



UNIVERSIDAD FEDERAL DE UBERLANDIA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS



O PAPEL DA NINJ1 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA MEDIADA POR PIROPTOSE EM
Toxoplasma gondii e *Neospora caninum*

NATALIA ACOSTA OLIVERA

UBERLÂNDIA – MG

MARÇO, 2026



UNIVERSIDAD FEDERAL DE UBERLANDIA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
E PARASITOLOGIA APLICADAS



**O PAPEL DA NINJ1 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA MEDIADA POR PIROPTOSE EM
Toxoplasma gondii e *Neospora caninum***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

NATALIA ACOSTA OLIVERA

UBERLÂNDIA – MG

MARÇO, 2026

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

O48p
2026

Olivera, Natalia Acosta, 1998-
O papel da NINJ1 na resposta inflamatória mediada por piroptose em
Toxoplasma gondii e *Neospora caninum* [recurso eletrônico] / Natalia
Acosta Olivera. - 2026.

Orientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.
Coorientadora: Caroline Martins Mota.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2026.5529>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca, 1979-, (Orient.). II.
Mota, Caroline Martins (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

André Carlos Francisco
Bibliotecário-Documentalista - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação número 320, do PPGIPA				
Data:	Dezoito de março de dois mil e vinte e seis	Hora de início:	14 h	Hora de encerramento:	16 h e 30 min
Matrícula do Discente:	12412IPA010				
Nome do Discente:	Natalia Acosta Olivera				
Título do Trabalho:	O papel da Ninj1 na resposta inflamatória mediada por Piroptose em <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação dos mecanismos de reconhecimento imunes frente a infecção pelos protozoários <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>				

Reuniu-se dia dezoito de março de dois mil e vinte e seis às quatorze horas, de forma remota pelo *Microsoft Teams*, link <https://teams.microsoft.com/meet/21461277228820?p=BDuEpQc07DEoIMGUSE>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Titulares: Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva - UFTM; Dra. Caroline Martins Mota - Pós Doc/UFU e Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo - UFU, presidente e orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Tiago Mineo, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), 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):

Aprovada.

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Wilson Patriarca Mineo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/03/2026, às 16:23, 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 **Marcos Vinicius da Silva, Usuário Externo**, em 18/03/2026, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caroline Martins Mota, Usuário Externo**, em 18/03/2026, às 16:23, 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 **7143802** e o código CRC **6122E1E5**.

A decorative L-shaped line consisting of a vertical line on the left and a horizontal line extending to the right, both in black.

Agradecimientos

À Deus, por me guiar e estar sempre presente em minha vida, concedendo-me força, coragem e saúde para superar os obstáculos. Pela oportunidade de conhecer e conviver com pessoas especiais que tornam cada dia único.

À minha família na Colômbia, por serem exemplo de amor, dedicação e carinho; pelo apoio constante, pelas palavras de incentivo e pelo amor que me fortaleceu mesmo à distância.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, por ter me recebido mesmo sem me conhecer, pela confiança depositada em mim e pela paciência e orientação ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora, Prof^a. Dra. Caroline Martins Mota, por ter me ensinado tanto, sempre com dedicação e paciência, especialmente nos momentos em que o idioma ainda representava um desafio para mim.

Aos meus amigos estrangeiros que conheci ao chegar à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), que foram parte fundamental desta caminhada, tornando este processo mais leve, acolhedor e inesquecível.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia, que me ajudaram no desenvolvimento desta pesquisa e tiveram paciência comigo quando ainda estava aprendendo português.

Às agências brasileiras de fomento à pesquisa, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro destinado à aquisição de materiais e reagentes necessários à execução deste trabalho, e, em especial, à CAPES, pela concessão da bolsa de auxílio financeiro.

RESUMO

O sistema imune inato é fundamental na defesa contra patógenos intracelulares, como os parasitas do filo Apicomplexa, incluindo *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. As vias de morte celular programada (PCD), como a piroptose, desempenham um papel crucial ao limitar a replicação parasitária e promover a resposta inflamatória. A piroptose é caracterizada pela ativação do inflamassoma e pela formação de poros de gasdermina, que promovem a permeabilização inicial da membrana plasmática. Durante muito tempo, acreditou-se que a ruptura da membrana plasmática ocorria em decorrência da pressão osmótica; no entanto, estudos recentes demonstraram que, em muitos casos, esse processo é ativo e mediado pela proteína ninjurin-1 (NINJ1). Nesse contexto, hélices alfa extracelulares de NINJ1 inserem-se na membrana plasmática e promovem a polimerização de monômeros de NINJ1 em filamentos anfipáticos, levando à ruptura da membrana plasmática. No entanto, o papel da NINJ1 durante infecções por Apicomplexa ainda não foi completamente elucidado. Para explorar essa questão, o estudo iniciou com uma revisão das vias de PCD em parasitas Apicomplexa, com o objetivo de identificar lacunas no conhecimento atual. Em seguida, investigou-se o papel da NINJ1 em infecções por *T. gondii* e *N. caninum*. Células DC2.4 deficientes para NINJ1 ($\Delta Ninj1$) foram geradas utilizando a técnica CRISPR-Cas9, e ensaios funcionais foram realizados para avaliar a permeabilização da membrana plasmática, a lise celular (PI e liberação de LDH) e a ativação de caspases-1/11. Além disso, macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos selvagens e deficientes para caspase-1/11 foram usados para avaliar a permeabilização da membrana dependente do inflamassoma. A carga parasitária intracelular foi analisada em células DC2.4 e macrófagos RAW 264.7, comparando a replicação do parasita em células normais e deficientes para NINJ1. Os resultados mostraram que a expressão de NINJ1 aumenta durante a infecção e que sua ausência favorece a replicação do parasita, ao mesmo tempo em que reduz a lise celular. A perda de NINJ1 não afetou a ativação de caspases-1/11 nem a permeabilização inicial da membrana, mas a liberação de LDH foi significativamente reduzida, indicando que NINJ1 é essencial para a etapa terminal da ruptura da membrana. Esses achados posicionam a NINJ1 como um efetor crítico na execução da morte celular inflamatória durante infecções por Apicomplexa.

Palavras-chave: NINJ1, piroptose, inflamassoma, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, morte celular programada, carga parasitária.

ABSTRACT

The innate immune system is crucial for defending against intracellular pathogens, such as Apicomplexan parasites, including *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. Programmed cell death (PCD) pathways, like pyroptosis, play a key role in limiting parasite replication and promoting inflammatory responses. Pyroptosis is characterized by inflammasome activation and gasdermin pore formation, leading to plasma membrane permeabilization. Recently, Nerve Injury-Induced Protein 1 (NINJ1) has been identified as a key mediator of terminal membrane rupture during inflammatory cell death. However, its role during Apicomplexan infections remains poorly understood. To address this, the study first conducted a review of PCD pathways in Apicomplexan parasites to identify existing knowledge gaps. It then investigated the role of NINJ1 in *T. gondii* and *N. caninum* infections. NINJ1-deficient DC2.4 cells (Δ Ninj1) were generated using CRISPR-Cas9, and functional assays were performed to assess membrane permeabilization, cell lysis (via PI uptake and LDH release), and caspase-1/11 activation. Additionally, bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from wild-type and caspase-1/11-deficient mice were used to assess inflammasome-dependent membrane permeability. Intracellular parasite burden was analyzed in DC2.4 cells and RAW 2.6.4.2 macrophages, comparing parasite replication in normal and NINJ1-deficient cells. The results showed that NINJ1 expression increases during infection and that its absence enhances parasite replication while significantly reducing cell lysis. Loss of NINJ1 did not affect caspase-1/11 activation or initial membrane permeabilization, but LDH release was greatly reduced, indicating that NINJ1 is essential for the terminal phase of plasma membrane rupture. These findings position NINJ1 as a critical effector linking inflammasome activation to terminal cellular disintegration during Apicomplexan infections.

Keywords: NINJ1, pyroptosis, inflammasome, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, programmed cell death, intracellular parasitism.

A decorative L-shaped line consisting of a vertical line on the left and a horizontal line extending to the right, both meeting at a right angle.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 O filo Apicomplexa	21
1.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	23
1.2.1 Ciclo de vida	23
1.2.2 Patogenia	25
1.3 <i>Neospora caninum</i>	26
1.3.1 Ciclo de vida	26
1.3.2 Patogenia	28
2. CAPÍTULO I	
MORTE CELULAR	29
2.1 Apoptose	31
2.2 Pirotoses	33
2.3 Necroptose.....	36
2.4 PANoptose.....	38
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. CAPÍTULO II	40
5. NINJ1 orchestrates pyroptotic death in <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Neospora caninum</i> infection ...	41
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 O filo Apicomplexa

O filo Apicomplexa compreende um grupo diverso de protozoários, com mais de 5.000 espécies descritas, cuja sobrevivência depende de um estilo de vida parasitário intracelular obrigatório (Seeber, 2010), caracterizados pela presença de alvéolos corticais, que conferem suporte à membrana e permitem mobilidade (Arisue et al., 2019). Adicionalmente, esses organismos possuem um complexo apical evolutivamente único, formado por organelas secretoras especializadas, incluindo roptrias, grânulos densos e micronemas, fundamentais para o ciclo lítico do parasito (Morrison, 2009; Seeber, 2010; White & Suvorova, 2018).

Os parasitos desse filo também se caracterizam pelo crescimento e pela replicação dentro de um vacúolo parasitóforo, um compartimento intracelular não fagossômico, no qual são secretadas moléculas capazes de modular as vias de sinalização celular do hospedeiro, permitindo a persistência e a sobrevivência do parasito (Morrissette & Sibley, 2002).

Portanto, os parasitos do filo Apicomplexa apresentam elevada relevância clínica e econômica (Tabela 1), especialmente espécies do gênero *Plasmodium*, responsáveis pela malária, uma das doenças infecciosas mais letais no mundo (Arisue et al., 2019; Escalante & Ayala, 1994; Hashimoto et al., 2021), *Neospora caninum*, causador da neosporose, uma doença de alto impacto econômico que acomete sobretudo bovinos e cães (Dubey, 2003), bem como o *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, uma zoonose que acomete principalmente indivíduos imunodeficientes ou gestantes, podendo desenvolver manifestações graves e potencialmente letais (Castro & Dubey, 2019).

Tabela 1. Principais gêneros de parasitos do filo Apicomplexa de importância clínica e econômica.

Parasito	Doença associada	Hospedeiro final ou vetor	Hospedeiros intermediários	Referência
Classe Aconoidasida (= Hematozoa), Ordem Haemosporida				
<i>Plasmodium sp.</i>	Malária	Mosquitos (Anopheles sp.)	Mamíferos, Aves	Collins; Jeffery, 2007; Escalante; Ayala, 1995
Classe Aconoidasida (= Hematozoa), Ordem Piroplasmida				
<i>Babesia sp.</i>	Babesiose	Carrapatos (Ixodidae)	Mamíferos, Aves	Homer et al., 2000
<i>Theileria sp.</i>	Theileriose	Carrapatos (Ixodidae)	Mamíferos	Mans; Pienaar; Latif, 2015
Classe Conoidasida, Ordem Eucoccidiorida				
<i>Cryptosporidium sp.</i>	Criptosporidiose	Mamíferos	Mamíferos, Aves, Répteis, Peixes	Fayer; Speer; Dubey, 2018
<i>Cyclospora sp.</i>	Ciclosporose	Mamíferos	Mamíferos, Aves, Répteis, Peixes	Strait; Else; Eberhard, 2012
<i>Neospora sp.</i>	Neosporose	Mamíferos (Canidae)	Mamíferos, Aves	Donahoe et al., 2015; Khan et al., 2020
<i>Toxoplasma sp.</i>	Toxoplasmose	Mamíferos (Felidae)	Mamíferos, Aves, Répteis	Castro; Dubey, 2019; Robert-Gangneux; Dardé, 2012

1.2 *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um parasito intracelular obrigatório pertencente à família Sarcocystidae, com a capacidade de infectar praticamente todas as células nucleadas de animais homeotérmicos (Castro & Dubey, 2019). O parasito foi descrito pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux, após a identificação do protozoário em um roedor semelhante ao hamster, *Ctenodactylus gundi*, utilizado em estudos sobre leishmaniose no Instituto Louis Pasteur, na Tunísia. Inicialmente, o organismo foi classificado como pertencente à ordem Piroplasmida e, posteriormente, atribuído ao gênero *Leishmania*. No entanto, com base em suas características morfológicas, os autores reconheceram que o parasito não correspondia a nenhum organismo previamente descrito. Assim, em 1909, o protozoário foi formalmente denominado

Toxoplasma gondii, sendo o termo *toxos* derivado do grego, significando “arco”, e *plasma*, “forma de vida”, enquanto o epíteto *gondii* faz referência ao hospedeiro no qual foi inicialmente identificado. De forma simultânea e independente, no Brasil, em 1908, Splendore e colaboradores também observaram *T. gondii* em um coelho; entretanto, o parasito foi erroneamente classificado como *Leishmania* sp. e não recebeu denominação formal à época (Dubey, 2016).

1.2.1 Ciclo de vida

T. gondii apresenta um ciclo de vida que envolve diferentes hospedeiros, com reprodução sexuada em felídeos e fases assexuadas em hospedeiros intermediários, composto por duas formas distintas de reprodução. A reprodução assexuada ocorre nos hospedeiros intermediários, enquanto a reprodução sexual é restrita aos hospedeiros definitivos, representados por espécies da família Felidae (Blader et al., 2015). Assim como ocorre na maioria das infecções causadas por coccídeos, a transmissão de *T. gondii* envolve a eliminação de oocistos nas fezes dos hospedeiros definitivos, nos quais se desenvolvem esporozoítos (Figura 1). A infecção dos hospedeiros intermediários ocorre por meio da ingestão de oocistos esporulados, que liberam esporozoítos capazes de invadir as células epiteliais do intestino, onde ocorre o processo de encistamento. No interior das células hospedeiras, os esporozoítos diferenciam-se em taquizoítos, que se replicam por endodiogenia, um mecanismo de divisão celular característico dos organismos do filo Apicomplexa (Gállego Berenguer, 2007). Esse processo ocorre dentro do vacúolo parasitóforo (VP) estabelecido após a invasão celular. Ao término do ciclo replicativo, os taquizoítos são liberados por meio da destruição da célula hospedeira, dando continuidade ao ciclo de invasão, replicação e liberação, conhecido como ciclo lítico. Esse processo permite a disseminação do parasito pelos tecidos do hospedeiro até que a resposta imune seja estabelecida, induzindo a diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos. Esses, por sua vez, formam cistos teciduais e mantêm a infecção em estado latente ao longo de toda a vida do hospedeiro (Blader et al., 2015; Castro & Dubey, 2019; Dubey, 2016).

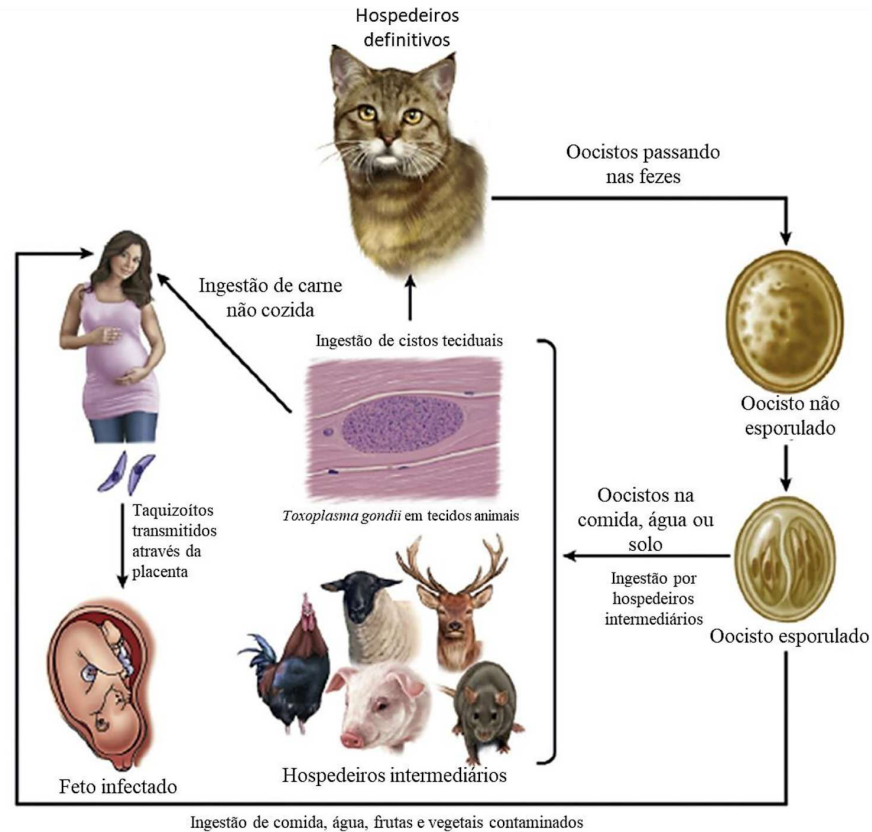


Figura 1. O ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. **Fonte:** Dubey (2007).

