. Os resultados foram expressos nanogramas (ng) de DNA do parasito para cada 100g de tecido.

4.8 Análises estatísticas

Os gráficos e cálculos estatísticos foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelos testes de Two-way ANOVA utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni, Kruskal-Wallis utilizando o teste de comparação múltipla de Dunn e teste de Mann-Whitney, quando apropriado. A curva de sobrevida foi estimada usando o método de Kaplan-Meier, seguido pela comparação das curvas de sobrevida através do teste de log-rank – Mantel-Cox. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (SEM). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Os genes da via ROS são diferencialmente expressos de acordo com o período de infecção por *N.caninum*

A análise da expressão de alguns genes da via das espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada em amostras de cDNA de baços de animais infectados com *N. caninum*, um dia e sete dias após a infecção, e os resultados foram comparados com as mesmas amostras coletadas de animais não infectados.

A expressão de Nox2 em células esplênicas de animais infectados por 1 dia e 7 dias é significativamente maior do que a expressão do gene em células de animais não infectados, conforme observado na figura 3-a. Comparando a expressão entre animais infectados nas duas fases, não foram observadas diferenças. Este resultado indica a participação do gene na resposta do hospedeiro à infecção por *N. caninum* tanto na fase hiperaguda quanto na fase aguda da infecção.

Para um melhor entendimento desta via, além de Nox2, a expressão de outros genes das NADPH oxidases, superóxido dismutase e da mieloperoxidase foram analisadas. A expressão dos genes Nox1 e Nox3 foi reduzida ao longo dos dias pós-infecção em animais infectados por *N. caninum* quando comparados a animais não infectados, tanto na fase hiperaguda, um dia após a infecção quanto na fase aguda de infecção, sete dias após a infecção, conforme observado nas figuras 2 b-d. Nox4 teve uma pequena expressão um dia após a infecção, mas a expressão foi reduzida sete dias após a infecção, semelhante a Nox1 e Nox3.

A expressão dos genes de superóxido dismutase Sod1, Sod3 e Mpo aumenta de acordo com o tempo de infecção, sendo marcante na fase aguda, 7 dias após a infecção pelo parasita (Figura 3e-f).

