

THUANY PRADO RANGEL

**Papel das Espécies Reativas de Oxigênio no Controle de
Toxoplasma gondii Mediado pelo Receptor P2X7**



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2017**

Trabalho realizado no Programa de Imunobiologia do Instituto Biofísica Carlos Chagas Filho UFRJ, sob a orientação do Professor Robson Coutinho Silva e da Doutora Aline Cristina de Abreu Moreira de Souza, em colaboração com a Professora Rossiane Claudia Vommaro.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rangel, Thuany Prado
R185p Papel das Espécies Reativas de Oxigênio no Controle de *Toxoplasma gondii*
Mediado pelo Receptor P2X7 / Thuany Prado Rangel. -- Rio de Janeiro, 2017.
xi; 63 f.
Orientador: Robson Coutinho Silva.
Coorientadora: Aline Cristina de Abreu Moreira de Souza.
Trabalho de conclusão de curso (Bacharelada em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, 2017. 1.
Bibliografia: f.58-62
1. Receptor P2X7 2. *Toxoplasma gondii* 3. ROS I. Silva, Robson Coutinho,
orient. II. Souza, Aline Cristina de Abreu Moreira de coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo (a)
autor (a).

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: Thuany Prado Rangel
DRE: 114095393

BANCA EXAMINADORA: Profa. Alessandra D'Almeida Filardy (Presidente)
Dr. Luiz Eduardo Baggio Savio
Dra. Juliana de Araújo Portes
Profa. Maria Bellio (Suplente)

**Título da Monografia: "Papel das espécies reativas de oxigênio na
eliminação de *Toxoplasma gondii* mediados pelo receptor P2X7"**

Local: Auditório, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/CCS/ UFRJ
Data e hora de início: 06 de dezembro de 2017 às 13:30h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 6 de dezembro de 2017.

NOTA

10,0

10,0

10,0

Banca Examinadora:

Alessandra D'Almeida Filardy

Profa. Alessandra D'Almeida Filardy

Luiz Eduardo Baggio Savio

Dr. Luiz Eduardo Baggio Savio

Juliana de Araújo Portes

Dra. Juliana de Araújo Portes

Profa. Maria Bellio

Aluno:

Thuany Prado Rangel

Thuany Prado Rangel

Orientador:

Robson Coutinho Silva

Prof. Robson Coutinho Silva

Coorientador:

Aline Cristina de Abreu Moreira-Souza

Aline Cristina de Abreu Moreira-Souza

Coordenador
de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho à Deus, pois creio que Ele é e sempre será a minha fortaleza, juntamente com os meus pais, por todo amor, carinho e auxílio.

“Se isto não for amor, o oceano secou, tudo perde valor, se isto não for amor”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, mesmo que muitos não acreditem, eu creio que Ele é e sempre será o que me fortalece, me ajuda, me acompanha nessa longa estrada que é ir e vir todos os dias de Itaboraí x Fundão / Fundão x Itaboraí, me ajudou em todos os momentos difíceis que eu não pude ter o “colinho de mamãe”, ouviu minhas orações e de todos que as fizeram por mim, por isso, Ele é o principal que tenho que agradecer.

Quero agradecer aos meus pais, Terezinha e Cleber, vocês são os melhores do mundo, fazem tudo e mais um pouco por mim, como sou grata. Obrigada por cada conselho, mesmo vocês estando longe de mim estão perto, obrigada mãe por ser meu porto seguro, obrigada pai por sempre poder contar contigo, não importa a distância o senhor sempre dá um jeito. Tenho muita coisa para falar, mas em resumo EU AMO VOCÊS! para todo sempre.

Ao meu irmão e minha cunhada, Cleber Jr e Lidiane, por sempre me ajudarem a ir aos congressos, quando meus pais não podiam, no apoio em todos os momentos tensos, a me impulsionar a sempre alcançar os objetivos que eu mesmo não sei que sou capaz, e principalmente por me fazer tia de dois príncipes lindos, Joshua e Ezekiel. Nos momentos tristes, de saudade, desespero... olhar para as fotos deles é muito aliviador, e saber que em breve estarei com eles pertinho de mim, me impulsiona todos os dias. Amo vocês, amo essa família linda que vocês formam!

As matriarcas da minha família, vovó Elza e vovó Ilza, vocês me ajudaram sempre, mesmo sem saber pra que era, mesmo sem entender o motivo, se alegravam sempre que eu contava às premiações que eu ganhei com esse trabalho, as viagens que eu fiz, etc. Me desculpe se estive longe, sumida, e até mesmo desatenta a vocês, eu as amo muito, e quero deixar vocês sempre orgulhosas da neta que tem.

Aos meus tios, tias e primos, principalmente a minha companheira de UFRJ, Nathany, que também completam essa família maravilhosa que eu tenho, podemos ficar sem nos ver muito tempo, mas quando a gente se encontra é sempre maravilhoso! Nossas “zueiras”, nossas brigas que sempre acabam bem, a forma que nos consolamos, nos ajudamos... Posso dizer que tenho a melhor família do mundo todo!

Agradeço ao Daniel, por me ouvir por longas horas, por sempre dizer que eu sou a melhor mesmo nos momentos em que tudo está dando errado, por ouvir minha apresentação, por telefone e sem entender nada, pelos momentos que me fez perder o foco dos problemas e olhar para as soluções, obrigada por esses 3 anos juntos. Eu amo você!

Não posso me esquecer das meninas da república (não vou escrever o nome de todas, mas elas sabem), que por 2 anos e meio foram meu apoio nos momentos de saudade, de desespero, de angústia em véspera de prova e/ou apresentação. Me ensinaram tantas coisas, foi muito bom compartilhar cada momento com vocês, as levarei para a vida toda em meu coração!

Agradeço a Stephanie, uma das poucas amigas que tenho, mas que marcou essa jornada por todas as vezes que me fez fixar a matéria “Thuany me ajuda em micro?” “Como se faz coloração de gran?” “E os vírus?” “E as bactérias?” “Não sei como consegue gostar de imuno?”, enfim...muito obrigada!

Ao professor Robson Coutinho Silva, muito obrigada por me aceitar ainda no início da graduação e confiar esse projeto a mim. A professora Rossiane por disponibilizar toda a estrutura do Laboratório Hertha Meyer para a realização desse trabalho.

Agradeço a Aline, você foi realmente uma mãe pra mim! Confiou a realização desse e de outro projetos a mim, me ensinou TUDO o que sei, e aquilo que tínhamos que fazer mas não sabíamos, me mostrou o caminho que deveria percorrer para conseguir realizar. Passamos por momentos difíceis, mas estamos aqui, firmes, fortes e seguindo prosseguindo no caminho que nosso coração diz que sim! Lembre-se sempre de “não esquecer de mim quando entrares no seu reino!” (rsrsrs...) Mesmo que esses caminhos nos separem, nunca vou esquecer do quão importante você é para minha carreira científica.

Agora pense em um laboratório bom...LIF! Mesmo com todas as tretas e problemas nunca me faltou ajuda em momento algum, sempre que tive vontade de largar o ROS para lá, vinha alguém e me fazia insistir!

Muito obrigada: Cássio, meu amigo de profissão. Ygor o primeiro que abriu a porta pra mim no lab. Débora pense na pessoa mais doce e amável, doida, mas maravilhosa!. Maria Luiza obrigada pelas caronas e todas as palavras de ânimo. Marcos Rangel meu primo! Obrigada por me ajudar nos lavados peritoneais, e por todas as trocas dentro do ônibus. Gabi obrigada por me ensinar e me ajudar nos momentos em que precisei principalmente com os BMDM's. Isabel, linda! Obrigada por chorar comigo porque o ROS nunca dava certo (rsrsrs...). Augusto, por ter essa disponibilidade de sempre ajudar a todos.

Agradeço a Sthefani, que mesmo chegando recentemente ao lab me ajudou muitas vezes, até mesmo nos momentos em que me pedia para explicar alguma coisa.

Muito obrigada a Pry e a Kelly, técnicas do lab, por sempre atenderem aos meus pedidos, e eu sei que não foram poucos (rsrsrs...), por serem tão atentas e cuidadosas com o trabalho com desenvolvem no lab, a ajuda de você é de suma importância.

A Mariana e a Patrícia, mesmo longe estão nos ajudando em tudo o que podem, muito obrigada pelos conselhos, ajudas e dicas, todas foram muito importantes para o meu crescimento e para a realização desse projeto.

Agradeço a toda à equipe de *Toxoplasma* do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, por cuidar tão carinhosamente do nosso parasito, por me socorrerem nas passagens, na manutenção de parasito...

Não posso esquecer o Lucas, a Verônica e a Adrianny, meus companheiros de sempre! Ao Lucas por me perturbar tanto, mas por sempre estar comigo, sua amizade é muito boa. A Verônica, nossa mãe que sempre nos aconselhou, nos ajudou, nos deu seu abraço de mãe! Adrianny uma menina maravilhosa, cabeça de vento, mas sempre me ajudou a fazer a parte difícil da coisa, a cada 10 palavras 11 é palavrão (rsrsrs...), mas tem um coração maravilhoso. Agradeço a vocês por estarem comigo até agora, espero leva-los pra sempre em minha vida!

Agradeço aos membros da banca por se disponibilizarem a ler, discutir e contribuir com esse trabalho e com a concomitante me ajudar na minha formação.

A UFRJ e a todos os professores do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes por me ajudarem e me ensinarem tanto durante essa jornada.

Aos órgão de fomento, CNPq, Capes e FAPERJ por financiarem a realização desse trabalho.

“Para tudo há uma ocasião, e um tempo para cada propósito debaixo do céu.”

(Eclesiastes 3:1)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

THUANY PRADO RANGEL

Papel das Espécies Reativas de Oxigênio no Controle de *Toxoplasma gondii* Mediado pelo Receptor P2X7

Orientadores: Robson Coutinho Silva e Aline Cristina de Abreu Moreira-Souza

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O receptor P2X7 pertence ao grupo dos receptores purinérgicos, tendo o ATP como sua molécula ativadora. A ativação desse receptor desencadeia diversas vias intracelulares envolvidas na: fusão lisossomal, produção de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários de nitrogênio (NO). O papel da ativação do receptor P2X7 tem sido amplamente estudada durante a infecção por patógenos intracelulares obrigatórios como: *Porphyromonas gingivalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania amazonensis* e *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). O *T. gondii* é um parasito capaz de infectar ativamente células nucleadas e de subverter os mecanismos de defesa da célula como: inibir a fusão fagolisossomal, bloquear a produção de ROS e NO, dentre outros. A ativação do receptor P2X7 durante a infecção por *T. gondii* é importante no controle da infecção por induzir a fusão lisossomal e gerar a produção de ROS. Entretanto, a cascata intracelular ativada por esse receptor envolvendo ROS, durante a infecção por *T. gondii* ainda não foi totalmente elucidada. Nesse trabalho, investigamos a possível fonte de produção de ROS induzida pela ativação do receptor P2X7 e seu papel na eliminação de *T. gondii* em macrófagos murinos. Apesar das enzimas antioxidantes do *T. gondii* o ATP foi capaz de induzir a produção de ROS, mesmo em células infectadas e reduzir carga parasitária. Entretanto, em macrófagos oriundos de animais *knockout* para o receptor P2X7 (P2X7^{-/-}) o tratamento com ATP não teve efeito no controle da carga parasitária. Com o uso do pan-inibidor de ROS, e inibidores específicos para NADPH oxidase e ROS mitocondrial (mtROS), foi possível observar que ATP induz a produção de ROS da NADPH oxidase e de mtROS durante a infecção. Nossos dados indicam que o efeito antiparasitário de ATP depende da NADPH oxidase. Enquanto mtROS se mostrou importante para a secreção de IL-

1 β , após a ativação do receptor P2X7, além de participar do efeito antiparasitário induzido pelo tratamento com IL-1 β recombinante. Nossos resultados suportam a hipótese de que a eliminação de *T. gondii* mediada pelo receptor P2X7 envolve a produção de ROS da NADPH oxidase e secreção de IL-1 β , e que o efeito de IL-1 β requer o ROS produzido pela NADPH oxidase e pela mitocôndria.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, receptor P2X7 e ROS.

