



UNIVERSIDAD FEDERAL DE UBERLANDIA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL
APLICADAS

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE GENES DA VIA DE INDUÇÃO DE ESPÉCIES
REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) NA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA FRENTE A
INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum***

JHOAN DAVID AGUILLÓN TORRES

UBERLÂNDIA, MG

FEVEREIRO, 2020



UNIVERSIDAD FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL
APLICADAS**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE GENES DA VIA DE INDUÇÃO DE ESPÉCIES
REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) NA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA FRENTE A
INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

JHOAN DAVID AGUILLÓN TORRES

ORIENTADOR: PROF. DR. TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO

UBERLÂNDIA, MG

FEVEREIRO, 2020

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

T693a
2023

Torres, Jhoan David Aguillón, 1993-
Avaliação do papel de genes da via de indução de espécies reativas de oxigênio (ros) na ativação do inflamassoma frente a infecção por toxoplasma gondii e neospora caninum [recurso eletrônico] / Jhoan David Aguillón Torres. - 2023.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.7118>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Biologia. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca, 1979-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 573

Glória Aparecida
Bibliotecária Documentalista - CRB-6/2047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas
Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico número 004/2020, do PPGBC				
Data:	26/02/2020	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:55
Matrícula do Discente:	11812BCE004				
Nome do Discente:	Jhoan David Aguillón Torres				
Título do Trabalho:	Avaliação do papel de genes da via de indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) na ativação do inflamassoma frente a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i>				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia Celular de Doenças Infecciosas e Degenerativas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Edição genômica no estudo da relação entre os protozoários <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i> e seus hospedeiros				

Reuniu-se na Sala 2B216, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Lourenço Faria Costa – UEG; Murilo Vieira da Silva – UFU e Tiago Wilson Patriarca Mineo, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa, Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do 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.

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 26/02/2020, às 16:59, 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 **Murilo Vieira da Silva, Médico(a) Veterinário(a)**, em 26/02/2020, às 17:00, 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 **Lourenço Faria Costa, Usuário Externo**, em 26/02/2020, às 17:00, 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 **1885912** e o código CRC **B94AD272**.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meu irmão e Angie, por ter me apoiado desde sempre para cumprir meus sonhos, por me acompanhar desde a distância e sempre ter uma voz de ânimo e carinho. Amo muito vocês.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Tiago Wilson Mineo, por ter me acolhido no seu laboratório e no seu grupo de trabalho mesmo sendo um desconhecido, pela paciência e dedicação, obrigado.

A minha co-orientadora a Dra. Caroline Martins Mota, por ter me ensinado todo no laboratório, pela companhia, auxílios, pela paciência com meu portunhol, e pelos tantos puxões de orelha, ficarei sempre agradecido com você, um exemplo a seguir.

Ao Prof. Dr. Jose Roberto Mineo, por ter me acolhido e me fazer sentir como em casa, pelos ânimos e motivações para continuar no caminho da pesquisa.

A Tayane Fontes, por ter me auxiliado sempre desde o começo, pelos almoços, as risadas e as dancinhas de comemoração, obrigado por me acompanhar sempre.

Aos colegas do Laboratório, Flavinha, Tamires, Mariana, Vanessa M, Eliezer, Carol S, Vanessa R, Angelis, Heber, Fernando e Isabela, por me auxiliar nas minhas múltiplas duvidas, pela companhia, os convívios, as risadas e os papos.

A Yusmaris Cariaco, pelo seu apoio eterno, por me ajudar mesmo desde antes de começar essa aventura, pelas palavras de ânimo e as companhias.

A Tatiana Durán e Marcos Paulo Oliveira, pelos convívios, conselhos e os almoços.

Ao meu Carlitos, por me acompanhar nessa aventura, pelos momentos de descontração, pela confiança, a companhia. Obrigado meu irmão.

Aos meus amigos bolsistas da OEA, Brenda, Wilcon, Wendy, Angela, Luis, Alex, Daniela, Victor, Juliana, por ser minha família aqui no Brasil.

Aos meus eternos e amigos, Sergio, Mapa, Animal, Carolina, Jroge, obrigado pelos tantos anos de amizade e seu apoio.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, Marley, Zilda, Ana Cláudia e Enrique pelo apoio no laboratório.

Ao Max pelo apoio na solução dos nossos problemas.

A Renata Claudia Giembinsky, secretaria do programa de pós-graduação, pela ajuda e sua boa disposição comigo.

Ao programa PAEC OEA-GCUB por ter me dado a oportunidade de vir ao Brasil para continuar com meus estudos.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

RESUMO

As infecções por parasitos do filo apicomplexa são amplamente estudadas por serem causadoras de problemas clínicos e econômicos. *Toxoplasma gondii* representa um problema de saúde pública pois afeta indivíduos imunodeficientes e fetos ou neonatos infectados intrauterinamente; já *Neospora caninum*, causa grandes perdas econômicas na indústria agropecuária pois é a principal causa de abortos bovinos. Diversos estudos têm demonstrado que existem grandes diferenças entre *T. gondii* e *N. caninum*, como o tipo de hospedeiros intermediários e definitivos e a patogenia. Também se sabe que esses parasitos usam mecanismos similares para a infecção e por consequência, compartilham algumas similaridades na resposta imune que induzem, como por exemplo, a indução de uma resposta de padrão Th1 para o controle da replicação parasitária. Adicionalmente, o inflamassoma - um complexo proteico que desencadeia a maturação de IL-1 β e IL-18 e leva as células a piroptose - tem sido estudado amplamente nos últimos anos como mecanismo de controle parasitário, assim como sua relação com outros mecanismos celulares de controle parasitário como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Sabe-se que infecção por parasitos pertencentes ao filo apicomplexa são capazes de induzir a produção de ROS e a ativação do inflamassoma. Neste sentido, objetivou-se no presente estudo relacionar genes relevantes na indução de espécies reativas do oxigênio com a ativação do inflamassoma durante a infecção de macrófagos murinos com *T. gondii* e *N. caninum*. Mediante o análise de RNAseq de macrófagos infectados com ambos os parasitos e a expressão esta posteriormente validadas por PCR em tempo real, encontrou-se que as infecções pelos dois parasitos são capazes de regular a expressão de genes associados a via ROS. Com base nestas informações, utilizando-se a técnica de edição genômica por CRISPR/Cas9, foram gerados macrófagos geneticamente deficientes de componentes centrais desta via de sinalização para se avaliar seus papéis na indução e ativação de componentes críticos do complexo inflamassoma. Com base nestas células, observamos que NOX1 e NOX2 estão estreitamente relacionados à ativação de Caspase-1/11 mediante as infecções, enquanto NOX1 e MPO são essenciais para a expressão de ASC nas células analisadas. Adicionalmente, foram encontradas diferenças parasito-específicas nos genes analisados. Desta forma, esses achados demonstram que genes relacionados à via de indução de ROS participam ativamente da formação do complexo inflamassoma durante as infecções pelos protozoários *T. gondii* e *N. caninum*.

Palavras-chave: Inflamassoma, c, neosporose, Caspase-1/11, ROS, NLRP3

ABSTRACT

Parasitic infections of the phylum apicomplexa are widely studied as they cause clinical and economic problems. *Toxoplasma gondii* represents a public health problem because it affects immunodeficient individuals and intrauterine infected fetuses or neonates; *Neospora caninum*, on the other hand, causes great economic losses in the agriculture sector because it is the main cause of bovine abortions. Several studies have shown that there are great differences between *T. gondii* and *N. caninum*, such as the type of intermediate and definitive hosts and pathogenesis. It is also known that these parasites use similar mechanisms for infection and therefore share some similarities in the immune response that induces, for example, the induction of a Th1 type response to control parasitic replication. Additionally, the inflammasome - a protein complex that triggers the maturation of IL-1 β and IL-18 and leads the cells to pyroptosis - has been extensively studied in recent years as a parasitic control mechanism, as well as its relationship with other cellular mechanisms of parasitic control such as the production of reactive oxygen species (ROS). It is known that infection by parasites belonging to the phylum apicomplexa is capable of inducing ROS production and inflammation activation. In this sense, the aim of the present study was to correlate relevant genes in the induction of reactive oxygen species with inflammation activation during murine macrophage infection with *T. gondii* and *N. caninum*. Through the analysis of RNAseq of macrophages infected with both parasites and the expression later validated by real-time PCR, it was found that the infections by both parasites can regulate the expression of genes associated with the ROS pathway. Based on this information, using the CRISPR/Cas9 genomic editing technology, genetically deficient macrophages were generated from central components of this signaling pathway to evaluate their roles in the induction and activation of critical components of the inflammasome complex. Based on these cells, we observed that NOX1 and NOX2 are closely related to the activation of Caspase-1/11 by infections, while NOX1 and MPO are essential for the expression of ASC in the analyzed cells. Additionally, parasite-specific differences were found in the genes analyzed. Thus, these findings show that genes related to the ROS induction pathway actively participate in the formation of the inflammasome complex during infections by *T. gondii* and *N. caninum* protozoans.

Keywords: Inflammasome, toxoplasmosis, neosporosis, Caspase-1/11, ROS, NLRP3

SUMÁRIO

SUMÁRIO

SUMÁRIO	13
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 O filo Apicomplexa.	19
1.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	20
1.1.1 Ciclo de vida.....	21
1.1.2 Patogenia.	23
1.3 <i>Neospora caninum</i>	24
1.3.1 Ciclo de vida do parasito.	25
1.3.2 Patogenia	26
1.4 Resposta imune protetora dos hospedeiros frente a infecção por <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i> . 28	
1.5 Espécies reativas de oxigênio (ROS).	29
1.6 O Inflamassoma.	31
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAIS E METODOS	37
4.1 Análise de RNASeq por bioinformática.	37
4.2 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs).	37
4.3 Cultura de células HeLa.	38
4.4 Cultura de parasitos <i>T. gondii</i> RH e <i>N. caninum</i> Liverpool.	38
4.5 Infecção de BMDMs com <i>T. gondii</i> RH e <i>N. caninum</i> Liv.....	39
4.6 Extração de RNA.	39

4.7	Biblioteca de cDNA.....	40
4.8	Quantificação de mRNA por qPCR.....	40
4.9	Transformação genética dos macrófagos imortalizados de camundongo por CRISPR/Casp.	42
4.9.1	Desenho de gRNAs.....	42
4.9.2	Ligação dos oligos ao vector	43
4.9.3	Transformação de células competentes DH5- α	43
4.9.4	Purificação dos plasmídeos.....	44
4.9.5	Transfecção de Macrófagos Imortalizados de Camundongo.....	45
4.10	Extração do DNA genômico dos clones transfectados.	45
4.11	Reação em cadeia de polimerase (PCR).	46
4.12	Eletroforese em gel de agarose.	46
4.13	Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS).	47
4.14	Mensuração da atividade da Mieloperoxidase intracelular.	47
4.15	Quantificação da caspasa-1/11 ativa.....	47
4.16	Quantificação da atividade do Lactato Desidrogenase extracelular.	48
4.17	Análise estatística.....	48
5.	RESULTADOS.....	50
5.1	A expressão dos genes envolvidos na produção de ROS é regulada pela presença de Casp1/11 e Myd88.....	50
5.2	Os genes da via ROS expressam diferencialmente ao longo do tempo da infecção.	54
5.3	Nox1 e Nox2 são necessários para a produção de ROS em macrófagos imortalizados infectados com <i>T. gondii</i>	56
5.4	A atividade da mieloperoxidase é mediada por Nox2 na infecção por <i>T. gondii</i>	56
5.5	A ativação da Caspase-1/11 em macrófagos imortalizados depende da atividade de Nox1, Nox2 e Mpo.	59
5.6	ROS regulam a expressão de genes associados ao Inflamassoma.	59
5.7	Nox1 regula a piroptose induzida por <i>N. caninum</i>	62

6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÃO.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns gêneros de parasitos do filo Apicomplexa de importância clínica e econômica..	20
Tabela 2. Primers para quantificação de mRNA por qPCR.	41
Tabela 3. Primers dos gRNA e insertos desenhados para a depleção de genes da via ROS.	42
Tabela 4. Primers para a checkagem de clones Knockout dos genes deletados.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>.	22
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>.	26
Figura 3. Espécies reativas de oxigênio.	30
Figura 4. Heatmap da expressão diferencial dos genes envolvidos na produção de ROS em macrófagos murinos.	51
Figura 5. Caspase-1/11 e Myd88 regulam a expressão dos genes associados à produção de ROS.	54
Figura 6. Cinética da expressão de genes de ROS ao longo do tempo da infecção por <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>.	56
Figura 7. Caracterização genotípica e fenotípica das células <i>Knockout</i> para os alguns genes da via ROS.	57
Figura 8. Atividade intracelular enzimática da mieloperoxidasa.	58
Figura 9. Atividade da Caspase 1/11 em macrófagos imortalizados <i>knockout</i> para genes da via ROS.	60
Figura 10. Expressão génica de elementos associados ao inflamassoma.	61
Figura 11. Atividade da Lactato Desidrogenase em macrófagos imortalizados murinos.	63
Figura 12. Modelo proposto da participação dos genes da via de indução de ROS na ativação do inflamassoma.	70

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 O filo Apicomplexa.

O filo apicomplexa compreende um grande grupo de mais de 5000 espécies de organismos protozoários descritos de estilo de vida parasitário intracelular obrigatório (SEEBER; SOLDATI-FAVRE, 2010), caracterizados pela presença dos alvéolos corticais, cuja função é fornecer suporte estrutural à membrana e mobilidade (ARISUE; HASHIMOTO, 2015; BERMAN, 2012). Além disso, apresentam um complexo apical evolutivamente único composto por organelas secretoras especializadas, tais como as roptrias, grânulos densos e as micronemas que ajudam no ciclo lítico do parasito (MORRISON, 2009; SEEBER; STEINFELDER, 2016; WHITE; SUVOROVA, 2018).

Os parasitos deste filo caracterizam-se também, pelo seu crescimento e replicação dentro de um vacúolo parasitóforo, um compartimento não-fagossômico unido à membrana que secreta moléculas importantes para a modulação das vias de sinalização celular do hospedeiro que permitirão sua sobrevivência (MORRISSETTE; SIBLEY, 2003).

Por tanto, os parasitos apicomplexa representam grandes problemas de importância clínica e econômica (Tabela 1), como por exemplo algumas espécies do gênero *Plasmodium*, que são causantes da malária, uma das doenças infecciosas com maior mortalidade no mundo (ARISUE *et al.*, 2019; ARISUE; HASHIMOTO, 2015; ESCALANTE; AYALA, 1994); ou *N. caninum*, o parasito causador da neosporose, de alto impacto econômico na agroindústria, sendo uma doença que afeta principalmente aos bovinos e cães (DUBEY, 2003) e *T. gondii* agente etiológico toxoplasmose, onde os indivíduos imunodeficientes e mulheres em estado de gravidez apresentam os principais sintomas e problemas que podem ser letais pela infecção (CASTRO; DUBEY, 2019).

Tabela 1. Alguns gêneros de parasitos do filo Apicomplexa de importância clínica e econômica. * Os parasitos deste gênero desenvolvem seu estado sexual em qualquer hospedeiro.

Parasito	Doença associada	Hospedeiro final ou vector	Hospedeiros intermediários	Referencia
Classe Aconoidasida (=Hematozoa), Ordem Haemosporida				
<i>Plasmodium</i> sp.	Malária	Mosquitos (<i>Anopheles</i> sp.)	Mamíferos, Aves	COLLINS; JEFFERY, 2007; ESCALANTE; AYALA, 1995
Classe Aconoidasida (=Hematozoa), Ordem Piroplasmida				
<i>Babesia</i> sp.	Babiose	Carrapatos (Ixodidae)	Mamíferos, Aves	HOMER et al., 2000
<i>Theileira</i> sp.	Theileriose	Carrapatos (Ixodidae)	Mamíferos	MANS; PIENAAR; LATIF, 2015
Classe Conoidasida, Ordem Eucoccidiorida				
* <i>Cryptosporidium</i> sp.	Cryptosporiose	Mamíferos, a Aves, Repteis, Peixes		FAYER; SPEER; DUBEY, 2018
* <i>Cyclospora</i> sp.	Ciclosporose	Mamíferos, a Aves, Repteis, Peixes		STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012
<i>Neospora</i> sp.	Neosporose	Mamíferos (Canidae)	Mamíferos, Aves	(DONAHOE et al., 2015; KHAN et al., 2020)
<i>Toxoplasma</i> sp.	Toxoplasmose	Mamíferos (Felidae)	Mamíferos, Aves, Repteis	CASTRO; DUBEY, 2019; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012

1.2 *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um parasito intracelular obrigatório pertencente à família Sarcocystidae. O parasito tem capacidade de infectar todas as células nucleadas de animais homeotérmicos

(CASTRO; DUBEY, 2019). Foi observado pela primeira vez por Nicolle e Manceaux, no ano de 1908, quando encontraram o protozoário em um roedor similar aos hamsters, *Ctenodactylus gundi*, usado na pesquisa da leishmaniose no Laboratório Louis Pasteur na República de Tunísia. Originalmente, o organismo foi categorizado como um parasito do ordem Piroplasmida e posteriormente como *Leishmania*, porém, graças a sua morfologia os autores consideraram que o parasito não correspondia a nenhum organismo já descrito, e no ano seguinte, no 1909, foi nomeado como *Toxoplasma gondii*, nome proveniente de *Toxo=arco* e *plasma=vida*, e o epíteto *gondii* foi pelo seu hospedeiro. Curiosamente e de forma simultânea no Brasil, no ano 1908, Splendore e colaboradores encontraram o parasito *T. gondii* em um coelho, mas foi erroneamente categorizado como *Leishmania* sp. e não foi nomeado pelos autores (DUBEY, 2016).