Uma segunda via de transmissão horizontal dos parasitos ocorre por meio da ingestão de cistos teciduais presentes em animais infectados, principalmente associada ao consumo de carne. Essa via constitui um mecanismo fundamental para a infecção dos hospedeiros definitivos (Blader et al., 2015), sendo também comum em humanos (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Em situações de comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro, os bradizoítos podem se diferenciar novamente em taquizoítos, processo que representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade associadas à infecção por *T. gondii* em indivíduos imunocomprometidos (Blader et al., 2015; Robert-Gangneux & Dardé, 2012; Saadatnia & Golkar, 2012).

Por outro lado, a transmissão vertical constitui uma via relevante de infecção, uma vez que, diferentemente da maioria dos coccídeos, os taquizoítos de *T. gondii* são capazes de atravessar a barreira placentária durante a gestação em humanos, infectando o feto e ocasionando graves manifestações clínicas, caracterizando a infecção congênita (Blader et al., 2015; Dubey, 2016; Pinard et al., 2003) infectando o feto e ocasionando graves comprometimentos clínicos, caracterizando a infecção congênita.

1.2.2 Patogênese

A toxoplasmose é uma zoonose amplamente distribuída, estimando-se que cerca de um terço da população humana esteja infectada. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção é predominantemente assintomática, enquanto nos casos sintomáticos podem ocorrer febre, linfadenopatia cervical, mialgia e astenia. Esses sinais inespecíficos, quando persistentes, podem mimetizar a mononucleose infecciosa, dificultando o diagnóstico em grande parte dos casos (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

O curso clínico da toxoplasmose depende principalmente do estado imunológico do hospedeiro, bem como da localização dos cistos teciduais e da cepa do parasito envolvida (Montoya & Liesenfeld, 2004; Pinard et al., 2003). Em indivíduos imunocomprometidos, a toxoplasmose configura-se como uma infecção oportunista, destacando-se a encefalite toxoplásmica em pacientes com AIDS, especialmente naqueles com contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 100 células/ μ L, associada a manifestações neurológicas graves (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Em receptores de transplantes e pacientes sob imunossupressão, a doença pode resultar da reativação de infecção latente ou da transmissão por órgãos infectados, sendo a forma pulmonar a mais frequente, com potencial disseminação sistêmica (Patrat-Delon et al., 2010).

Em relação à transmissão vertical, a gravidade da doença fetal está relacionada ao período gestacional, sendo inversamente proporcional à idade gestacional no momento da infecção. Embora a maioria das infecções adquiridas no terceiro trimestre seja assintomática, a transmissão no início da gestação pode levar a graves desfechos, incluindo anomalias do desenvolvimento, sequelas neurológicas e aborto (Montoya & Liesenfeld, 2004; Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

1.3 *Neospora caninum*

N. caninum é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa, e está estreitamente relacionado a *T. gondii* (Dubey & Schares, 2011). Esse parasita foi descrito pela primeira vez por Bjerkås e colaboradores em 1984, na Noruega, em cães com distúrbios neurológicos, incluindo paralisia nos membros posteriores e cistos teciduais com morfologia distinta dos cistos de *T. gondii*, além de resultados soronegativos para *T. gondii* (Dubey et al., 2007a).

Em 1988, *N. caninum* foi reconhecido como uma nova espécie e gênero após a análise de cortes histológicos de cães com doença fatal sugestiva de toxoplasmose. Durante os estudos, Dubey *et al.*, observaram características que diferenciavam *N. caninum* do quadro clínico típico da toxoplasmose, sendo constatado que este parasita causava uma forma mais severa de doença em cães, além de diferenças estruturais e histopatológicas em comparação com *T. gondii*. Também foi confirmado que os cães infectados com *N. caninum* apresentavam resultados negativos nos testes sorológicos e imunohistoquímicos para *T. gondii* (Dubey & Lindsay, 1996).

1.3.1 Ciclo de vida

N. caninum é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, com ciclo biológico heterógeno, envolvendo hospedeiros definitivos e intermediários, ou seja, o ciclo de vida do parasito ocorre em hospedeiros distintos. A reprodução sexuada acontece nos canídeos, que são os hospedeiros definitivos, enquanto a reprodução assexuada ocorre em diversos hospedeiros intermediários, incluindo animais domésticos e silvestres como gatos, porcos, bovinos e outros (Dubey & Schares, 2011; Hall *et al.*, 2005; Mineo *et al.*, 2011; Ortega-Mora *et al.*, 2003). O ciclo envolve três formas infecciosas: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos, todas essenciais para a transmissão do parasito (Dubey & Schares, 2011; Ortega-Mora *et al.*, 2003).

A infecção dos hospedeiros intermediários ocorre quando estes ingerem oocistos esporulados, encontrados em alimentos ou água contaminados. No trato digestivo, os esporozoítos são liberados e invadem células epiteliais do intestino, onde se transformam em taquizoítos. Estes se multiplicam por endodiogenia dentro dos vacúolos parasitóforos, espalhando-se por diversos tecidos e órgãos do hospedeiro, o que leva a uma forte resposta inflamatória e destruição tecidual. Essa fase é caracterizada pelas manifestações clínicas da toxoplasmose aguda (Dubey *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2010). Sob a pressão do sistema imune, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, iniciando a formação de cistos teciduais em tecidos como cérebro e músculos, o que caracteriza a fase crônica da infecção (Dubey *et al.*, 2002, 2007b).

Os bradizoítos permanecem em cistos teciduais por longos períodos no hospedeiro, muitas vezes sem causar sintomas, sendo considerados formas de latência. No entanto, podem ocorrer episódios de reativação em condições de imunossupressão, o que pode resultar em manifestações clínicas graves. A

infecção de hospedeiros definitivos ocorre quando estes ingerem carne contaminada contendo cistos teciduais. A digestão da parede do cisto libera os bradizoítos, que invadem as células epiteliais do intestino e iniciam a fase sexuada (esquizogonia) do ciclo de vida.

Na fase sexuada, os esquizontes formados liberam merozoítas, que iniciam a gamogonia, culminando na formação de oocistos não esporulados. Esses oocistos são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo e, após esporulação no ambiente, tornam-se infectantes para os hospedeiros intermediários. Assim, o ciclo biológico de *N. caninum* envolve a participação de hospedeiros definitivos e intermediários, sendo mantido pela transmissão horizontal por meio da ingestão de oocistos esporulados ou tecidos contendo cistos teciduais, além da transmissão vertical observada principalmente em bovino (Ellis et al., 2010; Gondim et al., 2004; Tenter et al., 2000).

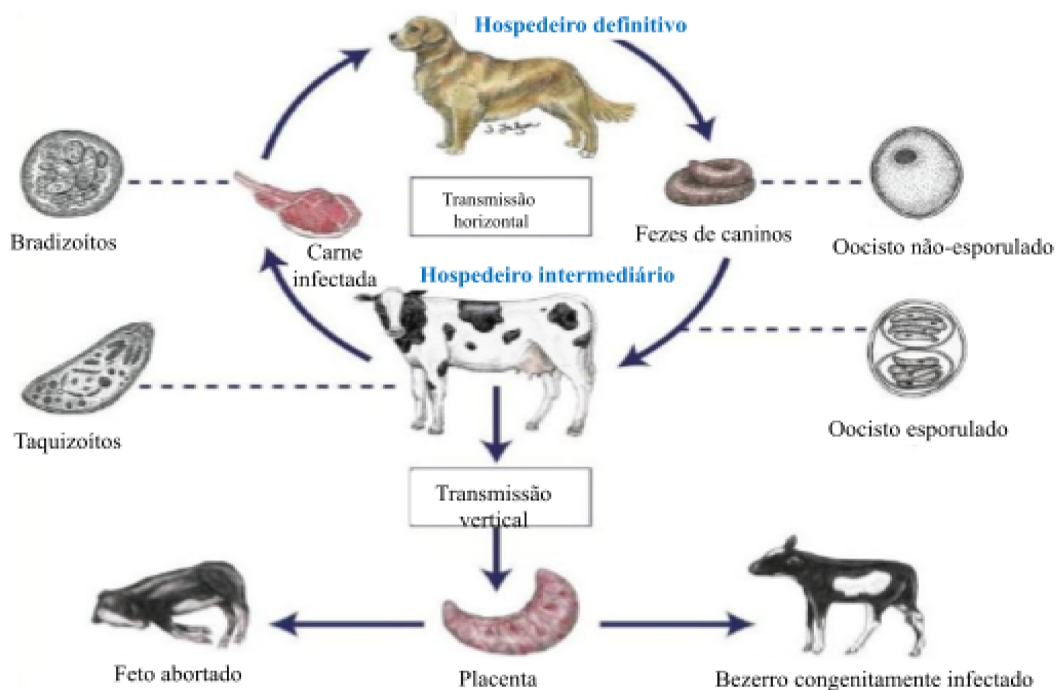


Figura 2. Ciclo Biológico de *Neospora caninum*. Fonte: Ellis (2013).

1.3.2 Patogênese

A patogênese de *T. gondii* e *N. caninum* apresenta mecanismos amplamente semelhantes, especialmente no que se refere à invasão celular e ao estabelecimento do parasito no interior da célula hospedeira. Como membros do filo Apicomplexa, ambos possuem um complexo apical formado por micronemas, roptrias e grânulos densos, organelas secretoras fundamentais para adesão, invasão e modulação do

ambiente intracelular do hospedeiro (Buxton et al., 2002; Dubey et al., 2002; McAllister et al., 2000). Esse processo é ativo, dependente de energia do parasito, e pode ser descrito em três etapas principais.

A primeira etapa corresponde à adesão inicial do parasito à célula hospedeira, processo mediado por antígenos de superfície e proteínas secretadas pelos micronemas. Após essa adesão inicial, o parasito reorienta sua extremidade apical em direção à membrana da célula hospedeira, promovendo a extrusão do conóide e o início do processo de internalização. Nesse momento, proteínas de micronemas (MIC) atuam como adesinas e participam da formação de uma zona de adesão irreversível, permitindo o movimento de invasão que conduz o parasito para o interior da célula. Durante esse processo, a membrana plasmática da célula hospedeira é invaginada para formar a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), originando um vacúolo que evita a fusão com lisossomos e favorece a sobrevivência intracelular do parasito (Buxton et al., 2002; Hemphill & Gottstein, 1996a; Keller et al., 2002; McAllister et al., 2000).

Na segunda etapa, ocorre a secreção de proteínas de roptrias (ROP), que são liberadas durante a invasão e contribuem para a formação e expansão do vacúolo parasitóforo, além de participarem da interação com componentes celulares do hospedeiro. Essas proteínas favorecem a associação do vacúolo com organelas como mitocôndrias e retículo endoplasmático, posicionadas próximas ao vacúolo parasitóforo e potencialmente relevantes para o metabolismo e a permanência do parasito no ambiente intracelular (Buxton et al., 2002; Dubey et al., 2002; McAllister et al., 2000).

A terceira etapa envolve a secreção de proteínas de grânulos densos (GRA), que promovem a remodelação e a maturação do vacúolo parasitóforo. Esse processo resulta na formação de uma rede intravacuolar metabolicamente ativa, essencial para o crescimento, replicação e sobrevivência do parasito. No interior do vacúolo parasitóforo, os taquizoítos proliferam por endodiogenia, originando novas gerações de parasitos poucas horas após a infecção. Posteriormente, ocorre a lise da célula hospedeira e a liberação dos taquizoítos, que passam a infectar novas células e tecidos, contribuindo para a disseminação da infecção (Hemphill & Gottstein, 1996b).

2. Morte celular

A morte celular é um processo biológico altamente regulado e essencial para o desenvolvimento embrionário, a manutenção da homeostase tecidual e o funcionamento adequado do sistema

imunológico (Galluzzi et al., 2018; Green, 2005). Em condições fisiológicas, a eliminação controlada de células danificadas ou envelhecidas contribui para a renovação tecidual e a prevenção de respostas inflamatórias exacerbadas. No contexto das infecções, particularmente aquelas causadas por patógenos intracelulares, a ativação de diferentes vias de morte celular assume papel central não apenas na eliminação direta das células infectadas, mas também na modulação da inflamação local e sistêmica, influenciando o grau de dano tecidual e o desfecho clínico da doença (Jorgensen et al., 2017; Nagata & Tanaka, 2017).

Como consequência da ativação do sistema imune inato, que constitui a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores e baseia-se no reconhecimento rápido de sinais moleculares conservados por meio de receptores de reconhecimento de padrões (pattern recognition receptors, PRRs), capazes de detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a dano (DAMPs) (Chen et al., 2025; Takeuchi & Akira, 2010).

A ativação desses receptores desencadeia cascatas de sinalização intracelular que promovem a produção de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios, além de regular diretamente a ativação de vias de morte celular programada (programmed cell death, PCD). Esses mecanismos são particularmente relevantes no controle de parasitas intracelulares, como *T. gondii* e *N. caninum*, cuja replicação ocorre no interior das células hospedeiras e depende da manipulação de respostas imunes e de sobrevivência celular (Bertheloot et al., 2021; Blader et al., 2015; Dubey et al., 2007b).

As vias de morte celular programada podem ser classificadas, de forma geral, em não líticas e líticas, de acordo com suas consequências estruturais e imunológicas (Jorgensen et al., 2017; Wang & Kanneganti, 2021). A apoptose representa a principal via não lítica e caracteriza-se pela ativação sequencial de caspases, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos, permitindo a remoção silenciosa das células infectadas ou danificadas, com mínima liberação de conteúdo inflamatório (Mustafa et al., 2024). Em contraste, as vias líticas, como a piroptose e a necroptose, resultam na ruptura da membrana plasmática, liberação de DAMPs e intensa ativação inflamatória, sendo particularmente importantes na contenção de infecções intracelulares, embora frequentemente associadas a imunopatologia (Choi et al., 2019; Frank & Vince, 2019; Gao et al., 2024)

A piroptose é mediada principalmente pela ativação de inflamassomas, como NLRP3 e AIM2, levando à ativação de caspase-1, à clivagem de gasderminas e à formação de poros na membrana plasmática. Esses poros promovem a permeabilização inicial da membrana e permitem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18. Posteriormente, a ruptura terminal da membrana plasmática, antes atribuída principalmente à pressão osmótica, tem sido reconhecida em muitos contextos como um processo ativo mediado por ninjurin-1 (NINJ1), que atua após a permeabilização inicial promovida por gasderminas (8). Já a necroptose é desencadeada, em geral, quando a apoptose é inibida, envolvendo a ativação das quinases RIPK1 e RIPK3 e a fosforilação de MLKL, culminando na lise celular e na amplificação da inflamação (Frank & Vince, 2019; Yang et al., 2025).

Mais recentemente, a PANoptose foi descrita como uma via integrada de morte celular inflamatória, coordenada por complexos multiproteicos denominados PANoptossomos, que promovem a ativação simultânea de componentes da apoptose, piroptose e necroptose (W. Jiang et al., 2021; Qi et al., 2023). Essa convergência funcional permite uma resposta robusta contra patógenos, mas também pode contribuir para inflamação exacerbada e lesão tecidual severa.

Nesse contexto, a capacidade de patógenos intracelulares, incluindo os Apicomplexa, de modular, suprimir ou redirecionar essas vias de morte celular representa um determinante crítico da patogênese, da persistência da infecção e da gravidade clínica. Assim, compreender os mecanismos moleculares que regulam a ativação diferencial das vias de morte celular durante a infecção é fundamental para elucidar a dinâmica da interação hospedeiro–parasita e os processos que levam tanto ao controle da infecção quanto ao desenvolvimento de imunopatologia.

2.1 Apoptose

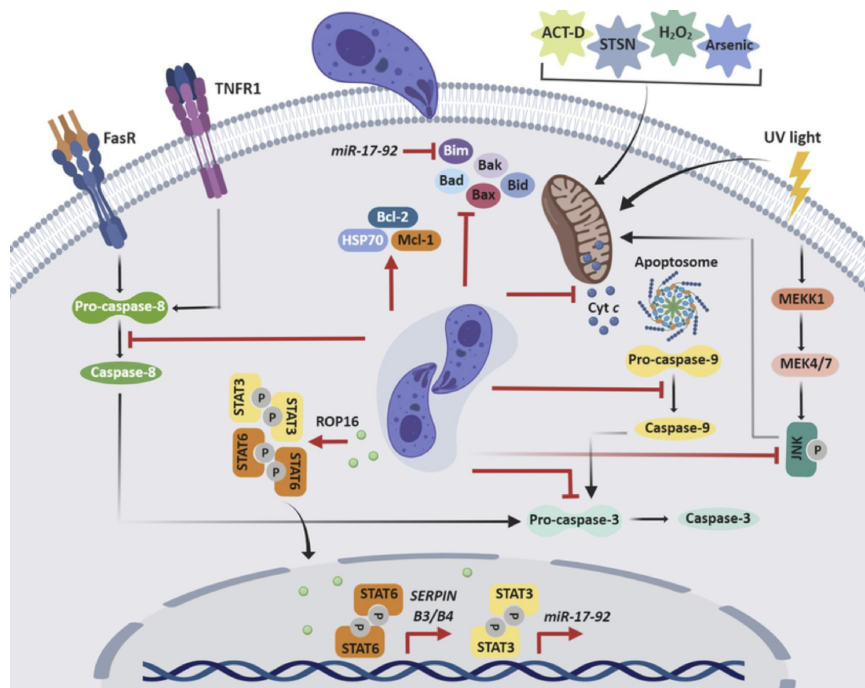


Figura 3. Inibição da apoptose da célula hospedeira por *T. gondii*. **Fonte:** Lima (2019).