ABSTRACT**THUANY PRADO RANGEL****Role of Reactive Oxygen Species in the Elimination of *Toxoplasma gondii* Mediated by the P2X7 Receptor****Orientadores: Robson Coutinho Silva e Aline Cristina de Abreu Moreira-Souza**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The P2X7 receptor belongs to the purinergic receptors group, with ATP as its activator molecule. The activation of this receptor triggers several intracellular pathways involved in: production of inflammatory mediators such as cytokines, chemokines, reactive oxygen species (ROS) and nitrogen intermediates (NO). The role of P2X7 receptor activation has been extensively studied during infection by obligate intracellular pathogens such as: *Porphyromonas gingivalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania amazonensis* and *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). *T. gondii* is a parasite capable of actively infecting nucleated cells and of subverting the cell defense mechanisms such as: inhibiting phagolysosomal fusion, blocking the production of ROS and NO, among others. After invasion of the host cell, the parasite is able to subvert defense mechanisms of the cell such as: phagolysosomal fusion, cytokine and chemokines production and inflammatory mediators such as ROS and NO. Activation of P2X7 receptor during *T. gondii* infection is important in controlling infection by inducing lysosomal fusion and generating ROS production. However, the intracellular cascade activated by this receptor has not yet been completely elucidated. In this work, we investigated the possible source of ROS production induced by activation of the P2X7 and its role in the elimination of *T. gondii* in murine macrophages. Although the antioxidant enzymes of *T. gondii* ATP was able to induce the production of ROS even in infected cells and reduce parasitic load. However, in macrophages from knockout animals to the P2X7 receptor (P2X7^{-/-}) the ATP treatment had no effect on parasite load control. With the use of pan-inhibitor ROS, and specific inhibitors for NADPH oxidase and mitochondrial ROS (mtROS), it was possible to observe that ATP induces ROS production of NADPH

oxidase and mtROS during infection. Our data indicate that the antiparasitic effect of ATP depends on NADPH oxidase. While mtROS was shown to be important for IL-1 β secretion after activation of the P2X7 receptor, it also participated in the antiparasitic effect induced by treatment with recombinant IL-1 β . Our results support the hypothesis that P2X7 receptor-mediated elimination of *T. gondii* involves ROS production of NADPH oxidase and IL-1 β secretion, and that the IL-1 β effect requires ROS produced by NADPH oxidase and mitochondria.

Key-words: *Toxoplasma gondii*, P2X7 receptor and ROS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	19
Figura 2 – Liberação de ATP para meio extracelular.	24
Figura 3 – Receptores purinérgicos e seus ligantes.....	25
Figura 4 – Receptores P2.	26
Figura 5 – Efeito celular da ativação do receptor P2X7.	27
Figura 6 – Modelo de eliminação de <i>T. gondii</i> por macrófagos via ativação do receptor P2X7.	31
Figura 7 – Esquema da enzima NADPH oxidase.	33
Figura 8 – Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e produção de mtROS..	34
Figura 9 - ATP induz a produção de ROS em células infectadas por <i>T. gondii</i>	42
Figura 10 - ATP induz a produção de mtROS em células infectadas por <i>T. gondii</i>	44
Figura 11 - Efeito do tratamento com ATP e IL-1 β no controle da infecção por <i>T. gondii</i> é mediado por ROS.....	48
Figura 12 - Efeito do controle da carga parasitária via IL-1 β dependente de mtROS.	50
Figura 13 – Efeito do controle da carga parasitária via IL-1 β dependente de mtROS.....	51
Figura 14 - NADPH oxidase participa da ação microbicida induzida por ATP.	53
Figura 15 – Secreção de IL-1 β , após ativação do receptor P2X7, requer mtROS.	46
Figura 16 – Mecanismo proposto para o controle da infecção mediado pelo receptor P2X7.....	56

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Moléculas antioxidantes do <i>T. gondii</i>	23
--	----

LISTA DE ABREVIACÃO E SIGLAS

ATP - Adenosina trifosfato

Ca²⁺ - Cálcio

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CGD – Doença granulomatosa crônica

Cyt b₅₅₈ - Subunidade flavocitocromo b₅₅₈

DAMPs - Padrões moleculares associados a dano

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

ERR- α - Receptor nuclear de estrogênio alfa

GTPases - Enzimas que clivam guanosina trifosfato

H₂DCFDA - 2', 7' - diacetato de diclorodihidrofluoresceína

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HBSS - Hank's Balanced Salt Solution

IFN - Interferon

IL - Interleucina

MCP - Proteína quimioatraente de monócitos

Mito - Mito-TEMPO

mtROS - ROS mitocondrial

mtROS – ROS mitocôndrial

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response 88*

NAC - N-acetilcisteína

NLRs - Receptores proteicos com domínio de oligomerização de nucleotídeos

NO - Óxido nítrico

O₂⁻ - Ânion superóxido

O₂ - Oxigênio

OH[•] - Radical hidroxila

P2X7^{-/-} - Camundongo *knockout* para o receptor P2X7

p³⁸ MAP Kinase - Proteína quinase ativada por mitogeno p38

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PBS - Tampão fosfato salino

PKC - Proteína quinase C

PLD - Fosfolipase D

PLD - Fosfolipase D

RE - Retículo endoplasmático

ROP - Róptria

ROS - Espécies reativas de oxigênio

TgSOD - Superóxido desmutase do *T. gondii*

TLRs - Receptores do tipo toll

TNF - Fator de necrose tumoral

TRAF6 - Receptor associado ao fator 6

WT – Camundongo selvagem

ÍNDICE

ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	18
1.2 Resposta imune contra infecção por <i>T. gondii</i>	21
1.3 Subversão do Sistema Imune.....	22
1.4 Sinalização Purinérgica	24
1.5 Sinalização Purinérgica Contra Patógenos Intracelulares	29
1.6 Sinalização Purinérgica na Infecção por <i>T. gondii</i>	29
1.7 Espécies Reativas de Oxigênio na Inflamação	32
2 JUSTIFICATIVA.....	36
3 OBJETIVO GERAL.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Obtenção de Macrófagos Peritoneais	37
4.2 Manutenção da Cepa de <i>Toxoplasma</i> (RH).....	37
4.3 Interação Parasito-Hospedeiro.....	38
4.4 Análise da Produção de ROS	38
4.4.1. Detecção de ROS por Espectrofotometria.....	38
4.4.2. Detecção de ROS por microscopia de Fluorescência.....	38
4.5 Análise de Carga Parasitária.....	39
4.6 Análise da Produção de IL-1 β – ELISA.....	40
4.7 Análise Estatística	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Ativação do receptor P2X7 induz a produção de ROS, em macrófagos murinos, durante a infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	41
5.2 ATP induz a produção de ROS mitocondrial em macrófagos murinos infectados com <i>T. gondii</i>	43
5.3 A secreção de IL-1 β , durante a infecção por <i>T. gondii</i> é dependente de mtROS.	45
5.4 O efeito antiparasitário de ATP e IL-1 β envolvem a participação de ROS.....	47
5.5 ATP atua no controle da infecção por <i>T. gondii</i> de forma independente de mtROS.....	49
5.6 NADPH oxidase medeia o efeito antiparasitário induzido por ATP em macrófagos infectados por <i>T. gondii</i>	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	56
8 PERSPECTIVAS	57
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO I.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um protozoário intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, capaz de infectar animais homeotermos, incluindo o homem (Sabin e Olitsky, 1937). Foi identificado pela primeira vez em 1908, concomitantemente no Brasil em coelhos por Afonso Splendore e em roedores na África do Norte por Charles Nicolle e Louis Manceaux (Ferguson, 2009). Atualmente, *T. gondii* tem distribuição cosmopolita, sendo mais presente em países tropicais (Tenter, A.M., Heckeroth, A.R. e Weiss, L.M., 2000).

O *T. gondii* possui três formas infectivas: taquizoíta, característico da fase aguda da infecção, apresenta alta taxa replicativa com a capacidade de invadir diversos órgãos; bradizoíta, característico da fase latente da infecção, presente em cistos teciduais mais comumente encontrados em sítios imunoprivilegiados; e esporozoíto, característico da fase sexuada no hospedeiro definitivo, presente em oocisto esporulado encontrado no ambiente (Jones, Lopez e Wilson, 2003).

O ciclo de vida do *T. gondii* tem início em seu hospedeiro definitivo, os felinos. O parasito realiza sua reprodução sexuada nas células do epitélio intestinal onde são formados os oocistos não esporulados que serão eliminados nas fezes. No ambiente os oocistos esporulam e são capaz de infectar os hospedeiros intermediários (Tenter, A.M., Heckeroth, A.R. e Weiss, L.M., 2000). Nos hospedeiros intermediários o parasito realiza sua reprodução assexuada, a infecção desses hospedeiros se dá por diferentes formas infectivas: pela ingestão de oocistos esporulados que podem estar presentes na água, no solo e em alimentos de origem vegetal; pela ingestão de bradizoítos em cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas de animais infectados; ou por infecção congênita onde os taquizoítos atravessam a placenta durante a gestação (Dubey, 2004). Outras formas de transmissão têm sido reportadas como o transplante de órgãos contendo cistos teciduais e por transfusão sangue contendo os taquizoítos (Hill e Dubey, 2002) (**Figura 1**).

A infecção por *T. gondii* é comum em seres humanos, sendo a terceira doença mais transmitida por alimentos, nos Estados Unidos, que requer hospitalização e a maior causa de doença parasitária transmitida por alimento no mundo (Pappas, Roussos e Falagas, 2009; Hunter e Sibley, 2012). Segundo a última publicação do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), foi mostrado que em alguns países cerca de 95 % da população está infectada por *Toxoplasma*, e o aumento da prevalência da doença está relacionada a áreas

quentes, úmidas e com baixas altitudes (CDC, 2017). O Brasil é conhecidamente endêmico para a toxoplasmose e casos de pacientes imunocompetentes apresentando sintomas clínicos da toxoplasmose como retinocoroidite, lesões oculares, insuficiência pulmonar, dentre outros são comuns. No Brasil a soroprevalência de toxoplasmose é quatro vezes maior se comparado aos Estados Unidos da América (EUA). Em uma comparação com a Europa, às crianças brasileiras com toxoplasmose congênita, apresentam lesões oculares mais extensas e com maior propensão no comprometimento da retina (Dubey *et al.*, 2012).

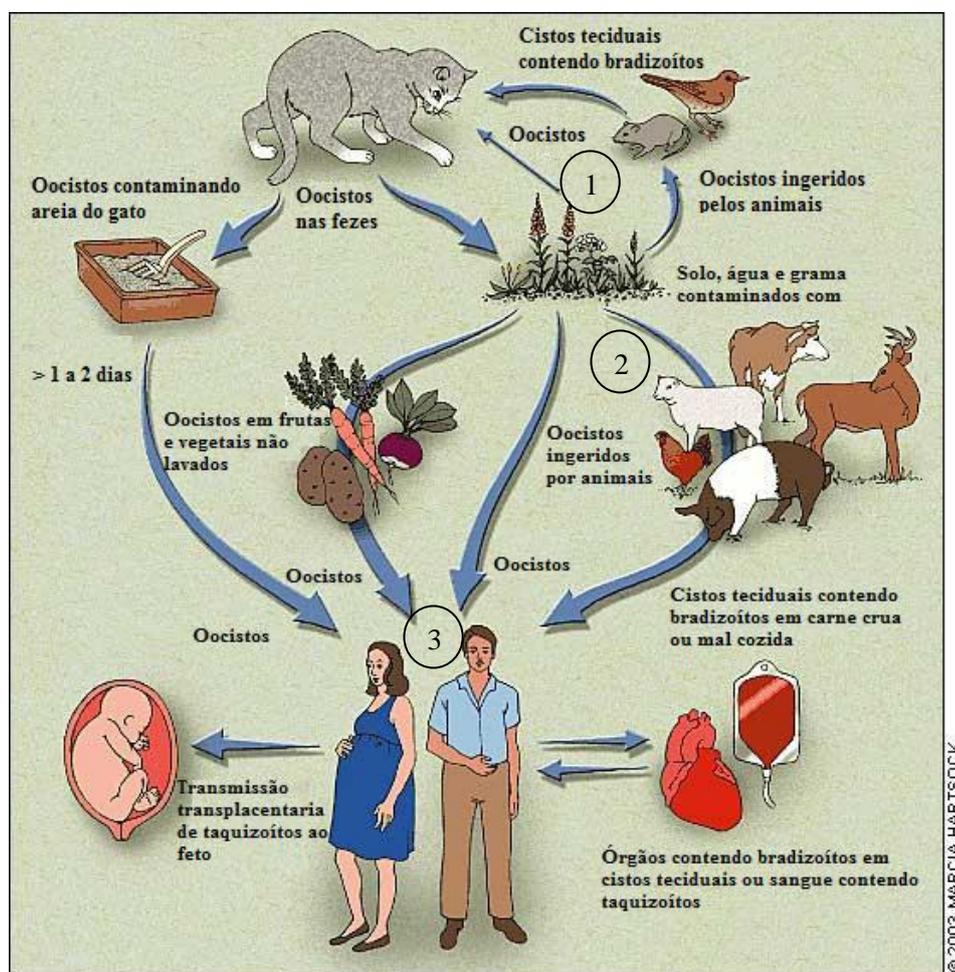


Figura 1 – Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Os oocistos eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos contaminam o ambiente podendo reiniciar o ciclo em seu hospedeiro definitivo através da predação de animais infectados ou pelo contato com os oocistos eliminados (1). Os hospedeiros intermediários podem se infectar pela ingestão dos oocistos presente em água ou alimentos (2). Além da contaminação por oocistos o homem pode se infectar de outras formas como: ingerindo carne crua ou mal cozida ou por transplante de órgão contendo cistos teciduais; através da passagem dos taquizoítos pela placenta ou transfusão de sangue contendo taquizoítos (3) (Adaptado de: Jones, Lopez e Wilson, 2003).