1.1.1 Ciclo de vida

T. gondii apresenta um ciclo de vida heterógeno, que consiste em duas formas distintas de reprodução: a primeira consiste na reprodução assexuada, que ocorre nos hospedeiros intermediários e a segunda, consiste na reprodução sexual que ocorre exclusivamente nos hospedeiros definitivos, neste caso, espécies da família Felidae. (BLADER *et al.*, 2015). Como a maioria das infecções por coccídios, *T. gondii* infecta a seus hospedeiros através do desenvolvimento de esporozoítos dentro de oocistos presentes nas fezes dos hospedeiros definitivos (Figura 1), assim, a infecção dos hospedeiros intermediários ocorre quando este ingere oocistos esporulados que posteriormente vão se encistar nas células epiteliais do intestino. Assim, os esporozoítos vão se desenvolver em taquizoítos e se replicar por endodiogenia, um processo de divisão celular característico de organismos apicomplexa (GÁLLEGO BERENGUER. JAIME, 2007) que ocorre dentro do vacúolo parasitóforo (VP) estabelecido após a invasão. Uma vez, o processo de replicação termina, os taquizoítos saíram da célula hospedeira que será destruída no processo e esse ciclo de invasão, replicação e saída (conhecido como o ciclo lítico) será continuamente repetido, sendo espalhados por os tecidos do organismo hospedeiro até ser controlados pela resposta imune, fazendo que o parasito se diferencie em um estágio conhecido como bradizoíto, mantendo a infecção latente por toda a vida útil do hospedeiro (BLADER *et al.*, 2015; CASTRO; DUBEY, 2019; DUBEY, 2016).

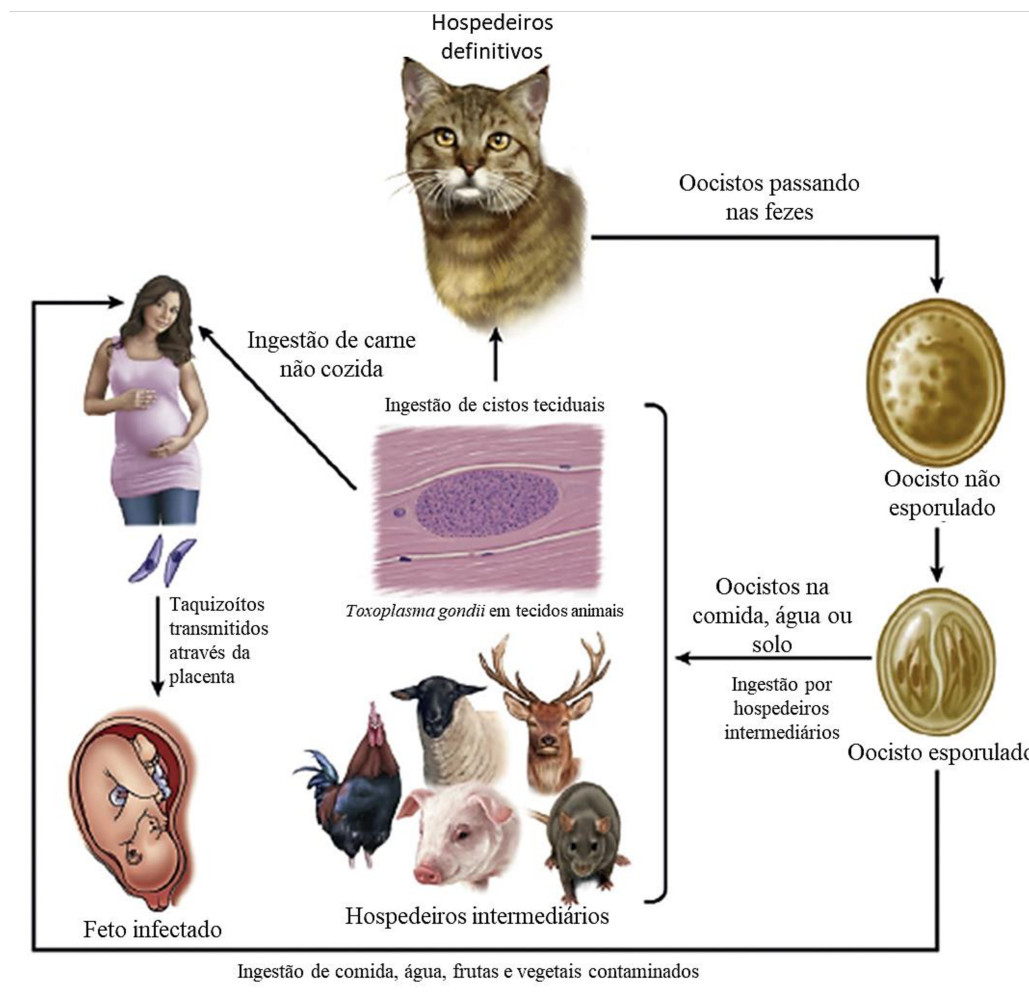


Figura 1. O ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Original de (CASTRO; DUBEY, 2019)

Uma segunda via de transmissão horizontal dos parasitos pode ocorrer, a qual é a ingestão de cistos teciduais de animais infectados, principalmente pelo consumo de carne, sendo esta a via fundamental para a infecção dos hospedeiros definitivos (BLADER *et al.*, 2015) e comum em humanos, (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Ocasionalmente, quando o hospedeiro sofre uma falha no seu sistema imune, os bradizoítos podem se diferenciar em taquizoítos novamente, sendo esta uma das causas principais de morbidade e mortalidade associada ao *T. gondii* em humanos imunocomprometidos (BLADER *et al.*, 2015; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SAADATNIA; GOLKAR, 2012).

Por outro lado, a via de transmissão vertical, onde diferentemente da maioria dos coccídios, os taquizoítos de *T. gondii* são capazes de atravessar a placenta durante a gestação em humanos

infectando o feto e trazendo graves problemas para o mesmo (infecção congênita) (BLADER *et al.*, 2015; DUBEY, 2016; PINARD; LESLIE; IRVINE, 2003; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SAADATNIA; GOLKAR, 2012)

1.1.2 Patogenia.

A toxoplasmose é uma zoonose na qual um terço da população humana encontra-se infectada e que cursa de forma assintomática nos pacientes imunocompetentes, e nas infecções sintomáticas os pacientes podem experimentar febres ou linfadenopatias cervicais associadas a mialgia, astenia e outros sinais clínicos inespecíficos que sendo persistentes durante várias semanas, podem imitar os sintomas da mononucleose infecciosa, pelo qual resulta de difícil diagnóstico em 80% da população, (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Portanto, o curso clínico da toxoplasmose depende do estado imunológico do paciente (MONTROYA; LIESENFELD, 2004), assim também, a apresentação clínica da doença sistêmica depende da localização e do efeito localizado dos cistos teciduais no corpo e da cepa do parasito (PINARD; LESLIE; IRVINE, 2003).

Em indivíduos imunocomprometidos a toxoplasmose é uma infecção oportunista; por exemplo em pacientes com AIDS, nos quais a incidência da infecção relaciona-se com o número de células T CD4+, sendo que os pacientes com uma contagem inferior a 100 células/ μ l exibem um maior risco de infecção, apresentando comumente Encefalite Toxoplásmica (ET) cuja manifestação clínica varia desde dor de cabeça, letargia, incoordenação ou ataxia hemiparesia, perda da memória, demência até grandes convulsões motoras geralmente associadas à febre (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Nos pacientes com transplantes de órgãos e terapia de imunossupressão a toxoplasmose grave ou disseminada pode ser o resultado da reativação de uma infecção latente ou de órgãos contendo os cistos de um doador soropositivo dado a um receptor soronegativo, sendo a toxoplasmose pulmonar a mais comum em este tipo de pacientes, disseminando-se a órgãos como cérebro, fígado, pâncreas, baço, medula óssea, entre outros (PATRAT-DELON *et al.*, 2010).

Além do anterior, a infecção por *T. gondii* é classicamente conhecida por ser vista em recém-nascidos de gestantes infectadas. A infecção congênita resulta de uma infecção materna primária durante a gestação e a frequência da transmissão vertical tanto como a severidade da doença depende do período gestacional onde ocorre a infecção. Na toxoplasmose congênita, a placenta tem um papel fundamental no processo de infecção já que é a barreira natural que supostamente é capaz de proteger ao feto assim como ser o tecido objetivo para a replicação dos parasitos. Portanto, tem sido observado que a gravidade da infecção fetal pode ser inversamente proporcional à etapa gestacional, sendo que no terceiro trimestre da gestação perto de um 80% dos neonatos infectados parecem ser assintomáticos, no entanto se a transmissão ocorre no primeiro semestre por exemplo, as consequências para o feto podem ser graves, sendo estas desde anormalidades do desenvolvimento severas até o aborto (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Dentro das manifestações clássicas que apresentam os neonatos com toxoplasmose, encontram-se a hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas, corioretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardo psicomotor ou mental, trombocitopenia e anemia (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.3 *Neospora caninum*.

N. caninum é um protozoário intracelular obrigatório, classificado na família Sarcocystidae, junto com *T. gondii*. O parasito foi observado inicialmente no ano 1984 por Bjerkås e colaboradores na Noruega, em cães com encefalomielite e miosite mas foi unicamente descrito como um cisto tecidual esporulado nos tecidos do sistema nervoso dos animais infectados (BJERKÅS; MOHN; PRESTHUS, 1984; DUBEY; LINDSAY, 1996), e somente foi descrito e proposto o nome do gênero *Neospora* no ano 1988 por Dubey e colaboradores quanto foi encontrado em cachorros que apresentavam sinais clínicos semelhantes à toxoplasmose e que não foram reativos no ensaio de imunoperoxidase com soro anti-*T. gondii* (DUBEY *et al.*, 1988; DUBEY; LINDSAY, 1996). Posteriormente foi reconhecido *N. caninum* como o agente etiológico mais frequente causante de abortos no gado (DE AQUINO DINIZ *et al.*, 2019; DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY; SCHARES, 2011).

Sabe-se que além dos animais já mencionados, tem sido isolado e identificados tanto o parasito como anticorpos ou DNA do mesmo em animais de vida silvestre tais como alguns mamíferos do ordem carnívora (Famílias: Canidae, Mustelidae, Hyaenidae, Ursidae, Procyonidae, Viverridae, Herpestidae, Felidae, Otariidae, Odobenidae e Phocidae), ordem Artiodactyla (Famílias: Cervidae, Bovidae, Suidae, Camelidae e Delphinidae), ordem Perissodactyla (Famílias: Equidae e Rhinocerotidae), ordem Rodentia (Famílias: Muridae, Cricetidae, Sciuridae e Caviidae), ordem Lagomorpha (Familia: Leporidae), ordem Eulipotyphla (Familia: Soricidae), ordem Proboscidea (Familia: Elephantidae), ordem Didephimorphia (Familia: Didelphidae), ordem Diprotodontia (Familia: Macropodidae); ou algumas aves dos ordens Galliformes (Familia: Phasianidae), Passeriformes (Famílias: Corvidae, Passeridae), Accipitriformes (Familia: Accipitridae) e Psittaciformes (Familia: Psittacidae) (DONAHOE *et al.*, 2015; LIU; REICHEL; LO, 2020).

1.3.1 Ciclo de vida do parasito.

N. caninum apresenta um ciclo de vida heteróxico, onde seus hospedeiros definitivos são espécies de mamíferos pertencentes à família Canidae (DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996; KHAN *et al.*, 2020; REICHEL; ELLIS; DUBEY, 2007). Em contraste com o desenvolvimento sexual de *T. gondii*, o estágio sexual conhecido de *N. caninum* é o oocisto diploide não esporulado, o qual é ambientalmente resistente a condições extremas (KHAN *et al.*, 2020). Esse oocisto é eliminado nas fezes dos canídeos infectados, onde sofrem uma meiose para constituir esporozoítos haploides. Posteriormente, os esporozoítos são consumidos pelos hospedeiros intermediários, liberando-se dos oocistos e transformando-se em taquizoítos, o estágio de rápido crescimento para a disseminação da infecção (Figura 2). Consecutivamente, os taquizoítos invadem as células do hospedeiro e replicam-se assexuadamente por endodiogenia dentro de um vacúolo parasitóforo. Após de vários ciclos de replicação, os parasitos saem das células hospedeiras re-infectando novas células, gerando a resposta imune inata tanto como adaptativa específica do hospedeiro que concomitante com outros fatores ambientais, fazem que os taquizoítos se convertem em bradizoítos, um estágio de latência do parasito, encistando nos tecidos de tal forma que podem persistir nos hospedeiros por um longo tempo e podem gerar uma infecção latente, particularmente

em hospedeiro imunocomprometidos (DUBEY *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2020; LIU; REICHEL; LO, 2020).

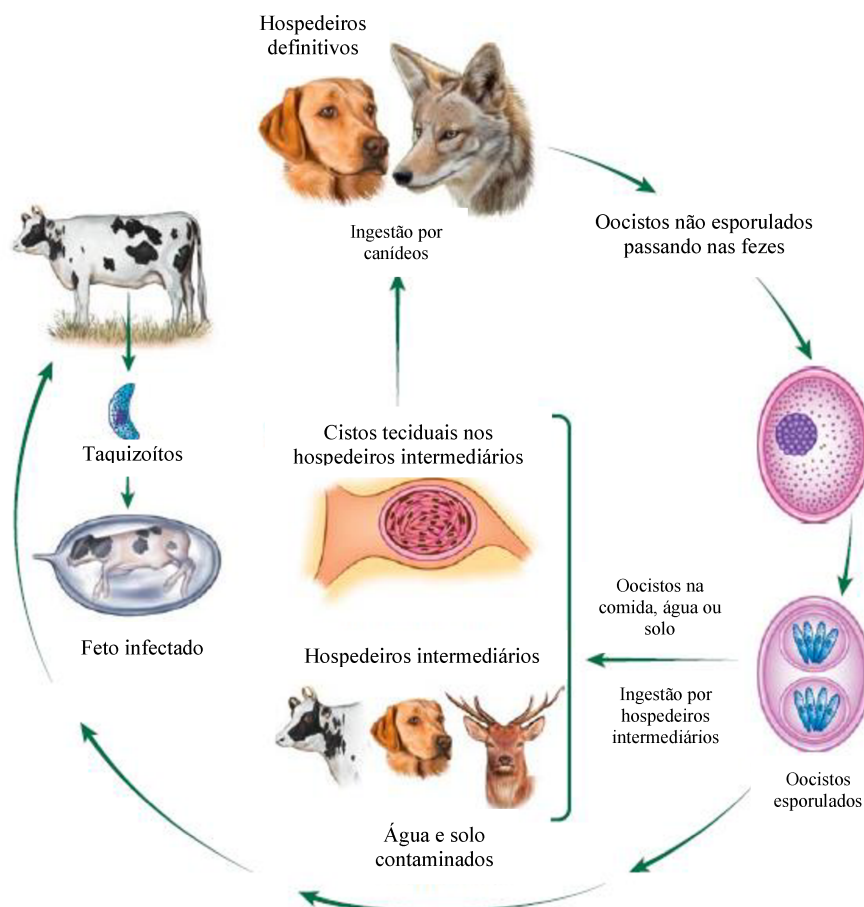


Figura 2. Ciclo biológico de *Neospora caninum*. Original do (DUBEY *et al.*, 2017).

1.3.2 Patogenia

A neosporose é uma doença parasitária de distribuição mundial que afeta principalmente bovinos e cães, provocando abortos e problemas neurodegenerativos e, portanto, um alto impacto na indústria pecuária e veterinária (DUBEY; LINDSAY, 1996; KIERBIC *et al.*, 2019).

Desse modo, a neosporose pode-se manifestar clinicamente dependendo do animal, da idade do mesmo, além do mecanismo de infecção (DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996; KHAN *et al.*, 2020), por exemplo nos cães após infecção transplacentário, cuja idade está entre as 5 semanas até os seis meses desenvolvem poliomyosite ou também polirradiculoneurite, causando nos animais paralisia ascendente dos membros posteriores, atrofia muscular, hiperextensão rígida do membro pélvico, fraqueza cervical e disfagia (DONAHOE *et al.*, 2015; REICHEL; ELLIS; DUBEY, 2007). Por outro lado, nos cães adultos, o parasito pode desenvolver encefalomielite protozoária, que se caracteriza por ter um curso clínico variável, com sinais neurológicos clínicos tais como paresia e paralisia das extremidades posteriores, convulsões, ataxia, disfagia, incontinência, anormalidades oculares, incluindo miose, reflexos pupilares diminuídos, anisocoria e enoftalmia. Além dos problemas neuromusculares que traz a infecção por *N. caninum* nos cães, esta pode induzir lesões variáveis como miocardite, polimiosite, pancreatite, pneumonia intersticial junto com edema pulmonar e alveolite, tudo isso dependendo dos tecidos e a s células que foram infectadas (DONAHOE *et al.*, 2015; GAROSI *et al.*, 2010).