A apoptose é a forma clássica de morte celular programada não lítica e, em geral, não inflamatória, desempenhando um papel central na manutenção da homeostase tecidual e na defesa imunológica. Esse processo permite a eliminação controlada de células danificadas, estressadas ou infectadas sem induzir uma resposta inflamatória exacerbada, distinguindo-se de vias inflamatórias de morte celular regulada, como a piroptose e a necroptose (Elmore, 2007; Mustafa et al., 2024).

A apoptose pode ser iniciada por duas vias principais: a via intrínseca (mitocondrial) e a via extrínseca (mediada por receptores de morte) (Galluzzi et al., 2020). A via intrínseca é ativada em resposta a sinais de estresse intracelular, incluindo danos ao DNA, estresse oxidativo, desequilíbrio metabólico ou privação de fatores de sobrevivência. Esses estímulos promovem a ativação de proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2, especialmente BAX e BAK, levando à permeabilização da membrana externa mitocondrial (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) (Gao et al., 2024). Como consequência, ocorre a liberação do citocromo c para o citosol, possibilitando a formação do apoptossomo, um complexo multiproteico composto pela proteína ativadora de proteases apoptóticas 1

(Apaf-1) e pela procaspase-9. A ativação da caspase-9 desencadeia a clivagem das caspases executoras -3 e -7, culminando no desmantelamento ordenado da célula (Fink & Cookson, 2005)

Por sua vez, a via extrínseca é iniciada pela ligação de ligantes de morte, como o Fas ligand (FasL) ou o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), aos seus respectivos receptores de superfície celular, incluindo Fas (CD95) e TNFR1 (Newton & Dixit, 2020). Essa interação promove o recrutamento de proteínas adaptadoras, como FADD e TRADD, levando à formação do complexo de sinalização indutor de morte (death-inducing signaling complex, DISC) e à ativação da caspase-8. A caspase-8 ativada pode clivar diretamente as caspases executoras ou interagir com outras vias de morte celular regulada, evidenciando o intenso crosstalk entre apoptose, necroptose e piroptose (Choudhury et al., 2024).

No contexto das infecções parasitárias, a apoptose exerce um papel ambíguo. A eliminação apoptótica de células infectadas contribui para o controle da replicação parasitária e para a contenção da infecção. Entretanto, parasitos intracelulares, como *T. gondii* e *N. caninum*, desenvolveram estratégias sofisticadas para modular a sinalização apoptótica, seja inibindo a apoptose para prolongar a sobrevivência da célula hospedeira, seja induzindo apoptose seletiva em células do sistema imune, favorecendo a evasão imunológica e a persistência da infecção (Lima & Lodoen, 2019; Zhang et al., 2022) Dessa forma, a regulação precisa da apoptose constitui um elemento-chave na determinação do desfecho da interação hospedeiro–parasita.

2.2 Piroptose

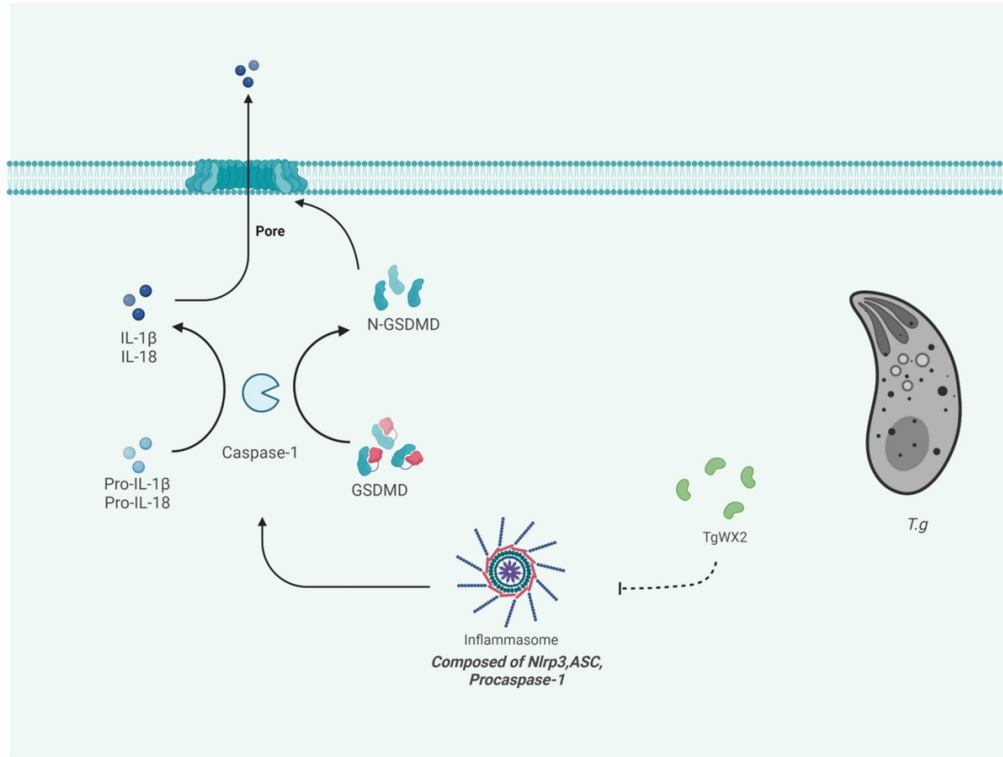


Figura 4. *T. gondii* wx2 inibe a piroptose da célula hospedeira. **Fonte:** Ma *et al.*, 2022.

A piroptose é uma forma de morte celular regulada, lítica e altamente inflamatória, desempenhando papel central na resposta imune inata contra patógenos intracelulares. Diferentemente da apoptose, a piroptose culmina na permeabilização da membrana plasmática, na ruptura celular e na liberação de mediadores inflamatórios, contribuindo tanto para a contenção da infecção quanto para a amplificação da resposta imune local (Broz, 2025; Y. Liu *et al.*, 2024).

Essa via é tipicamente iniciada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou de sinais de dano celular (DAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) citosólicos, como membros da família *NOD-like receptors* (NLRs) e o sensor AIM2. A ativação desses sensores leva à montagem de complexos multiproteicos denominados inflamassomas, entre os quais o inflamassoma NLRP3 é um dos mais amplamente estudados no contexto de infecções parasitárias e processos inflamatórios (Broz, 2025).

A formação do inflamassoma promove a ativação de caspases inflamatórias, principalmente a caspase-1, responsável por duas funções centrais: (i) o processamento das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18) em suas formas biologicamente ativas; e (ii) a clivagem da gasdermina D (GSDMD). Após sua clivagem, o domínio N-terminal da GSDMD oligomeriza e se insere na membrana plasmática, formando poros que promovem a permeabilização inicial da célula e permitem tanto o influxo e efluxo de íons quanto a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Kayagaki et al., 2015; J. Shi et al., 2015).

Durante muito tempo, esses poros foram considerados suficientes para explicar a lise celular. No entanto, estudos mais recentes demonstraram que a formação de poros por GSDMD é necessária, mas não suficiente, para a ruptura completa da membrana plasmática. Nesse contexto, a ninjurin-1 (NINJ1) atua *downstream* da GSDMD como mediadora crítica da ruptura terminal da membrana, regulando a liberação maciça de conteúdo citosólico durante a morte celular lítica (Kayagaki et al., 2021). Assim, na piroptose, a sequência clássica envolve o reconhecimento de PAMPs e DAMPs por PRRs citosólicos, a montagem do inflamassoma, a ativação da caspase-1, a clivagem da GSDMD e a formação de poros na membrana plasmática, seguida da ruptura terminal mediada por NINJ1. Essa organização em etapas reforça que a permeabilização inicial da membrana e a lise terminal constituem eventos funcionalmente distintos, embora intimamente acoplados na execução da morte celular inflamatória (David et al., 2024).

A relevância da NINJ1, contudo, não se restringe à piroptose. Estudos recentes demonstram que essa proteína também participa da fase terminal de outras vias líticas de morte celular, como a necroptose, mediada pelo eixo RIPK1–RIPK3–MLKL, e da PANoptose, um programa integrado que reúne componentes moleculares da apoptose, piroptose e necroptose. Dessa forma, a NINJ1 emerge como um ponto de convergência funcional entre diferentes programas de morte celular inflamatória, sendo responsável por converter sinais intracelulares de morte em ruptura efetiva da membrana plasmática (Xu et al., 2025). Do ponto de vista imunológico, essa função posiciona a NINJ1 como um amplificador crítico da inflamação, uma vez que a ruptura da membrana plasmática constitui o evento que efetivamente permite a liberação de mediadores pró-inflamatórios para o microambiente tecidual. (Wang & Kanneganti, 2021; Xu et al., 2025).

No contexto das infecções por Apicomplexa, a piroptose pode exercer papel ambivalente, funcionando tanto como mecanismo de contenção parasitária quanto como mediadora de dano tecidual. Em *Neospora*

caninum, a ativação do inflamassoma envolve os sensores NLRP3 e NLRC4, juntamente com ASC e caspase-1, sendo essencial para a produção de IL-1 α , IL-1 β e IL-18 e para a indução da piroptose (Mota et al., 2020). Durante a infecção, a ativação do inflamassoma está intimamente associada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que atuam como mediadores importantes desse processo e, ao mesmo tempo, são amplificadas como consequência da sinalização inflamatória, estabelecendo um circuito de retroalimentação que contribui para a restrição da replicação parasitária (Martinon, 2010).

Portanto, a NINJ1 redefine a compreensão das vias de morte celular regulada ao estabelecer uma separação funcional entre a permeabilização inicial da membrana, promovida por efetores como gasderminas e MLKL, e a lise terminal da célula. Ao integrar piroptose, necroptose e PANoptose em um eixo comum de execução da morte celular inflamatória, a NINJ1 se consolida como um elemento-chave para compreender como a morte celular pode contribuir simultaneamente para a defesa do hospedeiro e para o dano tecidual (Dondelinger et al., 2023; Hartenian et al., 2024).

2.3 Necroptose

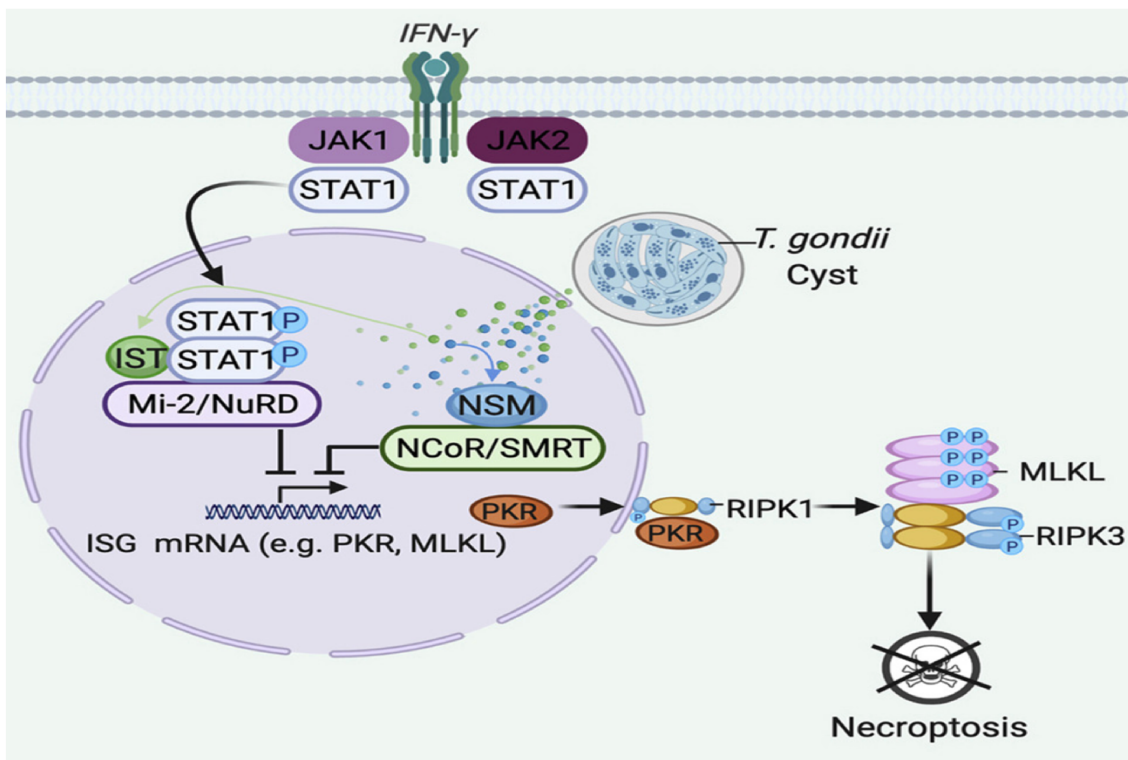


Figura 5. *T. gondii* inibe a necroptose da célula hospedeira. **Fonte:** Rosenberg (2021).

A necroptose representa outra via de morte celular programada (PCD) de caráter lítico e pró-inflamatório, geralmente ativada quando a apoptose é bloqueada, especialmente pela inibição funcional da caspase-8 (Choi et al., 2019). Em condições fisiológicas, a caspase-8 atua como um regulador negativo da necroptose; assim, sua ausência ou inibição permite a ativação de programas alternativos de morte celular inflamatória (Bertheloot et al., 2021).

A cascata necroptótica clássica é iniciada, em geral, pela estimulação de receptores de morte celular, como o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1), em um contexto no qual a sinalização apoptótica não pode prosseguir. Nessas circunstâncias, ocorre a ativação coordenada das quinases RIPK1 e RIPK3, que interagem para formar um complexo sinalizador conhecido como necrossomo (Dunai et al., 2011). A ativação da RIPK3 resulta na fosforilação da proteína MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein), a qual sofre oligomerização e translocação para a membrana plasmática, promovendo sua permeabilização e culminando na lise celular (Gao et al., 2024). Esse processo leva à liberação de padrões moleculares associados a dano (DAMPs), amplificando a inflamação local (Belizário et al., 2015).

Em infecções por parasitas do filo *Apicomplexa*, a necroptose pode atuar como um mecanismo de defesa celular, limitando a replicação de parasitas intracelulares. Sua ativação, no entanto, depende do tipo celular, do estágio da infecção e do equilíbrio entre a resposta imune e a inflamação. Por exemplo, *T. gondii* pode suprimir a necroptose através da modulação negativa do eixo RIPK1–RIPK3–MLKL, utilizando efetores parasitários para interferir na expressão dos componentes chave dessa via, prevenindo a morte celular e favorecendo a persistência do parasita durante a infecção crônica (Erazo & Knoll, 2025; Rosenberg & Sibley, 2021). Além disso, em condições experimentais onde a apoptose é bloqueada, a necroptose em macrófagos contribui para a limitação da replicação parasitária, destacando o papel da necroptose como mecanismo potencial de defesa do hospedeiro (Erazo & Knoll, 2025).

Em relação a *N. caninum*, os dados disponíveis indicam que o parasita é capaz de inibir a apoptose e modular processos celulares associados à sobrevivência e à resposta imune do hospedeiro. Estudos demonstram que a infecção pode induzir mitofagia e regular a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), interferindo em vias inflamatórias como p38, ERK e o inflamassoma NLRP3 (Mota et al., 2020). Essas alterações evidenciam que *N. caninum* exerce influência significativa sobre mecanismos celulares

inflamatórios; contudo, até o momento, não há evidências experimentais robustas que estabeleçam de forma direta a participação do eixo RIPK1–RIPK3–MLKL na infecção por esse parasito.

Estudos com emodina demonstraram aumento de marcadores associados à necroptose, como pMLKL e liberação de LDH, em macrófagos infectados por *N. caninum*. No entanto, o efeito antiparasitário foi semelhante em células WT e *Mkl*^{-/-}, indicando que sua atividade é independente da necroptose mediada por MLKL. Esses achados sugerem que a emodina atua principalmente por efeito direto sobre o parasito, embora MLKL contribua parcialmente para o controle basal da proliferação parasitária (F. Liu et al., 2025).

Embora a necroptose possa contribuir para o controle de parasitos intracelulares em determinados contextos experimentais, sua ativação desregulada está associada à inflamação exacerbada, necrose tecidual e imunopatologia, especialmente em infecções persistentes. Dessa forma, o papel da necroptose nas infecções por Apicomplexa reflete seu caráter ambivalente, atuando tanto como mecanismo potencial de defesa quanto como possível mediador de dano tecidual quando não adequadamente regulada.