A toxoplasmose é classicamente definida como assintomática em indivíduos imunocompetente, e em indivíduos imunocomprometidos, os sintomas apresentam-se de forma diversa e debilitante, podendo causar morte. Os casos mais graves podem ser apresentados em pacientes como: recém-nascidos, portadores de HIV e indivíduos transplantados, devido à limitação ou comprometimento em seu sistema imunológico (Ferguson, 2009).

Existe uma relação entre a virulência da cepa com a qual o hospedeiro pode ser infectado com a susceptibilidade ou resistência à toxoplasmose. Fenotipicamente as cepas são classificadas de acordo com a virulência expressa em estudos com camundongos e a taxa de crescimento *in vitro*, onde as cepas do tipo I são altamente virulentas e com alto crescimento, enquanto as do tipo II e III são menos virulentas e com uma menor taxa de crescimento *in vitro* (Yang N., *et al.*, 2013).

Em 1995 foi feita a primeira correlação do genótipo do parasito com a gravidade da doença, em amostras da Europa e América do Norte. Esse estudo mostrou que a cepa do tipo I é mais comum na toxoplasmose congênita, mas a maioria dos casos humanos são causados pela cepa do tipo II, sendo a cepa do tipo III mais comum em animais (Howe D.K. e Sibley L.D., 1995).

No Brasil as amostras isoladas de gatos têm se mostrado geneticamente diferentes dos achados na América do Norte e Europa. Foram identificados 48 genótipos separados em quatro diferentes tipos: BrI, BrII, BrIII e BrIV, que se diferenciaram também na taxa de mortalidade em camundongos, onde o tipo BrI se apresentou altamente virulento, BrII e BrIV com virulência intermediária e BRIII, não virulento (Pena H.F.J., *et al.*, 2008). A diversidade genética do Brasil, se comparado com América do Norte e Europa, pode contribuir para a maior prevalência de doença ocular causada pelo *Toxoplasma* e uma maior prevalência de infecção se comparado a outras partes do mundo (Furtado, *et al.*, 2011). Na maioria das regiões brasileiras 50 – 80 % das grávidas apresentam soroprevalência para toxoplasmose. Em consequência, as lesões oculares em crianças brasileiras são maiores em comparação com crianças européias (Dubey J.P., *et al.*, 2012).

Uma pesquisa realizada na cidade de Campos dos Goytacazes, situada na região norte fluminense do Rio de Janeiro, que apresenta alta taxa de uveíte relacionada com a infecção por *Toxoplasma*, comparou o nível socioeconômico da população infectada. Foi observado que pessoas com o nível socioeconômico baixo apresentam maior soroprevalência para *Toxoplasma*, quando comparada com níveis socioeconômicos médio e alto. Nesse mesmo estudo foi relacionado à soroprevalência com o consumo de água não tratada, apontando para

um aumento em três vezes no risco de infecção por *T. gondii*. Este dado confirma a importância de fatores como condições ambientais, hábitos alimentares e higiene, com a diferença da soroprevalência encontrada em distintos grupos (Bahia-Oliveira L.M.G., *et al.*, 2003; Furtado, *et al.*, 2011).

O *T. gondii* é um parasito bem sucedido em subverter os mecanismos de eliminação do hospedeiro, por inibir a produção de mediadores inflamatórios como a secreção de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), é capaz de se converter para forma de resistência (bradizoíto), o que permite estabelecer uma fase latente da infecção representada pela presença de cistos teciduais, o que gera dificuldade no tratamento e cura de indivíduos infectados (Blander e Saeij, 2009).

1. 2 Resposta imune contra infecção por *T. gondii*

A infecção natural por *T. gondii* se dá pela ingestão de formas infectivas, que se rompem no intestino do hospedeiro e inicia a infecção nas células epiteliais intestinais. Após replicação, o parasito lisa a célula hospedeira e consegue se disseminar pelo organismo, este é o momento em que pode ser reconhecido por células do sistema imune inato como os neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (Hou, *et al.*, 2011). Os macrófagos, monócitos e células dendríticas reconhecem o *T. gondii* através de receptores do tipo Toll (TLRs) que estão presentes na membrana ou no citoplasma da célula. Os TLRs presentes na membrana das células do sistema imune são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os TLRs membranares capazes de reconhecer padrões associados ao *T. gondii* são o TLR 2 e 4 capazes de reconhecer proteína ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), e o TLR 11 que reconhece profilina (Denkers E.Y., 2010).

A sinalização intracelular TLRs envolvidos no reconhecimento de *T. gondii* é mediada pela molécula adaptadora MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*). A ativação de MyD88 é importante para a produção de interleucina 12 (IL-12) durante a infecção por *Toxoplasma* (Hou B., *et al.*, 2011). A citocina IL-12 é secretada por células do sistema imune inato. Ao ser reconhecida por linfócitos T e *natural killer* estas células irão responder produzindo interferon gamma (IFN- γ) (Khan I.A., Matsuura T., Kasper L.H., 1994).

Diversos mecanismos são ativados pelo IFN- γ em células do sistema imune. A ativação de indoleamina 2,3 – dioxigenase (IDO) que degrada o triptofano, aminoácido essencial para o crescimento *Toxoplasma* (Takikawa O., *et al.*, 1988). O reconhecimento do IFN- γ também leva a ativação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ativando a produção

de óxido nítrico (NO) que possui efeito microbicida inibindo enzimas metabólicas do *T. gondii*. A iNOS também é capaz de diminuir a disponibilidade de arginina, impedindo a replicação do *Toxoplasma* (Fang F.C., 2004; Yarovinsky F., 2014). As GTPases relacionadas a imunidade (IRGs) e as proteínas ligadoras de guanilato (GBPs) também são ativadas por IFN, e são capazes de destruir o vacúolo parasitóforo, deixando o *T. gondii* livre no citoplasma da célula, deixando-o susceptível a eliminação pela célula hospedeira (Yarovinsky F., 2014).

1.3 Subversão do Sistema Imune

Para o estabelecimento de uma infecção bem sucedida, os microrganismos desenvolvem formas de subverter os mecanismos microbicidas da célula hospedeira. O *T. gondii* possui um sistema específico de motilidade e secreção que lhe confere à habilidade de invadir ativamente as células do hospedeiro, auxilia na evasão da resposta imunológica e facilitar sua dispersão pelo organismo devido sua capacidade de se estabelecer em diversos tipos celulares e tecidos (Hunter e Sibley, 2012).

Após a entrada na célula, o *T. gondii* é capaz de manipular a célula hospedeira favorecendo sua replicação. O *Toxoplasma* impede a expressão de proteínas de membrana associadas à lisossoma (LAMP), receptores de manose-6-PO₄, receptores de transferrina e outras moléculas que compõem um fagossoma primário, impedindo fusão lisossomal ao vacúolo parasitóforo (VP) a esse compartimento, e conseqüentemente sua acidificação (Sibley L.D., 2003). Para a aquisição de nutrientes importantes para sua replicação, o *T. gondii* expressa a proteína de roptria 2 (ROP2) ancorada ao VP voltada para o citoplasma da célula recrutando mitocôndrias da célula hospedeira, assim como retículo endoplasmático (RE), para o entorno do VP (Sibley, LD., 2003; Hunter, CA. e Simbley, LD., 2013; de Souza W. e Belfort Jr R., 2014).

A subversão de mecanismos microbicidas também pode ser feita através da secreção de ROP16, sua ação está relacionada com a fosforilação de transdutores de sinal, resultando na ativação prolongada desses fatores, o que gera um feedback negativo na produção de IL-12 (Butcher BA., *et al.*, 2011). A ROP18 é outra proteína importante do *T. gondii* que fica ancorada ao VP, impedindo a ligação de enzimas que clivam guanosina trifosfato (GTPases), relacionadas com a resposta imune do hospedeiro, que tem como alvo a desestabilizar o vacúolo parasitóforo (Khaminets A., *et al.*, 2010).

A presença de moléculas antioxidantes no *T. gondii* tem sido amplamente estudada como um importante mecanismo de escape do controle antimicrobiano do hospedeiro. As moléculas antioxidantes parasitárias são expressas em seu citosol (peroxirredoxina (Prx) 1 e 2, catalase, superóxido dismutase (SOD) 1) ou na mitocôndria (Prx3, SOD2 e 3), e são importantes para a proteção contra a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) do hospedeiro (Kwok, LY., *et al.*, 2004).

A superóxido dismutase do *Toxoplasma* 2 (TgSOD2) e a peroxirredoxina do *Toxoplasma* 1 (TgPrx1) são expressas de forma constitutiva em todas as formas do parasito. Já a TgSOD1 e TgPrx2 estão presentes na forma de taquizoíta e bradizoíta. Todas elas sendo o importantes para a evasão dos mecanismos oxidativos das células hospedeiras contra o parasito (**Tabela 1**) (Kwok, LY., *et al.*, 2004). A presença dessas moléculas no parasito possui um papel crucial para sua sobrevivência na célula hospedeira. A indução farmacológica da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) com composto de ferro (III) ([Fe (HPCINOL) (SO₄)] 2- μ -oxo), pela célula hospedeira e a diminuição da atividade das moléculas antioxidantes do *T. gondii*, aumentou de forma significativa a morte do parasito (Portes, J.A., *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Moléculas antioxidantes do *T. gondii*. Genes de moléculas antioxidantes do *T. gondii* que foram identificados até o momento (Adaptado de Kwok, LY., *et al.*, 2004).

Proteína	Nome	Acesso	Estágio	Localização	Referência
Superóxido dismutase	SODB1	AF029915	Taquizoito/Bradizoito	Citosólico	Odberg-Ferra., <i>et al.</i> , 2000
	SOD2	AY176062	Constitutivo	Mitocondrial	Kwok LY., <i>et al.</i> , 2004
	SOD3	AY254045	Oocisto esporulado	Mitocondrial	Kwok LY., <i>et al.</i> , 2004
Catalase	CAT	AF1611267	Constitutivo	Peroxissomo?	Kaasch and Joiner, 2000
				Citosólico	Ding, <i>et al.</i> , 2001 Kwok LY., <i>et al.</i> , 2004
Glutationa redutase	GR	AF041450			
Tioredoxina redutase	TrxR?	AA519618			
Tioredoxina II	Trx	BG657266	Constitutivo	Citosólico?	Rahisfs e Beckers, 2001
Glutaredoxina	Grx1	BM131493	Oocisto esporulado		
	Grx2	BM040167			
Glutationa/tioredoxina	GPx1?	AY043228	Taquizoito/Bradizoito		

1. 4 Sinalização Purinérgica

No contexto inflamatório diversos tipos celulares são capazes de liberar nucleotídeos que atuam como sinal de perigo, dentre eles a adenosina trifosfato (ATP). Foi observado que macrófagos murinos são capazes de liberar ATP para o meio extracelular após a ativação de receptores do tipo TOLL (TLR) (Ren, H., et al., 2014). Podemos encontrar ATP no meio extracelular no contexto de células em via de morte, tal como as células necróticas, que são capazes de liberada ATP de forma desregulada. O ATP também pode ser secretado das células por canais de panexina e conexina, em células inflamatórias, e por panexina em células apoptóticas (**Figura 2**) (Idzko M., et al., 2014).

Em 1972 Burnstock descreveu a ação do ATP em células do sistema nervoso, como modelo de transmissão não-adrenérgico e não-colinérgico, sugerindo o primeiro modelo de sinalização purinérgica. Os receptores purinérgicos foram descritos em 1976 e em 1978 foram classificados de acordo com a molécula capaz de ativá-los, sendo divididos em: receptores P1 (receptores para nucleotídeos difosfatados) e receptores P2 (receptores para nucleotídeos trifosfatados) (Burnstock G., 1972; Ralevic e Burnstock, 1998) (**Figura 3**).