Além disso, na neosporose bovina, a principal doença causada por um patógeno cuja principal manifestação clínica são os abortos em bovinos (DUBEY; SCHARES, 2011). Tem sido observado que semelhantemente ao curso clínico da toxoplasmose congênita, a neosporose congênita apresenta uma relação entre a etapa gestacional com a gravidade dos sinais clínicos do feto, onde se a infecção transplacentária ocorre durante os primeiros 100 dias da gestação quando os tecidos linfóides estão em desenvolvimento, pode-se resultar em uma reabsorção ou mumificação fetal; conforme o avanço da gestação, durante o segundo ou terceiro trimestre, apesar do feto já ter uma resposta imune crescente, existe uma alta probabilidade de aborto principalmente entre o quinto e o sétimo mês de gestação, e finalmente, se a infecção ocorre no último trimestre da gestação, quando a imunidade fetal está desenvolvida, é comum ter nascimentos de crias infectadas mas clinicamente normais, embora podem acontecer nascimentos de crias não infectadas (AL-QASSAB; REICHEL; ELLIS, 2010; DONAHOE *et al.*, 2015; DUBEY, 2003; DUBEY; LINDSAY, 1996; DUBEY; SCHARES, 2011; KHAN *et al.*, 2020).

Finalmente, tem sido reportado casos, onde animais tanto silvestres como no cativeiro apresentaram sinais clínicos quanto estavam infectados com *N. caninum*, por exemplo foi reportado um caso fatal de neosporose em uma Marta, *Martes martes* (Carnivora: Mustelidae) a qual

apresentou um quadro clínico tamanho corporal diminuído, diarreia, ataxia nas suas extremidades, dispnéia e taquicardia. Também tem sido reportados casos de neosporose em um grupo de raposas com uma alta taxa de morbidade e mortalidade, cujos sinais clínicos incluíam, inapetência, emagrecimento, febre, depressão, ataxia e paralisia febre, (DONAHOE *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2009).

1.4 Resposta imune protetora dos hospedeiros frente a infecção por *T. gondii* e *N. caninum*.

Tem sido observado nos diversos modelos de estudo que a imunidade protetora nos hospedeiros induzida pela infecção por *T. gondii* como por *N. caninum* é tipicamente uma resposta do tipo *T helper1* (Th1), sendo que essa resposta pró-inflamatória parece ser essencial para restringir a replicação parasitária e a indução da infecção latente por meio da formação dos cistos teciduais (DONAHOE *et al.*, 2015; HUNTER; SIBLEY, 2012). O reconhecimento inicial de moléculas dos parasitos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) é mediado pelos *Toll-Like Receptors* (TLRs), sendo o caso destes parasitos por exemplo, as profilinas por parte de TLR11 nas células dendríticas (DCs) (HUNTER; SIBLEY, 2012; JENKINS *et al.*, 2010; MANSILLA *et al.*, 2016; PIFER; YAROVINSKY, 2011), ou de *Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins* (GPI anchors) por parte dos TLR2 e TLR4 em macrófagos e monócitos (DEBIERRE-GROCKIEGO *et al.*, 2007; LIU; REICHEL; LO, 2020; MINEO *et al.*, 2010). Além disso, demonstrou-se a participação da proteína acopladora *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) que se liga aos TLRs induzindo o fator de transcrição NF- κ B que estimula a produção da citocina pró-inflamatória interleucina-12 (IL12) (MINEO *et al.*, 2010).

A produção de IL-12 por parte das DCs, monócitos e macrófagos, que também produzem o *Tumour necrosis fator* (TNF), um cofator na atividade antimicrobica, estimula as células *Natural killer* (NK) e células T CD4+ e células T CD8+ a produzir interferon- γ (IFN γ), cuja função principal é regular os mecanismos efetores antimicrobicidas para controlar os parasitos (BEITING *et al.*, 2014; DONAHOE *et al.*, 2015; HUNTER; SIBLEY, 2012). Adicionalmente, a produção de IL10 e IL27 tem um papel chave na modulação destas vias e impede a sobre produção das citocinas do tipo Th1 (HUNTER; SIBLEY, 2012).

Adicionalmente, durante a fase inata e adaptativa da resposta imune, IFN γ propaga um sinal através de um receptor de superfície IFN γ (IFN γ R) para ativar o transdutor de sinal e o ativador da transcrição 1 (STAT1), um fator de transcrição nuclear que controla a expressão gênica e que graças a isso, os fagócitos regulam a produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ROS), que contribuem no controle intracelular dos parasitos. Finalmente, no controle parasitário, também participam a classe de proteínas denominadas *immunity-related GTPases* (IRGs) e p67 *guanylate-binding proteins* (GBPs), as quais são recrutadas no VP e estão envolvidas na eliminação dos parasitos (DONAHOE *et al.*, 2015; HUNTER; SIBLEY, 2012).

1.5 Espécies reativas de oxigênio (ROS).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são bio - produtos derivados do metabolismo aeróbio (SCHIEBER; CHANDEL, 2015) que compreendem um grupo de íons quimicamente reativo, radicais e moléculas todas derivadas do oxigênio e cujas funções variam da biossíntese de hormônios, sinalização e envelhecimento celular e também participação no controle microbiano (KOHCHI *et al.*, 2009; RADA; LETO, 2008). A produção de ROS pode-se originar pela radiação, a luz, como um produto resultado da cadeia respiratória mitocondrial ou por outras enzimas as quais convertem o oxigênio em uma forma reativa (KOHCHI *et al.*, 2009), porém, esses processos são altamente inespecíficos, considerando-se muitas vezes como produtos acidentais nas células os quais tem que ser neutralizados (LAMBETH, 2004).

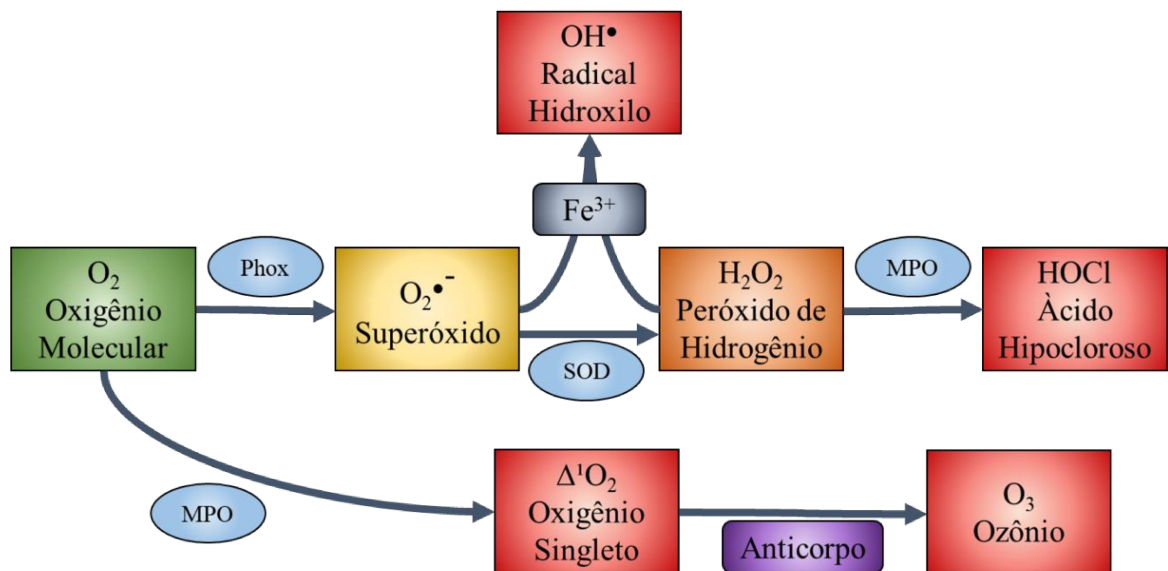


Figura 3. Espécies reativas de oxigênio. Original de LAMBETH, 2004

A via de espécies reativas de oxigênio é mediada por uma série de enzimas que catalisam diversas reações químicas na célula onde liberam-se os diferentes produtos derivados do oxigênio (Figura 3). Primeiramente, o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é produzido de multiplex formas, as quais podem incluir a oxidação do NADPH ou de NADH a $NADP^+$ e NAD^+ respectivamente, com a intervenção catalisadora de enzimas com um domínio estrutural da ligação de fosfoinositida envolvido na marcação de proteínas da membrana celular (ou como *Phagocytic oxidase*) PHOX, onde encontram-se proteínas como as NADPH oxidases (NOXs) e as Dual oxidases (DUOXs). Posteriormente, após da produção de superóxido, duas dessas moléculas podem reagir a gerar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em uma reação conhecida como dismutação, a qual é acelerada por um conjunto de enzimas denominadas como Superóxido Dismutases (SODs). Se existe Ferro (Fe^{3+}) como catalizador após da dismutação na célula disponível, pode ocorrer a formação de radicais hidroxilo por decomposição do peróxido (LAMBETH, 2004; MATTA *et al.*, 2018a; PEREZ-BENITO, 2004).

Além do superóxido, peróxido e dos radicais hidroxilo outras ROS podem se produzir nos sistemas biológicos; por exemplo em locais inflamados, os neutrófilos podem produzir ácido hipocloroso (HOCl) a partir de H_2O_2 e cloreto graças à ação catalizadora da enzima fagocitária mieloperoxidase (MPO); ou o oxigênio singlete (Δ^1O_2) que é formado através da ação catalizadora

das Phox e MPO a partir da oxidação de íons halogenados, e o ozônio (O₃), que pode ser gerado a partir do oxigênio singlete e pela ação catalizadora de anticorpos (LAMBETH, 2004).

1.6 O Inflamassoma.

O inflamassoma é um complexo protéico característico da imunidade inata correspondente à via de ativação da caspase-1 e representa uma reação coordenada de resposta para a supressão de patógenos evitando o dano tecidual. O complexo encontra-se formado por um receptor com domínio de oligomerização e união ao nucleotídeo, *NOD-like receptor* (NLR) ou uma proteína induzível por interferon (AIM2), a *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) e a caspase-1 (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; SWANSON; DENG; TING, 2019). A formação desse complexo resulta na indução de caspases inflamatórias além do processamento das pró-interleucinas 1 β (pro-IL-1 β) e 18 (pro-IL-18) para suas formas ativas interleucina 1 β (IL-1 β) e a interleucina 18 (IL-18), que são interleucinas com atividade pleiotrópica (SAHOO *et al.*, 2011).

A liberação das IL-1 β e da IL-18 ocorre em um sistema de dois níveis: No primeiro, o sinal é mediado pela estimulação dos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) através dos PAMPs e Padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que resulta na ativação da via NF- κ B para a expressão da pro-IL-1 β e dos genes associados às proteínas do inflamassoma. No segundo, o sinal é conferido tanto pelo fluxo de potássio devida à estimulação do canal de potássio sensível ao ATP ou pela formação de poros por toxinas bacterianas, tanto como pela desintegração lisossomal que dirige à saída de catepsina B no citosol ou também pela liberação de ROS. Portanto, sendo os sinais requeridos para a montagem do inflamassoma, resulta na maturação das interleucinas pela enzima caspase-1/11 por processamento proteolítico e induzindo uma morte celular inflamatória conhecida como piroptose.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Toxoplasma gondii e *Neospora caninum* são patógenos que geram riscos importantes para a saúde humana e animal. As células imunes inatas possuem diferentes mecanismos de resposta frente estas infecções que, apesar de não serem capazes de eliminar os parasitos por completo, são cruciais na resistência dos hospedeiros frente ao pico de replicação parasitária, promovendo sua sobrevivência.

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS) tem um papel fundamental no controle de patógenos intracelulares, pois induz a produção de agentes antimicrobianos como peróxido de hidrogênio, superóxido, ozônio ou ácido hipocloroso. Além disso, a ativação destas proteínas durante às infecções parasitárias também contribui para a ativação do inflamassoma, que também contribui para a restrição dos parasitos. Desta forma, o propósito deste trabalho foi observar a expressão de genes da via de indução de ROS na ativação de uma resposta imune contra as infecções por *T. gondii* e *N. caninum*, buscando contribuir para o entendimento das interações parasito-hospedeiro.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral.

Avaliar o papel dos diferentes genes da via de síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) na ativação do inflamassoma durante as infecções por *T. gondii* e *N. caninum* em macrófagos murinos.

3.2. Objetivos específicos.

- a.** Selecionar os principais alvos das vias de síntese de ROS por análise de bioinformática em bibliotecas de transcriptomas.
- b.** Validar por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) a expressão dos genes alvos em infecções de macrófagos murinos por *T. gondii* e *N. caninum*.
- c.** Gerar macrófagos murinos geneticamente deficientes para alvos selecionados mediante a utilização da técnica de edição genômica CRISPR/Cas9.
- d.** Avaliar o fenótipo de expressão e produção de moléculas relacionadas à síntese de ROS e ativação do Inflamassoma em células modificadas geneticamente frente à infecção por *T. gondii* e *N. caninum*.

MATERIAIS E METODOS

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Análise de RNASeq por bioinformática.

As sequências em formato FASTAQ dos transcriptomas foram obtidos por meio de financiamento de parceria internacional entre a UFU e MIT, financiado pelo CNPq, por meio do laboratório do Dr. Jeroen Saeij, hoje na Universidade da Califórnia, Davis (UCDAVIS). Os resultados foram obtidos através de sequenciamento de transcriptoma de macrófagos de camundongos da linhagem C57BL/6, juntamente com células Myd88^{-/-} e Caspase-1/11^{-/-} infectadas com *T. gondii* RH e *N. caninum* Liv por um período de 6 horas com MOI 3, por meio do sistema Solexa6/Illumina. As sequências foram analisadas na plataforma Galaxy (<https://galaxyproject.org/>) usando como genoma de referência do *Mus musculus* C57BL/6J versão GRCm38 depositado no HostDB (<https://hostdb.org/hostdb/>) e seguindo o seguinte fluxo de trabalho: FastQC revisando a qualidade das sequências, Trimmomatic alinhando as sequências entre si, HISAT2 alinhando as sequências respeito ao genoma de referência, HTSeq quantificando os níveis de expressão e DESeq2 avaliando a expressão dos genes em relação ao controle (células não infectadas).

4.2 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs).

Camundongos C57BL/6, MyD88^{-/-} e caspase1/11^{-/-} foram eutanasiados por deslocamento cervical e foram extraídos os fêmures e as tíbias, sendo estocados em meio RPMI. Posteriormente, os fêmures e as tíbias foram lavados em álcool 70% por 1 minuto em câmara de fluxo laminar, e foram cortadas as epífises. Depois, o conteúdo da medula óssea foi lavado com meio RPMI 1640 incompleto (Gibco, Paisley, Inglaterra) com auxílio de uma seringa e uma agulha 26G. Em seguida, a suspensão celular restante da lavagem foi centrifugada a 400 x g por 10 min e ressuspendida em meio R20/30 (RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco), 2mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Lois, EUA) e 30% de meio condicionado de células L929

(MARIM *et al.*, 2010). Posteriormente, as células foram incubadas em placas de Petri em estufa a 37°C e 5% CO₂.

Após de quatro dias de incubação, foi adicionado 9 ml de meio R20/30 e as placas foram mantidas por mais 2 dias na estufa a 37°C e 5% CO₂. Uma vez completados os 6 dias de incubação o sobrenadante foi removido das placas de Petri e foi adicionado PBS 1X gelado estéril a 4°C por 5 minutos para descolar as células da placa. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 400 x g por 10 minutos e o pellet obtido foi ressuspensionado em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas de acordo com o layout experimental.

4.3 Cultura de células HeLa.

Células HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]) foram obtidas do Laboratório de Imunoparasitologia Mário Endsfieldz Camargo, do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). As células foram cultivadas em garrafas de cultura T25 em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM HEPES (Gibco), 100 U/ml penicilina (Gibco), 100 µg/mL estreptomicina (Gibco), 2mM L-Glutamina (Sigma Chemical Co., St. Lois, EUA), 3 mM NaHCO₃ e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C até atingirem a confluência. Para os repiques as células foram lavadas com PBS 1X a temperatura ambiente e foi adicionado 1 ml de Tripsina-EDTA (Gibco) a 37°C, incubando-se até as células descolarem, posteriormente foram coletadas as suspensões celulares e centrifugaram-se a 400 x g por 5 minutos. Em seguida, o pellet de células foram ressuspensionados em Meio RPMI 10% e foram inoculadas novas garrafas ou adicionadas às culturas de parasitos.

4.4 Cultura de parasitos *T. gondii* RH e *N. caninum* Liverpool.

Foram mantidas linhagens dos parasitos *T. gondii* RH e *N. caninum* Liverpool (NcLiv) em garrafas de cultura T25 com uma monocamada de células HeLa, cuja manutenção foi descrita anteriormente. Para a infecção das células foram utilizados taquizoítos dos dois parasitos e mantidos nas células por passagens seriadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM HEPES (Gibco), 100 U/ml penicilina (Gibco), 100 µg/mL estreptomicina (Gibco), 2mM L-Glutamina (Sigma Chemical Co., St. Lois, EUA), 3 mM NaHCO₃ e 2% de soro fetal

bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C, a cada 48-72 horas. Para os experimentos *in vitro*, os parasitos livres foram coletados e parcialmente purificados por passagens através de uma agulha 13 x 4 mm e foram centrifugados posteriormente a 800 x g por 10 minutos, o pellet foi ressuscitado em meio RPMI incompleto e foram contados os parasitos em câmara de Neubauer com corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA).