2.4 PANoptoses

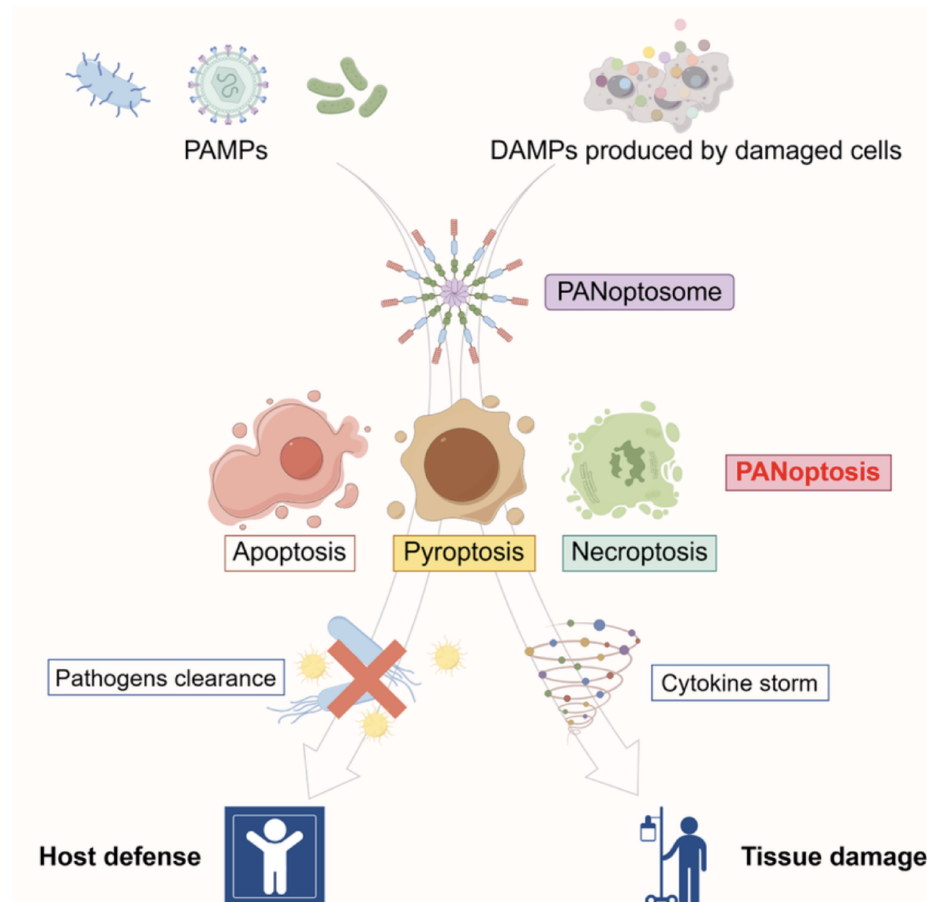


Figura 6. PANoptose na defesa do hospedeiro e no dano tecidual **Fonte:** Jiang (2024).

A PANoptose é uma via emergente de morte celular regulada altamente inflamatória, que integra de maneira coordenada componentes moleculares clássicos da apoptose, piroptose e necroptose (Gao et al., 2024; W. Jiang et al., 2021). Diferentemente das vias tradicionais de morte celular, que geralmente seguem rotas de ativação relativamente bem definidas e independentes, a PANoptose caracteriza-se pela ativação simultânea e interdependente de múltiplos mecanismos executores, culminando em uma resposta inflamatória robusta e amplificada (Gao et al., 2024).

Essa via é mediada por complexos multiproteicos denominados PANoptossomos, os quais atuam como plataformas de sinalização capazes de reunir sensores imunológicos, proteínas adaptadoras, caspases

inflamatórias e apoptóticas, além de quinases envolvidas na necroptose. Entre os principais componentes descritos nesses complexos estão as caspases-1, -8 e -3/7, as quinases RIPK1 e RIPK3, a proteína MLKL, a gasdermina D (GSDMD) e a proteína NINJ1, bem como sensores moleculares como ZBP1, AIM2, NLRP3 e NLRP12, que permitem a integração de múltiplos sinais de perigo intracelulares (Y. Jiang et al., 2025; Ma et al., 2025; Qi et al., 2023).

A ativação da PANoptose ocorre, em geral, em contextos de infecção ou inflamação intensa, nos quais diversos sinais de estresse celular, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e sinais de dano celular (DAMPs) são detectados simultaneamente pela célula hospedeira. Nessas condições, a convergência das vias apoptótica, piroptótica e necroptótica possibilita a superação de mecanismos de evasão patogênica que bloqueiam seletivamente apenas uma forma de morte celular, assegurando a eliminação de células infectadas mesmo quando vias isoladas são inibidas (Karaca & Oral, 2025; Pandian & Kanneganti, 2022)

Do ponto de vista morfológico e imunológico, a PANoptose compartilha características com as vias líticas de morte celular regulada, incluindo a permeabilização da membrana plasmática, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18, e de padrões moleculares associados a dano (DAMPs), bem como a amplificação da resposta inflamatória local (Gao et al., 2024; Sipos & Múzes, 2025). No entanto, sua principal característica distintiva reside na ativação concomitante de múltiplos executores moleculares, o que a diferencia qualitativamente das demais formas de morte celular regulada.

Apesar dos avanços recentes na caracterização da PANoptose, diversos aspectos relacionados à sua regulação molecular, especificidade celular e relevância fisiopatológica ainda permanecem em investigação. Ainda não está completamente estabelecido se todos os tipos celulares possuem o repertório proteico necessário para a execução plena da PANoptose, nem de que maneira patógenos intracelulares, como os parasitas do filo Apicomplexa, modulam, exploram ou evitam essa via ao longo do curso da infecção (Hou et al., 2025). Assim, a PANoptose representa um campo emergente de grande interesse para a compreensão das interações hospedeiro-patógeno e dos mecanismos que regulam a inflamação e o dano tecidual (Cai et al., 2025).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel da proteína NINJ1 na resposta imune do hospedeiro durante infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, com ênfase na sua participação nos mecanismos de piroptose e na ruptura terminal da membrana plasmática.

3.2 Objetivos específicos

- Gerar linhagens celulares deficientes para NINJ1 (*Ninj1*^{-/-}) por meio de edição genética utilizando tecnologia CRISPR-Cas9;
- Avaliar a permeabilidade da membrana plasmática e a citotoxicidade, além da ativação das caspases-1/11, durante as infecções pelos protozoários em linhagens celulares selvagens (WT) e *Ninj1*^{-/-};
- Analisar o papel de *Ninj1* no controle da carga parasitária de *T. gondii* e *N. caninum* em linhagens celulares WT e *Ninj1*^{-/-};

NINJ1 orchestrates Pyroptotic death in *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection

Natalia Acosta Olivera, Marya Fernanda Santos Lopes, João Vitor Eleutério da Silva, Jhoan David Aguillón Torres, Caroline Martins Mota¹, and Tiago Wilson Patriarca Mineo*

¹Laboratory of Immunoparasitology "Dr. Mário Endsfieldz Camargo", Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, ^ Av. Amazonas, 4C01, Campus Umuarama, Uberlandia, ^ Minas Gerais 38405-320, Brazil

*** Correspondence:**
Corresponding Author
tiago.mineo@ufu.br

Keywords: NINJ1; pyroptosis; inflammasome; plasma membrane rupture; innate immunity; lytic cell death.

1. Abstract

For full guidelines please refer to [Author Guidelines](#)

The innate immune system restricts intracellular pathogens through programmed cell death pathways that limit replication and promote inflammation. Ninjurin-1 (NINJ1), a conserved plasma membrane protein, has recently emerged as a key mediator of terminal plasma membrane rupture during lytic cell death; however, its role during parasitic infection remains poorly defined. Here, we investigated whether NINJ1 contributes to infection control and modulation of the immune response during infection with the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. Using *Ninj1*-deficient (*Ninj1*^{-/-}) cells generated by CRISPR/Cas9, we evaluated plasma membrane permeabilization, cytolysis, inflammasome activation, and intracellular parasitism. Infection with either parasite was associated with *Caspase-1* activation and early plasma membrane permeabilization in both wild-type and *Ninj1*^{-/-}. In contrast, *Ninj1* deficiency markedly reduced lactate dehydrogenase release while preserving PI incorporation, indicating impaired terminal plasma membrane rupture. Loss of *Ninj1* also differentially affected intracellular parasite burden, reducing *T. gondii* replication while having minimal impact on *N. caninum*. These findings identify NINJ1 as a downstream effector of inflammasome signaling that executes terminal

plasma membrane rupture during the infection by both parasites, linking inflammatory cell death to host–parasite dynamics.

Introduction

The innate immune system represents the first line of host defense against pathogens by using pattern recognition patterns (PRRs) to detect pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and danger-associated molecular patterns (DAMPs) (1). Activation of PRRs triggers antimicrobial such as cytokine production, inflammasome assembly, and programmed cell death (2), which together limit pathogen replication and shape the inflammatory responses (3).

Programmed cell death (PCD) is a central host defense mechanism against intracellular pathogens (4). Among the different PCD modalities, Pyroptosis has emerged as a key innate immune mechanism against bacterial, viral, and protozoan pathogens (5). This process is triggered by inflammasome-forming PRRs, such as NLRP3, NLRC4, and AIM2, which assemble cytosolic multiprotein complexes that activate Caspase-1. Activated Caspase-1 promotes both cytokine maturation and the cleavage of Gasdermin D (GSDMD), whose N-terminal fragment oligomerizes and inserts into the plasma membrane to form pores (6,7). Gasdermin pores disrupt the electrochemical gradient of the plasma membrane, leading to water influx, cell swelling, and ultimately osmotic lysis. Beyond their mechanical effects, pore formation also activates the membrane protein Ninjurin-1 (NINJ1), which oligomerizes to drive complete plasma membrane rupture (PMR) and the release of large cytosolic molecules and DAMPs (8).

NINJ1 functions as a conserved terminal effector of lytic cell death downstream of executors such as GSDMD, GSDME, MLKL, and Caspase-3, mediating the final rupture of the cell membrane (8,9).

NINJ1 has been widely characterized in sterile inflammation, but its function during infection remains poorly defined. Although NINJ1 has been widely characterized in sterile inflammation, its function during infection remains poorly defined. This question is particularly relevant in the context of apicomplexan parasites such as *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, which replicate within parasitophorous vacuoles and modulate host immune responses to ensure persistence. Although inflammasome activation contributes to resistance against *T. gondii* (10,11), it remains unclear whether

this response also leads to NINJ1 activation and whether NINJ1 participates in pathogen-induced cell death or immune modulation during apicomplexan infection.

Previous studies have shown that inflammasome activation is an important component of host defense against apicomplexan parasites. In *N. caninum*, ROS promote activation of NLRP3 and NLRC4 inflammasomes, leading to Caspase-1 activation, IL-1 β and IL-18, and the induction of pyroptosis (13,14). Similarly, in *T. gondii* infection, inflammasomes such as NLRP1 and NLRP3 contribute to cytokine production and parasite restriction, although the parasite can also modulate inflammasome assembly. Together, these findings show the ROS–inflammasome axis as a key mechanism of host defense against Apicomplexan parasites (15). In this study, we investigated the role of NINJ1 in lytic cell death and immune response modulation during the infection with *T. gondii* and *N. caninum*.

2. Materials and Methods

Generation of NINJ1 Knockout (Δ Ninj1) DC2.4 and RAW 264.7 Cells

Ninj1-deficient DC2.4 dendritic cells and RAW 264.7 macrophages were generated using CRISPR–Cas9–mediated genome editing. A single guide RNA (sgRNA) targeting exon 1 of the murine *Ninj1* locus, immediately downstream of the translation start codon, was designed using e-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP>) and HostDB (<http://grna.ctegd.uga.edu/>) platforms. Complementary oligonucleotides corresponding to the sgRNA sequence were annealed and cloned into the BbsI-digested px330-T2A vector (Addgene plasmid #64323) using T4 DNA ligase.

Ligation products were transformed into chemically competent *Escherichia coli* DH5 α cells by heat shock, and positive colonies were selected on LB agar plates containing ampicillin. Plasmids were purified using the GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) and verified by restriction enzyme digestion prior to transfection.

For homology-directed repair (HDR), donor constructs containing a CMV-driven fluorescent reporter (eBFP or tdTomato) and a neomycin resistance cassette were amplified using a high-fidelity polymerase.

Primer name	Type	Sequence (5'→3')
gRNA NINJ1 FWD	sgRNA cloning oligo (px330 BbsI)	CACCGCCTCGTGTGCAGATAGGAG

gRNA NINJ1 REV	sgRNA cloning oligo (px330 BbsI)	AAACCTCCTATCTGCACACGAGGC
<i>Ninj1</i> repair homology Fwd	HDR homology arm (5' side)	GAGGGTCGGAACCCCTGTGCACTCTTCCTGTAGCTCACCG TATCCCCCTGATTCTGTG
<i>Ninj1</i> repair homology Rev	HDR homology arm (3' side)	CTTACTCCCTGAGGGCCAAGAGTCTGAGGTGAAACCACTG CGTTGGGCGTCGCTTGGTC

Cells (1×10^5 per well, 24-well plate) were transfected with 1–2 μ g of CRISPR–Cas9 plasmid and 400–800 ng of HDR template using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in Opti-MEM medium. After 4–5 h, the medium was replaced with complete culture medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), and cells were incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂. Transfected cells were selected with Geneticin (G418, 500 μ g/mL) and single-cell cloned by limiting dilution in 96-well plates (0.5–1 cell per well).

Parasites and Cell Culture

T. gondii (type I RH strain) and *N. caninum* (NcLiv) tachyzoites were maintained by serial passage in human foreskin fibroblast (HFF) monolayers cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Campinas, Brazil), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, USA), 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin (Gibco, USA). Cultures were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Wild-type and *Ninj1*^{-/-} DC2.4 dendritic cells were cultured in T25 flasks in RPMI-1640 medium (Gibco, Paisley, UK) supplemented with 25 mM HEPES (Gibco), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (Gibco), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, USA), 3 mM NaHCO₃, and 10% fetal bovine serum. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere and used for infection assays.

Parasite burden

Intracellular parasitism by *T. gondii* and *N. caninum* was assessed using quantitative and microscopy-based approaches. Wild-type (WT) and NINJ1-deficient (*Ninj1*^{-/-}) cells were infected with tachyzoites at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 and incubated for 18 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Following infection, cells were fixed and imaged by fluorescence microscopy for DC2.4 dendritic cells and by light microscopy for RAW 264.7 using identical acquisition

settings across experimental conditions. After image acquisition, intracellular tachyzoites were quantified using ImageJ software by counting the number of parasites located within host cells. For each condition, at least 20 randomly selected fields were analyzed per experiment. Data were obtained from three independent experiments and are expressed as mean \pm SEM.

Functional Assays

Propidium Iodide (PI) Uptake Assay

To evaluate plasma membrane rupture, *Ninj1*^{-/-} and wild-type (WT) DC2.4 cells were seeded at 2×10^5 cells per well (1×10^6 cells/mL) in 96-well black plates with clear bottoms (Costar, USA). Before infection, the medium was replaced with phenol red-free DMEM containing 2% FBS, NaHCO₃ (0.038 g/mL), and propidium iodide (PI, 6 μ g/mL). Cells were infected with *T. gondii* or *N. caninum* tachyzoites at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 and maintained at 37 °C and 5% CO₂. PI fluorescence was recorded every 5 min for 200 min (excitation 538 nm; emission 617 nm) using a SpectraMax M2e plate reader (Molecular Devices, USA). Representative images were acquired with an EVOS FL fluorescence microscope (Thermo Fisher Scientific).

Lactate Dehydrogenase (LDH) Release Assay

Cytotoxicity was quantified by measuring LDH released into culture supernatants. DC2.4 cells (2×10^5 per well) were seeded in 96-well plates and infected with *T. gondii* and *N. caninum* tachyzoites (MOI 0.5) for 24 h. Cell-free supernatants were collected, and LDH activity was determined using a colorimetric cytotoxicity detection kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as percentages relative to maximal LDH release induced by 1% Triton X-100.

Caspase-1/11 Activation (FLICA Staining)

Caspase-1/11 activation was assessed using the fluorescent inhibitor probe FAM-YVAD-FMK (FLICA, ImmunoChemistry Technologies, USA). WT and Δ Ninj1 DC2.4 cells were infected with *T. gondii* or *N. caninum* tachyzoites (MOI 0.5) for 24 h, incubated with FLICA reagent for 1 h at 37 °C, and washed twice with PBS. Fluorescence was visualized by epifluorescence microscopy (EVOS FL) and quantified by measuring relative fluorescence units (RFU) using a SpectraMax M2e plate reader (excitation 488 nm; emission 530 nm).

Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

To evaluate NINJ1 mRNA expression, bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from wild-type C57BL/6 (B6) and MyD88^{-/-} mice were infected with *N. caninum* and *T. gondii* tachyzoites at the indicated multiplicity of infection and harvested at 1 and 6 hours post-infection (hpi).

Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions, and cDNA was synthesized from 1 µg of RNA. Quantitative real-time PCR was performed using PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix in a StepOneTM StepOnePlusTM Real-Time PCR System. Ninj1 expression was quantified using exon-specific primers targeting exon 1 and exon 2, and primer sequences are listed in Table 1.

Mice

C57BL/6 wild-type and *Caspase-1/11*^{-/-} mice were obtained from the institutional animal facility and maintained under specific pathogen-free (SPF) conditions. Female mice aged 6–10 weeks were used for bone marrow isolation. Animals were housed in individually ventilated cages under a 12 h light/dark cycle, at a controlled temperature of 22 ± 2 °C and relative humidity of 55 ± 10%, with food and water available *ad libitum*. All animal procedures were approved by the institutional Animal Ethics Committee (CEUA/UFU) under protocol number 029/12 (Annex I).

Differentiation of Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDMs)

Bone marrow stem cells were isolated from femurs and tibiae of WT and *Caspase-1/11*^{-/-} mice, cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 20% FBS, 30% L929 cell-conditioned medium (LCCM), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine. Cells were maintained in non-tissue-culture-treated Petri dishes at 37 °C in 5% CO₂. On day 4, fresh medium was added. After 7 days, adherent cells were collected, confirmed as CD11b⁺ macrophages (>95%) by flow cytometry, and used for infection assays.