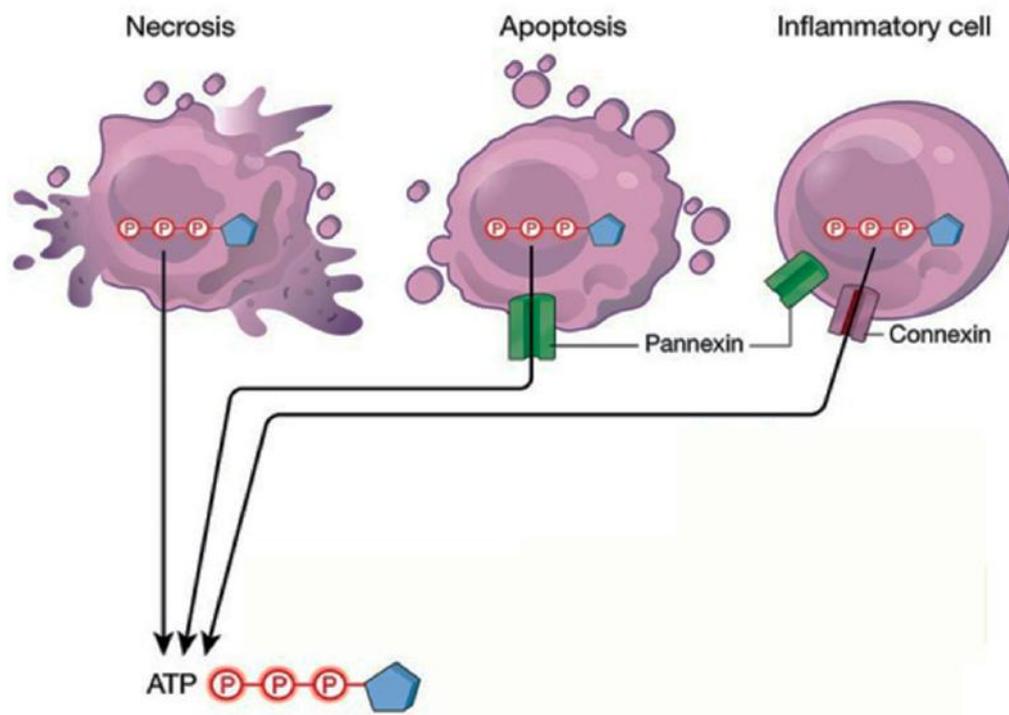


Figura 2 – Liberação de ATP para meio extracelular. O ATP pode ser liberado para o meio extracelular por células necróticas de forma desregulada, ou por canais de panexina e conexina em células apoptóticas e inflamatórias (Adaptado de: Idzko M., et al., 2014)

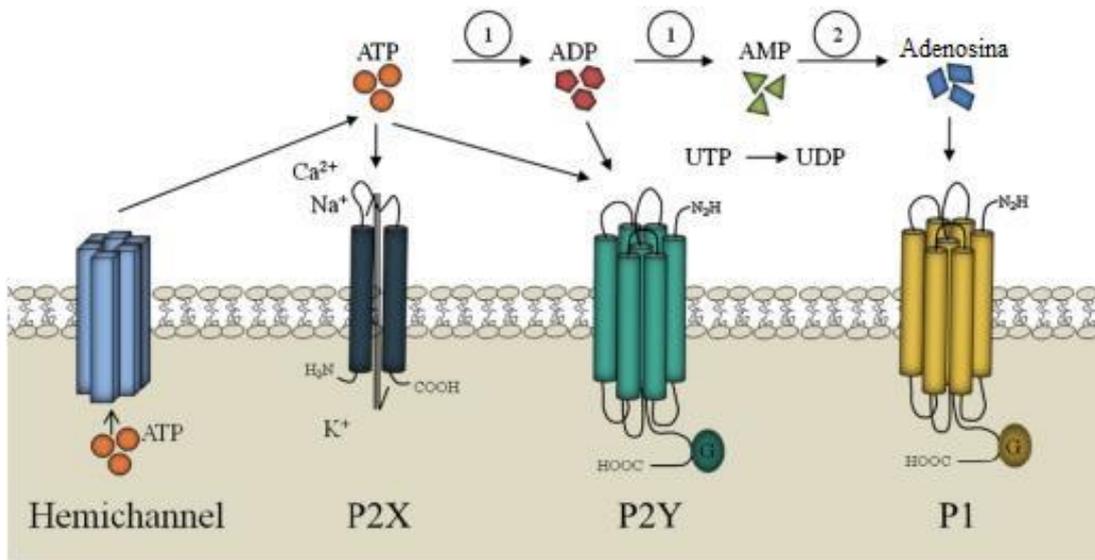


Figura 3 – Receptores purinérgicos e seus ligantes. O ATP ativa receptores P2X e P2Y. Por ação de enzimas como a nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) e ectonucleotidases fosfato do ATP e ADP, respectivamente, gerando ADP, AMP e adenosina. Os nucleotídeos gerados são capazes de ativar P2Y e P1. O UTP e UDP também são capazes de ativar receptores do tipo P2Y (Adaptado de: Kaebisch, C., *et al.*, 2015).

Em 1985 os receptores P2 foram divididos em duas subfamílias, de acordo com sua função (Burnstock G., 2004). A subfamília P2Y, composta por 8 membros (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13} e 14), que são receptores metabotrópicos ligados à proteína G. Enquanto que a subfamília P2X, é composta por 7 membros (P2X₁₋₇) conhecidos como receptores ionotrópicos, formadores de canais iônicos (Lazarowski, Boucher e Harden, 2003). (**Figura 4**)

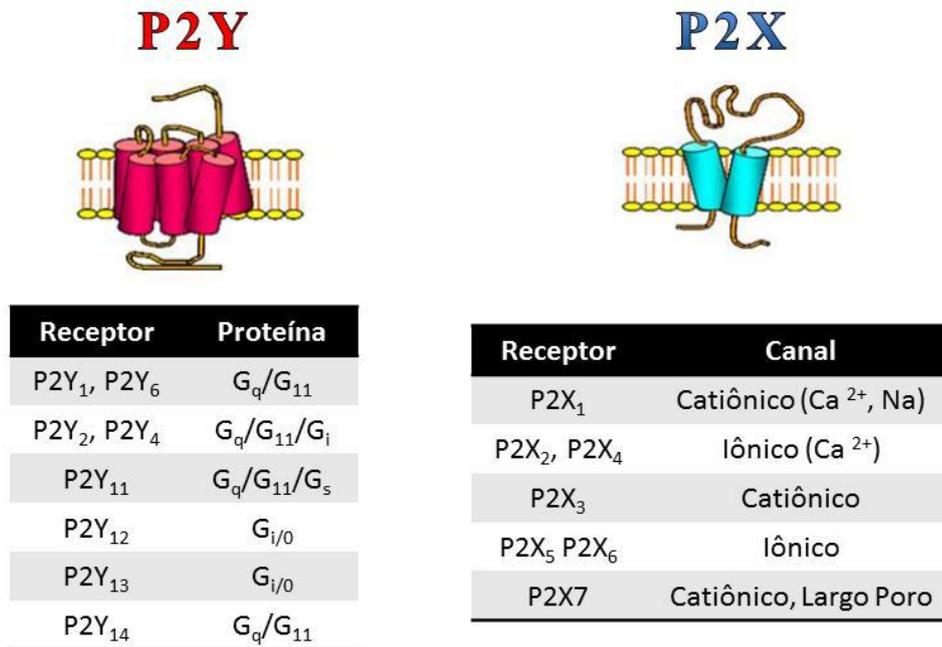


Figura 4 – Receptores P2. Os receptores P2 são subdivididos em P2Y – receptores metabotrópicos associados à proteína G e P2X – receptores ionotrópicos. (Adaptado de Burnstock G., *et al.*, 2007)

Dentre os receptores ionotrópicos, o receptor P2X7 tem grande importância no contexto inflamatório (**Figura 5**), tendo como molécula ativadora endógena o ATP. O receptor P2X7 está presente em células de diferentes tecidos incluindo células do sistema imunológico, e sua ativação participa da liberação de mediadores inflamatórios como a citocina IL-1 β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), proteína quimioatraente de monócito-1 (MCP-1), ROS, óxido nítrico (NO), além de levar a indução da fusão fagolisossomal e morte celular programada (Coutinho-Silva, *et al.*, 2007; Hughes, JP., Hatcher, JP., e Chessell, IP., 2007; Coutinho-Silva, *et al.*, 2009).

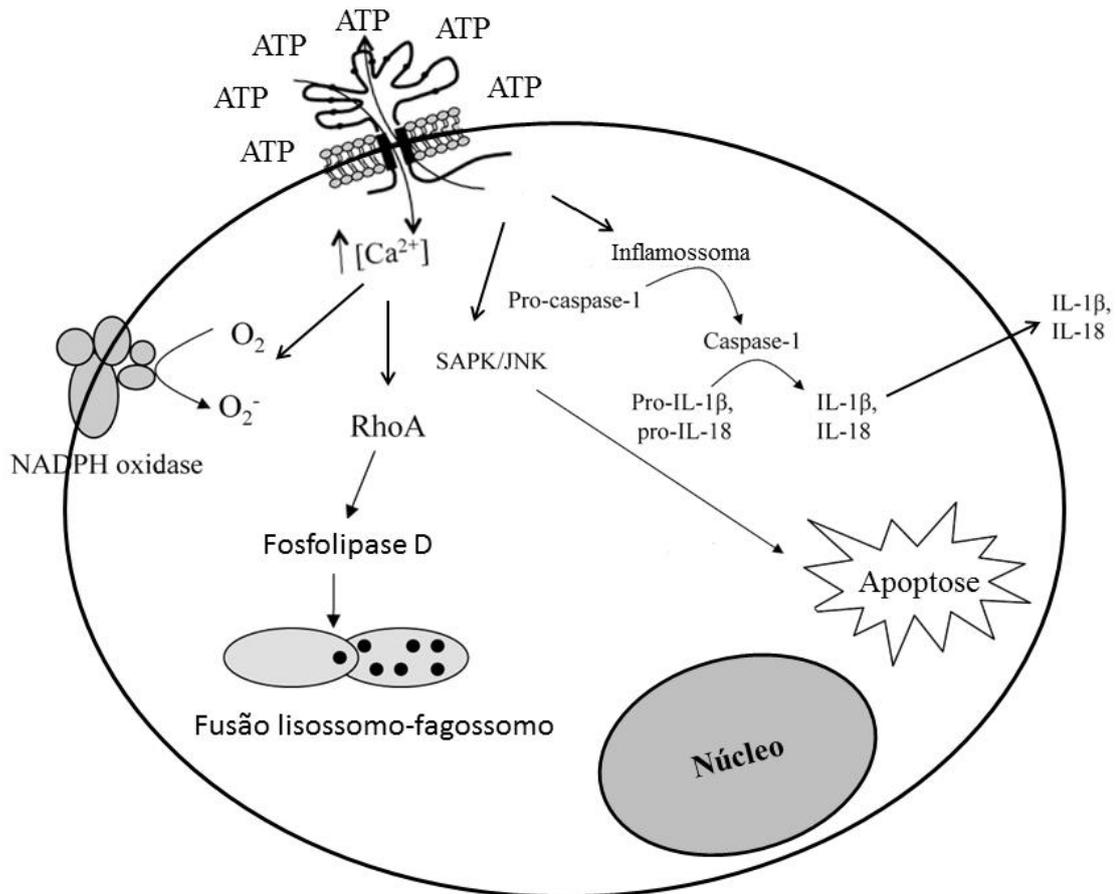


Figura 5 – Efeito celular da ativação do receptor P2X7. P2X7 após ser ativado por ATP induz a ativação de inflamossoma NLRP3 que resulta na clivagem de pró-IL-1 β e IL-18 secretadas em sua forma madura; ativa proteína quinase ativada por estresse (SAPK) / quinase c-Jun N-terminal (JNK), ativando vias de morte celular. O influxo de Ca²⁺, ativa fosfolipase D via RhoA, gerando a fusão lisossomal ao fagossomo, culminando na eliminação de patógenos intracelulares; ativa NADPH oxidase, gerando espécies reativas de oxigênio, importante mediador inflamatório (adaptado de Miller, CM., *et al.*, 2011).

Em diversos modelos tem sido mostrado que a morte celular programada por apoptose, é um dos mecanismos desencadeados pelo receptor P2X7. Estudos mostram que a ativação do receptor P2X7 é capaz de ativar diversas moléculas pró-apoptóticas como as quinases ativadas por estresse - *Stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase* (SAPK/JNK) - e ativação de caspase 3, por exemplo (Coutinho-Silva R., *et al.*, 1999; Humphreys B.D., *et al.*, 2000).

Outro mecanismo desencadeado pela ativação do receptor P2X7 é a ativação de fosfolipase D (PLD) via influxo de cálcio (Ca²⁺) (Miller, CM., *et al.*, 2011). A PLD é uma enzima que auxilia a fusão lisossomal ao fagossoma e também ativando outras fosfolipases como a fosfolipase A₂ (PLA₂), que também é capaz de promover o mecanismo de fusão (Fairbairn I.P., *et al.*, 2001).

A ativação da PLA₂ e mobilização de ácido araquidônico, gerada pelo receptor P2X7, também participa da síntese de leucotrieno B₄ (LTB₄), que são mensageiros químicos que transmitem sinais do sistema imune e sua síntese tem apresentado um papel importante durante infecções (Flamand N., *et al.*, 2007; El Ouaaliti M., Seil M. e Dehaye J.P., 2012; Chaves M.M., *et al.*, 2014)

A ativação do receptor P2X7 tem sido associada com a ativação de inflamassoma NLRP3. O inflamassoma é uma plataforma multiproteica, importante para a clivagem e consequente secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e IL-18, e sua ativação necessita de dois sinais (Schroder K. e Tschopp J., 2010). A principal proteína que compõem o inflamassoma é um sensor intracelular da família de receptores proteicos com domínio de oligomerização de nucleotídeos (NLRs) (Clay G.M., Sutterwala F.S. e Wilson M.E., 2014). Dentre os NLRs que compõem o inflamassoma, o mais estudado tem sido o NLRP3, que se associa a proteína adaptadora ASC (proteína *speck like* associada a apoptose) e uma enzima proteolítica, a caspase-1, que se encontra na sua forma inativa (pró-caspase-1).