4.5 Infecção de BMDMs com *T. gondii* RH e *N. caninum* Liv.

Foram plaqueados 1x10⁶/mL macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6, *myd88*^{-/-} e *caspase1*/*11*^{-/-} em placas de 12 poços e incubados em meio RPMI completo overnight. Posteriormente, foram infectados taquizoítos de *T. gondii* RH e *N. caninum* Liv (*Multiplicity of infection* : MOI 3) por um período de 6 horas.

Por outro lado, 1x10⁶/mL macrófagos de camundongo C57BL/6 foram plaqueados em placas de 12 poços e infectados com taquizoítos de *T. gondii* RH e *N. caninum* Liv (MOI 0,5) por períodos de 1, 6 e 18 horas de infecção com a finalidade de compreender a cinética da expressão gênica.

4.6 Extração de RNA.

O sobrenadante das células foi retirado e foram adicionados 500 µl de Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA) em cada poço, e foi coletada a suspensão de células e colocada em nitrogênio líquido para ser estocadas no freezer a -80°C.

As amostras foram descongeladas e adicionado 300 µl 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 µl 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 ressuscitado em H₂O livre de DNase e RNase. Após isso, foi realizado a dosagem de RNA em um NanoDropTM Lite *Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA); a leitura foi feita a 260nm.

As amostras foram tratadas para a posterior síntese de cDNA. Para isso, ajustaram-se as amostras em 3 µg de RNA em 50 µl de suspensão. Foi adicionado 5 µl de MgCl₂ e 1 µl de DNase e foram incubadas a 37°C por 15 minutos, em seguida, foi adicionado 25 µl de trizol e 25 µl de clorofórmio e foram centrifugadas as amostras a 10000 x g por 15 minutos. Coletaram-se os sobrenadantes e adicionaram 20 µl de C₂H₃NaO₂ 3M pH 5.3, 1 µl de glicogênio e 150 µl de etanol ultrapuro. As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e pellet mantido a temperatura ambiente para secagem. Finalmente os pellets foram ressuspendidos em 50 µl de H₂O livre de DNase e RNase e as concentrações medidas pelo NanoDrop Lite *Spectrophotometer*.

4.7 Biblioteca de cDNA.

As amostras contendo RNA extraído foram ajustadas a 1 µg de RNA em 4 µl. Foi usado o kit comercial *GoScript™ Reverse Transcriptios System* (Promega, Madison, EUA) para a síntese do cDNA. Resumidamente, adicionou-se 1 µl de Primer Oligo (dT) e se incubou a 75°C por 5 minutos, imediatamente deixaram-se as amostras em banho de gelo por 10 minutos. Após disso, foi adicionado 15 µl do *Master Mix* do kit (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) e foram levadas as amostras ao termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler na programação para RT-PCR com os seguintes tempos e temperaturas de reação: 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 10 minutos. Finalmente, as amostras foram diluídas com H₂O livre de nucleasas e foram estocadas no freezer a -20°C.

4.8 Quantificação de mRNA por qPCR.

Para o qPCR foi usado o Kit comercial *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* e seguidas as recomendações do fabricante (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EUA). Resumidamente, foram adicionados em placas óticas de 96 poços para qPCR, 5 µl de *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* [2X], 0,5 µl Primer Forward 10 µM, 0,5 Primer Reverse 10 µM (Tabela 2) e 4 µl de cDNA 10 ng. Posteriormente, as placas foram submetidas às seguintes condições de ciclagem no

StepOne™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System: ativação 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, desnaturação 95°C por 15 segundos, anelamento de primers 60°C por 1 minuto, extensão 72°C por 15 segundos (desnaturação, anelamento e extensão num total de 40 ciclos) e finalmente a curva de *melt* feita a 95°C por 15 segundos e 60°C.

Tabela 2. Primers para quantificação de mRNA por qPCR. Fwd: Forward Rvs: Reverse

Abreviação	Gene	Identificador	Sequência	
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_008084	Fwd 5'	ggagaaacctgccaactatgatg 3'
			Rvs 5'	cagtgtagcccaagatgcc 3'
Duox1	dual oxidase 1	NM_001099297.1	Fwd 5'	atttcttgggaggtacagcg 3'
			Rvs 5'	gttaggcaggtagggttcttc 3'
Duox2	dual oxidase 2	NM_001362755.1	Fwd 5'	cacgacagtgatctccgattc 3'
			Rvs 5'	ggagtccggtgatgaacga 3'
Nox1	NAPDH oxidase 1	NM_172203.2	Fwd 5'	attcttgggactgccttggc 3'
			Rvs 5'	atggcttctcagtgtacggtt 3'
Nox2	cytochrome b-245, beta polypeptide	NM_007807.5	Fwd 5'	aggcagaaccaacttaacc 3'
			Rvs 5'	caaccacaccagaatgacaaag 3'
Nox3	NAPDH oxidase 3	NM_198958.2	Fwd 5'	acaggctcaaatggacggaaag 3'
			Rvs 5'	caaccacgaaggaccactc 3'
Nox4	NAPDH oxidase 4	NM_001285833.1	Fwd 5'	gcctccagactcagtacagc 3'
			Rvs 5'	ccgaaaggagcagatcagtg 3'
Sod1	superoxide dismutase 1, soluble	NM_011434.2	Fwd 5'	ggaagcatggcgatgaaagc 3'
			Rvs 5'	gcttgcttctgctcgaagt 3'
Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	NM_013671.3	Fwd 5'	gcctgcactgaagttcaatg 3'
			Rvs 5'	atctgtaagcgacctgctc 3'
Sod3	superoxide dismutase 3, extracellular	NM_011435.3	Fwd 5'	ggccttctgttctacggct 3'
			Rvs 5'	gtaggtcgaagctggactc 3'
Mpo	myeloperoxidase	NM_010824.2	Fwd 5'	gttacagatgtgtgacacct 3'
			Rvs 5'	gatactgtcattcggtgggc 3'
Pycard	PYD and CARD domain containing	NM_023258.4	Fwd 5'	gccagggtcacagaagtgga 3'
			Rvs 5'	cacgaactgcctggtactgt 3'
Ilr1	interleukin 1 receptor, type I	NM_001123382.1	Fwd 5'	taccagatgccagcccaacg 3'
			Rvs 5'	tgccggcagtttctccttag 3'

Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3	NM_001359638.1	Fwd 5'	atccactgccgagaggtgag	3'
			Rvs 5'	atcttgcacactggtgggtt	3'

Após a reação finalizar, os dados obtidos foram analisados pelo *Cycle Threshold* (Ct) no StepOne™ Software 2,3 (TermoFisher Scientific, California, EUA) usando o método de expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e tendo como gene *Housekeeping* de referência o Gapdh e para o *fold change* foram comparadas com células não infectadas.

4.9 Transformação genética dos macrófagos imortalizados de camundongo por CRISPR/Casp.

Os genes selecionados da via ROS foram deletados em macrófagos imortalizados de camundongo C57BL/6 por CRISPR/Cas9 (BAUER; CANVER; ORKIN, 2015) com algumas modificações.

4.9.1 Desenho de gRNAs.

As sequencias dos genes Nox1, Cybb e Mpo foram obtidas da base de dados *HOSTDB* (<https://hostdb.org/hostdb/>) e foi usada a ferramenta online *E-CRISPR* (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrisp.html>) para identificar as sequencias adequadas. O primer selecionado consistiu em uma sequência de 20 nucleotídeos e uma sequência *protospacer adjacent motif* (PAM) do tipo “NGG” (Tabela 3). Foram adicionadas sequencias de reconhecimento da enzima de restrição BslI, “CACC” antes da sequência guia e “AAAC” antes do complemento reverso.

Tabela 3. Primers dos gRNA e insertos desenhados para a depleção de genes da via ROS.

Gene	Nome Primer			Sequência	
Nox1	gRNA.Nox1.Exon1	Fwd	5'	CACCgaaactggctggttaaccac	3'
	gRNA.Nox1.Exon1	Rvs	5'	AAACgtggtaaccagccagtttcC	3'
Cybb	gRNA.Cybb.Exon2	Fwd	5'	CACCgattatactcgaactcctt	3'
	gRNA.Cybb.Exon2	Rvs	5'	AAACaaggagtttcgagtataatC	3'
Mpo	gRNA.Mpo.Exon1	Fwd	5'	CACCgccatgcttcagacctcaa	3'
	gRNA.Mpo.Exon1	Rvs	5'	AAACttggaggtctgaagcatggcC	3'

Nox1	Insert.TdTomato.Neo	Fwd	5'	cctagggaggctccaaacctccatttgacaTAGTTAT TAATAGTAATCAATTACGGG	3'
	Insert.TdTomato.Neo	Rvs	5'	gagcaaaggaaagtgtggaagctgtgctgcttctccaag CATAGAAGGCGGCGGTGG	3'
Cybb	Insert.TdTomato.Neo	Fwd	5'	gaggcagaaccaaaccttaacctttgctaacTAGTTAT TAATAGTAATCAATTACGGG	3'
	Insert.TdTomato.Neo	Rvs	5'	attggcagcatacactggttctggtgaaagagcggagC ATAGAAGGCGGCGGTGG	3'
Mpo	Insert.TdTomato.Neo	Fwd	5'	gttgtcagtgagaggagttgacagtgtcagTAGTTAT TAATAGTAATCAATTACGGG	3'
	Insert.TdTomato.Neo	Rvs	5'	caggaaggccaatggcctccgctcttctccggcagactc CATAGAAGGCGGCGGTGG	3'

4.9.2 Ligação dos oligos ao vector

Inicialmente o plasmídeo foi linearizado usando a enzima de restrição BbsI, e incubado a 37°C *overnight*.

Os insertos desenhados foram inseridos ao plasmídeo pSpCas9n(BB)-2^a-Puro (PX462) V2.0 (Addgene 62987). A reação de ligação foi realizada com 4 µl do plasmídeo (100 ng), 3 µl de inserto (1 µM), 1 µl de tampão 10X T4 DNA Ligase (BioLabs), 1 µl de enzima T4 DNA Ligase (BioLabs) e 1 µl de H₂O. Após incubação por 2 horas a temperatura ambiente foi realizada a transformação de células competentes DH5-α.

4.9.3 Transformação de células competentes DH5-α.

A expressão e seleção de plasmídeos foram realizados na cepa DH5-α de *Escherichia coli*. Inicialmente foram adicionados 5 µl do plasmídeo ligado ao inserto a 50 µl de bactérias e foi mantido em gelo por 10 minutos, posteriormente foi incubado por 45 segundos a 42° C e imediatamente o tempo finalizar, foram deixados por dois minutos a temperatura ambiente e acrescentado 150 µl de meio SOC (Invitrogen) e incubado por 1 hora a 37 °C sob agitação. Após a incubação o conteúdo foi plaqueado em meio de cultura LB com ampicilina (100µg/mL, Sigma), e incubado a 37 °C por 18 horas. Colônias isoladas foram selecionadas, checadas e inoculadas em

tubos com 5 ou 50 mL de meio LB líquido e ampicilina (100µg/mL), por aproximadamente 18 horas. Os plasmídeos foram extraídos das células competentes mediante a utilização do Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific).

4.9.4 Purificação dos plasmídeos.

Os plasmídeos foram extraídos pelo Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific), segundo as recomendações do fabricante. Resumidamente, a suspensão de bactérias transformadas foi centrifugada a 3500 x g por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação e uma vez descartado o sobrenadante, foi adicionado ao pellet 250 µl do tampão de ressuspensão e 250 µl do tampão de lise, e homogeneizado gentilmente por inversão, incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, neutralizado com 350 µl de tampão de neutralização e gentilmente homogeneizada até a formação do precipitado. Posteriormente foram centrifugadas as suspensões a 10000 x g por 20 minutos, e o sobrenadante foi transferido para uma coluna sobre um tubo coletor, e centrifugado por 2 minutos a 10000 x g. As colunas foram lavadas com 500 µl do tampão de lavagem, centrifugadas por 2 minutos a 10000 x g, e o processo repetido. Após descarte do tampão de lavagem, foi realizado uma nova centrifugação a 10000 x g por 2 minutos para retirada de qualquer resíduo do tampão de lavagem. As colunas foram transferidas para novos tubos, e foi adicionado 50µl do tampão de eluição. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 10000 x g. As colunas foram descartadas e o material eluído contendo o plasmídeo armazenado a -20 °C.

Para transfecção os plasmídeos foram concentrados e purificados com auxílio de fenol-clorofórmio. Foi adicionado 400 µl a cada plasmídeo extraído e levado ao vortex por 30 segundos. Seguidamente foram centrifugados a 10000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado em transferido para um novo tubo com 400 µl de clorofórmio (Sigma) e levado ao vortex por 30 segundos para ser centrifugado a 10000 x g por 5 minutos novamente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 40µl de 3M NaOAc e 1200 µl de etanol P.A. gelado. A amostra foi homogeneizada gentilmente por inversão, centrifugada a 10000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado e acrescentado 1000 µl de etanol 70% e centrifugado a 10000 x g

por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e mantido a temperatura ambiente por 20 minutos para secagem e adicionado 30µl de água estéril e a quantidade de plasmídeo foi mensurada no Nanodrop Lite *Spectrophotometer*.

4.9.5 Transfecção de Macrófagos Imortalizados de Camundongo.

2×10^5 macrófagos imortalizados de camundongo C57Bl/6 foram plaqueados em placas de 24 poços com 500 µl de meio 20% e mantidas até atingir um 90% de confluência. Nesse ponto, foi diluído o plasmídeo a 500 ng de DNA em 50 µl de meio Opti-Mem-I e em um tubo separado, diluídos 2 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen LifeTechnologies) em 50 µl de meio Opti-Mem-I, e mantidos por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram combinadas as duas soluções e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, foi removido o meio das placas e adicionados 100 µl da solução com o plasmídeo e a lipofectamina e acrescentado com 400 µl de meio fresco 10% e incubados *overnight* a 37°C. Após da incubação o meio foi substituído por 500 µl de meio fresco 10% e incubado por dois dias a 37 °C. Após um dia da transfecção, as células foram selecionadas com o uso de 400 µg/mL Geneticina G148 por 10 dias, tendo trocas de meio com antibiótico cada 2 dias.

Após o tratamento de seleção as células foram clonadas por diluição limitante, colocando uma célula por poço em placas de 96 poços com 200 µl de meio 10%. Os clones foram checados usando PCR convencional.

4.10 Extração do DNA genômico dos clones transfectados.

As células foram coletadas e lavadas duas vezes em 1X PBS a temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 8 µl de Proteinasa K 20 mg/mL, 500 µl tampão NLB (50 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA. 1% SDS) e 16 µl de SDS 10% e incubadas as amostras a 50°C *Overnight*. Posteriormente, foram adicionados 150 µl de NaCl 6M e levados a vortex por 15 segundos. Em seguida as amostras foram levadas a centrifugação a 12000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado em um tubo novo, foram adicionados 800 µl de etanol absoluto e misturados por inversão. Foram centrifugadas as amostras novamente a 12000 x g por 15 minutos

e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 1 ml de etanol 75% e centrifugado a 12000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os pellets secados por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente o DNA foi suspenso em 200 µl de H₂O e a quantidade de DNA foi mensurada no Nanodrop Lite *Spectrophotometer*.

4.11 Reação em cadeia de polimerase (PCR).

A PCR foi realizada mantendo-se as concentrações dos reagentes: 10x tampão para Taq/PFU polimerase; 200 µM de dNTP Mix; 2 pmol de cada primer (Tabela 4); 2,5 U da enzima Taq/PFU polimerase. As reações foram realizadas em termociclador (MasterCycler, Eppendorf), iniciando-se com pré-desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 30 segundos; anelamento com temperatura adequada aos primers por 30 segundos; e extensão a 72 °C com tempo adequado ao tamanho do fragmento de DNA. Uma extensão final foi adicionada após a finalização dos 30 ciclos, a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 4. Primers para a checagem de clones *Knockout* dos genes deletados.

Abreviação	Gene	Amplicon	Sequência			
Nox1	NAPDH oxidase 1	816 pb	Fwd	5'	attcttgggactgccttggc	3'
			Rvs	5'	atggctttctcagtgtacgggt	3'
Nox2	cytochrome b-245, beta polypeptide	957 pb	Fwd	5'	ctggtgtgggtgggctgaa	3'
			Rvs	5'	accagctactcccttctc	3'
Mpo	myeloperoxidase	715 pb	Fwd	5'	gttacagatgtgtgacacct	3'
			Rvs	5'	gatactgtcattcggtgggc	3'

4.12 Eletroforese em gel de agarose.

Foram preparados géis de agarose 1% em tampão TAE (0,04 M Tris acetato, 1 mM EDTA em pH 8,3) contendo 2,5 µg de *SyberSafe* (ThermoFisher Scientific). As eletroforeses foram realizadas em tampão TAE, usando voltagem constante de 100 V e amperagem livre. As amostras foram diluídas seis vezes em tampão de corrida *BlueJuice Gel Loading Buffer* (ThermoFisher Scientific) e foi utilizado o padrão molecular *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (ThermoFisher Scientific).

Scientific). As fotografias dos géis de agarose foram obtidas no aparelho ChemiDoc MP Systems (BioRad).