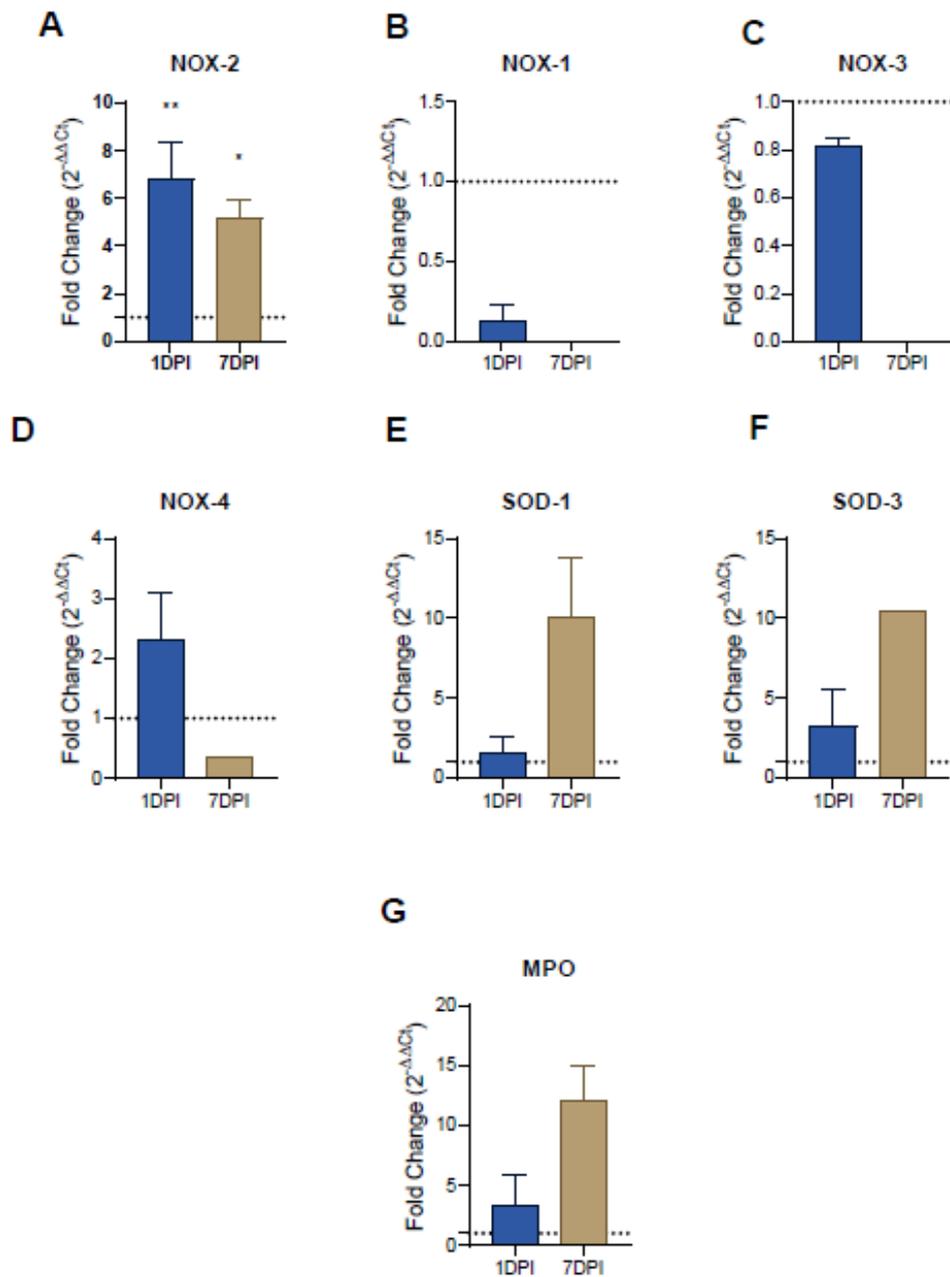


Figura 3. Cinética da expressão de genes de ROS ao longo do tempo da infecção por *N. caninum*. Células esplênicas derivadas do baço de camundongos C57BL/6 não infectados e infectados com *N. caninum*, por períodos de 1 dia (barra azul) e 7 dias (barra marrom), foram recebidas para a expressão dos genes NOX-2 (A), NOX-1 (B), NOX-3 (C), NOX-4 (D), SOD-1 (E), SOD-3 (F) e MPO (G). Os dados demonstraram a proporção de células infectadas detectadas para células não infectadas, sendo representadas em Fold Change (2^{-ΔΔCt}). A linha pontilhada refere-se a células não infectadas. As diferenças entre a expressão em células não infectadas e infectadas por 1 dia, bem como entre células não infectadas e infectadas por 7 dias foram significativas pelo teste de Kruskal-Wallis (* p= 0,0287 e ** p=0,0083) para NOX-2.

5.2 NOX2 está relacionado com a perda de peso corporal em animais infectados com *N.caninum*

Para verificar o papel de NOX-2 na sobrevivência do hospedeiro, camundongos WT e Nox2-^{-/-} foram infectados com uma dose subletal de *N. caninum* (1×10^7 taquizoítos por animal) e monitorados por 30 dias para avaliar a taxa de sobrevivência (figura 4a), com esta dose espera-se que 50% dos animais infectados não sobrevivam. A morbidade desses animais também foi avaliada através da variação de peso e foi observada diferença significativa na perda de peso entre os dois grupos a partir do vigésimo dia após a infecção.

Ao longo dos 30 dias, nenhum camundongo sobreviveu no grupo Nox2-^{-/-}, no grupo WT um animal sobreviveu. No entanto, as diferenças na análise de sobrevivência entre os dois grupos não foram significativas.

Posteriormente foi avaliada a morbidade, comparando os dois grupos de animais infectados com uma dose não letal, 1×10^6 taquizoítos por animal, através do acompanhamento da perda de peso dos animais na fase crônica da infecção (figura 4b). Em média, os animais geneticamente deficientes para Nox2 apresentaram maior perda de peso corporal, a partir do vigésimo dia pós-infecção, sendo esta diferença significativa ($p < 0,0001$), resultado semelhante ao experimento anterior, utilizando dose sub-letal.