Infection of BMDMs

BMDMs were infected with *N. caninum* or *T. gondii* tachyzoites. After 2 h, extracellular parasites were removed by washing twice with PBS, and cells were incubated in fresh medium for 6, 12, or 24 hr as indicated. Uninfected cells served as controls.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. Comparisons between two groups were performed using unpaired two-tailed Student’s *t* tests. Comparisons involving more than two groups or experimental factors were analyzed using ordinary one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey’s or Bonferroni’s post hoc tests as appropriate. Kinetic analyses of propidium iodide (PI) uptake were evaluated using two-way repeated-measures ANOVA. Data are presented as mean ± SEM, and statistical significance was defined as $p < 0.05$. All experiments were independently repeated at least twice, with each condition analyzed in triplicate.

Ethics Statement

All protocols involving mice were previously approved by the institution’s animal research ethics committee (Protocol number 23117.075839/2023-94) and were conducted in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), endorsed by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, CONCEA; https://olaw.nih.gov/sites/default/files/Guiding_Principles_2012.pdf). The Animal Facilities Network (Rede de Biotérios, REBIR/UFU) is accredited by the National Commissions for Animal Experimentation (CONCEA, CIAEP 01.0105.2014) and Biosecurity (CTNBio, CQB 163/02). All experimental procedures followed institutional and national biosafety and ethical guidelines, with efforts made to minimize animal suffering and the number of animals used.

3. Results

Generation and validation of Δ *Ninj1* DC2.4 and RAW 264.7 cells

we generated *Ninj1*^{-/-} DC2.4 dendritic cells and RAW 264.7 macrophages using a CRISPR/Cas9 strategy coupled to homology-directed repair (HDR). As outlined in **Figure 1A**, the editing strategy targeted the 5’ region of the murine *Ninj1* locus, spanning the exon 1–2 region, and employed an HDR donor construct containing a pCMVIE-driven eBFP reporter and a neomycin resistance cassette (NeoR) for

G418/Geneticin selection, flanked by homology arms. HDR-mediated integration was designed to disrupt the endogenous *Ninj1* locus and generate Δ *Ninj1* cells.

Successful editing was confirmed by diagnostic PCR. As shown in Figure 1B, the two edited clones (KO1 and KO2) displayed a distinct lower-migrating amplicon pattern compared with the wild-type (WT) control, consistent with modification of the targeted *Ninj1* locus. These data support successful genomic editing in the selected clones.

Representative fluorescence images further confirmed the establishment of edited cell populations (Figure 1C). Together, these results validated the generation of Δ *Ninj1* DC2.4 and RAW 264.7 cells and established these models for subsequent analyses of inflammasome activation, membrane permeabilization, cytolysis, and intracellular parasitism during infection with *T. gondii* and *N. caninum*.

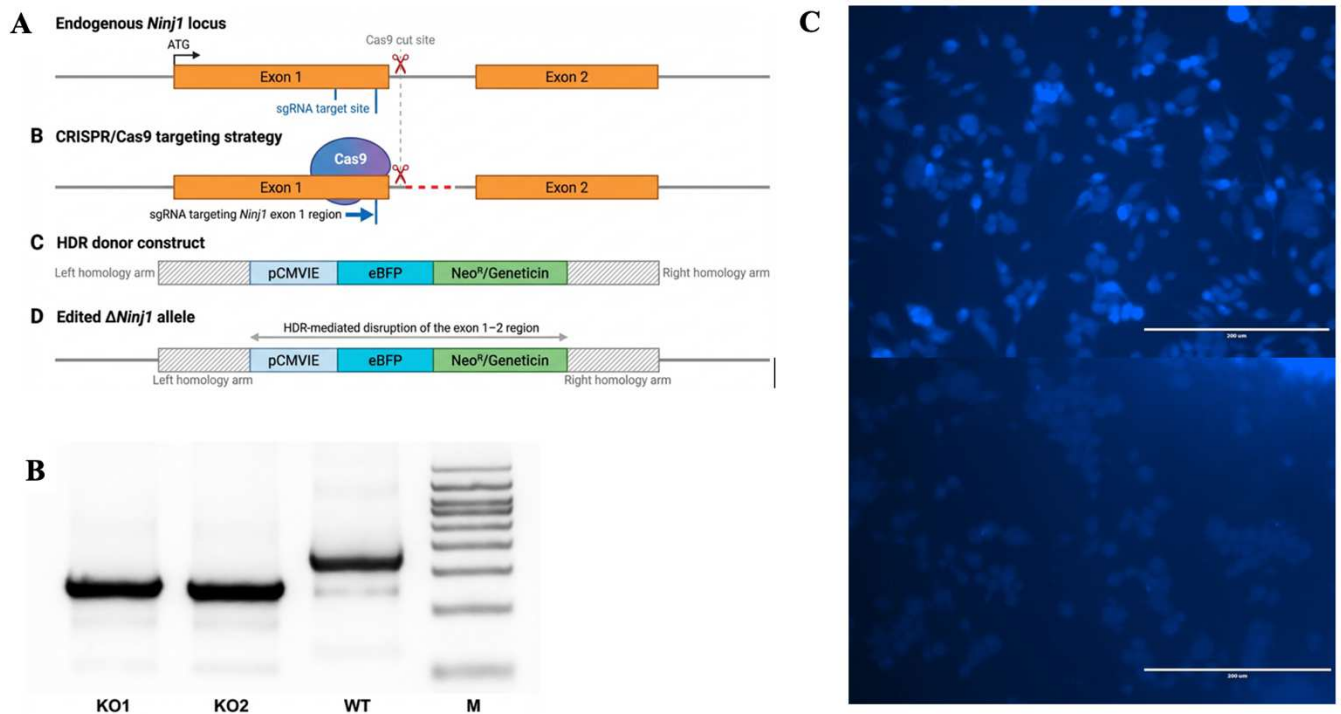


Figure 1. Generation and validation of *Ninj1*^{-/-} cells.

(A) Schematic representation of the CRISPR/Cas9-HDR strategy used to generate *Ninj1*^{-/-}. An sgRNA targeting the 5' region of the murine *Ninj1* locus was used together with an HDR donor construct containing a pCMVIE-driven eBFP reporter and a neomycin resistance cassette (NeoR) for G418/Geneticin selection, flanked by homology arms. HDR-mediated insertion was designed to disrupt the exon 1–2 region of the endogenous *Ninj1* locus. (B) Diagnostic PCR confirmation of edited clones. (C) Representative fluorescence images of edited cells showing eBFP expression (blue) with a 200 μm scale bar.

Representative agarose gel showing two knockout clones (KO1 and KO2), a wild-type control (WT), and a molecular marker (M). The edited clones displayed lower-migrating amplicons compared with the WT control, consistent with modification of the targeted *Ninj1* locus. (C) Representative fluorescence images of edited cell populations. Scale bars, 200 μm .

***Ninj1* expression remains stable during early *T. gondii* and *N. caninum* infection in BMDMs**

Ninj1 expression was not significantly altered in BMDMs following infection with *T. gondii* or *N. caninum*. In BMDMs infected with *T. gondii*, transcript levels of *Ninj1* exon 1 and exon 2 remained comparable to those of non-infected controls at 1 and 6 hours post-infection (hpi) (Figure 2A, C). Similarly, infection with *N. caninum* did not induce significant changes in *Ninj1* exon 1 or exon 2 expression at the same time points (Figure 2B, D). These findings indicate that early infection with either parasite does not significantly modulate *Ninj1* transcription in BMDMs.

Transcriptomic data generated by our group were consistent with these observations, showing no robust induction of *Ninj1* expression during infection. Together, these results suggest that *Ninj1* is not transcriptionally upregulated during the early macrophage response to *T. gondii* or *N. caninum*.

A similar pattern was observed in both wild-type (B6) and *Myd88*^{-/-} BMDMs. Two-way ANOVA revealed no significant effects of *Myd88* deficiency, time post-infection, or their interaction on *Ninj1* exon 1 or exon 2 expression. Thus, under these conditions, *Ninj1* transcription does not appear to be regulated by MyD88-dependent signaling during early apicomplexan infection.

Although *Ninj1* expression remained stable at the mRNA level, these findings did not exclude a functional role for NINJ1 during infection. Instead, they suggested that its contribution to host-parasite interactions may depend more on post-transcriptional regulation or protein function than on early transcriptional induction.

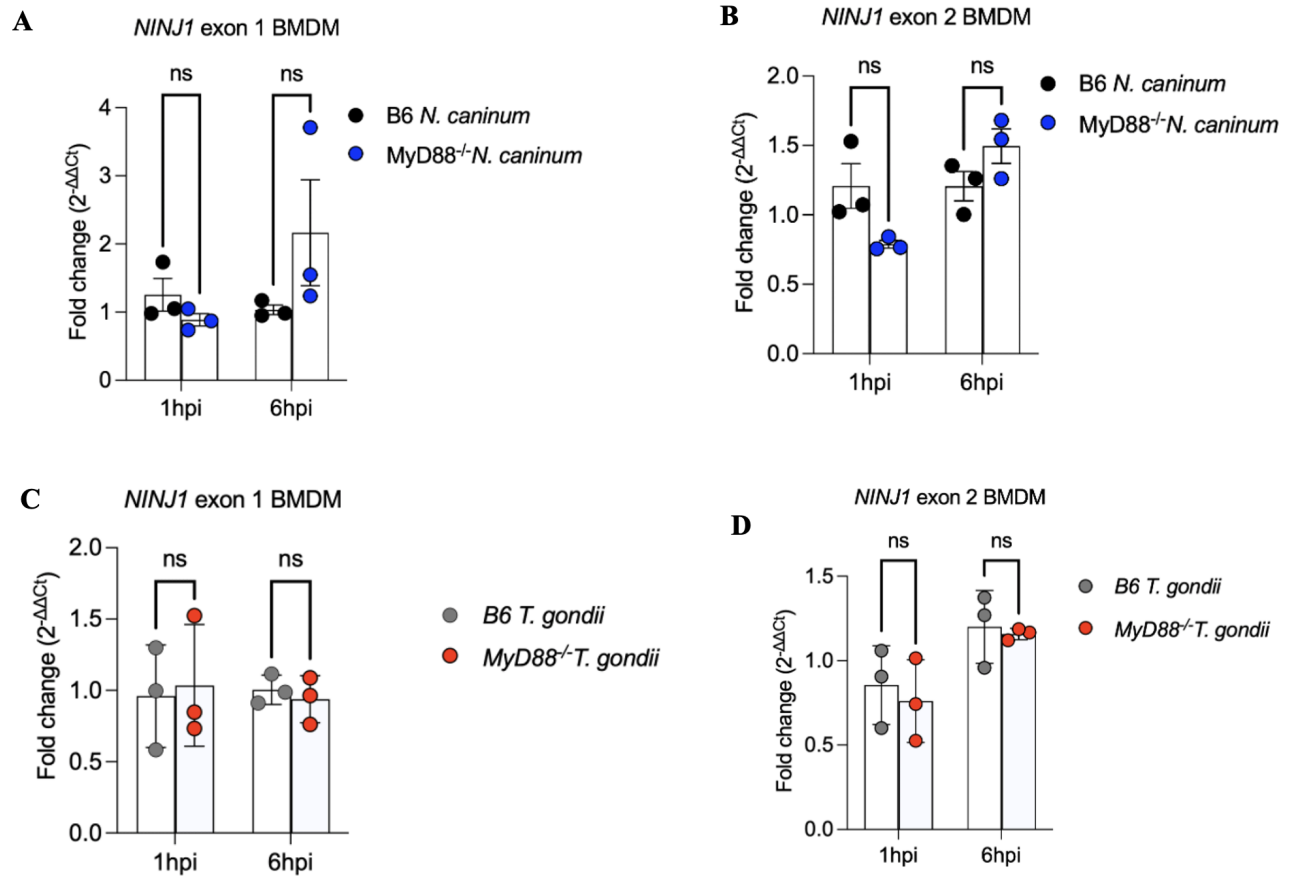


Figure 1. *Ninj1* expression in BMDMs following *T. gondii* or *N. caninum* infection.

(A–D) Relative mRNA expression levels of *Ninj1* exon 1 (A, C) and *Ninj1* exon 2 (B, D) in bone marrow–derived macrophages (BMDMs) obtained from WT (C57BL/6) and *MyD88*^{-/-} mice and infected with *Neospora caninum* (A, B) or *Toxoplasma gondii* (C, D). Gene expression was measured by *RT-qPCR* at 1 and 6 hours post-infection (hpi) and normalized to GAPDH. Data are expressed as fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Statistical analyses were performed using two-way ANOVA to assess the effects of genotype and time post-infection, followed by Bonferroni’s post hoc test where applicable. Bars represent **mean ± SEM** from three independent experiments. ns, not significant.

NINJ1 differentially affects *T. gondii* and *N. caninum* parasitism in DC2.4 dendritic cells

Quantitative analysis and fluorescence microscopy showed that the impact of NINJ1 deficiency on intracellular parasitism differed according to parasite species in DC2.4 dendritic cells. In these cells, *Ninj1*^{-/-} significantly reduced intracellular *T. gondii* burden, whereas *N. caninum* replication remained unchanged, as determined by parasite counts and representative fluorescence images. These findings

indicate that NINJ1 favors intracellular parasitism by *T. gondii* but is dispensable for *N. caninum* infection in DC2.4 cells.

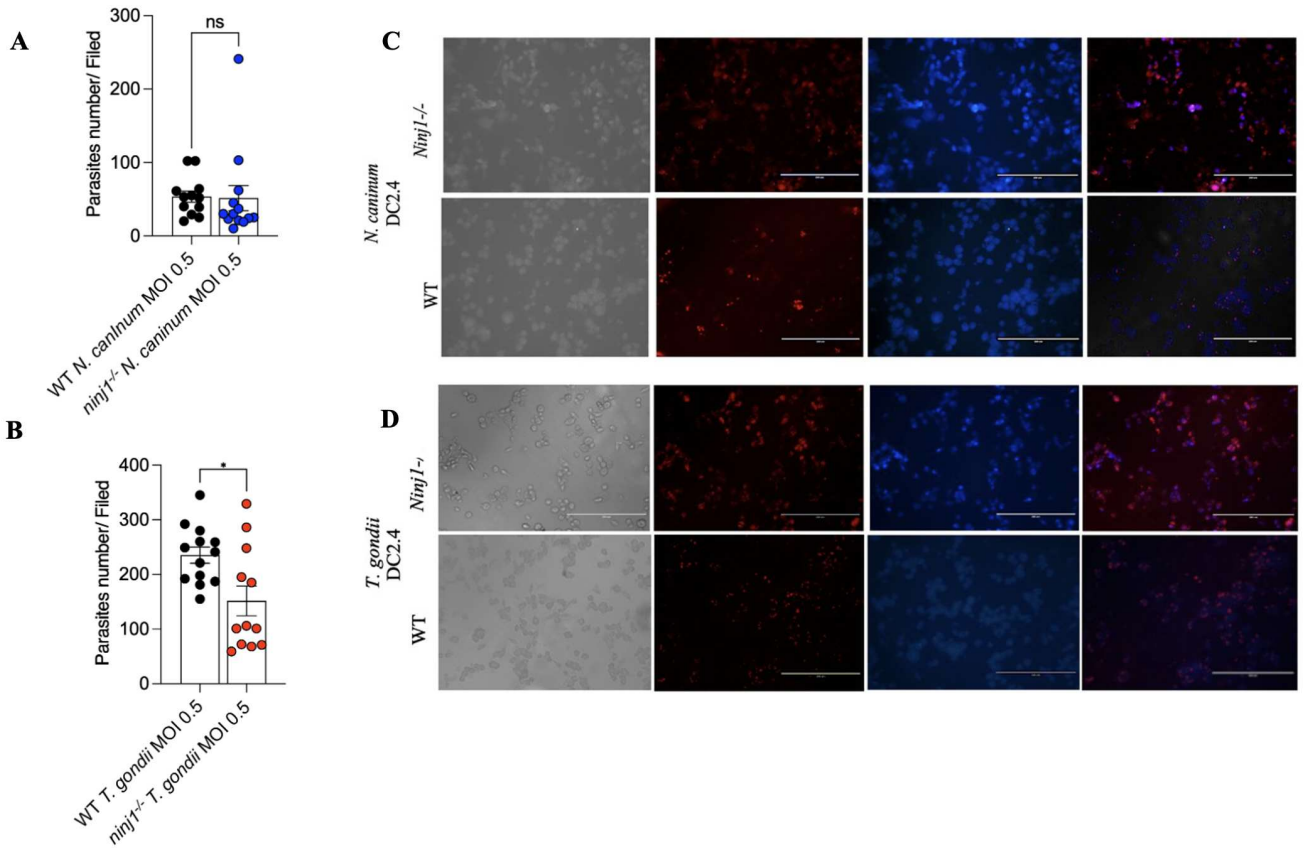


Figure 2. *Ninj1*^{-/-} affects parasitism during *T. gondii* and *N. caninum* infection.

(A–B) Quantification of intracellular tachyzoites per field in wild-type (WT) and NINJ1-deficient (*Ninj1*^{-/-}) DC2.4 cells infected with *T. gondii* (A) and *N. caninum* (B) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 for 24 h. Parasite numbers were quantified from fluorescence microscopy images by counting intracellular tachyzoites per field. Data were analyzed using unpaired two-tailed Student’s t test. (C–D) Representative fluorescence microscopy images of WT and ΔNinj1 DC2.4 cells infected with *T. gondii* (C) and *N. caninum* (D). Parasites are shown in red and host cell nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bars, 50 μm. Bars represent mean ± SEM from three independent experiments. ns, not significant; p < 0.05.