4.13 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Para a quantificação de ROS nos macrófagos modificados geneticamente, foram plaqueados 1×10^6 /mL células em placas pretas de 96 poços com meio 10% de SFB. Uma vez as células aderirem na placa, foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* e *N. caninum* MOI 0,5. Após 18 horas de infecção as células foram lavadas uma vez com PBS 1X, e adicionado $5 \mu\text{M}$ da sonda DCFH-DA (Sigma Aldrich) em meio DMEM sem vermelho de fenol (Gibco). Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS-BSA 2% e a fluorescência mensurado no espectrofotômetro (SpectraMax *Microplate Reader Serie M2*) a 488 nm de excitação e 535 nm de emissão.

4.14 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase intracelular.

1×10^6 /mL macrófagos modificados geneticamente foram plaqueados em placas de 24 poços e infectados com taquizoítos de *T. gondii* e *N. caninum* MOI 0,5. Após 18 horas de infecção o sobrenadante foi coletado e lisado para outras análises. A atividade da MPO foi realizada seguindo ao KUMAR et al., 2002. Resumidamente os macrófagos foram lisados em Triton X-100 0.05% e mantidos no freezer a -80°C . Foi preparada uma solução de substrato com 5 ml de 0.1M Tampão citrato (pH 5.5), 32 μl de Triton X-100 20%, 50 μl de 82.4 mM OPD em DMSO e 20 μl de 26.4 mM H_2O_2 . Foram usados 5 μl do lisado celular e diluídos em 7 μl de 0.1M tampão citrato pH 5.5 e posteriormente adicionados 48 μl da solução substrato, a mistura foi incubada a temperatura ambiente por uma hora e foi mensurada a OD 450 no espectrofotometro (SpectraMax *Microplate Reader Serie M2*).

4.15 Quantificação da caspasa-1/11 ativa.

Para a quantificação da ativação de caspase1/11 nos macrófagos modificados geneticamente, foram plaqueados 1×10^6 /mL de células em placas pretas de 96 poços com meio 10% SFB. Após as células aderirem, foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* e *N. caninum* MOI 0,5. Após 18 horas de infecção, as células foram lavadas com PBS 1X, e adicionado $5 \mu\text{M}$ da sonda FAM–YVAD– FMK (ImmunoChemistry Technologies) em meio DEMEM sem vermelho de fenol (Gibco). Após 60 minutos de incubação a temperatura ambiente as células foram lavadas com PBS-BSA 2% e a fluorescência mensurado no espectrofotômetro (SpectraMax *Microplate Reader Serie M2*) a 488 nm de excitação e 535 nm de emissão.

4.16 Quantificação da atividade do Lactato Desidrogenase extracelular.

A atividade do Lactato Desidrogenase extracelular (LDH) foi mensurada segundo as instruções do Kit LDH LIQUIFORM, (Labtest). Resumidamente, 2 μl de sobrenadante foi adicionado a 100 μl de tampão de trabalho (Tampão pH7,5, piruvato de sódio 1,2mmol/L, NADH 300 $\mu\text{mol/L}$ e azeda de sódio 0,095%). As amostras foram incubadas por 1 minuto e a absorbância mensurada a 340 nm no espectrofotometro (SpectraMax *Microplate Reader Serie M2*). Foram realizadas leituras subsequentes para conhecer a razão da LDH.

4.17Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As diferenças entre os grupos na análise foram analisadas pelo teste ANOVA *two way*, utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni para examinar comparações entre pares de grupos selecionados. Todos os resultados foram expressos em média e desvio padrão, e considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 A expressão dos genes envolvidos na produção de ROS é regulada pela presença de Casp1/11 e Myd88

Através de análises da literatura foram identificadas dez proteínas associadas à via ROS distribuídas em quatro grupos: Superóxido dismutases (SOD1, SOD2 e SOD3), NADPH oxidases (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4), Dual oxidases (DUOX1 e DUOX2) e a Mieloperoxidase (MPO). Para avaliar a expressão genica dos genes associados à produção de ROS assim como sua relação com a resposta imune do hospedeiro, foram utilizados dados de RNAseq de macrófagos infectados por seis horas com *T. gondii* cepa RH, *N. caninum* isolado Nc1, assim como células não infectadas como controle (Figura 4). Observou-se que dos dez genes selecionados para a análise, somente dois, pertencentes à família Phox (*Duox2* e *Nox4*) e o *Mpo*, não apresentaram nenhuma alteração em expressão frente as infecções em células selvagens e *Myd88*^{-/-} e *Casp1*^{-/-}. Além disso, o perfil de expressão dos genes difere dependendo da infecção, sendo que *T. gondii* induz um leve aumento na expressão de genes associados à oxidação de NADPH, principalmente *Nox1* e *Nox2*, ao passo que inibe a expressão de *Sods*. Em relação a infecção por *N. caninum*, observamos maior expressão de *Nox1*, um dos genes relacionados à produção de superóxido, bem como houve incremento da superóxido dismutase 1 (*Sod1*), que induz a síntese de enzima com ação catalisadora nesta via. .

Quanto a relação desta via com Casp1/11 observou-se que, na sua ausência, ocorreu uma alteração significativa na expressão de *Nox3* para ambos os parasitos, enquanto que a infecção por *T. gondii* também induziu aumento na a expressão de *Sod.1* Não foram observadas alterações na expressão dos genes analisados em macrófagos geneticamente deficientes para MyD88.

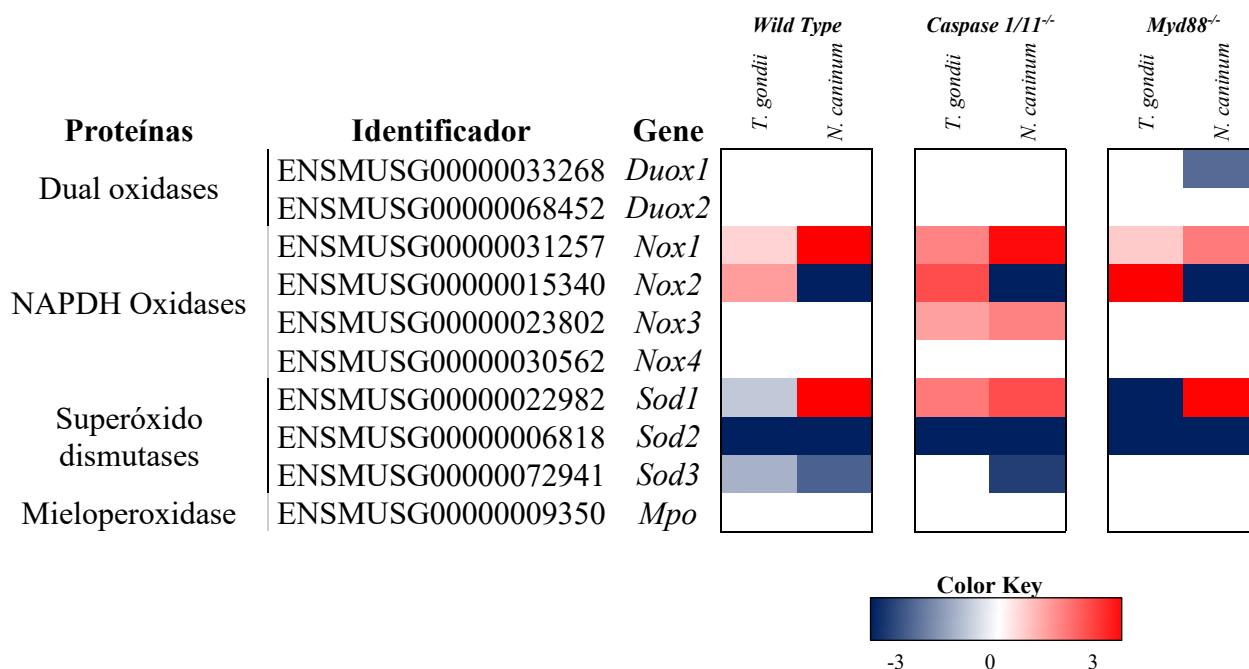


Figura 4. Heatmap da expressão diferencial dos genes envolvidos na produção de ROS em macrófagos murinos. A análise de RNAseq foi feita em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (Wild Type) assim como geneticamente deficientes para Caspase1/11 e Myd88, infectados com *T. gondii* RH e *N. caninum* Liverpool (MOI 3), por um período de infecção de 6 horas. Os dados apresentados ressaltam a razão das células infectadas comparados com as células não infectadas, sendo representadas com a escala de cor, vermelho para o aumento de expressão, azul para redução da expressão e sem alteração em branco.

Para validar os dados obtidos a partir da análise por bioinformática do RNAseq, foram infectados BMDMs Wild Type, Caspase-1/1^{-/-} e Myd88^{-/-} com *T. gondii* e *N. caninum*, em condições idênticas aquela realizada para o ensaio de sequenciamento de nova geração do transcriptoma (Figura 5). Observou-se diferenças em relação aos dados obtidos pelo RNAseq, sendo possível detectar alterações mais significativas na expressão dos genes quando analisados.

Pontualmente, ressalta-se que os genes *Duox1* e *Duox2* aumentam sua expressão durante a infecção por *N. caninum* e na ausência de *Caspase1/11* (Figura 5A e 5B). A expressão de *Nox1* também se mostrou significativamente alterado em células *Caspase1/11*^{-/-} frente as duas infecções (Figura 5C).

Conforme anteriormente observado no ensaio de RNASeq, *T. gondii* induziu a expressão de *Nox2* em células *Wild Type*, contudo a expressão deste gene se mostrou dependente de Caspase1/11 e Myd88 (Figura 5D). Quanto ao gene *Nox3* (Figura 5E), este mostrou-se alterado principalmente na infecção de macrófagos Caspase-1/11^{-/-} por *T. gondii*. Em contrapartida, estas

células demonstraram um aumento da expressão de *Nox4* durante a infecção por *N. caninum* (Figura 5F). . Por outro lado, quanto aos genes das superóxidos dismutases, observou-se que a expressão de *Sod1* foi reduzida em todas as condições analisadas (Figura 5G), enquanto *Sod2* aumentou sua expressão de modo mais robusto em células *Myd88*^{-/-} infectadas por *N. caninum* (Figura 5H). Quanto ao gene *Mpo*, novamente notamos o padrão de aumento significativo da expressão em células *Caspase1/11*^{-/-} (Figura 5I).

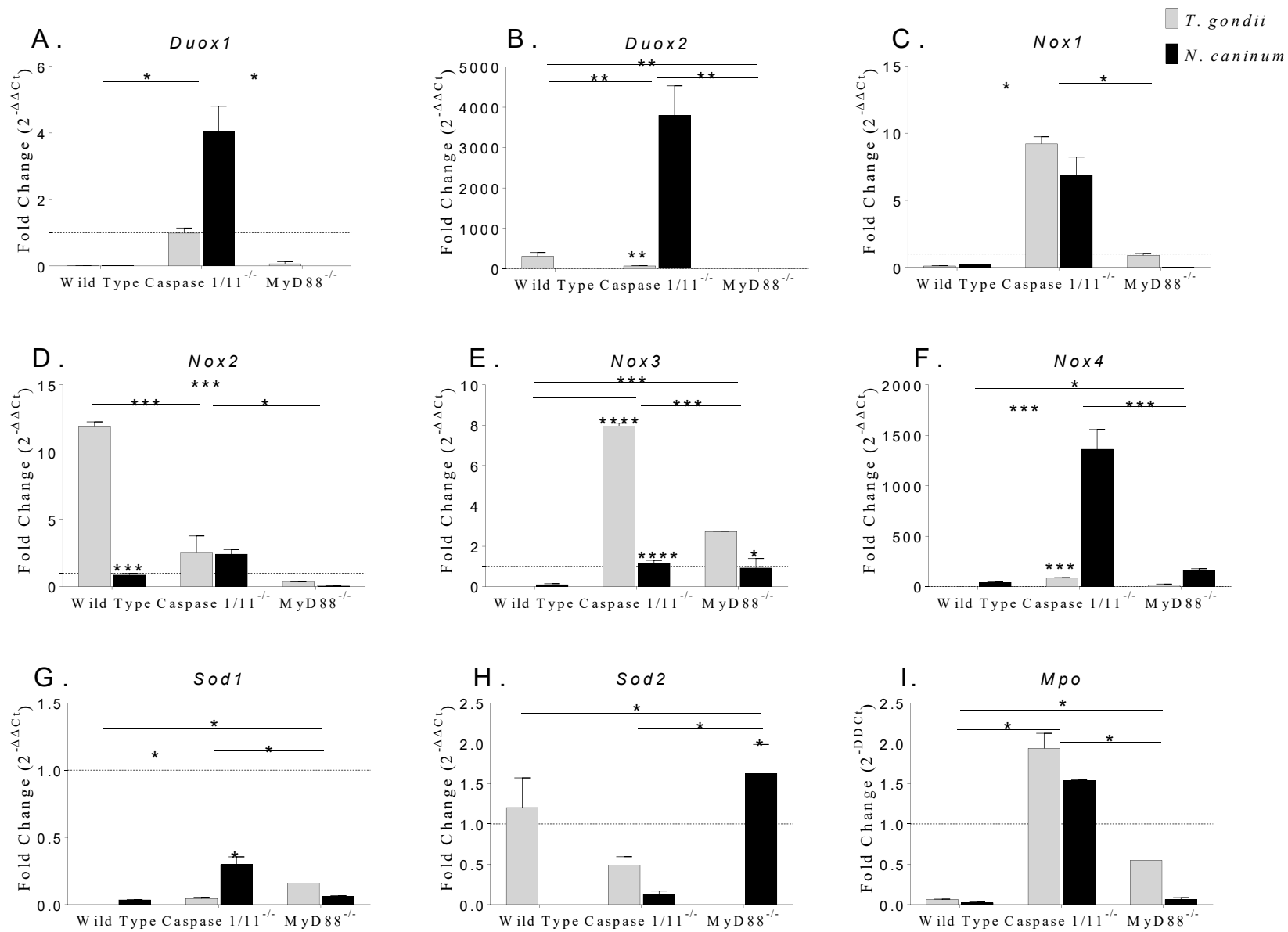


Figura 5. Caspase-1/11 e Myd88 regulam a expressão dos genes associados à produção de ROS. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (*Wild Type*) e *knockout* para Caspase1/11 e Myd88 foram infectados com *T. gondii* RH e *N. caninum* (MOI 3) por um período de 6 horas. Os dados apresentados ressaltam a razão das células infectadas comparadas com as não infectadas, sendo representadas em *Fold Change* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). A linha pontilhada é a referência das células não infectadas. * Diferença significativa entre as células e entre as infecções. (*p values* 0,0332(*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0.0001(****))

5.2 Os genes da via ROS expressam diferencialmente ao longo do tempo da infecção.

Para elucidar o comportamento ao longo do tempo da expressão dos genes associados as espécies reativas de oxigênio, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram infectados com *T. gondii* RH e *N. caninum* Liverpool (MOI 0,5) por três tempos diferentes de infecção (1 hora, 6 horas e 18 horas; Figura 6). Como esperado, o gene *Duox1* não exibiu mudanças na sua expressão ao longo do tempo em nenhuma das infecções (Figura 6A) e pelo contrário, *Duox2* aumentou gradualmente a expressão na infecção por *T. gondii* e não mostrou mudanças na infecção por *N. caninum* (Figura 6B). Quanto aos genes das NADPH oxidases, observou-se que com exceção de *Nox2*, a maior expressão genica foi nas 18 horas de infecção, sendo que *Nox1* e *Nox4* apresentaram maior expressão na infecção por *N. caninum* e *Nox3* na infecção por *T. gondii* (Figuras 5C 5D 5E e 5F). Para os genes das Superóxido dismutases, encontrou-se que o gene da *Sod1* se expressa gradualmente na infecção por *N. caninum* (Figura 5G) e para *Sod2*, observou-se que na infecção por *T. gondii* teve uma maior expressão sendo as 6 horas o maior pico de expressão (Figura 5H). Finalmente, o gene da mieloperoxidase teve uma maior expressão na infecção frente a *N. caninum* as 18 horas.