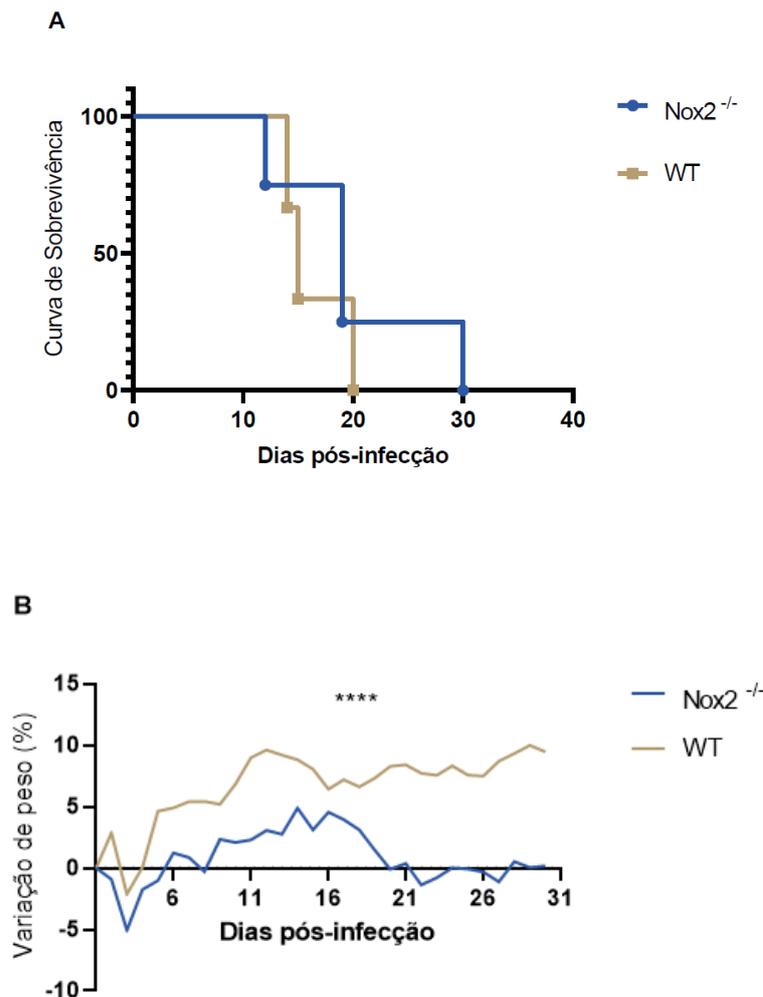


Figura 4. NOX-2 está relacionado com a variação de peso corporal na infecção por *N.caninum*. (A) Curva de sobrevivência de camundongos WT e Nox2^{-/-} infectados com 1x10⁷ taquizoítos de *N. caninum*. **(B)** Variação no peso de camundongos WT e Nox2^{-/-} infectados com 1x10⁶ taquizoítos de *N. caninum*. Em ambos experimentos os animais foram monitorados por 30 dias após a infecção. As curvas de sobrevida foram comparadas por Kaplan-Meier e a variação de peso pela análise log-rank – Mantel-Cox (**** p < 0,0001).

5.3 NOX-2 não tem influência na replicação parasitária durante infecção por *N. caninum*

Para estudar o papel de NOX-2 no controle da replicação do parasita *in vivo* em diferentes tecidos para cada estágio da infecção, camundongos WT e Nox2^{-/-} foram infectados com uma dose não letal (1x10⁶ taquizoítos por animal) de *N. caninum*.

Com o objetivo de entender melhor a migração parasitária, avaliamos o parasitismo

presente nas células recuperadas do lavado intraperitoneal 1, 3 e 7 dias após a infecção (figura 5a), a carga parasitária foi semelhante entre os dois grupos, diminuindo de acordo com o pós-infecção. período de infecção, no entanto, as diferenças não foram significativas entre os dois grupos. Na fase aguda, uma semana após a infecção, foram analisados fragmentos do pulmão (figura 5b) e do fígado (figura 5c) dos animais, também sem diferenças significativas.

Na fase crônica, 30 dias após a infecção, observou-se que os cérebros dos animais *Nox2*^{-/-} estavam ligeiramente mais parasitados em relação aos animais do grupo WT, mas essa diferença não foi significativa (figura 5d).