O primeiro sinal para a ativação de inflamassoma se dá pelo reconhecimento de padrões moleculares ligados a patógeno (PAMPs) pelos TLRs, induz a ativação do fator de transcrição NF- κ B dando início a transcrição de componentes do inflamassoma e pró-IL-1 β e pró-IL-18 (Gombault A., Baron L. e Couillin I., 2012). O segundo sinal envolve a ativação do receptor P2X7, induzindo a montagem e ativação do complexo clivando a pró-caspase em caspase madura, que converte pró-IL-1 β e pró-IL-18 em IL-1 β e IL-18 maduras, subsequentemente secretada pela célula (He Y., Hara H. e Núñez G., 2016).

O receptor P2X7, após sua ativação, estimula a produção de ROS em leucócitos frente a estímulos inflamatórios ou na presença de patógenos (Guerra N.A., *et al.*, 2007). Por ser um canal iônico, sua ativação gera a alteração de íons intracelulares que ativam proteínas como a proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAP *kinase*), responsáveis por fosforilar subunidades da enzima NADPH oxidase, estimulando sua montagem e ativação (Guerra A.N., *et al.*, 2007).

A presença do receptor P2X7 em células de Kupffer é importante para a associação das subunidades da enzima NADPH oxidase, e a ativação de P2X7 está associada com maior expressão da subunidade p47^{phox} (Chatterjee S., *et al.*, 2012). A geração de ROS, após ativação do receptor P2X7, também está associada com a indução da ativação de inflamassoma, e secreção de IL-1 β (Schroder K. e Tschopp J., 2010; Tschopp J, Schroder K., 2010).

1. 5 Sinalização Purinérgica Contra Patógenos Intracelulares

Os mecanismos microbicidas ativados pelo receptor P2X7 tem um papel importante na resposta contra patógenos intracelulares. Durante a infecção por diferentes espécies e cepas de *Chlamydia* a ativação do receptor P2X7 é capaz de controlar a infecção em macrófagos e células epiteliais através da ativação de fosfolipase D (PLD) e consequente formação do fagolisossomo (Coutinho-Silva R., et al., 2003). Na infecção por outras bactérias como *Porphyromonas gingivalis*, a ativação do receptor em células epiteliais gengivais, resulta na produção de ROS, ativação de caspase-1, secreção de IL-1 β e eliminação do patógeno (Almeida-da-Silva C.L.C., et al., 2016).

O receptor P2X7 é capaz de ativar PLD, que culmina na fusão lisossomal e controle microbiano, mesmo em modelos que conhecidamente impedem esse mecanismo de eliminação, como durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Kusner D.J. e Adams J., 2000).

No contexto da infecção por protozoários como *Leishmania*, foi observado o aumento na expressão dos receptores P2X7 funcionais, tornando a célula mais susceptível à apoptose, e mais resistente à infecção (Coutinho-Silva e Ojcius, 2012). Neste mesmo contexto, já foi descrito que a ativação do receptor P2X7 é importante para a produção de mediadores inflamatórios como NO (Chaves SP., et al., 2009). A geração de LTB₄ via ativação do receptor P2X7, também tem sido mostrado importante para a eliminação de *Leishmania amazonensis* em macrófagos murinos (Chaves M.M, et al., 2014). Recentemente foi mostrado que animais deficientes para o receptor P2X7 apresentam maior susceptibilidade na infecção por *Leishmania*, desenvolvendo maior lesão na pata e maior carga parasitária, quando comparados com animais selvagens, além de uma excessiva proliferação de células T efectoras (Figliuolo, V. R., et al., 2017).

Como é possível observar, a ativação do receptor P2X7 está intimamente associada à ativação de cascatas intracelulares que desencadeiam mecanismos importantes para a proteção do hospedeiro contra diversos agentes infecciosos.

1. 6 Sinalização Purinérgica na Infecção por *T. gondii*

No contexto da infecção por *T. gondii*, a ativação do receptor P2X7 pode ocorrer após o ciclo lítico do parasito tendo um importante papel o controle da toxoplasmose. Em humanos o polimorfismo relacionado com a diminuição de função do receptor P2X7 gera um aumento

da susceptibilidade à infecção por *T. gondii* mesmo em indivíduos saudáveis (Lee, MP., *et al.*, 2010).

No contexto da infecção por *Toxoplasma* o ATP presente no meio extracelular induz a ativação do receptor P2X7 em macrófagos murinos, e a resposta microbicida desencadeada por esse receptor envolve: produção de ROS, fusão lisossomal, independente da produção de óxido nítrico (NO) (Correa, *et al.*, 2010; Lees, MP., *et al.*, 2010) (**Figura 6**).

A ausência do receptor P2X7 aumenta a susceptibilidade à infecção e dano hepático em animais infectados via intraperitoneal com *T. gondii* Me-49 (tipo II - avirulenta) (Miller, CM., *et al.*, 2011). No modelo de infecção oral, também com cepa Me-49, ocorre uma desregulação no perfil de citocinas no epitélio intestinal de animais *knockout* para o receptor P2X7 (P2X7^{-/-}) durante a fase aguda da infecção (Miller, CM., *et al.*, 2015). Dados prévios do nosso grupo mostram que na ausência do receptor P2X7, animais infectados com uma cepa virulenta de *T. gondii* (RH), apresentam maior destruição tecidual durante a fase aguda da infecção e menor produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-12, TNF- α e IFN- γ (Corrêa, G., *et al.*, 2016). Esses dados sugerem que o receptor P2X7 tem um papel chave frente à infecção por *T. gondii* nos motivando a explorar mais intimamente os mecanismos de ação por ele disparados.

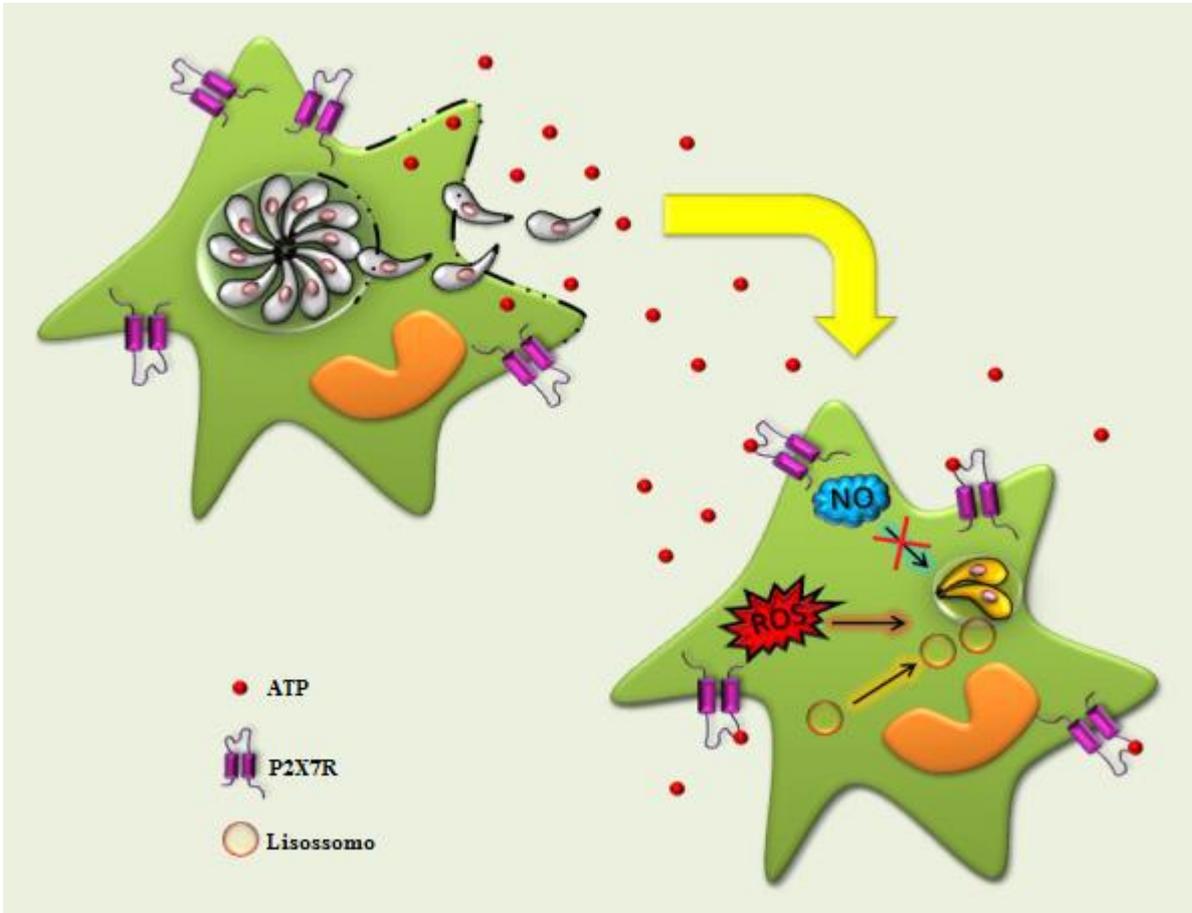


Figura 6 – Modelo de eliminação de *T. gondii* por macrófagos via ativação do receptor P2X7. Após o engresso do parasita há a liberação de ATP para o meio extracelular, ATP ativa o receptor P2X7, durante a infecção induzindo a produção de ROS e a fusão lisossomal, independente da produção de NO (Adaptado de: Correa, et al., 2010).

1. 7 Espécies Reativas de Oxigênio na Inflamação

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são definidas como radicais de oxigênio (O_2). Elas resultam do metabolismo celular e incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (Martinon 2010). Espécies reativas de oxigênio podem ser geradas como produtos do metabolismo do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons dentro da mitocôndria e também por enzimas como: NADPH oxidases, xantina oxidoreductases, lipoxigenases e ciclooxygenases (Martinon 2010). Em fagócitos, a primeira função descoberta para o ROS foi sua atividade microbicida (Dupré-Crochet, Erard e Nüße, 2013). Duas fontes de ROS se destacam em fagócitos: a NADPH oxidase e a mitocôndria.

A NADPH oxidase é uma enzima composta por multi-subunidade que estão presentes na membrana plasmática e no citosol. Duas proteínas integrais de membranas formam a subunidade principal: NOX2 (também conhecida como $gp91^{phox}$), $p22^{phox}$, que compreendem a subunidade flavocitocromo b_{558} (cyt b_{558}) e RAP1A, na porção citosólica da enzima encontra-se as subunidades reguladoras: $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$ e RAC2. A subunidade $p47^{phox}$ é fosforilada e a RAC2 se liga a guanosina trifosfato (GTP) e todo complexo citoplasmático se desloca para a membrana e se associa com a cyt b_{558} , dando início a atividade oxidativa da enzima. Ao ser ativada a NADPH oxidase transfere elétrons de NADPH para FAD, que estão associadas ao domínio c-terminal citoplasmático da NOX2, e logo em seguida para o O_2 , transformando em O_2^- (**Figura 7**) (Panday A., *et al.*, 2015).

A ausência de NOX2 é a principal causa da doença granulomatosa crônica (CGD), que gera uma deficiência na produção de ROS deixando o paciente mais susceptível a infecções fúngicas e bacteriana (Dan Dunn J., *et al.*, 2015).

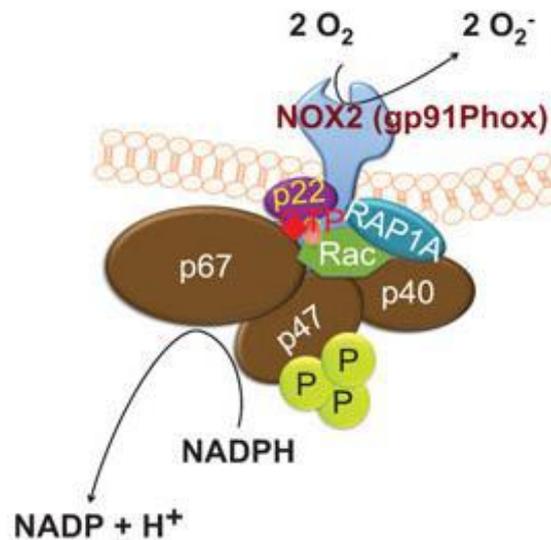


Figura 7 – Esquema da enzima NADPH oxidase. A subunidade citoplasmática p47^{phox} é fosforilada e se liga ao complexo citoplasmático (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e RAC) e por fim se associa à NOX2. A enzima a NADPH oxidase é ativada e inicia a transferência elétrons da NADPH para o O₂, gerando O₂⁻ (adaptada de Panday A., *et al.*, 2015).

A mitocôndria contribui para a geração de ROS através da cadeia respiratória, que é responsável pela síntese de ATP por fosforilação oxidativa. Essa fosforilação se dá através da oxidação aeróbica do hidrogênio, baseando-se na transferência de elétrons que ocorre na cadeia respiratória mitocondrial (**Figura 8**). O Oxigênio (O₂) recebe elétrons através da oxidação de NADH pelo complexo I e de succinato pelo complexo II, e se transforma em O₂⁻ na matriz mitocondrial, onde rapidamente transformado em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela SOD2. Os complexos I, II, em condições fisiológicas, são as principais fontes de ROS mitocondrial (mtROS), mas também existem outras fontes como o complexo III que recebe elétrons da ubiquinona para a redução do O₂, que é liberado na membrana mitocondrial interna (Hamanaka, RB. e Chandel, NS., 2010; Dikalov, 2011). Em macrófagos o mtROS pode estar envolvido com ação do ROS fora do fagossoma, como por exemplo na infecção por *Listeria monocytogenes*.