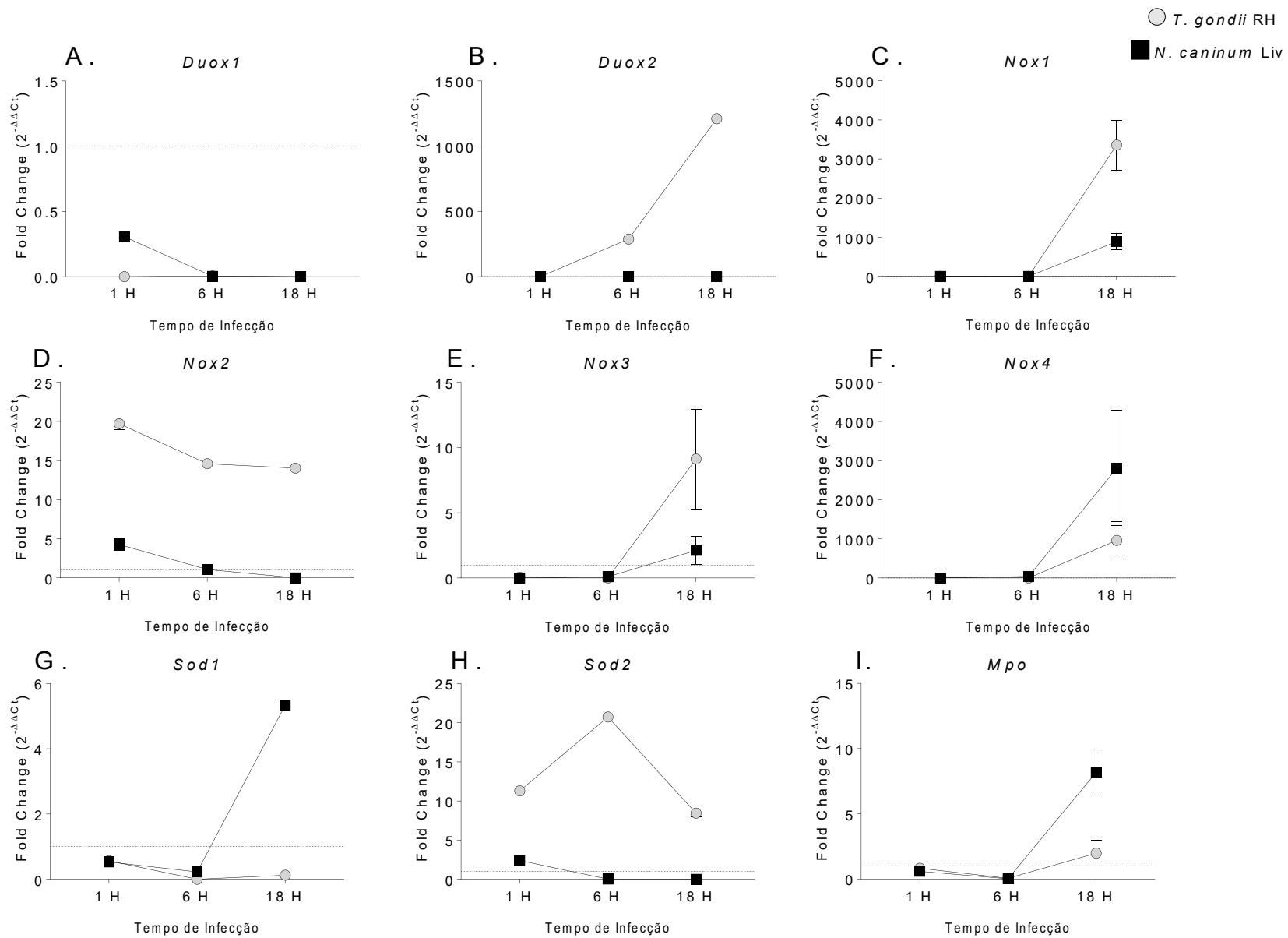


Figura 6. Cinética da expressão de genes de ROS ao longo do tempo da infecção por *T. gondii* e *N. caninum*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C56BL/6 foram infectados com *T.gondii* RH e *N. caninum* (MOI 0,5) por períodos de 1, 6 e 18 horas. Os dados representam a expressão relativa dos genes respeito à expressão de GAPDH. A linha pontilhada é a referência das células não infectadas.

5.3 *Nox1* e *Nox2* são necessários para a produção de ROS em macrófagos imortalizados infectados com *T. gondii*.

Para dar continuidade ao estudo, foram selecionados genes *Nox1*, *Nox2* e *Mpo* a partir das análises previamente feitas com a finalidade de se compreender o papel destes na ativação do inflamassoma. Estes genes foram selecionados pois observou-se que possuem expressão alterada na ausência de Caspase1/11. Utilizando-se a técnica *Crispr/Cas9*, os genes foram deletados em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6, imortalizados com lentivirus, sendo clones destas células posteriormente caracterizados genotípica e fenotípicamente (Figura 7).

Inicialmente, determinou-se por PCR que a deleção dos genes foi realizada de modo adequado, pois as células modificadas não apresentam região genômica correspondente (Figura 7A e 7B). Os clones destes macrófagos, juntamente com células WT, foram infectados por um período de 18 horas com *T. gondii* RH e *N. caninum* Liverpool (MOI 0,5). Como esperado, houve uma redução significativa na produção de ROS, quando comparado com os macrófagos parentais (Figura 7C-E).

5.4 A atividade da mieloperoxidase é mediada por *Nox2* na infecção por *T. gondii*.

Com a finalidade de se caracterizar o fenótipo das células geneticamente deficientes, foi mensurada a atividade da mieloperoxidase intracelular em células infectadas por *T. gondii* e *N. caninum* (MOI 0,5) por um período de infecção de 18 horas (Figura 8). Primeiramente, observou-se que a atividade da mieloperoxidase foi completamente abolida em macrófagos geneticamente deficientes de *Mpo* (Figura 8C). Em contrapartida, observou-se que células *Nox2*^{-/-} apresentaram uma diminuição significativa na atividade de MPO durante a infecção por *T. gondii* (Figura 8B). Não foram encontradas alterações na atividade de MPO em macrófagos *Nox1*^{-/-} (Figura 8A).

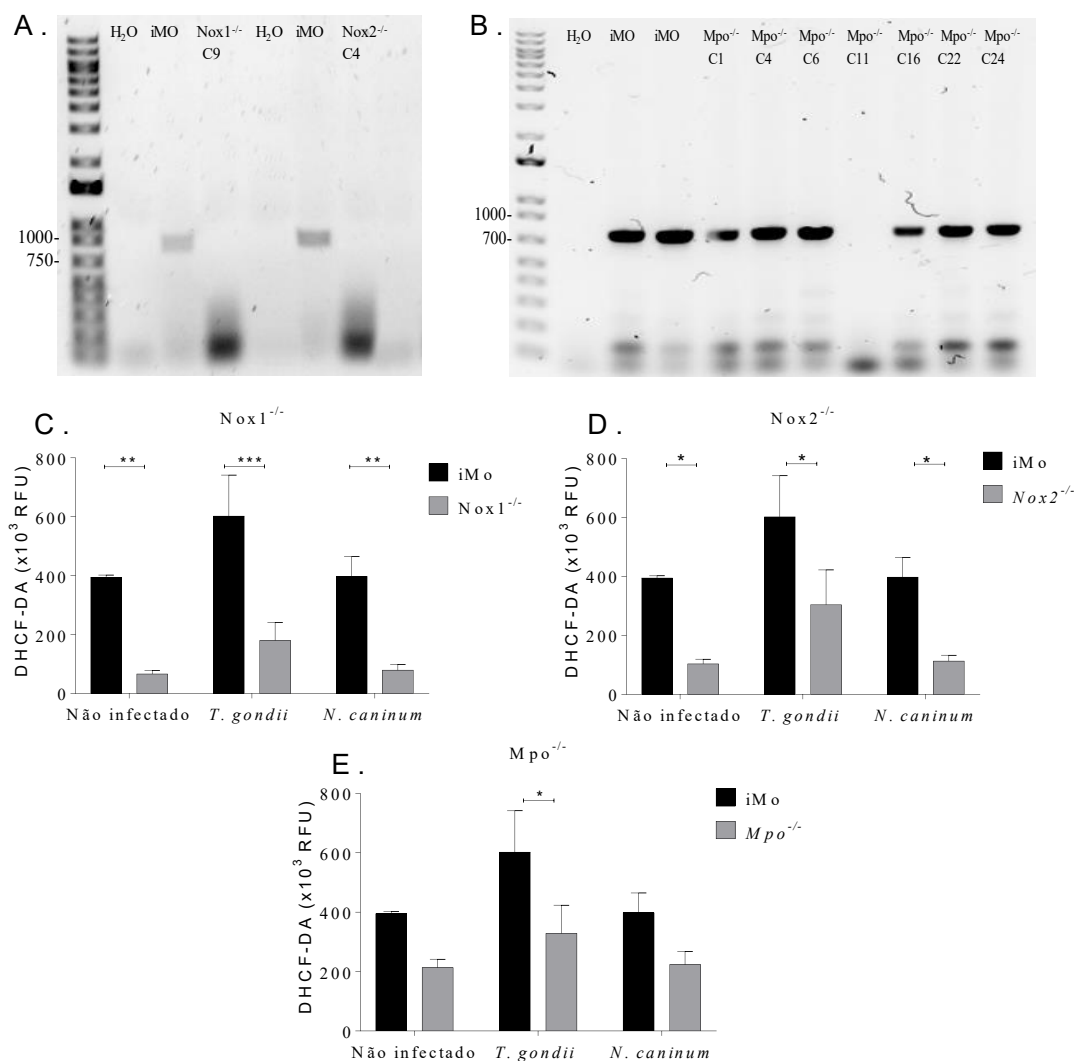


Figura 7. Caracterização genotípica e fenotípica das células *Knockout* para os alguns genes da via ROS. Foram deletados os genes *Nox1*, *Nox2* e *Mpo* usando a técnica de *Crispr/Cas9* em macrófagos imortalizados derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 (iMo) e foi avaliada a deleção dos genes mediante PCR convencional e feito um análise do fenótipo mediante a quantificação de ROS. **A.** Caracterização por PCR de clones C9 para *Nox1*^{-/-} e C4 para *Nox2*^{-/-} que não apresentam expressão do gene respectivamente quando comparado com os macrófagos parentais **B.** Caracterização por PCR de vários clones para *Mpo*^{-/-}, unicamente o clone C11 não apresentam expressão do gene quando comparado com os macrófagos parentais. **C.** Produção de ROS do clone C9 de *Nox1*^{-/-} comparado com os macrófagos parentais. **D.** Produção de ROS do clone C4 de *Nox2*^{-/-} comparado com os macrófagos parentais. **E.** Produção de ROS do clone C11 de *Mpo*^{-/-} comparado com os macrófagos parentais. (*p* values 0,0332(*),0,0021(**), 0,0002(***), <0.0001(****)).

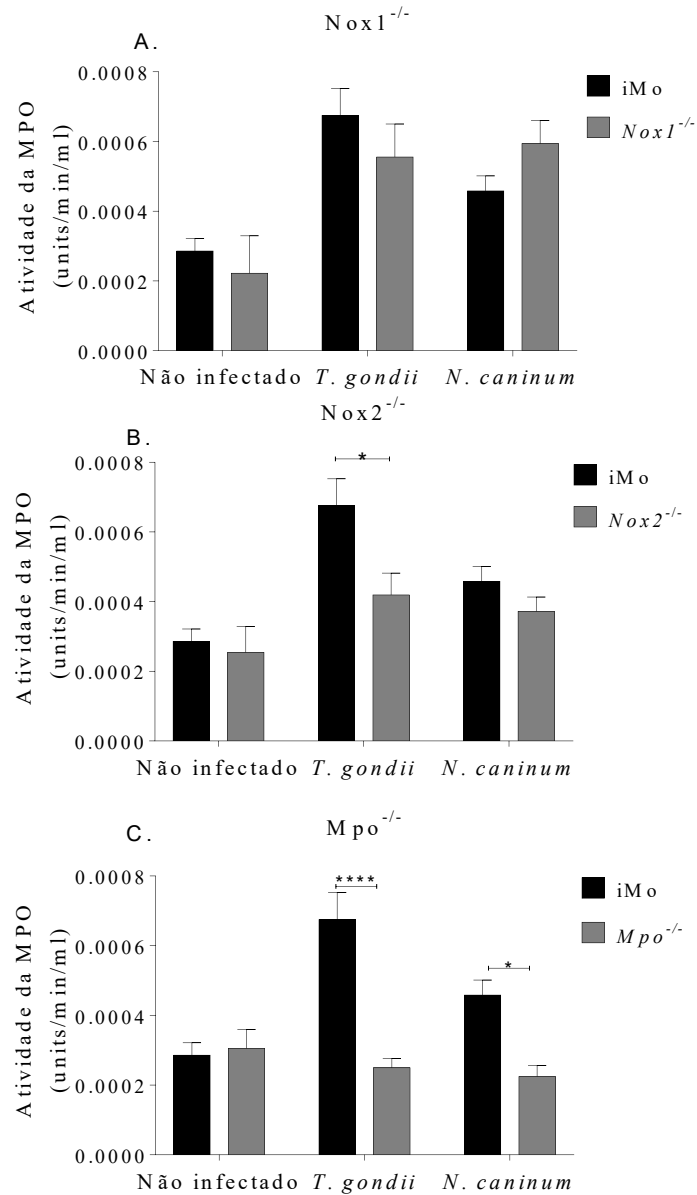


Figura 8. Atividade intracelular enzimática da mieloperoxidasa. Macrófagos imortalizados de medula óssea de camundongo C57BL/6 (iMo) e *knockout* para *Nox1*^{-/-}, *Nox2*^{-/-} e *Mpo*^{-/-} foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* e *N. caninum* (MOI 0,5). **A.** Atividade enzimática da MPO em células *Nox1*^{-/-}. **B.** Atividade enzimática da MPO em células *Nox2*^{-/-}. **C.** Atividade enzimática da MPO em células *Mpo*^{-/-}. (*p* values 0,0332(*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0.0001(****))

5.5 A ativação da Caspase-1/11 em macrófagos imortalizados depende da atividade de *Nox1*, *Nox2* e *Mpo*.

Para elucidar se existe uma correlação na atividade de Caspase1/11 com as espécies reativas de oxigênio, foram infectadas células *Nox1*^{-/-}, *Nox2*^{-/-} e *Mpo*^{-/-} com taquizoítos de *T. gondii* RH e *N. caninum* Liverpool (MOI 0,5) por 18 horas de infecção e mensurada a atividade da proteína por meio de sonda fluorescente (Figura 9). Percebeu-se um comportamento homogêneo na atividade da Caspase1/11 em macrófagos *Nox1*^{-/-} e *Nox2*^{-/-}, onde observou-se uma diminuição similar na atividade da enzima para ambos os parasitos, com maiores diferenças sendo observadas em células infectadas por *T. gondii* (Figura 9A e 9B). Por outro lado, as células *Mpo*^{-/-} apresentaram a diminuição da atividade de Caspase1/11 somente perante a infecção por *T. gondii* (Figura 9C).

5.6 ROS regulam a expressão de genes associados ao Inflamassoma.

Quanto à relação das ROS com outras proteínas referentes ao complexo inflamassoma, foi feito um análise de expressão genica por PCR em tempo real dos genes envolvidos, para isso, macrófagos imortalizados *knockout* para os genes de ROS, foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* e *N. caninum* (MOI 0,5) e analisadas as expressões relativas dos genes IL-1R, NLRP3 e ASC (Figura 10). Ressalta-se inicialmente que a expressão relativa do gene que expressa para o IL-1R não teve alterações significativas relacionadas com a ausência dos genes da via ROS (Figura 10A). Por outro lado, a expressão do NLRP3 viu-se comprometida principalmente na ausência de *Nox1*, onde na infecção por *N. caninum* foi a que apresentou a maior queda, porém, na ausência de *Mpo* observou-se também uma diminuição na expressão do gene, sendo a expressão similar nas duas infecções (Figura 10B). Finalmente, a expressão de ASC foi a maiormente comprometida, sendo que na ausência de *Nox1* e *Mpo*, não houve expressão do gene quando comparado com as células parentais, e pelo contrário, as células *Nox2*^{-/-} apresentaram uma maior expressão do gene quando comparado com as células controle (Figura 10C).