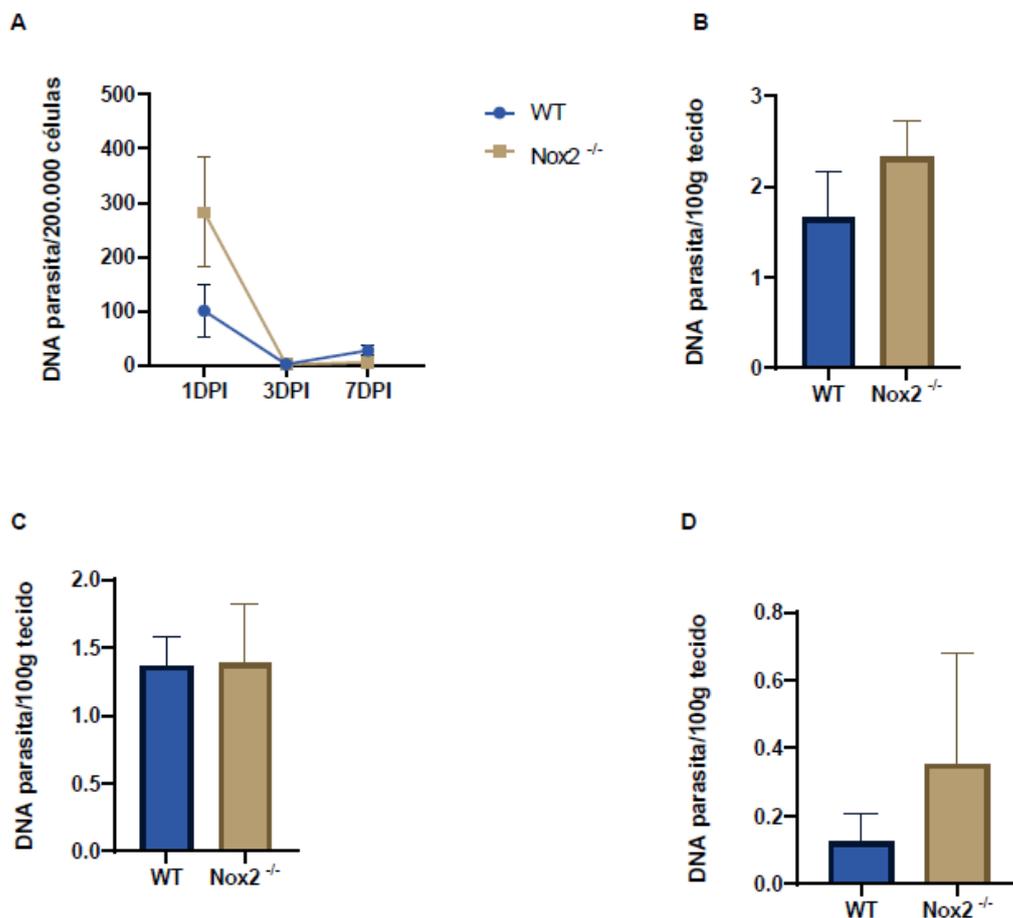


Figura 5. NOX-2 não influencia a replicação do parasita durante a infecção por *N. caninum*. Camundongos tipo selvagem C57BL/6 (WT) e *Nox2*^{-/-} foram infectados com 1×10^6 taquizoítos *N. caninum*, eutanasiados após 1, 3, 7 e 30 dias de infecção e subsequentemente células de lavagem peritoneal (A) e pulmão (B), fragmentos de fígado (C) e cérebro (D) foram coletados e analisados para parasitismo por *N. caninum* usando qPCR. Não houve diferença significativa entre os dois grupos.

6 DISCUSSÃO

A participação dos genes da via ROS na resposta a infecções por diferentes patógenos e sua importância no controle dos mesmos, seja por sua toxicidade aos parasitas ou intervenção na resposta imune dos hospedeiros, tem sido objeto de estudos (LAGISHETTY et al., 2011). No entanto, alguns patógenos podem eventualmente regular a produção dessas moléculas como um mecanismo de escape (GUERRA et al., 2016; SILVA et al., 2017). Para compreender o papel desta via na resposta à infecção por *N. caninum in vivo*, realizamos este trabalho.