A geração de ROS em células do sistema imune inato está associada à ativação celular mediado pelo reconhecimento de PAMPs através de receptores de reconhecimento padrão (PPRs), padrões moleculares associados a dano (DAMPs) podem ser reconhecido por diversos receptores como PPRs, receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) e *triggering receptor expressed on myeloid cells 1* (TREM-1) e a secreção de citocinas pró-

bacteriostático em *Escherichia coli*, promovendo dano ao DNA enquanto concentrações mais altas desempenham outras ações que culminam na morte bacteriana (Fang F.C., 2011).

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria que tem a capacidade de se multiplicar no citosol da célula hospedeira e durante a resposta imune contra essa bactéria o reconhecimento de IFN- γ ativa o receptor nuclear de estrogênio alfa (ERR- α) que é importante para a expressão de genes que codificam a maquinaria da cadeia respiratória, aumentando a produção de mtROS, importante para o controle bacteriano (Sonoda J., *et al.*, 2007). Após o reconhecimento de *Salmonella typhimurium* por TLRs houve um aumento de mtROS pela translocação do receptor associado ao fator 6 (TRAF6), e a inibição da produção desse ROS resultou na diminuição do controle bacteriano (West A.P., Shadel G.S. e Ghosh S., 2011). Embora os estudos a cerca da participação de ROS no controle a infecções estejam crescentes, os mecanismos anti-*toxoplasma* por essa via ainda não estão totalmente elucidados.

2 JUSTIFICATIVA

Dados da literatura demonstram que ROS é um mecanismo importante para o controle de infecções contra patógenos intracelulares. Já é descrito que o *T. gondii* é capaz de modular a produção de ROS da célula hospedeira, liberando moléculas antioxidantes para o ambiente citoplasmático.

Conhecendo a importância do receptor P2X7 para o controle da infecção e proteção do hospedeiro bem como capacidade induzir a produção de ROS, se faz necessário mais estudos para compreender a contribuição de ROS na ação microbicida do receptor P2X7 no contexto da toxoplasmose.

3 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da ativação do receptor P2X7 na produção de ROS e seu papel na eliminação de *T. gondii* em macrófagos murinos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Identificar as fontes de ROS induzidas pela ativação do receptor P2X7 durante a infecção por *T. gondii*;
- 2 – Investigar a participação de ROS na atividade antiparasitária induzida pela ativação do receptor P2X7;
- 3 - Explorar a participação de ROS na secreção de IL-1 β induzida pela ativação do receptor P2X7 durante a infecção por *T. gondii*;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção de Macrófagos Peritoneais

Foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos C57Black/6 selvagens (WT) ou *knockout* para o receptor P2X7 (P2X7^{-/-}), machos ou fêmeas com 8-12 semanas. Os animais foram eutanasiados conforme as normas de bioética na utilização de animais de laboratório do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF (nº do processo: 01200.001568/2013-87). Foi realizada a injeção de 6 mL de tampão fosfato-salino (PBS) gelado no peritoneo de cada animal, seguido de massagem e aspiração do volume introduzido. O lavado peritoneal foi transferido para tubos de 15 mL e então centrifugados a 340 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspensionado em 1 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - Invitrogen, EUA). As células foram contadas em hemocítmetro e a concentração ajustada para cada experimento especificamente. As células foram mantidas por 1 hora a 37 °C e 5% de CO₂ na estufa em atmosfera umidificada (período de adesão celular). Após esse período foi realizada a lavagem dos poços com PBS a 37 °C por 2 vezes, para remoção das células não aderentes. A cultura foi mantida em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco, EUA) e 1% de penicilina e estreptomicina 100 U/mL (Sigma - Aldrich, EUA), na estufa por pelo menos 24 h antes dos experimentos.

4.2 Manutenção da Cepa de *Toxoplasma* (RH)

Os taquizoítas foram mantidos através de passagem na cavidade peritoneal de camundongos CF1, não isogênicos, com três semanas de idade. A infecção foi realizada de forma intraperitoneal com inóculo de 10⁶ parasitas por camundongo. Para a obtenção dos taquizoítos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ seguido pelo deslocamento cervical, 48 ou 72 horas após infecção. Foi injetado 5 mL de PBS gelado na cavidade peritoneal do animal seguido de aspiração. O lavado peritoneal foi transferido para um tubo de 15 mL e centrifugado por 5 minutos à 50 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 15 mL e centrifugado por 10 minutos à 1000 g. O pellet foi ressuspensionado com 1 mL de DMEM e os parasitos quantificados em hemocítmetro, e a concentração ajustada para a infecção de acordo com o número de macrófagos utilizados para cada experimento.

4.3 Interação Parasito-Hospedeiro

Para a realização dos experimentos, os macrófagos foram infectados na proporção de três parasitos para cada célula (MOI 3) e mantidos por 2 horas na estufa a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. Após o período de interação, a cultura foi levemente lavada com PBS à 37°C, com a intenção de remover os parasitos que não infectaram as células. Em seguida foram realizados os tratamentos específicos pertinentes a cada experimento.

4.4 Análise da Produção de ROS

4.4.1. Detecção de ROS por Espectrofotometria

A sonda 2', 7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA – ThermoFisher, EUA), foi utilizada como indicador para produção de ROS. Os macrófagos foram plaqueados em placa de 96 poços negra com fundo transparente, na densidade 2x10⁵ células por poço. Após infecção com *T. gondii* (cepa RH), conforme citado no item 4.3, as células foram incubadas com 5 µM da sonda H₂DCFDA diluída em Solução Balanceada de Hank's (HBSS) e juntamente pré tratadas ou não com 10 mM de N-acetilcisteína (NAC – pan inibidor de ROS), por 30 minutos. Em seguida foram tratadas ou não com 1 mM de ATP ou 100µM de H₂O₂ por 40 minutos. Todas as incubações foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. A fluorescência foi detectada em espectrofotômetro "SpectraMax³, com excitação a 490 nm e emissão em 520 nm, a uma temperatura 37 °C. Foram realizadas três leituras com intervalo de 10 minutos (tempo 40, 50 e 60 minutos).

4.4.2. Detecção de ROS por microscopia de Fluorescência

A sonda MitoSOXTM Red (ThermoFisher, EUA) detecta a produção de superóxido produzido pelas mitocôndrias. Os macrófagos foram plaqueados em placa de 24 poços na densidade 2x10⁵ células por poço. Após infecção com *T. gondii* (cepa RH), conforme citado no item 4.3, a cultura foi incubada com 5µM da sonda MitoSOX diluída em HBSS e também pré tratada com 1 µM de Rotenona (inibidor do complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons) por 30 minutos. Em seguida as células serão tratadas com 1 mM de ATP e 100 µM

de H₂O₂ por 30 minutos. Após os tratamentos as células foram lavadas com PBS, e fixadas com formaldeído 4% por 30 minutos, lavadas novamente com PBS e incubadas com 2 µg/ml de Hoechst 33342 (Invitrogen, EUA) por 5 minutos, em seguida foram lavadas com água destilada. As lamínas foram montadas com ProLong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen, EUA). A fluorescência foi observada por microscopia de fluorescência no microscópio Axio Observer- Zeiss.

4.5 Análise de Carga Parasitária

Os macrófagos de camundongos C57Black/6 WT ou P2X7^{-/-} foram plaquedas sobre lamínula redonda de 13 mm estéril, em placa de 24 poços, em uma densidade de 2x10⁵ células por poço. Após infecção com *T. gondii* (cepa RH), conforme citado no item 4.3, as células foram pré tratadas com inibidores de ROS: 10 mM de NAC, 100 nM de Mito-TEMPO (Mito – inibidor de mtROS), 1 µM de Rotenona ou 1 µM de Apocinina (inibidor específico da NADPH oxidase), por 30 minutos. Em seguida as células foram tratadas ou não com 1mM de ATP ou 1ng/mL de IL-1β recombinante, por 30 minutos. Após os tratamentos o meio foi trocado e a cultura mantida por 15 horas, totalizando 18 horas de infecção. Após incubação, as células foram fixadas com formaldeído a 4% por 30 minutos, em seguida os macrófagos foram corados com KIT Panótico Rápido (Laborclin, Brasil) e montados com entelan (Merck, EUA) em lâminas de vidro devidamente identificadas. A carga parasitária foi analisada por microscopia de luz (Zeiss Primo Star - objetiva de 100x), quantitativa e qualitativamente. A análise quantitativa é gerada pelo cálculo da porcentagem de infecção, e a análise qualitativa é obtida pelo cálculo do índice de infecção, através das fórmulas abaixo:

$$\% \text{ de Infecção} = \frac{(CI \times 100)}{CTotais}$$

$$\text{Índice de Infecção} = \frac{[\% \text{ de Infecção} \times (\frac{PI}{CI})]}{CTotais}$$

Onde: Células infectadas (CI); Células totais (CTotais); Parasitos intracelulares (PI)

4.6 Análise da Produção de IL-1 β – ELISA

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços na densidade de 2×10^5 células por poço, e após a infecção com *T. gondii* (cepa RH), conforme citado no item 4.3, as células foram pré-tratadas ou não com 100 nM de Mito-TEMPO (Mito) por 30 minutos, seguido pelo tratamento ou não com 1 mM de ATP por 30 minutos. Em seguida o meio foi trocado e as células mantidas em cultura por 15 horas, totalizando 18 horas de infecção. Após esse tempo foi coletado o sobrenadante da cultura e realizado o ensaio imunoenzimático ELISA para avaliar a secreção da citocina IL-1 β com kit comercial (kit ELISA R&D Systems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.7 Análise Estatística

Foi realizada a análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, sendo empregado *teste-T student* para as comparações entre dois grupos e ANOVA com pós-teste Turkey, para comparações múltiplas dos grupos analisados. Foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

Para análise de intensidade de fluorescência foi utilizado o programa ImageJ.

5 RESULTADOS

5.1 Ativação do receptor P2X7 induz a produção de ROS, em macrófagos murinos, durante a infecção por *Toxoplasma gondii*.

A ativação do receptor P2X7 tem a produção de ROS como uma de suas vias de eliminação de patógenos. A produção de ROS, como mecanismo microbicida, é conhecidamente subvertida pelo *T. gondii*. Com base em estudos prévios e achados do nosso grupo, nos propuzemos a analisar se o tratamento com ATP, frente a infecção por *Toxoplasma* em macrófagos de camundongos C57Black/6, seria capaz de induzir a produção de ROS.

Para tal ensaio, macrófagos infectados ou não com *T. gondii* cepa RH, foram em seguida tratados com ATP. As células foram então incubadas com a sonda H₂DCFDA, (grupamento cetato é oxidado) e a leitura da fluorescência medida 40 minutos depois do tratamento. Foi possível observar que o tratamento com ATP induziu a produção de ROS (**Figura 9**). Tal produção foi notada tanto em células não infectadas (**Figura 9 A**) quanto em células infectadas (**Figura 9 B**) com *T. gondii*. As células também receberam um pré-tratamento com pan inibidor de ROS, NAC, que se mostrou capaz de reduzir o efeito do ATP. A partir de 50 minutos após o tratamento com ATP a produção de ROS foi significativamente maior em relação ao controle não tratado (**Figura 9 C**).