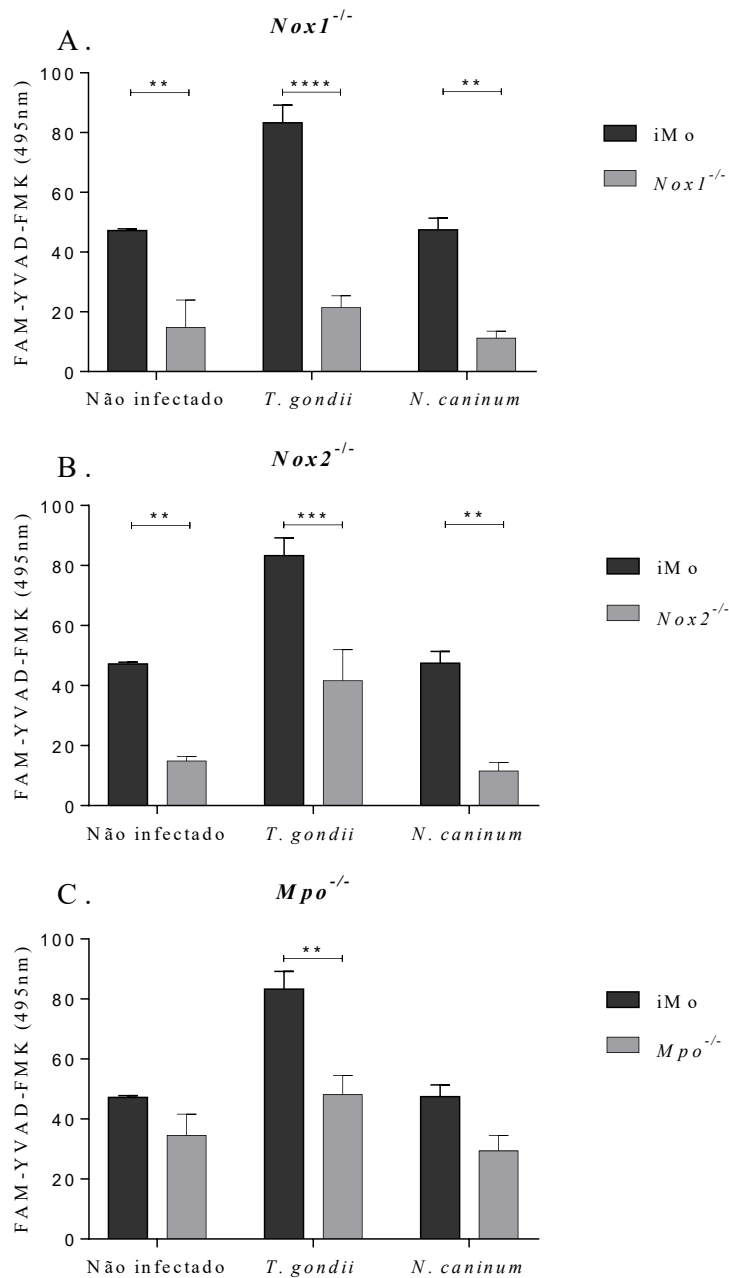


Figura 9. Atividade da Caspase 1/11 em macrófagos imortalizados *knockout* para genes da via ROS. As células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* RH e *N. caninum* (MOI 0,5) por um período de infecção de 18 horas, após disso, foi usado o Kit fluorescente para mensurar a atividade da Caspasa1/11. **A.** Atividade da Caspasa1/11 em células *Nox1*^{-/-}. **B.** Atividade da Caspasa1/11 em células *Nox2*^{-/-}. **C.** Atividade da Caspasa1/11 em células *Mpo*^{-/-}. (*p* values 0,0332(*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0.0001(****))

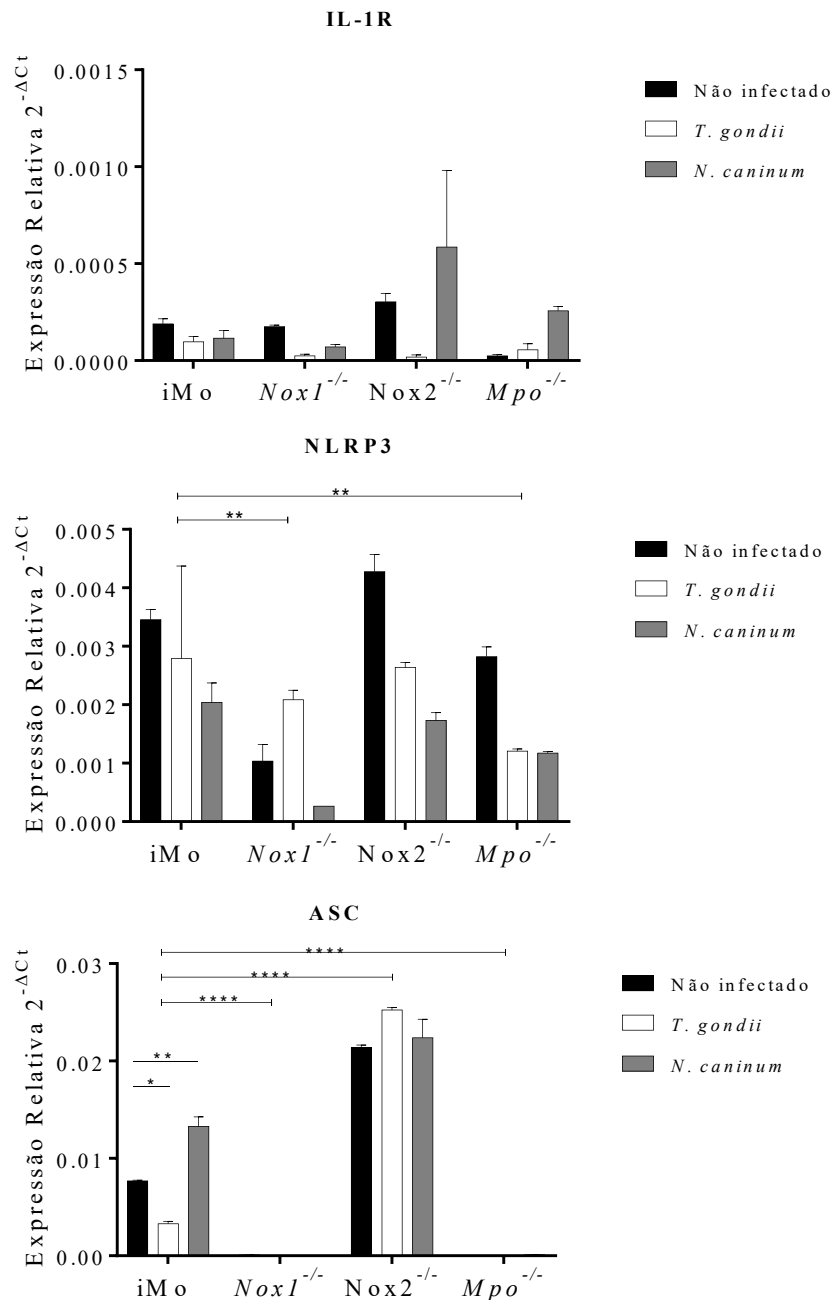


Figura 10. Expressão gênica de elementos associados ao inflamassoma. Macrófagos imortalizados de medula óssea de camundongo C57BL/6 (iMo) e de macrófagos *Nox1*^{-/-}, *Nox2*^{-/-} e *Mpo*^{-/-} foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* e *N. caninum* (MOI 0,5) por um período de 18 horas. A expressão é relativa utilizando GAPDH como gene constitutivo. **A.** Expressão genica do receptor da interleucina 1 (IL-1R). **B.** Expressão genica de *NLR family, pyrin domain containing 3* (NLRP3). **C.** Expressão genica de *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC). (*p* values 0,0332(*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0.0001(****))

5.7 *Nox1* regula a piroptose induzida por *N. caninum*.

Para avaliar se existe uma relação entre a produção de ROS com a piroptose, mensurou-se a atividade extracelular da lactato desidrogenase (LDH) como marcador indireto desse processo de lise celular, e para isso foram infectadas células com taquizoítos de *T. gondii* RH e *N. caninum* Liverpool com MOI 0,5 por um período de infecção de 18 horas (Figura 11). De modo marcante, observou-se que os níveis de atividade de LDH foram negativamente alterados em células *Nox1*^{-/-} (Figura 11A). As outras células (*Nox2*^{-/-} e *Mpo*^{-/-}) não apresentaram mudanças significativas para ambos os parasitos (Figura 11B e 11C).

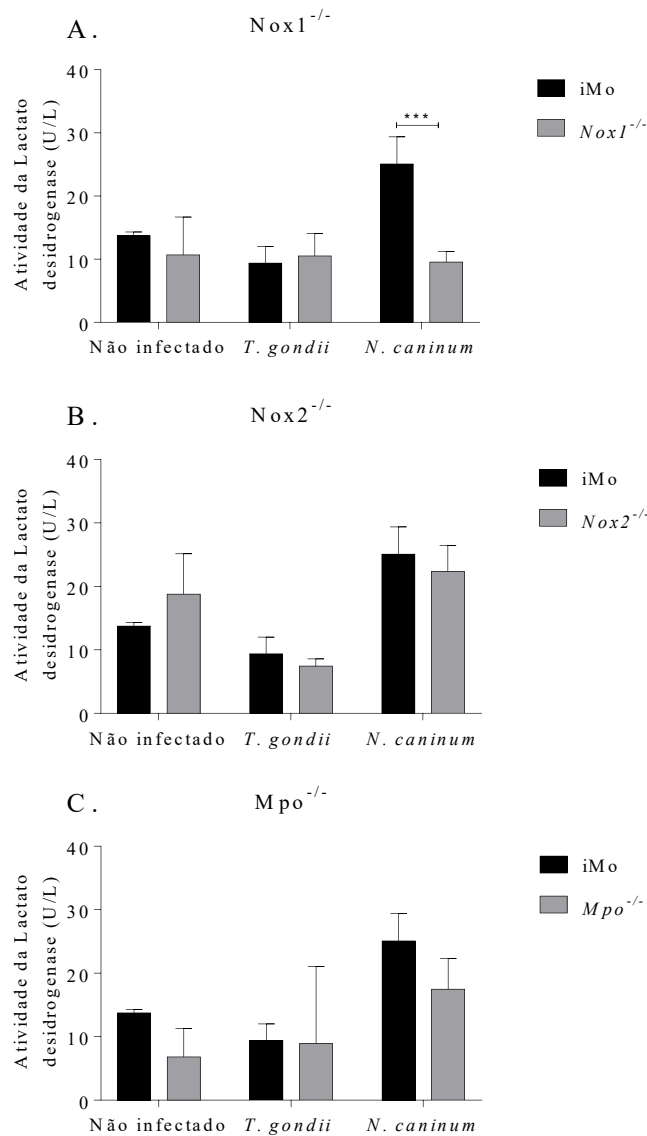


Figura 11. Atividade da Lactato Desidrogenase em macrófagos imortalizados murinos. Foi avaliada a atividade extracelular da enzima como marcador indireto de piroptose em sobrenadante de cultura celular de macrófagos imortalizados de medula óssea de camundongo C57BL/6 (iMo) e de macrófagos *Nox1*^{-/-}, *Nox2*^{-/-} e *Mpo*^{-/-} infectados com taquizoítos de *T. gondii* e *N. caninum* (MOI 0,5) por um período de 18 horas. **A.** LDH em células *Nox1*^{-/-}. **B.** LDH em células *Nox2*^{-/-} e **C.** LDH em células *Mpo*^{-/-}. Os resultados estão expressos em Unidades de atividade enzimática por Litro de sobrenadante (U/L) (*p* values 0,0332(*), 0,0021(**), 0,0002(***), <0.0001(****))

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os parasitos do filo apicomplexa são importantes indutores de afecções de importância clínica e econômica (ARISUE; HASHIMOTO, 2015). Tal é o caso do parasito *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose que é capaz de afetar à população imunocomprometida assim como também à população gestante (DUBEY, 2016); e o caso do parasito *Neospora caninum*, causante da neosporose que gera perdas econômicas importantes na indústria veterinária e pecuária pois é uma doença mundial que produz abortos nos bovinos e alguns outros organismos relacionados (DUBEY *et al.*, 2017).

Por outro lado, tem emergido uma necessidade de estudar as espécies reativas de oxigênio, já que tem sido descoberta sua importância do seu papel em diversos processos nos organismos e pode resultar chave no controle de patógenos dada sua toxicidade para os parasitos ou sua intervenção na resposta imune dos hospedeiros (KOHCHI *et al.*, 2009). Consequentemente, sabe-se que ROS apresenta um rol especial na ativação do inflamassoma, um mecanismo de associação de várias proteínas que intervêm no controle parasitário assim como em múltiplas doenças inflamatórias (ABAIS *et al.*, 2015).

Sabe-se que os parasitos são capazes de modular a resposta imune dos hospedeiros com diversos mecanismos de evasão, tal é o caso de *T. gondii* que é capaz de regular a produção de ROS em células epiteliais de retina humana reduzindo a expressão de *Nox2* e *Nox4* (ZHOU *et al.*, 2013). Outro estudo *in vivo* revelou que quando os hospedeiros são infectados por *T. gondii* a produção de ROS em células mieloides inflamatórias diminuiu quando comparado com animais não infectados (SHRESTHA *et al.*, 2006) assim como também neutrófilos felinos infectados com *T. gondii* após de 30 minutos de infecção são capazes de produzir ROS por um aumento significativo de ânions superóxido (LACERDA *et al.*, 2019).

Por outro lado, pouco se sabe do efeito indutor de ROS quando os hospedeiros são infetados por *N. caninum*, mas já se tem relatado que é capaz de induzir um aumento na produção de ROS sérico em gado leiteiro (GLOMBOWSKY *et al.*, 2017). Em gerbilos (*Meriones unguiculatus*) a neosporose experimental inibe a atividade das creatinas quinases, mitocondrial e citosólica, nos fígados e cérebros dos animais que posteriormente leva a um aumento na produção de ROS após

de 18 dias de infecção (DA SILVA *et al.*, 2020). Também, um estudo em macrófagos derivados de medula óssea bovinos, no qual foi comparada a resposta diferencial de isolados de *N. caninum* de alta e baixa virulência, demonstrou-se que *N. caninum* intracelular vivo é capaz de reduzir a produção de ROS dos macrófagos infectados na infecção precoce, mas apenas o isolado altamente virulento Nc-Spain7 mantém a produção revogada de ROS ao longo do tempo (GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

O presente estudo revelou que *T. gondii* é capaz de modular positivamente a expressão dos genes associados à ROS em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6, principalmente aqueles associados à produção de superóxido de tais como *Duox2* e *Nox2* e *Sod2* associado à produção de peróxido. De forma similar, contrário ao esperado, *N. caninum* estimulo negativamente expressão de genes associados à produção de ROS.

Diferentes estudos demonstram que as ROS são necessárias para a ativação das caspasas. Tem se observado que ROS regula a via do fator de crescimento transformador β 1 TGF β 1- bcL-xL que leva a apoptose em hepatócitos de rato, sendo necessárias para a ativação da caspase -3, -8 e -9 (HERRERA, 2001). Em células epiteliais de pulmão, a presença de ROS reduz a produção de Bcl-2 o que desencadeia a ativação das caspasas (MOUNGJAROEN *et al.*, 2006). Além disso, estudos revelaram o papel no controle parasitário dos genes *Nox1* e *Nox2* em camundongos, onde cepas não virulentas como a CTG conseguem sobreviver em camundongos geneticamente deficientes para es genes mencionados, demonstrando que o complexo de NADPH oxidases é necessário para o controle parasitário de *T. gondii* pela produção de ROS e posterior ativação do inflamassoma NLPR3 (MATTA *et al.*, 2018)

Neste trabalho, encontrou-se que existe uma possível relação mediadora, onde a presença da Caspase1/11 é necessária para o controle da expressão dos genes *Duox1*, *Duox2*, *Nox1*, *Nox2*, *Nox4* e *Mpo* na infecção por *N. caninum* e necessária para o controle da expressão dos genes *Nox1*, *Nox3* e *Mpo* na infecção por *T. gondii*. De forma interessante, a ausência de genes associados à produção de ROS tais como *Nox1* e *Nox2* diminui a ativação de Caspase1/11 na infecção pelos dois parasitos e nas células não infectadas, no entanto, a ausência de mieloperoxidase na célula inibe a ativação de Caspase1/11 unicamente na infecção por *T. gondii*. De fato, pode-se sugerir na infecção por *T. gondii* que a regulação feita pela Caspase1/11 nos macrófagos à expressão dos genes, encontra-se relacionada com o controle inflamatório que tem a proteína e que é capaz de

atenuar a patogênese da infecção (COUTERMARSH-OTT *et al.*, 2016). Similarmente, tem sido observado que a Caspase1/11 tem um papel importante na proteção do hospedeiro frente a infecção por *N. caninum*, onde a eliminação do parasito depende da atividade da Caspase1/11 e por tanto da produção de ROS (WANG *et al.*, 2018).

A ativação do complexo proteico inflamassoma requer a montagem de diferentes proteínas e domínios proteicos, tais como NLRP3 e ASC (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). Estudos comprovaram o rol de algumas isoformas de NOX, como a NOX4, são capazes de regular a atividade da carnitina palmitoyltransferase 1A (CPT1A), uma enzima mitocondrial chave na oxidação de ácidos graxos, resultando posteriormente na baixa ativação do inflamassoma NLRP3 (MOON *et al.*, 2016). Quanto aos parasitos, *T. gondii* é um efetor de ativação do inflamassoma NLRP1 (EWALD; CHAVARRIA-SMITH; BOOTHROYD, 2014) embora já tem se observado que a infecção por *T. gondii* também regula a expressão dos genes sensor como incluindo NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP8, NLRP13, AIM2, e NAIP, de maneira dependente do tempo. A infecção também regulou positivamente os níveis de proteína ASC, adaptadora do inflamassoma e da caspase-1 (CHU *et al.*, 2016). Tem sido estudado que a ativação do receptor P2X7 por ATP extracelular contribui na eliminação de *T. gondii* em macrófagos pela produção de ROS dependente de NAPDH oxidases e a fusão dos lisossomos com o vacúolo parasitóforo, conseqüentemente o inflamassoma NLRP3 é ativado aumentando a produção de IL-1 β pela via de Caspase1/11e induzindo um aumento da produção de ROS mitocondrial (MOREIRA-SOUZA *et al.*, 2017).

Quanto a infecção por *N. caninum*, tem se demonstrado que o parasito induz a ativação do inflamassoma NLRP3 acompanhado com a produção de IL-1 β e IL-18 em macrófagos de camundongo derivados de medula óssea (WANG *et al.*, 2018). Neste estudo, foi possível observar que *Nox1* intervêm na expressão de mRNA de NLRP3, sendo necessário para a expressão do gene principalmente na infecção por *N. caninum*, o mesmo fenômeno ocorre em menor escala quando *Mpo* é deletado.

De forma interessante, a expressão de ASC é regulada por ROS de forma diferencial, pois baseados nos resultados, é necessária a presença de *Nox1* e de *Mpo* para que expresse o gene e *Nox2* para regular a sua expressão, isso na infecção por *T. gondii* tanto como por *N. caninum*. Finalmente, como o reportado por Wang e colaboradores em 2018, onde ressalta-se que *N. caninum* induz a apoptose em macrófagos de camundongo, neste trabalho se encontrou que as 18 horas pós-

infecção, o parasito é capaz de induzir piroptose nos macrófagos infectados, indicando de forma indireta que existe um processo apoptótico na célula associado ao inflamassoma e que, além do anterior, é regulado de maneira negativa por *Nox1* pois na célula geneticamente deficiente a atividade de LDH induzido por *N. caninum* viu-se comprometida.