Os dados iniciais mostram que há expressão de NOX-2 nas fases hiperaguda e aguda da infecção parasitária, esse achado demonstra que há participação do gene na infecção e é corroborado por trabalhos anteriores que relataram o papel das ERO na inflamação tecidual em resposta à morte celular e liberação de sinais de perigo por meio da resposta imune inata nos estágios iniciais da infecção (TY et al., 2019). Ao contrário de NOX-2, a expressão de NOX-1, NOX-3 e NOX-4 foi reduzida ao longo dos dias pós-infecção em animais infectados na fase hiperaguda e na fase aguda da infecção, demonstrando neste trabalho pouca participação destes genes.

Posteriormente, observamos que a expressão de outros genes relacionados à produção de ROS, SOD-1, SOD-3 e MPO aumenta de acordo com o período de infecção, essa resposta pode estar relacionada a uma ativação do inflamassoma. Uma vez que estudos anteriores mostraram que as ERO são um fator crítico para a ativação do inflamassoma, ao mesmo tempo que são produto de sua ativação, sendo um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra a replicação de *N. caninum* tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MARTINON, 2010; MOTA et al., 2020).

As ROS foram relatadas como importantes no controle da replicação de *Neospora caninum* em um estudo usando camundongos *Nox2^{-/-}*, resultando em uma carga parasitária significativamente maior nesses animais (SILVA et al., 2017). Em nosso trabalho, para investigar o papel do NOX-2 na resposta fisiológica à infecção por *N. caninum*, bem como no parasitismo de hospedeiros em diferentes estágios da infecção, foram analisados tecidos que são alvos comuns de multiplicação do parasito.

Primeiro, foi observada uma relação entre a ausência de NOX-2 e perda de peso progressiva em animais durante a fase crônica da infecção. No entanto, o nível de

morbidade nestes hospedeiros não foi relacionado ao aumento do parasitismo nos tecidos investigados.

A detecção precoce de *N. caninum* resulta em aumento do estresse oxidativo. Mas essa relação entre ERO e ativação do inflamassoma, se não for controlada, pode levar ao aumento da patologia em hospedeiros infectados (MOTA et al., 2020), levantando a hipótese de possível proteção gerada pela ausência de NOX-2.

Comparando a resposta diferencial de isolados de *N. caninum* de alta e baixa virulência, um estudo em macrófagos derivados da medula óssea bovina foi realizado, os resultados demonstraram que o parasito pode reduzir a produção de ERO por macrófagos infectados no início da infecção, mas apenas o isolado altamente virulento o mantém reduzido ao longo do tempo (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2019), a partir disso, a cepa utilizada na infecção pode ser outro fator relacionado ao aumento ou redução de ROS.

Portanto, para definir os principais alvos do parasitismo em hospedeiros geneticamente deficientes para NOX-2, novos estudos devem ser realizados, investigando a relação entre a expressão de NOX-2 e inflamação em diferentes órgãos, usando medidas inflamatórias de fase aguda. Assim como sua influência na migração do parasito para melhor definir os tecidos acometidos, principalmente na fase crônica, explicando melhor a acentuada perda de peso em animais nocautes. Além disso, o uso de doses infecciosas mais altas poderiam exacerbar os resultados.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a via de ROS está envolvida na resposta a infecção contra *N. caninum*, NOX-2 é diferencialmente expresso ao longo do período de infecção e sua ausência induz uma menor perda de peso em camundongos na fase crônica da infecção. Contudo, NOX-2 pode não estar relacionado com a resistência à infecção de acordo com replicação parasitária nos tecidos pesquisados.