Quantitative analysis and representative light microscopy images showed that NINJ1 deficiency differentially affected intracellular parasitism depending on parasite species. In RAW 264.7 macrophages, *Ninj1*^{-/-} significantly reduced intracellular *T. gondii* burden, whereas no significant differences were observed during *N. caninum* infection. These findings indicate that NINJ1 favors intracellular parasitism by *T. gondii* but is dispensable for *N. caninum* infection under the conditions tested.

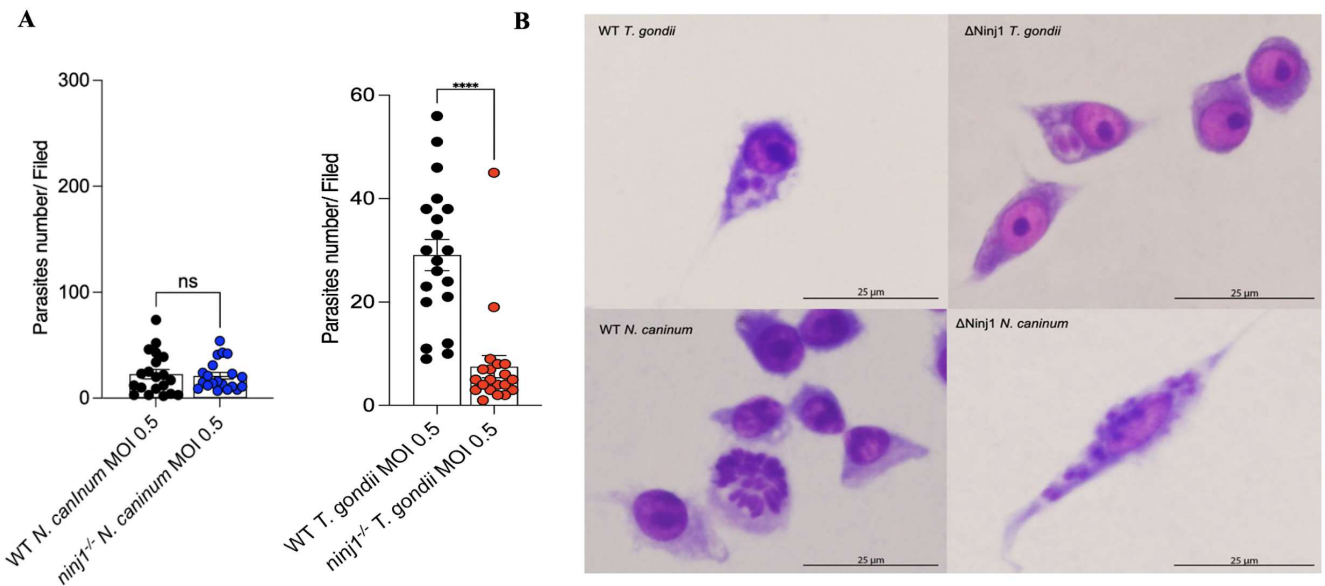


Figure 3. *Ninj1*^{-/-} affects intracellular parasitism by *T. gondii* and *N. caninum* in RAW 264.7 macrophages.

(A) Quantification of intracellular tachyzoites per field in wild-type (WT) and *Ninj1*^{-/-} RAW 264.7 macrophages infected with *N. caninum* (left) or *T. gondii* (right) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 for 24 h. Intracellular parasite burden was quantified by counting tachyzoites per field. Bars represent mean \pm SEM from three independent experiments. Statistical analysis was performed using an unpaired two-tailed Student's *t* test; **** *p* < 0.0001; ns, not significant.

(B) Representative light microscopy images of WT and *Ninj1*^{-/-} RAW 264.7 macrophages infected with *T. gondii* (upper panels) or *N. caninum* (lower panels) for 24 h at an MOI of 0.5. Scale bars, 25 μ m.

NINJ1 acts downstream of inflammasome signaling to drive terminal plasma membrane rupture during the infection.

Plasma membrane integrity and cytolysis were assessed by propidium iodide (PI) uptake and lactate dehydrogenase (LDH) release in DC2.4 dendritic cells and BMDMs (Figure 3). Infection with *T. gondii* or *N. caninum* induced a progressive increase in PI fluorescence in wild-type (WT) cells, indicating plasma membrane permeabilization. *Ninj1*^{-/-} DC2.4 cells displayed PI uptake kinetics comparable to WT cells, demonstrating that early membrane permeabilization occurs independently of NINJ1.

In contrast, LDH release was markedly reduced in *Ninj1*^{-/-} cells, particularly during *T. gondii* infection, revealing impaired cytosolic content release despite preserved membrane permeability. These data indicate that NINJ1 is dispensable for initial membrane permeabilization but required for terminal plasma membrane rupture and efficient cytolysis (Figure 3c).

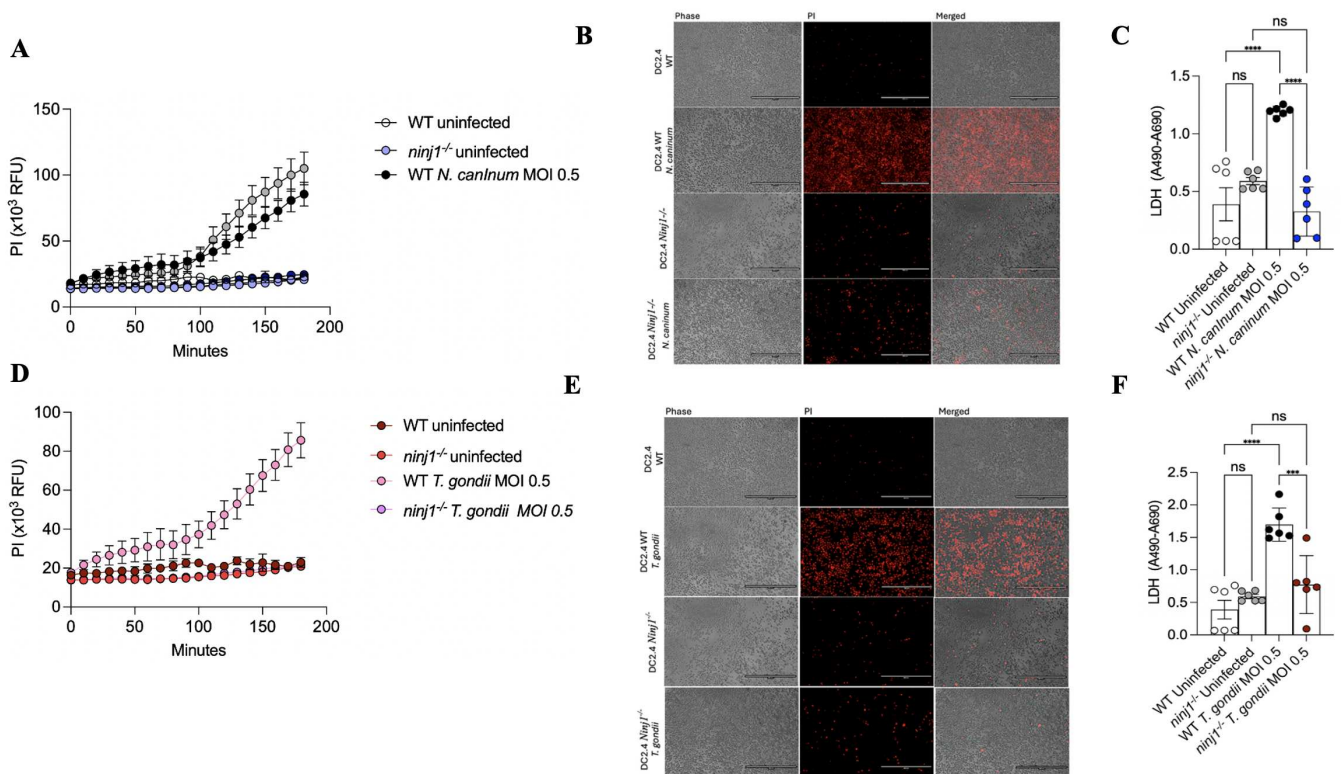


Figure 3. NINJ1 is dispensable for early plasma membrane permeabilization and contributes to LDH release during *T. gondii* and *N. caninum* infection.

(A–C) Analysis of membrane permeabilization and LDH release in wild-type (WT) and *Ninj1*^{-/-} DC2.4 cells infected with *N. caninum* (MOI 0.5). (A) Kinetics of propidium iodide (PI) uptake monitored for 200 min post-infection. (B) Representative phase-contrast, PI fluorescence (red), and merged images illustrating plasma membrane permeabilization under the indicated conditions. Scale bars as indicated. (C) Quantification of lactate dehydrogenase (LDH) release under the same conditions. (D–F) Analysis of membrane permeabilization and LDH release in WT and *Ninj1*^{-/-} DC2.4 cells infected with *T. gondii* (MOI 0.5). (D) Kinetics of PI uptake. (E) Representative images as described above. (F) Quantification of LDH release. PI fluorescence kinetics were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. LDH release was analyzed by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test. Data represent mean ± SEM from three independent biological experiments. ns, not significant; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Consistent with this model, *Caspase-1/11*^{-/-} BMDMs showed only partial reductions in PI uptake following infection, suggesting that parasite-induced membrane permeabilization is partially Caspase-1/11 dependent, while NINJ1 is necessary to execute the final lytic event. Together, these findings identify NINJ1 as a downstream effector linking inflammasome signaling to terminal plasma membrane rupture during *T. gondii* and *N. caninum* infection (Figure 4).

Caspase-1/11 has a limited impact on parasite-induced plasma membrane permeabilization in BMDMs

We monitored propidium iodide (PI) uptake in wild-type (WT) and *Caspase-1/11*^{-/-} bone marrow-derived macrophages (BMDMs) infected with *N. caninum* or *T. gondii*. In both infection models, PI fluorescence increased in infected cells relative to uninfected controls, indicating infection-associated plasma membrane permeabilization. However, despite these increases, no significant differences were detected between infected WT and infected *Caspase-1/11*^{-/-} BMDMs in the key pairwise comparisons at the analyzed time points or in the endpoint measurements. Together, these findings indicate that parasite-induced PI uptake is largely maintained in the absence of Caspase-1/11, supporting the interpretation that Caspase-1/11 plays only a limited role in the initial membrane permeabilization triggered by *N. caninum* and *T. gondii* under the conditions tested.

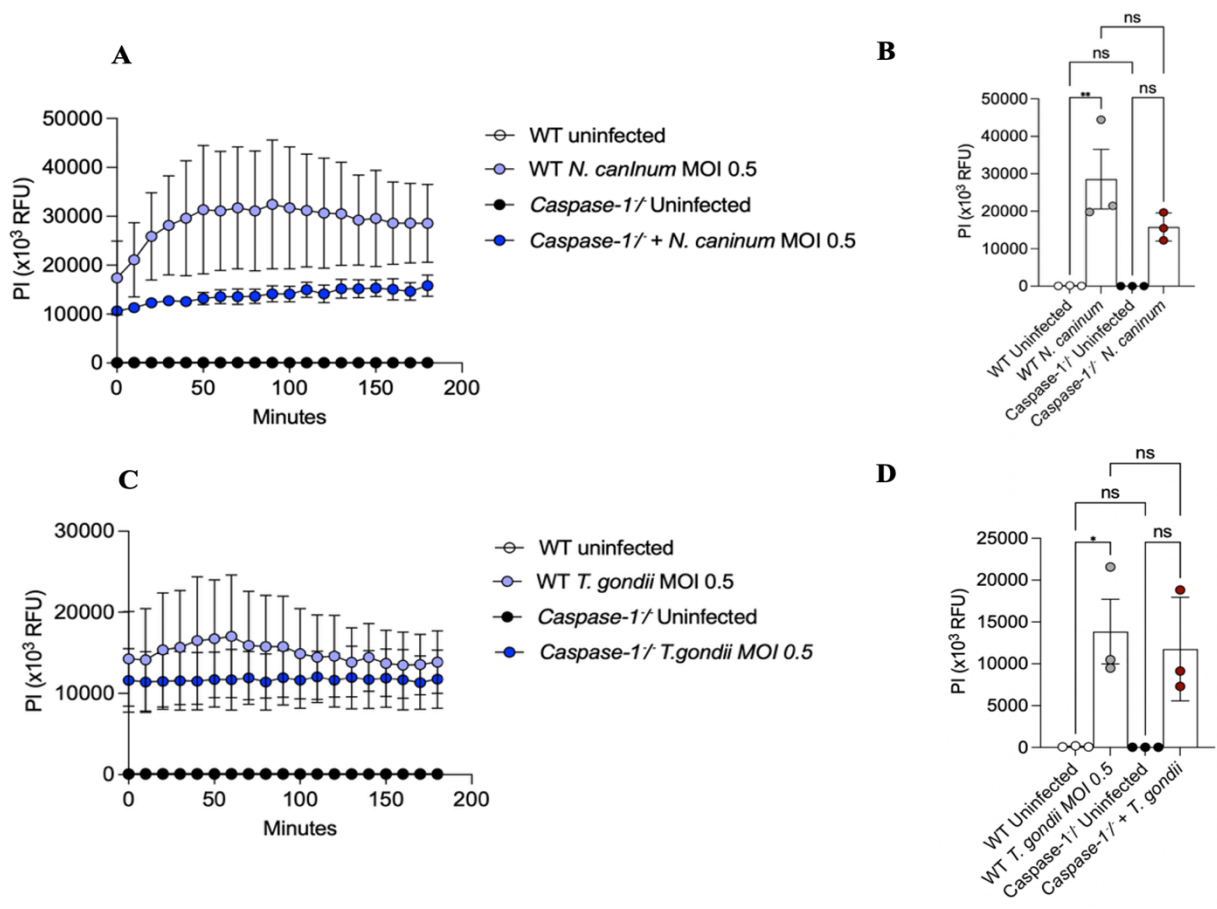


Figure 4. *Caspase-1/11* has a limited impact on parasite-induced plasma membrane permeabilization in BMDMs.

(A–B) Kinetics of propidium iodide (PI) uptake (A) and endpoint quantification at 200 min post-infection (B) in wild-type (WT) and *Caspase-1/11*^{-/-} bone marrow-derived macrophages (BMDMs) infected with *N. caninum* at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5.

(C–D) Kinetics of PI uptake (C) and endpoint quantification at 200 min post-infection (D) in WT and *Caspase-1/11*^{-/-} BMDMs infected with *T. gondii* at an MOI of 0.5. PI fluorescence was monitored for 200 min post-infection. Kinetic data were analyzed by two-way ANOVA followed by Šídák’s multiple-comparisons test. Endpoint measurements were analyzed by one-way ANOVA. Bars represent mean ± SEM from three independent experiments. ns, not significant; $p < 0.05$; $*p < 0.01$.

NINJ1 deficiency has limited impact on FAM-YVAD-FMK-detected caspase activity during *T. gondii* and *N. caninum* infection

we quantified FAM-YVAD-FMK fluorescence in WT and *Ninj1*^{-/-} DC2.4 cells infected with *T. gondii* or *N. caninum*. In both infection models, infected cells showed a modest increase in fluorescence relative to uninfected controls. However, no significant differences were detected between WT and *Ninj1*^{-/-} infected cells for either parasite. These findings indicate that NINJ1 deficiency does not significantly alter FAM-YVAD-FMK-detected caspase activity under these conditions, supporting a role for NINJ1 downstream of inflammasome-associated caspase signaling during terminal cell lysis.

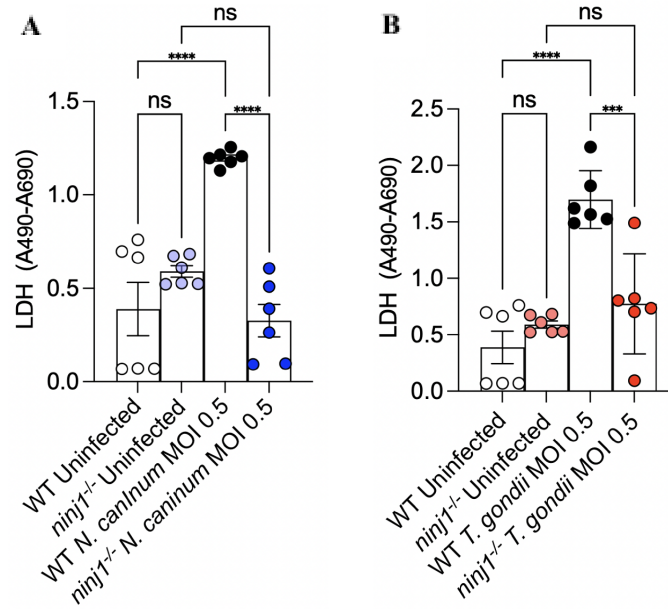


Figure 5. *Ninj1*^{-/-} has limited impact on FAM-YVAD-FMK fluorescence during *T. gondii* and *N. caninum* infection.

(A–B) Quantification of FAM-YVAD-FMK fluorescence intensity ($\times 10^3$ RFU) in WT and *Ninj1*^{-/-} DC2.4 cells infected with *T. gondii* (A) and *N. caninum* (B) at an MOI of 0.5 for 24 h. Bars represent mean \pm SEM from three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple-comparisons test. ns, not significant.