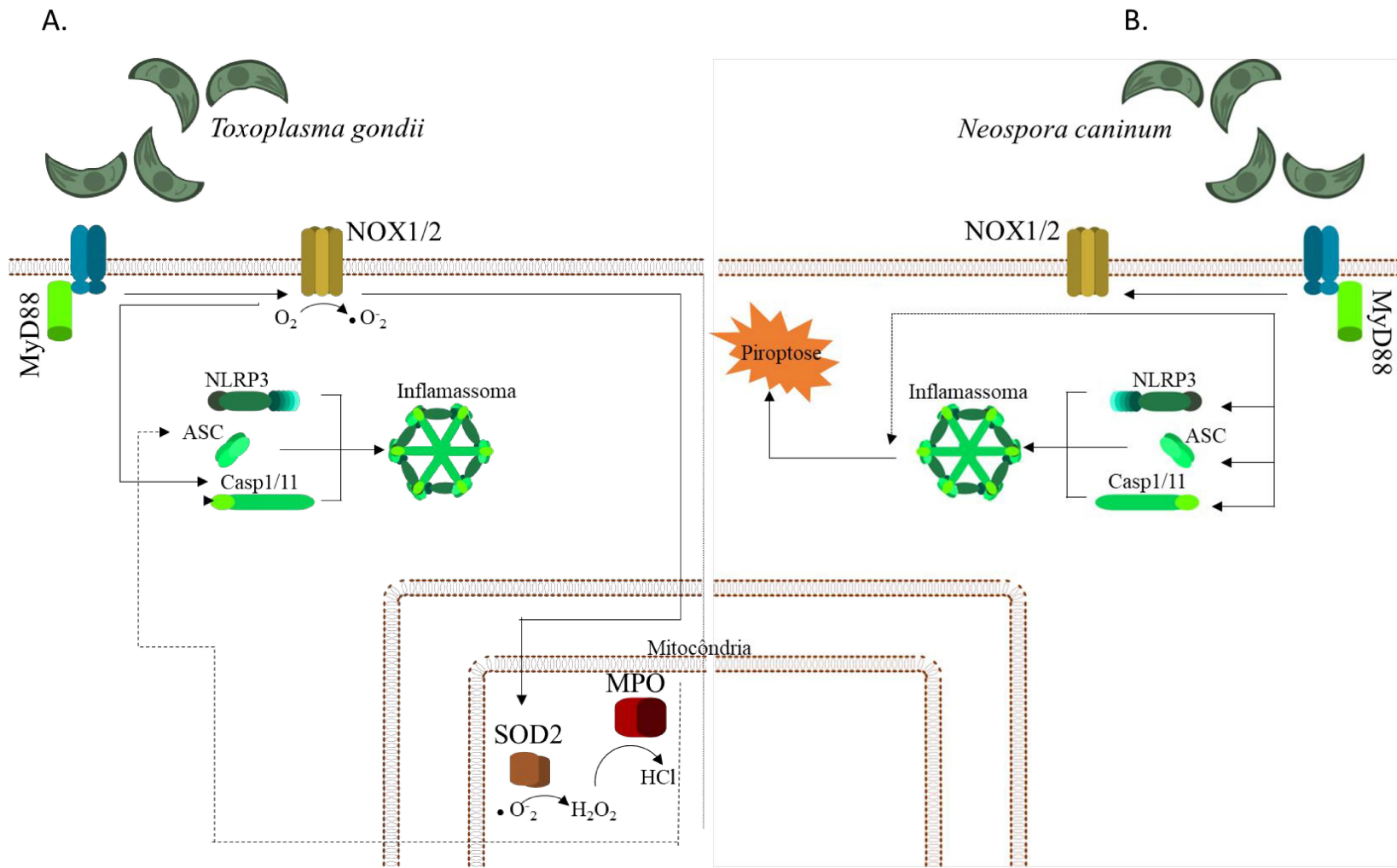


Figura 12. Modelo proposto da participação dos genes da via de indução de ROS na ativação do inflamassoma. A. A infecção por *T. gondii* induz a produção de superóxido pela intervenção da proteína NOX2 que será processado posteriormente pela SOD2 para produzir peróxido e ácido hipocloroso pela MPO. Simultaneamente, a presença de NOX2 contribui na ativação da Caspasa1/11 e a presença de MPO na produção de ASC que levarão posteriormente à montagem do inflamassoma. **B.** Na infecção por *N. caninum*, pelo contrário a produção de ROS não foi especificamente elucidada, porém a ativação da Caspasa1/11 depende da presença de NOX1, além disso, a produção de NLRP3 e ASC é dependente também dessa proteína assim como também da MPO.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que genes da via de indução de espécies reativas de oxigênio são mediadores importantes da ativação do Inflamassoma em macrófagos murinos infectados com *T. gondii* e *N. caninum*. Acredita-se que o mapeamento dos pontos de regulação destas vias possa ser importante na busca por alvos de intervenção terapêutica contra estas infecções.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAIS, Justine M. *et al.* **Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ROS as Trigger or Effector?**. [S. l.]: Mary Ann Liebert Inc., 2015. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5994>

AL-QASSAB, Sarwat E.; REICHEL, Michael P.; ELLIS, John T. **On the biological and genetic diversity in *Neospora caninum***. [S. l.: s. n.], 2010. <https://doi.org/10.3390/d2030411>

ARISUE, Nobuko *et al.* Apicoplast phylogeny reveals the position of *Plasmodium vivax* basal to the Asian primate malaria parasite clade. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43831-1>

ARISUE, Nobuko; HASHIMOTO, Tetsuo. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. **Parasitology International**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 254–259, 2015. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2014.10.005>.

BAUER, Daniel E; CANVER, Matthew C; ORKIN, Stuart H. Generation of Genomic Deletions in Mammalian Cell Lines via CRISPR/Cas9. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], v. 95, n. e52118, p. 1–9, 2015. <https://doi.org/doi:10.3791/52118>.

BEITING, Daniel P. *et al.* Differential Induction of TLR3-Dependent Innate Immune Signaling by Closely Related Parasite Species. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. e88398, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088398>.

BERMAN, Jules J. Apicomplexa. *In*: BERMAN, Jules J. (org.). **Taxonomic Guide to Infectious Diseases**. 1 eded. [S. l.]: Academic Press Inc., 2012. p. 103–109. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415895-5.00019-2>.

BJERKÅS, I; MOHN, S F; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 271–274, 1984. <https://doi.org/10.1007/bf00942230>.

BLADER, Ira J. *et al.* Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii* : 15 Years Later . **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 463–485, 2015.

<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

CASTRO, Pablo David Jimenez; DUBEY, Jitender P. *Toxoplasma gondii* – the facts. **Companion Animal**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 300–305, 2019. <https://doi.org/10.12968/coan.2019.24.6.300>

CHU, Jia Qi *et al.* Production of IL-1 β and inflammasome with Up-regulated expressions of NOD-like receptor related genes in *Toxoplasma gondii*-infected THP-1 macrophages. **Korean Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 711–717, 2016. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.6.711>

COLLINS, William E.; JEFFERY, Geoffrey M. **Plasmodium malariae: Parasite and disease**. [S. l.: s. n.], 2007. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-07>

COUTERMARSH-OTT, Sheryl L. *et al.* Caspase-11 Modulates Inflammation and Attenuates *Toxoplasma gondii* Pathogenesis. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9848263>

DA SILVA, Aleksandro S. *et al.* Experimental infection by *Neospora caninum* in gerbil reduces activity of enzymes involved in energy metabolism. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 208, p. 107790, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107790>

DE AQUINO DINIZ, Lanna Vivien *et al.* Vertical transmission of *Neospora caninum* in bovine fetuses from a slaughterhouse in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, [s. l.], v. 51, n. 6, p. 1751–1755, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01828-y>

DEBIERRE-GROCKIEGO, Françoise *et al.* Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from *Toxoplasma gondii* . **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 179, n. 2, p. 1129–1137, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1129>

DONAHOE, Shannon L. *et al.* **A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife**. [S. l.]: Australian Society for Parasitology, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>

DUBEY, J. P. *et al.* **Cryptosporidiosis of Man and Animals**. 1. ed. Miami: CRC Press, 2017.

DUBEY, J. P. *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 192, n. 9, p. 1269–1285, 1988.

DUBEY, J. P. **Review of Neospora caninum and neosporosis in animals**. [S. l.: s. n.], 2003. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 2nd eded. Beltsville, Maryland: CRC Press, 2016.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. **A review of Neospora caninum and neosporosis**. [S. l.: s. n.], 1996. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01035-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01035-7)

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-The last five years. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 180, n. 1–2, p. 90–108, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>

ESCALANTE, Ananias A.; AYALA, Francisco J. Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based on rRNA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 92, n. 13, p. 5793–5797, 1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5793>

ESCALANTE, Ananias A.; AYALA, Francisco J. Phylogeny of the malarial genus Plasmodium, derived from rRNA gene sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 91, n. 24, p. 11373–11377, 1994. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11373>

EWALD, Sarah E.; CHAVARRIA-SMITH, Joseph; BOOTHROYD, John C. NLRP1 is an inflammasome sensor for Toxoplasma gondii. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 460–468, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01170-13>

FAYER, R.; SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. General Biology of Cryptosporidium. *In*: CRYPTOSPORIDIOSIS OF MAN AND ANIMALS. [S. l.]: CRC Press, 2018. p. 1–30. <https://doi.org/10.1201/9781351071260-1>.

GÁLLEGO BERENGUER. JAIME. **Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario**. [S. l.: s. n.], 2007. *E-book*.

GARCÍA-SÁNCHEZ, Marta *et al.* Differential responses of bovine monocyte-derived macrophages to infection by neospora caninum isolates of high and low virulence. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. APR, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00915>

GAROSI, L. *et al.* Necrotizing Cerebellitis and Cerebellar Atrophy Caused by Neospora caninum Infection: Magnetic Resonance Imaging and Clinicopathologic Findings in Seven Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 571–578, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0485.x>.

GLOMBOWSKY, Patrícia *et al.* Oxidative stress in dairy cows seropositives for Neospora caninum. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 54, p. 34–37, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.07.007>

HERRERA, B. Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-xL down-regulation, and early cytochrome C release in apoptosis induced by transforming growth factor β in rat fetal hepatocytes. **Hepatology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 548–556, 2001. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.27447>. A

HOMER, Mary J *et al.* Babebiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 451–469, 2000. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451-469.2000>

HUNTER, Christopher A.; SIBLEY, L. David. Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 766–778, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>

JENKINS, Mark C. *et al.* Neospora caninum: Cloning and expression of a gene coding for cytokine-inducing profilin. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 125, n. 4, p. 357–362, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.03.001>

KHAN, Asis *et al.* Neosporosis: An Overview of Its Molecular Epidemiology and Pathogenesis. **Engineering**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 10–19, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2019.02.010>

KIERBIC, A. *et al.* **Neospora caninum infection in cattle: Not only an economic problem.** [S. l.]: Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych, 2019.

<https://doi.org/10.21521/mw.6232>

KOHCHI, Chie *et al.* ROS and innate immunity. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 822, p. 817–821, 2009. <http://ar.iijournals.org/content/29/3/817.long>

KUMAR, Promod *et al.* NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis patients. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 10, p. 832–836, 2002. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-10-832>

LACERDA, Luciana Carvalho *et al.* Toxoplasma gondii induces extracellular traps release in cat neutrophils. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 207, p. 107770, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107770>

LAMBETH, J. David. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 181–189, 2004. <https://doi.org/10.1038/nri1312>

LIU, Yue; REICHEL, Michael P; LO, Wing-cheong. Combined control evaluation for Neospora caninum infection in dairy : Economic point of view coupled with population dynamics. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 277, n. July 2019, p. 108967, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108967>.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

MANS, Ben J.; PIENAAR, Ronel; LATIF, Abdalla A. **A review of Theileria diagnostics and epidemiology**. [S. l.]: Australian Society for Parasitology, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.12.006>

MANSILLA, Florencia Celeste *et al.* Immunization with Neospora caninum profilin induces limited protection and a regulatory T-cell response in mice. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 160, p. 1–10, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.10.008>

MARIM, Fernanda M. *et al.* A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. e15263, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015263>.

MARTINON, Fabio; BURNS, Kimberly; TSCHOPP, Jürg. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . **Molecular Cell**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 417–426, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)

MATTA, Sumit K. *et al.* NADPH Oxidase and Guanylate Binding Protein 5 Restrict Survival of Avirulent Type III Strains of *Toxoplasma gondii* in Naive Macrophages. **mBio**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1–18, 2018a. <https://doi.org/10.1128/mbio.01393-18>

MATTA, Sumit K. *et al.* NADPH oxidase and guanylate binding protein 5 restrict survival of avirulent type III strains of *Toxoplasma gondii* in naive macrophages. **mBio**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2018b. <https://doi.org/10.1128/mBio.01393-18>

MINEO, Tiago W.P. *et al.* Recognition by toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. **Immunology and Cell Biology**, [s. l.], v. 88, n. 8, p. 825–833, 2010. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.52>

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *In:* , 2004. **Lancet**. [S. l.: s. n.], 2004. p. 1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MOON, Jong Seok *et al.* NOX4-dependent fatty acid oxidation promotes NLRP3 inflammasome activation in macrophages. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 1002–1012, 2016. <https://doi.org/10.1038/nm.4153>

MOREIRA-SOUZA, Aline Cristina Abreu *et al.* The P2X7 receptor mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through canonical NLRP3 inflammasome activation and reactive oxygen species production. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, n. OCT, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01257>

MORRISON, David A. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 375–382, 2009. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2009.05.010>.

MORRISSETTE, N. S.; SIBLEY, L. D. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 21–38, 2003.

<https://doi.org/10.1128/membr.66.1.21-38.2002>

MOUNGJAROEN, Jirapan *et al.* Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 319, n. 3, p. 1062–1069, 2006. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.110965>

PATRAT-DELON, Solène *et al.* Correlation of parasite load determined by quantitative PCR to clinical outcome in a heart transplant patient with disseminated toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 2541–2545, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.00252-10>

PEREZ-BENITO, Joaquin F. Iron(III)–Hydrogen Peroxide Reaction: Kinetic Evidence of a Hydroxyl-Mediated Chain Mechanism. **The Journal of Physical Chemistry A**, [s. l.], v. 108, n. 22, p. 4853–4858, 2004. <https://doi.org/10.1021/jp031339l>. Acesso em: 10 jan. 2020.

PIFER, Reed; YAROVINSKY, Felix. **Innate responses to Toxoplasma gondii in mice and humans**. [S. l.: s. n.], 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.009>

PINARD, Jennifer A; LESLIE, Nan S; IRVINE, Pamela J. Maternal serologic screening for toxoplasmosis. **Journal of midwifery & women's health**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 308–316; quiz 386, 2003. [https://doi.org/10.1016/s1526-9523\(03\)00279-4](https://doi.org/10.1016/s1526-9523(03)00279-4).

RADA, Balázs; LETO, Thomas L. Oxidative Innate Immune Defenses by Nox/Duox Family NADPH Oxidases. *In*: TRENDS IN INNATE IMMUNITY. Basel: KARGER, 2008. v. 15, p. 164–187. <https://doi.org/10.1159/000136357>.

REICHEL, M. P.; ELLIS, J. T.; DUBEY, J. P. Neosporosis and hammondiosis in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 308–312, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2006.00236.x>

ROBERT-GANGNEUX, Florence; DARDÉ, Marie Laure. **Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis**. [S. l.: s. n.], 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

SAADATNIA, Geita; GOLKAR, Majid. **A review on human toxoplasmosis**. [S. l.:

s. n.], 2012. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.693197>

SAHOO, Manoranjan *et al.* Role of the inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in bacterial infections. **TheScientificWorldJournal**, [s. l.], v. 11, p. 2037–2050, 2011. <https://doi.org/10.1100/2011/212680>

SCHIEBER, Michael; CHANDEL, Navdeep. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Curr Biol**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 1–25, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.ROS

SEEBER, Frank; SOLDATI-FAVRE, Dominique. Metabolic pathways in the apicoplast of apicomplexa. **International Review of Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 281, n. C, p. 161–228, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(10\)81005-6](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(10)81005-6)

SEEBER, Frank; STEINFELDER, Svenja. Recent advances in understanding apicomplexan parasites. **F1000Research**, [s. l.], v. 5, 2016. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7924.1>.

SHRESTHA, Sunder P. *et al.* Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 433–441, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.01.006>

STRAIT, Karen; ELSE, James G.; EBERHARD, Mark L. Parasitic Diseases of Nonhuman Primates. *In*: NONHUMAN PRIMATES IN BIOMEDICAL RESEARCH. [S. l.]: Elsevier Inc., 2012. p. 197–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381366-4.00004-3>

SWANSON, Karen V.; DENG, Meng; TING, Jenny P.Y. **The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>

WANG, Xiaocen *et al.* NLRP3 Inflammasome Participates in Host Response to *Neospora caninum* Infection. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 9, p. 1791, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01791>

WHITE, Michael W; SUVOROVA, Elena S. Apicomplexa Cell Cycles: Something Old, Borrowed, Lost, and New. **Trends in parasitology**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 759–771, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.006>.

YU, Xiu Ling *et al.* Detection of *Neospora caninum* from farm-bred young blue foxes (*Alopex lagopus*) in China. **Journal of Veterinary Medical Science**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 113–115, 2009. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.113>

ZHOU, Wei *et al.* *Toxoplasma gondii* Proliferation Require Down-Regulation of Host Nox4 Expression via Activation of PI3 Kinase/Akt Signaling Pathway. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. e66306, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066306>