8 REFERÊNCIAS

- ANVARI, D., SABERI, R., SHARIF, M., SARVI, S., HOSSEINI, S. A., MOOSAZADEH, M., ... & DARYANI, A. (2020). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dog population worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Acta parasitologica*, 65, 273-290. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00163-4>
- BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 397, n. 2, p. 342-344, 2002. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2642>
- BEDARD, Karen; KRAUSE, Karl-Heinz. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- CESBRON-DELAUW, M. F. (1994). Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitology Today*, 10(8), 293-296. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90078-7)
- CESBRON-DELAUW MF, LECORDIER L, MERCIER C. Role of secretory dense granule organelles in the pathogenesis of toxoplasmosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;219:59–65. https://doi.org/10.1007/978-3-642-51014-4_6
- CHENG G, Cao Z, Xu X, Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, Nox5. *Gene* 269: 131–140, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00449-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00449-8)
- DAVOLI-FERREIRA, M., FONSECA, D. M., MOTA, C. M., DIAS, M. S., LIMA-JUNIOR, D. S., DA SILVA, M. V., & MINEO, T. W. (2016). Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 prompts potent inflammatory stimuli during *Neospora caninum* infection. *Scientific reports*, 6(1), 29289. <https://doi.org/10.1038/srep29289>
- DE NARDO, DOMINIC. Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, v. 74, n. 2, p. 181-189, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025>
- DONAHOE, S. L., LINDSAY, S. A., KROCKENBERGER, M., PHALEN, D., & ŠLAPETA, J. (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(2), 216-238. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>
- DUBEY, J. P., BARR, B. C., BARTA, J. R., BJERKÅS, I., BJÖRKMAN, C., BLAGBURN, B. L., & LINDSAY, D. S. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International journal for parasitology*, 32(8), 929-946. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00094-2)
- DUBEY, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology*, 41(1), 1. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>

- ELLIS, J. T.; RYCE, C.; ATKINSON, R.; BALU, S.; JONES, P.; HARPER, P. A. Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. **Parasitology**, 120 (Pt 4), 383-390,2000. <https://doi.org/10.1017/S0031182099005673>
- FEREIG, RAGAB M.; NISHIKAWA, Yoshifumi. From signaling pathways to distinct immune responses: Key factors for establishing or combating *Neospora caninum* infection in different susceptible hosts. **Pathogens**, v. 9, n. 5, p. 384, 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050384>
- GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infect Genet Evol**, 13, 133-150,2013. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>
- GRIFFITH, Michael B.; PEARCE, Camille S.; HEASLIP, Aoife T. Dense granule biogenesis, secretion, and function in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 69, n. 6, p. e12904, 2022. <https://doi.org/10.1111/jeu.12904>
- GROEMPING, Yvonne; RITTINGER, Katrin. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochemical Journal**, v. 386, n. 3, p. 401-416, 2005. <https://doi.org/10.1042/BJ20041835>
- GUERRA, F. E., ADDISON, C. B., DE JONG, N. W., AZZOLINO, J., PALLISTER, K. B., VAN STRIJP, J., & VOYICH, J. M. (2016). *Staphylococcus aureus* SaeR/S-regulated factors reduce human neutrophil reactive oxygen species production. *Journal of Leucocyte Biology*, 100(5), 1005-1010. <https://doi.org/10.1189/jlb.4VMAB0316-100RR>
- HAN, C. H., FREEMAN, J. L., LEE, T., MOTALEBI, S. A., & LAMBETH, J. D. (1998). Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: identification of an activation domain in p67phox. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 16663-16668. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16663>
- HOU, B., BENSON, A., KUZMICH, L., DE FRANCO, A. L., & YAROVINSKY, F. (2011). Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 278-283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011549108>
- KELLER, C. W., KOTUR, M. B., MUNDT, S., DOKALIS, N., LIGEON, L. A., SHAH, A. M., ... & LÜNEMANN, J. D. (2021). CYBB/NOX2 in conventional DCs controls T cell encephalitogenic during neuroinflammation. *Autophagy*, 17(5), 1244-1258. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1756678>
- KOHCHI, C. et al. ROS and innate immunity. **Anticancer Research**, v. 822, p. 817–821, 2009. <https://doi.org/10.1097/BPO.0b013e3181b76a01>
- LAMBETH, J. David. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 181-189, 2004. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, 36, 205-222,2020. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>

MANSILLA, FLORENCIA C.; CAPOZZO, ALEJANDRA V. Apicomplexan profilins in vaccine development applied to bovine neosporosis. **Experimental parasitology**, v. 183, p. 64-68, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.009>

MARTINON, Fabio. Signaling by ROS drives inflammasome activation. **European journal of immunology**, v. 40, n. 3, p. 616-619, 2010. <https://doi.org/10.1002/eji.200940168>

MINEO, T. W., CARRASCO, A. O., MARCIANO, J. A., WERTHER, K., PINTO, A. A., & MACHADO, R. Z. (2009). Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. *Veterinary parasitology*, 159(2), 149-153. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.024>

MONNEY, THIERRY; HEMPHILL, ANDREW. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental parasitology**, v. 140, p. 52-70, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.015>