4. Discussion

Overview and findings

Our findings position NINJ1 as a conserved executor of terminal plasma membrane rupture during infection by both *T. gondii* and *N. caninum*, while revealing that the biological consequences of this rupture differ between the two parasites. Consistent with previous studies demonstrating that NINJ1 acts downstream of inflammasome activation (8). *Ninj1*^{-/-} markedly reduced LDH release without affecting caspase-1 activation or early membrane permeabilization. These data support the now well-established model in which gasdermin-mediated pore formation initiates membrane permeabilization, whereas NINJ1 is required for the catastrophic rupture phase of lytic cell death (16). Structural studies have further clarified this mechanism, showing that NINJ1 forms oligomeric assemblies capable of generating membrane disks and promoting membrane fragmentation rather than simple pore formation (17). More recently, NINJ1 has also been identified as a determinant of membrane biomechanical integrity, lowering the threshold for rupture under mechanical strain (18). Together, these findings establish NINJ1 as a membrane-intrinsic regulator that integrates biochemical signals from pyroptotic pathways with physical membrane destabilization.

T. gondii and *N. caninum* activate inflammasome pathways in macrophages and dendritic cells, leading to *Caspase-1* activation and IL-1 β maturation (12,19,20). Our data indicate that NINJ-dependent plasma membrane rupture is triggered during infection with both parasites, supporting the presence of a shared molecular execution mechanism. However, only *T. gondii* exhibited a reduction in intracellular burden in *Ninj1*^{-/-} cells, indicating that the downstream biological consequences of rupture are parasite specific.

One plausible explanation lies in the differential reliance on host cell lysis for egress. *T. gondii* is highly adapted for rapid dissemination and relies on tightly regulated egress processes that involve calcium signaling, cytoskeletal remodeling, and host membrane destabilization (21,22). In this context, NINJ1-mediated weakening of membrane integrity may accelerate terminal rupture and facilitate parasite release, thereby enhancing secondary infection cycles. Given that NINJ1 lowers the mechanical force required for membrane rupture (18), its activation during *T. gondii* infection may synergize with parasite-induced mechanical stress to promote host cell collapse. In contrast, *N. caninum* exhibits a more restricted dissemination strategy and host range (23,24), this is consistent with our observation that *Ninj1*^{-/-} did not significantly affect *N. caninum* intracellular burden. Nevertheless, the present data do

not allow discrimination between effects on parasite invasion and intracellular proliferation, and these mechanisms should be addressed in future studies.

Distinct modulation of host inflammasome pathways may further contribute to the divergent outcomes. *T. gondii* actively manipulates host innate immune signaling through secreted rhoptry and dense granule effectors, inflammasome activation and balancing host cell survival and death to optimize replication (20,25). Such modulation may create a permissive environment for coordinated gasdermin activation and NINJ1 oligomerization. In contrast, although *N. caninum* also induces NLRP3-dependent responses (12,26), the magnitude or kinetics of inflammasome activation may differ, potentially influencing the threshold for downstream membrane rupture. Because NINJ1-dependent PMR appears to require both upstream membrane perturbation and mechanical stress (16,18), even modest differences in the magnitude or kinetics of inflammasome activation may influence the efficiency of NINJ1-dependent plasma membrane rupture.

Differences in intracellular niche dynamics may also shape the impact of NINJ1-dependent rupture. *T. gondii* extensively remodels the host cell and parasitophorous vacuole to support rapid replication and dissemination (27,28). If NINJ1-mediated membrane fragmentation occurs at a stage compatible with parasite maturation, it may facilitate dissemination rather than restrict growth. By contrast, variations in replication kinetics or vacuole stability between *T. gondii* and *N. caninum* (29), could determine whether premature rupture limits intracellular expansion or remains biologically neutral. Structural evidence that NINJ1 excises membrane disks (17) suggests that rupture is an active remodeling event capable of rapidly destabilizing cellular architecture, with consequences that depend on parasite life-cycle timing.

Finally, these findings underscore the dual nature of inflammatory cell death. Pyroptosis is traditionally considered a host-protective mechanism that eliminates intracellular niches and promotes immune recruitment (30). However, the multistep model of pyroptosis now clearly distinguishes gasdermin-mediated permeabilization from NINJ1-mediated catastrophic rupture (16,17). While inflammasome activation may restrict pathogen replication through cytokine release, NINJ1-driven membrane fragmentation may have context-dependent consequences. In the case of *T. gondii*, NINJ1-dependent rupture may inadvertently facilitate parasite dissemination, representing a parasite-exploitative outcome of an otherwise protective pathway. In contrast, *N. caninum* does not

appear to derive the same benefit from NINJ1-mediated lysis, highlighting how identical host cell death machinery can yield divergent ecological consequences depending on parasite biology.

Collectively, these data demonstrate that *T. gondii* and *N. caninum* share a conserved NINJ1-dependent molecular phenotype at the level of terminal plasma membrane rupture yet differ in the biological implications of this event. By integrating structural, biochemical, and biomechanical advances in NINJ1 biology with the immunology of apicomplexan infection, this study expands the current understanding of pyroptosis beyond inflammasome activation and pore formation, situating NINJ1-mediated membrane fragmentation as a critical determinant of host–parasite interaction outcomes.

Limitations

An important limitation of this study was the lack of access to *Ninj1*^{-/-} mice and complementary *Ninj1* knock-in (KI) or rescue cellular models. While the experimental systems used here enabled mechanistic dissection of NINJ1-dependent plasma membrane rupture, the absence of *Ninj1*^{-/-} animals prevented direct in vivo validation during apicomplexan infection. Likewise, the lack of KI/rescue cell models limited additional confirmation that the observed phenotypes were specifically attributable to NINJ1 deficiency. Future work incorporating these models will be essential to strengthen both the physiological relevance and the mechanistic specificity of our findings.

Future studies should aim to identify the molecular cues linking inflammasome activation to NINJ1 oligomerization and determine whether *T. gondii* or *N. caninum* secrete effectors that directly modulate this process. Live-cell imaging, proteomic analyses, and targeted mutagenesis could uncover NINJ1-interacting partners and post-translational modifications that regulate its activation. Finally, selective modulation of NINJ1 activity may represent a novel therapeutic strategy to limit immunopathology while preserving essential antimicrobial responses during parasitic infection.

5. Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

6. Author Contributions

CM, and TM conceived and designed the experiments. NA, CM, MF, JV and DA performed the experiments. CM, NA, DA and TM analyzed the data. JS, JM, DZ, and TM contributed reagents, materials, analysis tools and mice. NA, CM and TM wrote the paper. All authors revised the manuscript.

7. Funding

This work was supported by multiple projects granted by the Brazilian Funding Agencies CNPq and CAPES. The funders of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report.

8. Acknowledgments

The authors thank to Caroline Martins, Tiago Mineo, Marya Fernanda Santos, Joao Vitor and David Aguillon for their assistance during the experiments. This work was supported by multiple projects granted by the Brazilian Funding Agencies CNPq and CAPES.

9. References

1. Man SM, Karki R, Kanneganti T. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological Reviews*. 2017 May;277(1):61–75. doi:[10.1111/imr.12534](https://doi.org/10.1111/imr.12534)
2. Chen R, Zou J, Chen J, Zhong X, Kang R, Tang D. Pattern recognition receptors: function, regulation and therapeutic potential. *Signal Transduct Target Ther*. 2025 Jul 11;10(1):216. doi:[10.1038/s41392-025-02264-1](https://doi.org/10.1038/s41392-025-02264-1) PubMed PMID: 40640149; PubMed Central PMCID: PMC12246121.
3. Oh S, Choi YK, Lee S. Pattern recognition receptors and inflammasome: Now and beyond. *Mol Cells*. 2025 Aug;48(8):100239. doi:[10.1016/j.mocell.2025.100239](https://doi.org/10.1016/j.mocell.2025.100239) PubMed PMID: 40527410; PubMed Central PMCID: PMC12270683.

4. Flieger A, Frischknecht F, Häcker G, Hornef MW, Pradel G. Pathways of host cell exit by intracellular pathogens. *Microb Cell*. 2018 Oct 18;5(12):525–44. doi:[10.15698/mic2018.12.659](https://doi.org/10.15698/mic2018.12.659) PubMed PMID: 30533418; PubMed Central PMCID: PMC6282021.
5. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*. 2021 May;18(5):1106–21. doi:[10.1038/s41423-020-00630-3](https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3) PubMed PMID: 33785842; PubMed Central PMCID: PMC8008022.
6. Broz P. Pyroptosis: molecular mechanisms and roles in disease. *Cell Res*. 2025 Apr 3;35(5):334–44. doi:[10.1038/s41422-025-01107-6](https://doi.org/10.1038/s41422-025-01107-6)
7. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov*. 2020;6:36. doi:[10.1038/s41421-020-0167-x](https://doi.org/10.1038/s41421-020-0167-x) PubMed PMID: 32550001; PubMed Central PMCID: PMC7280307.
8. Kayagaki N, Kornfeld OS, Lee BL, Stowe IB, O'Rourke K, Li Q, et al. NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature*. 2021 Mar 4;591(7848):131–6. doi:[10.1038/s41586-021-03218-7](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03218-7)
9. Zhu L, Xu Y. Multifaceted roles of ninjurin1 in immunity, cell death, and disease. *Front Immunol*. 2025 Jan 31;16:1519519. doi:[10.3389/fimmu.2025.1519519](https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1519519)
10. Ewald SE, Chavarria-Smith J, Boothroyd JC. NLRP1 is an inflammasome sensor for *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2014 Jan;82(1):460–8. doi:[10.1128/IAI.01170-13](https://doi.org/10.1128/IAI.01170-13) PubMed PMID: 24218483; PubMed Central PMCID: PMC3911858.
11. Quan JH, Gao FF, Ma TZ, Ye W, Gao X, Deng MZ, et al. *Toxoplasma gondii* Induces Pyroptosis in Human Placental Trophoblast and Amniotic Cells by Inducing ROS Production and Activation of Cathepsin B and NLRP1/NLRP3/NLRC4/AIM2 Inflammasome. *The American Journal of Pathology*. 2023 Dec;193(12):2047–65. doi:[10.1016/j.ajpath.2023.08.016](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2023.08.016)

12. Mota CM, Lima-Junior DDS, Ferreira França FB, Aguillón Torres JD, Barros PDSC, Santiago FM, et al. Interplay Between Reactive Oxygen Species and the Inflammasome Are Crucial for Restriction of *Neospora caninum* Replication. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 May 25;10:243. doi:[10.3389/fcimb.2020.00243](https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00243)
13. Mineo TW, Oliveira CJ, Gutierrez FR, Silva JS. Recognition by toll-like receptor 2 induces antigen-presenting cell activation and Th1 programming during infection by *Neospora caninum*. *Immunol Cell Biol*. 2010 Nov;88(8):825–33. doi:[10.1038/icb.2010.52](https://doi.org/10.1038/icb.2010.52)
14. Moreira-Souza ACA, Almeida-da-Silva CLC, Rangel TP, Rocha GDC, Bellio M, Zamboni DS, et al. The P2X7 Receptor Mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through Canonical NLRP3 Inflammasome Activation and Reactive Oxygen Species Production. *Front Immunol*. 2017 Oct 12;8:1257. doi:[10.3389/fimmu.2017.01257](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01257)
15. Quan JH, Gao FF, Ma TZ, Ye W, Gao X, Deng MZ, et al. *Toxoplasma gondii* Induces Pyroptosis in Human Placental Trophoblast and Amniotic Cells by Inducing ROS Production and Activation of Cathepsin B and NLRP1/NLRP3/NLRC4/AIM2 Inflammasome. *The American Journal of Pathology*. 2023 Dec;193(12):2047–65. doi:[10.1016/j.ajpath.2023.08.016](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2023.08.016)
16. Kayagaki N, Stowe IB, Alegre K, Deshpande I, Wu S, Lin Z, et al. Inhibiting membrane rupture with NINJ1 antibodies limits tissue injury. *Nature*. 2023 Jun 29;618(7967):1072–7. doi:[10.1038/s41586-023-06191-5](https://doi.org/10.1038/s41586-023-06191-5)
17. David L, Borges JP, Hollingsworth LR, Volchuk A, Jansen I, Garlick E, et al. NINJ1 mediates plasma membrane rupture by cutting and releasing membrane disks. *Cell*. 2024 Apr;187(9):2224–2235.e16. doi:[10.1016/j.cell.2024.03.008](https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.03.008)

18. Zhu Y, Xiao F, Wang Y, Wang Y, Li J, Zhong D, et al. NINJ1 regulates plasma membrane fragility under mechanical strain. *Nature*. 2025 Aug 28;644(8078):1088–96.
doi:[10.1038/s41586-025-09222-5](https://doi.org/10.1038/s41586-025-09222-5)
19. Ewald SE, Chavarria-Smith J, Boothroyd JC. NLRP1 Is an Inflammasome Sensor for *Toxoplasma gondii*. Adams JH, editor. *Infect Immun*. 2014 Jan;82(1):460–8.
doi:[10.1128/IAI.01170-13](https://doi.org/10.1128/IAI.01170-13)
20. Gorfu G, Cirelli KM, Melo MB, Mayer-Barber K, Crown D, Koller BH, et al. Dual role for inflammasome sensors NLRP1 and NLRP3 in murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *mBio*. 2014 Feb 18;5(1):e01117-13. doi:[10.1128/mBio.01117-13](https://doi.org/10.1128/mBio.01117-13) PubMed PMID: 24549849; PubMed Central PMCID: PMC3944820.
21. Fruth IA, Arrizabalaga G. *Toxoplasma gondii*: induction of egress by the potassium ionophore nigericin. *Int J Parasitol*. 2007 Dec;37(14):1559–67. doi:[10.1016/j.ijpara.2007.05.010](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.05.010) PubMed PMID: 17618633; PubMed Central PMCID: PMC2221775.
22. Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annual review of microbiology*. 2015;69:463–85.
23. Reid AJ, Vermont SJ, Cotton JA, Harris D, Hill-Cawthorne GA, Könen-Waisman S, et al. Comparative Genomics of the Apicomplexan Parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia Differing in Host Range and Transmission Strategy. Striepen B, editor. *PLoS Pathog*. 2012 Mar 22;8(3):e1002567. doi:[10.1371/journal.ppat.1002567](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002567)
24. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Apr;20(2):323–67. doi:[10.1128/CMR.00031-06](https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06) PubMed PMID: 17428888; PubMed Central PMCID: PMC1865591.

25. Rosenberg A, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* secreted effectors co-opt host repressor complexes to inhibit necroptosis. *Cell Host & Microbe*. 2021 Jul;29(7):1186-1198.e8.
doi:[10.1016/j.chom.2021.04.016](https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.016)
26. Wang X, Gong P, Zhang X, Li S, Lu X, Zhao C, et al. NLRP3 Inflammasome Participates in Host Response to *Neospora caninum* Infection. *Front Immunol*. 2018 Jul 30;9:1791.
doi:[10.3389/fimmu.2018.01791](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01791)
27. Kochanowsky JA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*. *Current Biology*. 2018 Jul;28(14):R770–1.
doi:[10.1016/j.cub.2018.05.035](https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.035)
28. Frickel EM, Hunter CA. Lessons from *Toxoplasma* : Host responses that mediate parasite control and the microbial effectors that subvert them. *Journal of Experimental Medicine*. 2021 Nov 1;218(11):e20201314. doi:[10.1084/jem.20201314](https://doi.org/10.1084/jem.20201314)
29. Nolan SJ, Romano JD, Luechtefeld T, Coppens I. *Neospora caninum* Recruits Host Cell Structures to Its Parasitophorous Vacuole and Salvages Lipids from Organelles. *Eukaryot Cell*. 2015 May;14(5):454–73. doi:[10.1128/EC.00262-14](https://doi.org/10.1128/EC.00262-14)
30. Zhang Y, Zhao D, Wang T, Li P, Yu D, Gao H, et al. Pyroptosis, a double-edged sword during pathogen infection: a review. *Cell Death Discov*. 2025 Jul 1;11(1):289.
doi:[10.1038/s41420-025-02579-6](https://doi.org/10.1038/s41420-025-02579-6)

6. CONCLUSÕES

Este trabalho auxilia na compreensão sobre o papel da proteína NINJ1 no processo de ruptura terminal da membrana plasmática durante a piroptose induzida por *T. gondii* e *N. caninum*. Os resultados indicam que *Ninj1* atua como um executor downstream da ativação do inflamassoma, desempenhando papel crucial na lise celular e na liberação de mediadores inflamatórios, o que amplifica a resposta inflamatória e contribui para a dinâmica de morte celular lítica. Essa atividade é mais proeminente em *T. gondii*, enquanto sua função é mais limitada em *N. caninum*, sugerindo uma modulação diferencial da morte celular dependendo do parasita e do tipo celular hospedeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arisue, N., Hashimoto, T., Kawai, S., Honma, H., Kume, K., & Horii, T. (2019). Apicoplast phylogeny reveals the position of *Plasmodium vivax* basal to the Asian primate malaria parasite clade. *Scientific Reports*, *9*(1), 7274.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-43831-1>
- Belizário, J., Vieira-Cordeiro, L., & Enns, S. (2015). Necroptotic Cell Death Signaling and Execution Pathway: Lessons from Knockout Mice. *Mediators of Inflammation*, *2015*(1), 128076. <https://doi.org/10.1155/2015/128076>
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*, *18*(5), 1106–1121.
<https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Blader, I. J., Coleman, B. I., Chen, C.-T., & Gubbels, M.-J. (2015). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annual Review of Microbiology*, *69*(1), 463–485.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>
- Broz, P. (2025). Pyroptosis: Molecular mechanisms and roles in disease. *Cell Research*, *35*(5), 334–344. <https://doi.org/10.1038/s41422-025-01107-6>
- Buxton, D., McAllister, M. M., & Dubey, J. P. (2002). The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitology*, *18*(12), 546–552.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02414-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02414-5)
- Cai, Y., Zhang, H., Wang, X., Liu, M., Jin, R., Zeng, T., & Ju, J. (2025). Emerging role of PANoptosis in pathogen infection and systemic diseases. *Cell Biology and Toxicology*, *41*(1), 163. <https://doi.org/10.1007/s10565-025-10112-9>