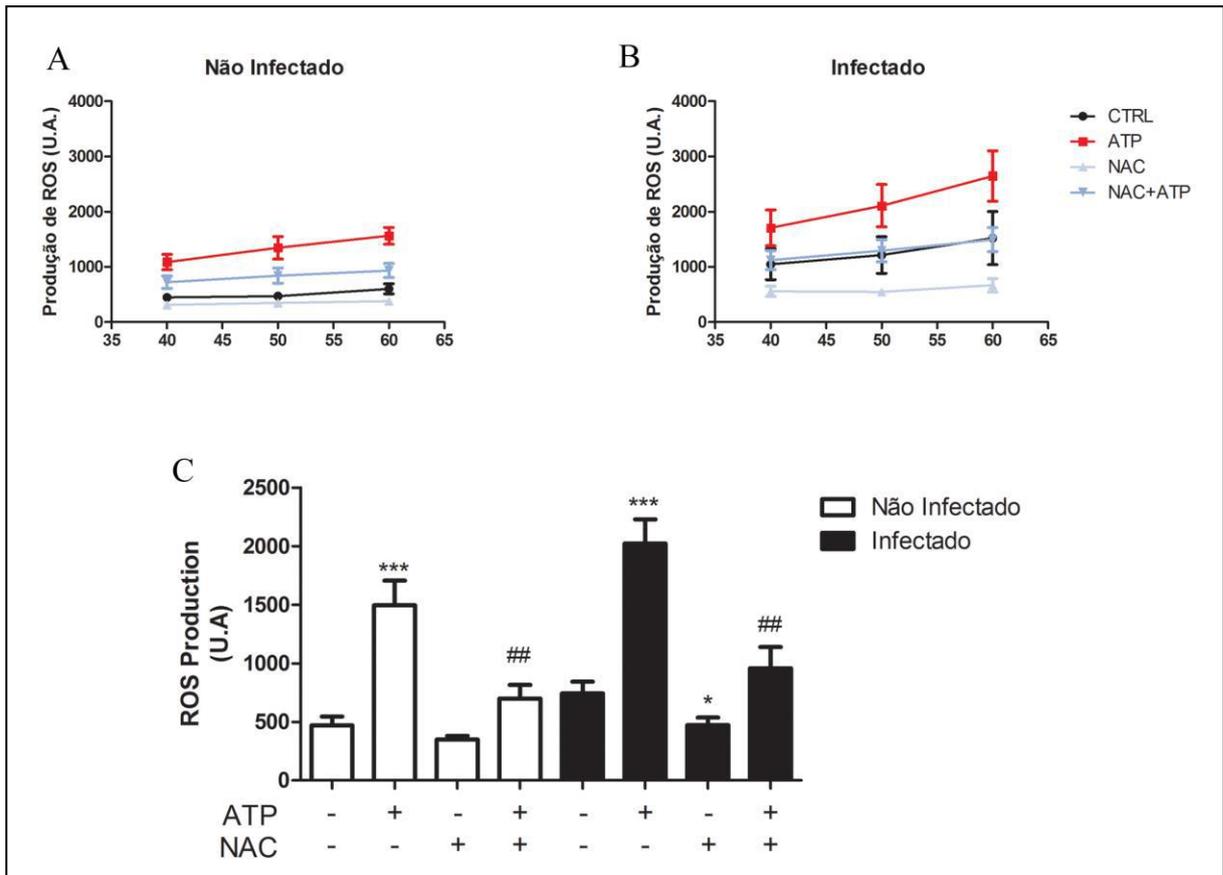


Figura 9 - ATP induz a produção de ROS em células infectadas por *T. gondii*. Macrófagos peritoneais foram infectados (B) ou não (A) com *T. gondii* (cepa RH) MOI:3 por 2 h. As células foram incubadas com a sonda H₂DCFDA e inibidor de ROS (NAC 10 mM) por 30 minutos, imediatamente após a infecção. Em seguida as células foram tratadas com ATP 1 mM. A fluorescência foi medida com uma excitação de 495 nm e emissão em 520 nm durante nos tempos de 40 min, 50 min e 60 min. Gráfico da produção de ROS após 50 minutos de tratamento com ATP (C). Gráficos apresentam média de 3 experimentos independentes. (*) significativo em relação ao controle e (#) significativo em relação ao efeito do tratamento. (* / #) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***/ ###) $p < 0,001$.

5.2 ATP induz a produção de ROS mitocondrial em macrófagos murinos infectados com *T. gondii*.

O ROS mitocondrial é essencial para o metabolismo celular, entretanto, tem sido atualmente explorado no contexto da resposta imune (Dan Dunn J., *et al.*, 2015).

Para avaliar se a ativação do receptor P2X7 induz a produção de ROS mitocondrial, os macrófagos foram infectados ou não com *T. gondii* cepa RH, incubadas com a sonda para mtROS, MitoSOX (indicador de superóxido), na presença ou ausência de de rotenona, (inibidor do complexo I da cadeia respiratória), seguidos pelo tratamento com ATP.

Como já sugerido na literatura que *T. gondii* é eficiente em bloquear a produção de ROS, em nossos experimentos a infecção foi capaz de diminuir a produção de mtROS basal e a produção estimulada por H₂O₂ na célula hospedeira (**Figura 10 A** – controle/H₂O₂). Neste contexto o tratamento com ATP foi eficiente em induzir a produção de mtROS tanto em células infectadas quanto em células não infectadas (**Figura 10**). Embora o efeito do tratamento com ATP tenha sido positivo em células infectadas com *T. gondii* e em células não infectadas, o uso do inibidor de mtROS (rotenona), reverteu a produção de ROS induzida por ATP apenas em células infectadas. Nossos dados indicam que a ativação do receptor P2X7, via ATP, é importante para a produção de diferentes fontes de ROS, em células infectadas e não infectadas.

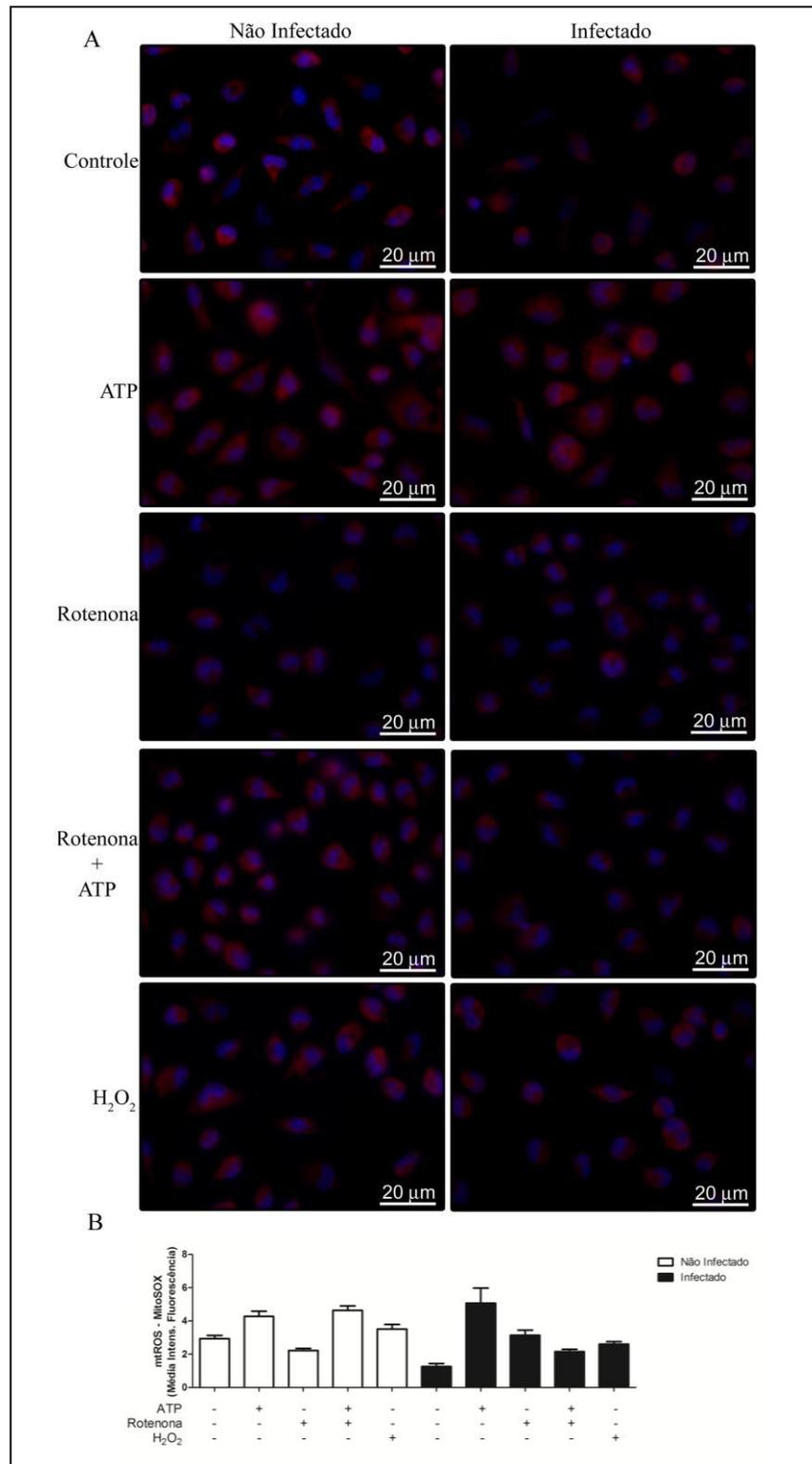


Figura 10 - ATP induz a produção de mtROS em células infectadas por *T. gondii*. Micrografia (A) apresenta macrófagos peritoneais infectados ou não com *T. gondii* (cepa RH) MOI:3 por 2 h. As células foram incubadas com a sonda MitoSOX (vermelho) juntamente com o inibidor de ROS (Rotenona 1 μ M) por 30 minutos após a infecção. Em seguida as células foram tratadas com 1 mM de ATP. Após 30 minutos as imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência, microscópio Zeiss Axio Observer, na objetiva de 100x. Gráfico apresenta quantificação da média da intensidade de fluorescência (B). N=1

5.3 A secreção de IL-1 β , durante a infecção por *T. gondii* é dependente de mtROS.

A ativação do receptor P2X7 leva a secreção de IL-1 β (Schroder K. e Tschopp J., 2010). Já tem sido mostrado que camundongos P2X7^{-/-}, durante a fase aguda da infecção por *T. gondii* cepa RH apresenta uma menor produção de IL-1 β , quando comparados com animais WT (Corrêa, G., *et al.*, 2016). Considerando que a produção de ROS também tem sido relacionada com a secreção de IL-1 β (Gabelloni M.L., *et al.*, 2013). Nos propusemos a investigar a participação de ROS na secreção de IL-1 β após a ativação do receptor P2X7, durante a infecção por *T. gondii*.

Nesse contexto utilizamos macrófagos infectados ou não com *T. gondii* cepa RH, em seguida as células foram incubadas ou não com Mito-TEMPO (Mito) e tratadas com ATP. Nossos dados mostram que, durante a infecção por *T. gondii*, o tratamento com ATP é capaz de produzir a secreção de IL-1 β . O tratamento com o inibidor de mtROS foi capaz de reverter à produção de IL-1 β desencadeada por ATP durante a infecção por *T. gondii*. **(Figura 15)**

Esses dados sugerem que a ativação do receptor P2X7, durante a infecção por *T. gondii* é importante para a secreção de IL-1 β tendo a participação de ROS produzido pela mitocôndria.

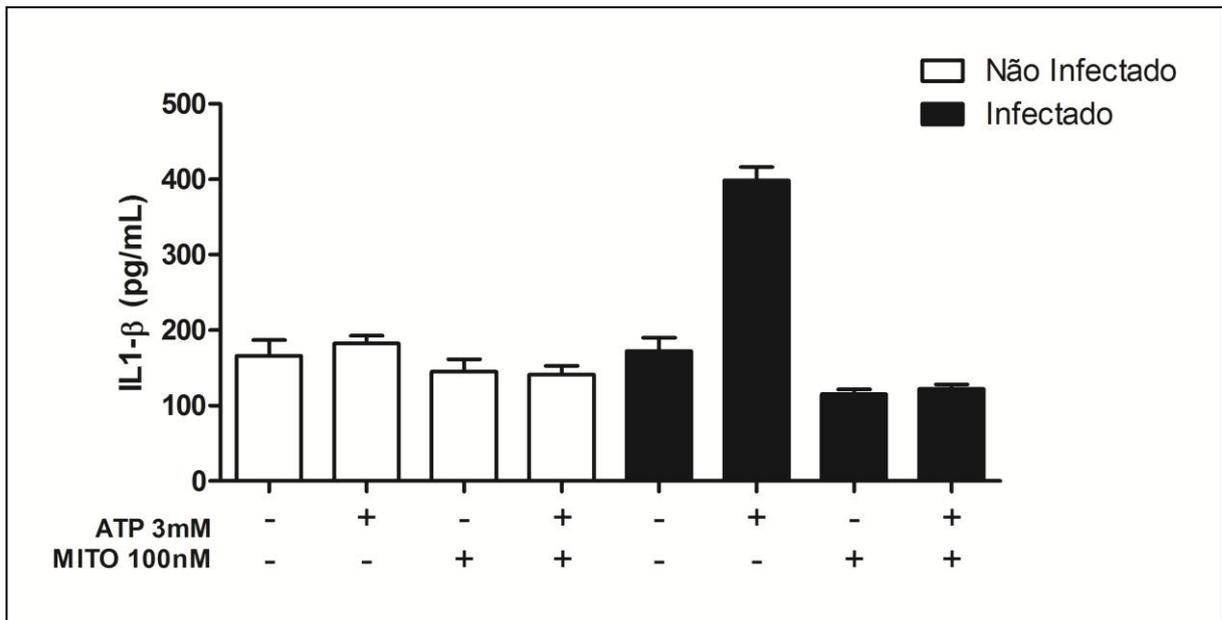


Figura 11 – Secreção de IL-1 β , após ativação do receptor P2X7, requer mtROS. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Black/6 infectados com *T. gondii* (cepa RH), MOI: 3, por 2 h. As células foram incubadas com 100 nM de Mito TEMPO (MITO) por 40 min., e em seguida foram tratadas com 3 mM de ATP. A citocina IL-1 β foi dosada após 24 h de infecção por ELISA. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

5. 4 O efeito antiparasitário de ATP e IL-1 β envolvem a participação de ROS.