MOTA, C. M., LIMA-JUNIOR, D. D. S., FERREIRA FRANCA, F. B., AGUILLON TORRES, J. D., BARROS, P. D. S. C., SANTIAGO, F. M., ... & MINEO, T. W. (2020). The interplay between reactive oxygen species and the inflammasome is crucial for the restriction of *Neospora caninum* replication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 243. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00243>

NAYERI, T., SARVI, S., MOOSAZADEH, M., & DARYANI, A. (2022). The global prevalence of *Neospora caninum* infection in sheep and goats that had an abortion and aborted fetuses: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.870904>

NAUSEEF, William M. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. **Histochemistry and cell biology**, v. 122, p. 277-291, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0679-8>

PASTORI, D., PIGNATELLI, P., CARNEVALE, R., & VIOLI, F. (2015). Nox-2 up-regulation and platelet activation: Novel insights. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 120, 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.03.010>

POLLOCK, J. D., WILLIAMS, D. A., GIFFORD, M. A., LI, L. L., DU, X., FISHERMAN, J., ... & DINAUER, M. C. (1995). Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nature genetics*, 9(2), 202-209. <https://doi.org/10.1038/ng0295-202>

REICHEL, M. P., ALEJANDRA AYANEGUI-ALCERRECA, M., GONDIM, L. F. & ELLIS, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - the billion-dollar question. *Int. J. Parasitol.* 43, 133–142 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>

SILVA, M. V. D., FERREIRA FRANCA, F. B., MOTA, C. M., MACEDO JÚNIOR, A. G. D., RAMOS, E. L. P., SANTIAGO, F. M. & MINEO, T. W. P. (2017). Dectin-1 compromises innate responses and host resistance against *Neospora caninum* infection. *Frontiers in immunology*, 8, 245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00245>

SUGAMURA, KOICHI; KEANEY JR, JOHN F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free radical biology and medicine**, v. 51, n. 5, p. 978-992, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004>

THAISS, C. A., LEVY, M., ITAV, S., & ELINAV, E. (2016). Integration of innate immune signaling. *Trends in immunology*, 37(2), 84-101. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.12.003>

TY, M. C., ZUNIGA, M., GÖTZ, A., KAYAL, S., SAHU, P. K., MOHANTY, A., ... & RODRIGUEZ, A. (2019). Malaria inflammation by xanthine oxidase-produced reactive oxygen species. *EMBO Molecular Medicine*, 11(8), e9903. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809903>

VIJAY, KUMAR. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International immunopharmacology**, v. 59, p. 391-412, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.002>

WANG, X., GONG, P., ZHANG, X., LI, S., LU, X., ZHAO, C., ... & ZHANG, X. (2018). NLRP3 inflammasome participates in host response to *Neospora caninum* infection. *Frontiers in immunology*, 9, 1791. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01791>

YANG, C., WANG, C., LIU, J., & LIU, Q. (2021). Biotinylation of the *Neospora caninum* parasitophorous vacuole reveals novel dense granule proteins. *Parasites & vectors*, 14(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05023-7>

9 ANEXO

Anexo 1: Comprovante de aprovação do Comitê de Ética e Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais



CERTIFICADO

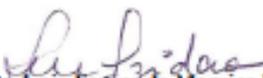
Certificamos que o projeto intitulado “Investigação de protocolos vacinais contra infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ruminantes de importância zootécnica”, protocolo nº 109/16, sob a responsabilidade de **Tiago Wilson Patriarca Mineo** – que envolve a produção, manutenção e/ou 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 **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **01 de Novembro de 2021**.

(We certify that the project entitled “Investigação de protocolos vacinais contra infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ruminantes de importância zootécnica”, protocol 109/16, under the responsibility of **Tiago Wilson Patriarca Mineo** - 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 November 01th, 2021).

Vigência do Projeto	Início: 01/12/2016 Término: 31/12/2022
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico e camundongo Knockout
Número de animais	4572
Peso / Idade	20 g / 6-8
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	REBIR - UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR - UFU

Alteração Realizada: Alteração na data término de 31/12/2021 para 31/12/2022.

Uberlândia, 01 de novembro de 2021.


Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais
Coordenador da CEUA
Portaria R Nº 1114/2020