- Castro, P. D. J., & Dubey, J. P. (2019). *Toxoplasma gondii* – the facts. *Companion Animal*, 24(6), 300–305. <https://doi.org/10.12968/coan.2019.24.6.300>
- Chen, R., Zou, J., Chen, J., Zhong, X., Kang, R., & Tang, D. (2025). Pattern recognition receptors: Function, regulation and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 216. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02264-1>
- Choi, M. E., Price, D. R., Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2019). Necroptosis: A crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight*, 4(15), e128834. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128834>
- Choudhury, S. M., Sarkar, R., Karki, R., & Kanneganti, T.-D. (2024). A comparative study of apoptosis, pyroptosis, necroptosis, and PANoptosis components in mouse and human cells. *PLOS ONE*, 19(2), e0299577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299577>
- David, L., Borges, J. P., Hollingsworth, L. R., Volchuk, A., Jansen, I., Garlick, E., Steinberg, B. E., & Wu, H. (2024). NINJ1 mediates plasma membrane rupture by cutting and releasing membrane disks. *Cell*, 187(9), 2224-2235.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.03.008>
- Dondelinger, Y., Priem, D., Huyghe, J., Delanghe, T., Vandenabeele, P., & Bertrand, M. J. M. (2023). NINJ1 is activated by cell swelling to regulate plasma membrane permeabilization during regulated necrosis. *Cell Death & Disease*, 14(11), 755. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06284-z>
- Dubey, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41(1), 1. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>
- Dubey, J. P. (2016). *Toxoplasmosis of Animals and Humans* (0 ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420092370>

- Dubey, J. P., Barr, B. C., Barta, J. R., Bjerškås, I., Björkman, C., Blagburn, B. L., Bowman, D. D., Buxton, D., Ellis, J. T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D. E., Howe, D. K., Jenkins, M. C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A. E., Mattsson, J. G., McAllister, M. M., ... Lindsay, D. S. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, *32*(8), 929–946.
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00094-2)
- Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, *67*(1–2), 1–59. [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. (2011). Neosporosis in animals—The last five years. *Veterinary Parasitology*, *180*(1–2), 90–108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>
- Dubey, J. P., Schares, G., & Ortega-Mora, L. M. (2007a). Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(2), 323–367.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06>
- Dubey, J. P., Schares, G., & Ortega-Mora, L. M. (2007b). Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(2), 323–367.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06>
- Dunai, Z., Bauer, P. I., & Mihalik, R. (2011). Necroptosis: Biochemical, Physiological and Pathological Aspects. *Pathology & Oncology Research*, *17*(4), 791–800.
<https://doi.org/10.1007/s12253-011-9433-4>
- Ellis, J., Sinclair, D., Morrison, D., Al-Qassab, S., Springett, K., & Ivens, A. (2010). Microarray analyses of mouse responses to infection by *Neospora caninum* identifies disease associated cellular pathways in the host response. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *174*(2), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.08.007>

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Erazo, B. J., & Knoll, L. J. (2025). Induced necroptosis limits *Toxoplasma gondii* replication in a RIPK3/MLKL-dependent manner. *Infection and Immunity*, 93(11), e0047925. <https://doi.org/10.1128/iai.00479-25>
- Escalante, A. A., & Ayala, F. J. (1994). Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11373–11377. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11373>
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- Frank, D., & Vince, J. E. (2019). Pyroptosis versus necroptosis: Similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death & Differentiation*, 26(1), 99–114. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0212-6>
- Gállego Berenguer, J. (2007). *Manual de parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Universitat de Barcelona, Publicacions i edicions.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

- Gao, J., Xiong, A., Liu, J., Li, X., Wang, J., Zhang, L., Liu, Y., Xiong, Y., Li, G., & He, X. (2024). PANoptosis: Bridging apoptosis, pyroptosis, and necroptosis in cancer progression and treatment. *Cancer Gene Therapy*, 31(7), 970–983. <https://doi.org/10.1038/s41417-024-00765-9>
- Gondim, L. F. P., McAllister, M. M., Pitt, W. C., & Zemlicka, D. E. (2004). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 34(2), 159–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.001>
- Green, D. R. (2005). Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell*, 121(5), 671–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.019>
- Hall, C. A., Reichel, M. P., & Ellis, J. T. (2005). *Neospora* abortions in dairy cattle: Diagnosis, mode of transmission and control. *Veterinary Parasitology*, 128(3–4), 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.012>
- Hartenian, E., Bernard, E. M., Ammirati, G., Monnier, S., Leloup, H. B., Agustoni, M., Bissegger, L., Santos, J. C., Mari, S., Sieben, C., Petrilli, V., Müller, D., & Broz, P. (2024). *Ninjurin-1 mediated plasma membrane rupture is a two-step process requiring cell swelling*. <https://doi.org/10.1101/2024.10.29.620849>
- Hashimoto, S., Hikichi, M., Maruoka, S., & Gon, Y. (2021). Our future: Experiencing the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak and pandemic. *Respiratory Investigation*, 59(2), 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2020.11.006>
- Hemphill, A., & Gottstein, B. (1996a). Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology Research*, 82(6), 497–504. <https://doi.org/10.1007/s004360050152>

- Hemphill, A., & Gottstein, B. (1996b). Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology Research*, *82*(6), 497–504.
<https://doi.org/10.1007/s004360050152>
- Hou, K., Pan, W., Liu, L., Yu, Q., Ou, J., Li, Y., Yang, X., Lin, Z., Yuan, J. H., & Fang, M. (2025). Molecular mechanism of PANoptosis and programmed cell death in neurological diseases. *Neurobiology of Disease*, *209*, 106907.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2025.106907>
- Jiang, W., Deng, Z., Dai, X., & Zhao, W. (2021). PANoptosis: A New Insight Into Oral Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, *12*, 789610.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.789610>
- Jiang, Y., Qiang, Z., Liu, Y., Zhu, L., Xiao, L., Du, Z., Cai, R., & Qiang, S. (2025). Diverse functions of NLRP3 inflammasome in PANoptosis and diseases. *Cell Death Discovery*, *11*(1), 389. <https://doi.org/10.1038/s41420-025-02689-1>
- Jorgensen, I., Rayamajhi, M., & Miao, E. A. (2017). Programmed cell death as a defence against infection. *Nature Reviews Immunology*, *17*(3), 151–164.
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.147>
- Karaca, M., & Oral, H. B. (2025). PANoptosis: A Coordinated Response in the Diversity of Cell Death. *Turkish Journal of Immunology*, 2–21. <https://doi.org/10.36519/tji.2025.573>
- Kayagaki, N., Kornfeld, O. S., Lee, B. L., Stowe, I. B., O'Rourke, K., Li, Q., Sandoval, W., Yan, D., Kang, J., Xu, M., Zhang, J., Lee, W. P., McKenzie, B. S., Ulas, G., Payandeh, J., Roose-Girma, M., Modrusan, Z., Reja, R., Sagolla, M., ... Dixit, V. M. (2021). NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature*, *591*(7848), 131–136.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03218-7>

- Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q. T., Liu, P. S., Lill, J. R., Li, H., Wu, J., Kummerfeld, S., Zhang, J., Lee, W. P., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., ... Dixit, V. M. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526(7575), 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature15541>
- Keller, N., Naguleswaran, A., Cannas, A., Vonlaufen, N., Bienz, M., Björkman, C., Bohne, W., & Hemphill, A. (2002). Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcMIC1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. *Infection and Immunity*, 70(6), 3187–3198. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3187-3198.2002>
- Lima, T. S., & Lodoen, M. B. (2019). Mechanisms of Human Innate Immune Evasion by *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 103. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00103>
- Liu, F., Li, J., Li, X., Zhang, X., Yan, L., Gao, L., Liu, Z., Gong, P., Zhang, N., Zhang, X., & Wang, X. (2025). Evaluation of the inhibitory effects of emodin on *Neospora caninum* invasion and proliferation in vitro. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 29, 100624. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2025.100624>
- Liu, Y., Pan, R., Ouyang, Y., Gu, W., Xiao, T., Yang, H., Tang, L., Wang, H., Xiang, B., & Chen, P. (2024). Pyroptosis in health and disease: Mechanisms, regulation and clinical perspective. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 245. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01958-2>
- Ma, W., Wang, Q., Guo, L., & Ju, X. (2025). The molecular mechanisms, roles, and potential applications of PANoptosis in cancer treatment. *Frontiers in Immunology*, 16, 1550800. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1550800>

- Man, S. M., & Kanneganti, T. (2015). Regulation of inflammasome activation. *Immunological Reviews*, 265(1), 6–21. <https://doi.org/10.1111/imr.12296>
- Martinon, F. (2010). Signaling by ROS drives inflammasome activation. *European Journal of Immunology*, 40(3), 616–619. <https://doi.org/10.1002/eji.200940168>
- McAllister, M. M., Björkman, C., Anderson-Sprecher, R., & Rogers, D. G. (2000). Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(6), 881–887. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.881>
- Mineo, T. W. P., Carrasco, A. O. T., Raso, T. F., Werther, K., Pinto, A. A., & Machado, R. Z. (2011). Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. *Veterinary Parasitology*, 182(2–4), 352–355. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.022>
- Montoya, J., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363(9425), 1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- Morrison, D. A. (2009). Evolution of the Apicomplexa: Where are we now? *Trends in Parasitology*, 25(8), 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.010>
- Morrisette, N. S., & Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 21–38. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.21-38.2002>
- Mota, C. M., Lima-Junior, D. D. S., Ferreira França, F. B., Aguilón Torres, J. D., Barros, P. D. S. C., Santiago, F. M., Silva, J. S., Mineo, J. R., Zamboni, D. S., & Mineo, T. W. P. (2020). Interplay Between Reactive Oxygen Species and the Inflammasome Are Crucial for Restriction of *Neospora caninum* Replication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 243. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00243>

- Mustafa, M., Ahmad, R., Tantry, I. Q., Ahmad, W., Siddiqui, S., Alam, M., Abbas, K., Moinuddin, Hassan, Md. I., Habib, S., & Islam, S. (2024). Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells*, *13*(22), 1838.
<https://doi.org/10.3390/cells13221838>
- Nagata, S., & Tanaka, M. (2017). Programmed cell death and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *17*(5), 333–340. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.153>
- Ortega-Mora, L. M., Ferre, I., del-Pozo, I., Caetano-da-Silva, A., Collantes-Fernández, E., Regidor-Cerrillo, J., Ugarte-Garagalza, C., & Aduriz, G. (2003). Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Veterinary Parasitology*, *117*(4), 301–308.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.09.015>
- Pandian, N., & Kanneganti, T.-D. (2022). PANoptosis: A Unique Innate Immune Inflammatory Cell Death Modality. *Journal of Immunology*, *209*(9), 1625–1633.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200508>
- Patrat-Delon, S., Gangneux, J.-P., Lavoué, S., Lelong, B., Guiguen, C., Le Tulzo, Y., & Robert-Gangneux, F. (2010). Correlation of Parasite Load Determined by Quantitative PCR to Clinical Outcome in a Heart Transplant Patient with Disseminated Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(7), 2541–2545.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00252-10>
- Pinard, J. A., Leslie, N. S., & Irvine, P. J. (2003). CEU Maternal Serologic Screening for Toxoplasmosis. *Journal of Midwifery & Women's Health*, *48*(5), 308–316.
[https://doi.org/10.1016/S1526-9523\(03\)00279-4](https://doi.org/10.1016/S1526-9523(03)00279-4)

- Qi, Z., Zhu, L., Wang, K., & Wang, N. (2023). PANoptosis: Emerging mechanisms and disease implications. *Life Sciences*, 333, 122158. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122158>
- Quan, J.-H., Gao, F. F., Ma, T.-Z., Ye, W., Gao, X., Deng, M.-Z., Yin, L.-L., Choi, I.-W., Yuk, J.-M., Cha, G.-H., Lee, Y.-H., & Chu, J.-Q. (2023). Toxoplasma gondii Induces Pyroptosis in Human Placental Trophoblast and Amniotic Cells by Inducing ROS Production and Activation of Cathepsin B and NLRP1/NLRP3/NLRC4/AIM2 Inflammasome. *The American Journal of Pathology*, 193(12), 2047–2065. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2023.08.016>
- Ramos, S., Hartenian, E., Santos, J. C., Walch, P., & Broz, P. (2024). NINJ1 induces plasma membrane rupture and release of damage-associated molecular pattern molecules during ferroptosis. *The EMBO Journal*, 43(7), 1164–1186. <https://doi.org/10.1038/s44318-024-00055-y>
- Robert-Gangneux, F., & Dardé, M.-L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 264–296. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Rosenberg, A., & Sibley, L. D. (2021). Toxoplasma gondii secreted effectors co-opt host repressor complexes to inhibit necroptosis. *Cell Host & Microbe*, 29(7), 1186-1198.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.04.016>
- Saadatnia, G., & Golkar, M. (2012). A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 44(11), 805–814. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.693197>
- Seeber, F. (2010). Metabolic Pathways in the Apicoplast of Apicomplexa. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 281, pp. 161–228). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(10\)81005-6](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(10)81005-6)

- Shi, B., Tang, C., Rutter, S. F., Audi, O., Ozkocak, D. C., Trenerry, A. M., Simpson, D. S., Williams, S. A., Le, Q. T., Ryan, G. F., Cooray, P. T. M., Vince, J. E., Mackenzie, J. M., Hulett, M. D., Phan, T. K., & Poon, I. K. H. (2025). NINJ1 oligomerises on large apoptotic cell-derived extracellular vesicles to regulate vesicle stability and cellular content release. *Frontiers in Immunology*, *16*, 1599809.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1599809>
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., & Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, *526*(7575), 660–665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
- Sipos, F., & Múzes, G. (2025). Emerging Insights into the Interplay Between PANoptosis and Autophagy in Immune Regulation and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Medical Sciences*, *13*(4), 310. <https://doi.org/10.3390/medsci13040310>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, *140*(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International Journal for Parasitology*, *30*(12–13), 1217–1258.
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)
- Tian, X., Xing, Y., Zhou, Y., Huang, Y., Zhang, Y., Guo, J., Wang, Q., Fu, L., Shi, Z., Yang, X., Pan, W., & Sun, F. (2026). Pyroptosis Drives the Impairment of Colonic Barrier Integrity During *Toxoplasma Gondii* Chronic Infection. *Immunology*, *177*(1), 70–82.
<https://doi.org/10.1111/imm.70023>
- Wang, Y., & Kanneganti, T.-D. (2021). From pyroptosis, apoptosis and necroptosis to PANoptosis: A mechanistic compendium of programmed cell death pathways.

Computational and Structural Biotechnology Journal, 19, 4641–4657.

<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.038>

White, M. W., & Suvorova, E. S. (2018). Apicomplexa Cell Cycles: Something Old, Borrowed, Lost, and New. *Trends in Parasitology*, 34(9), 759–771.

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

Xu, Y., Zheng, Y., Liu, Y., Wei, C., Ren, J., Zuo, W., Gu, R., Liu, H., Deng, X., Liu, Y., Shang, X., Ge, W., Li, Z., Huang, Y., He, D., Shen, X., Wang, Z., Lyu, C., Wang, Z., ... Cao, B. (2025). Ninjurin-1 mediates cell lysis and detrimental inflammation of PANoptosis during influenza A virus infection. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 307. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02391-9>

Yamane, I., Kitani, H., Kokuho, T., Shibahara, T., Haritani, M., Hamaoka, T., Shimizu, S., Koiwai, M., Shimura, K., & Yokomizo, Y. (2000). The inhibitory Effect of Interferon Gamma and Tumor Necrosis Factor Alpha on Intracellular Multiplication of *Neospora caninum* in Primary Bovine Brain Cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(3), 347–351. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.347>

Yang, T., An, J., Xu, X., Li, B., & Dou, Z. (2025). Research progress on pyroptosis regulated by mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Frontiers in Immunology*, 16, 1717465.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1717465>

Zhang, X., Wang, Y., Gong, P., Wang, X., Zhang, N., Chen, M., Wei, R., Zhang, X., Li, X., & Li, J. (2022). *Neospora caninum* Evades Immunity via Inducing Host Cell Mitophagy to Inhibit Production of Proinflammatory Cytokines in a ROS-Dependent Manner. *Frontiers in Immunology*, 13, 827004. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.827004>

Zhu, L., & Xu, Y. (2025). Multifaceted roles of ninjurin1 in immunity, cell death, and disease. *Frontiers in Immunology*, 16, 1519519. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1519519>