A ativação do receptor P2X7 pelo ATP, ativa diferentes vias de eliminação de patógenos intracelulares (Coutinho-Silva, et al., 2007). Dentre esses mecanismos temos a produção de ROS, como tem sido observado no presente trabalho, e a secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β (Hughes, JP., Hatcher, JP., e Chessell, IP., 2007). Foi possível observar a secreção de IL-1 β durante a fase aguda da infecção por *T. gondii* (Corrêa, G., et al., 2016).

Conhecendo que o tratamento com ATP leva a produção de ROS e a secreção de IL-1 β , fomos investigar a ação desses mediadores inflamatórios durante a infecção por *T. gondii* e verificar se o ROS teria alguma participação no mecanismo de controle. Para tal, macrófagos infectados foram tratados com ATP 1 mM ou IL-1 β 1 ng/mL, na presença ou ausência do pan-inibidor de ROS e após 18 h de infecção a carga parasitária foi avaliada por microscopia óptica.

Foi possível observar que o tratamento com ATP ou IL-1 β recombinante foi capaz de reduzir a carga parasitária nos macrófagos (**Figura 11 A e B**). O mecanismo de controle foi mediado por ROS, uma vez que, na presença do pan-inibidor de ROS o efeito dessas duas moléculas foi revertido (**Figura 11 A e B**). Este dado nos indica que a ação do ATP e do IL-1 β no controle da infecção é dependente da produção de ROS.

Para avaliar se o efeito do tratamento com ATP é dependente do receptor P2X7 fomos avaliar a carga parasitária em macrófagos de animais P2X7^{-/-} infectados e tratados com ATP e IL-1 β recombinante (**Figura 11 D e E**), onde foi possível observar que o tratamento com ATP não teve efeito sobre a carga parasitária, mas o tratamento com IL-1 β recombinante se mostrou eficaz no controle parasitário, mesmo na ausência do receptor P2X7. Nossos resultados apontam que o tratamento com ATP atua de forma dependente do receptor P2X7.

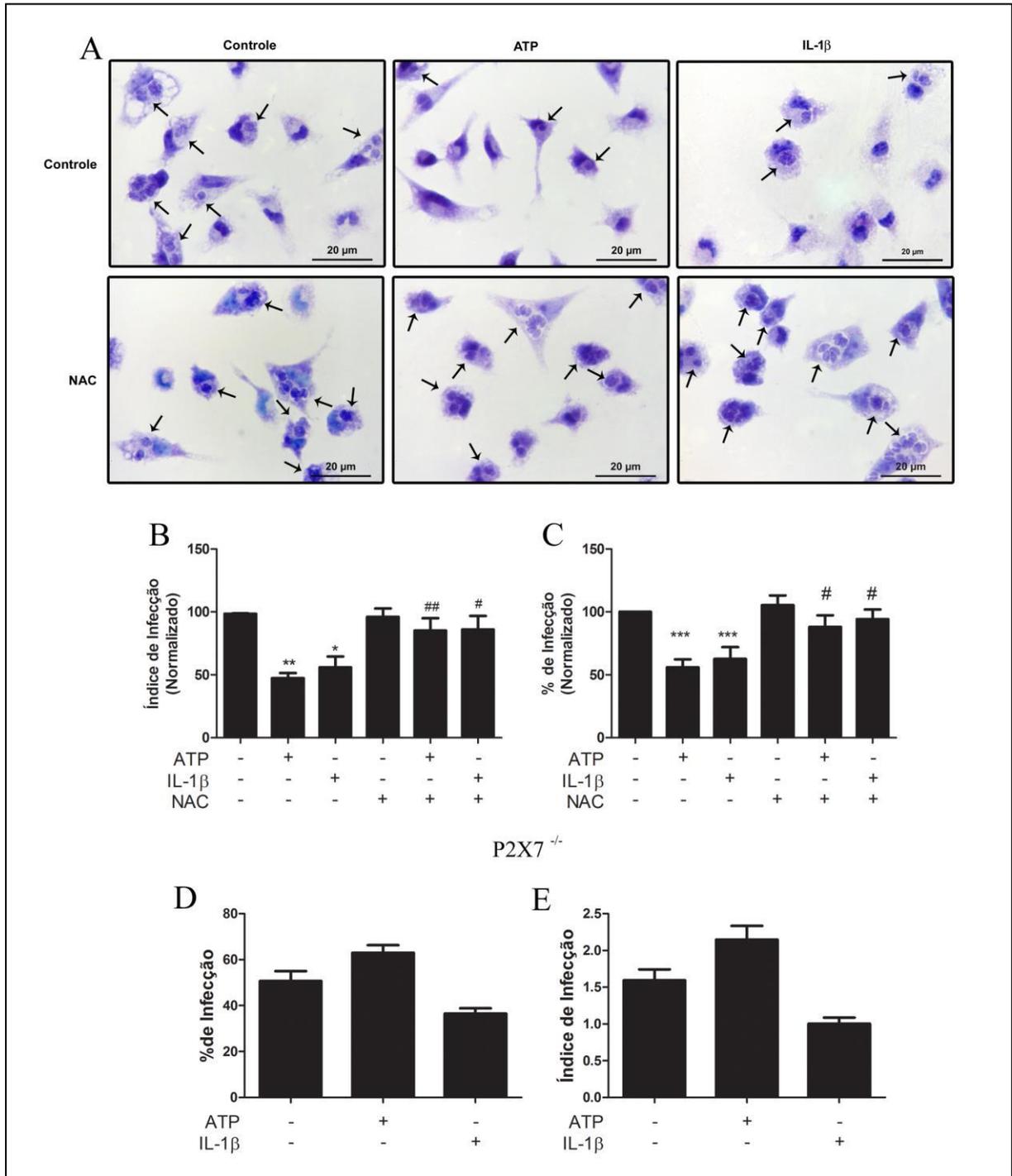


Figura 12 - Efeito do tratamento com ATP e IL-1β no controle da infecção por *T. gondii* é mediado por ROS. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Black/6 WT e P2X7^{-/-}, foram infectados com *T. gondii* (cepa RH), MOI: 3, por 2 h. Em seguida foram incubados com 10 mM de NAC por 30 min, e depois tratados com 1 mM de ATP ou 1 ng/mL IL-1β recombinante, por 30 min. (A – C) Macrófagos WT (A) Micrografia da cultura. Setas indicam células infectadas. Fotos obtidas pelo microscópio Primo Star, Zeiss. (B) Gráfico de índice de infecção (C) gráfico de porcentagem de infecção, respectivamente apresentando média e desvio de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. (D e E) Macrófagos P2X7^{-/-}. (D) Gráfico de porcentagem de infecção e (E) gráfico de índice de infecção, respectivamente, representativo de 2 experimentos independentes em triplicata. Gráficos apresentam média de 3 experimentos independentes. (*) significativo em relação ao controle e (#) significativo em relação ao efeito do tratamento (* / #) p < 0,05; (** / ##) p < 0,01; (***/ ###) p < 0,001.

5.5 ATP atua no controle da infecção por *T. gondii* de forma independente de mtROS.

Sabendo que o efeito da ativação do receptor P2X7 e da citocina IL-1 β é dependente de ROS, fomos investigar qual seria a fonte específica de ROS, envolvida no mecanismo microbicida conduzido pelo receptor P2X7. Para isso, macrófagos infectados com *T. gondii* foram pré-tratados ou não com inibidores específicos de mtROS (Rotenona ou Mito TEMPO) por 30 min. Em seguida tratados com ATP, e após 18 h de infecção a carga parasitária foi avaliada por microscopia óptica.

Como mostrado (**Figura 11**), o tratamento com ATP ou IL-1 β recombinante reduziu a carga parasitária. Interessantemente, observamos que o tratamento com rotenona apresentou redução no efeito da IL-1 β sobre o controle da carga parasitária. Entretanto, a ação do ATP sobre a infecção foi mantida (**Figura 12**), mostrada na micrografia (**Figura 12 A**) e confirmada pela quantificação de parasito intracelular – índice de infecção (**Figura 12 B**) e pela porcentagem de células infectadas (**Figura 12 C**).

Para confirmar esses dados repetimos o procedimento experimental utilizando outro inibidor de mtROS – Mito TEMPO. Foi possível observar que, novamente o efeito da citocina IL-1 β é revertido, mas o efeito do ATP se manteve (**Figura 13 A**), confirmado pela quantificação do índice de infecção (**Figura 13 B**) e pela porcentagem de infecção (**Figura 13 C**). Esses dados nos apontam que o efeito antiparasitário mediado por ATP via P2X7 é independente de mtROS, enquanto a ação microbicida da citocina IL-1 β é dependente de mtROS.

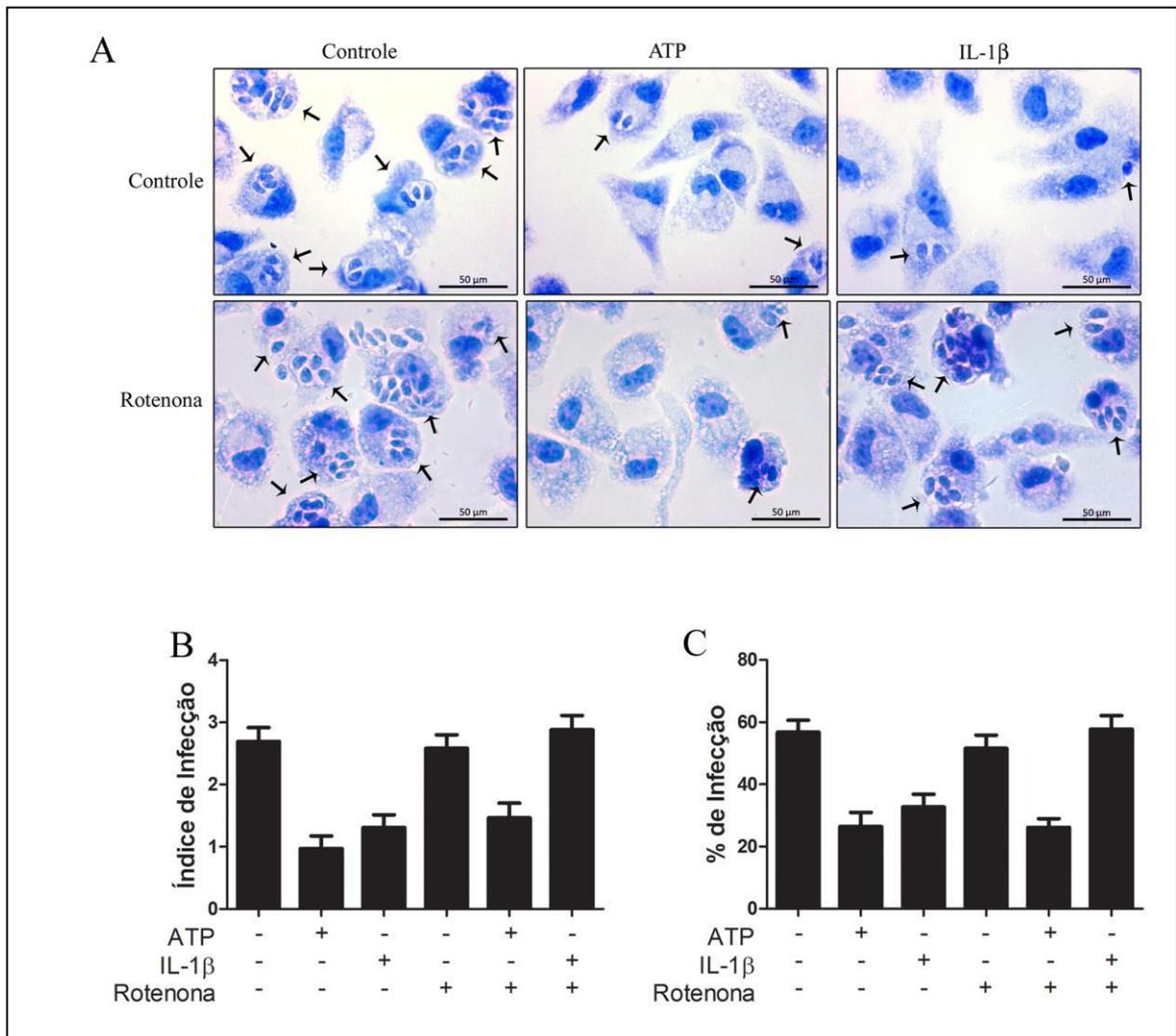


Figura 13 - Efeito do controle da carga parasitária via IL-1 β dependente de mtROS. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Black/6 infectados com *T. gondii* (cepa RH), MOI: 3, por 2 h. As células foram incubadas com 1 μ M de rotenona por 30 min., e em seguida foram tratadas com 1 mM ATP ou 1 nM IL-1 β recombinante, por 30 min. (A) Micrografia da cultura. Setas indicam células infectadas. Fotos obtidas pelo microscópio Axionplan - Zeiss. (B) Gráfico do índice de infecção e (C) gráfico de porcentagem de infecção. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes, realizados em triplicata.

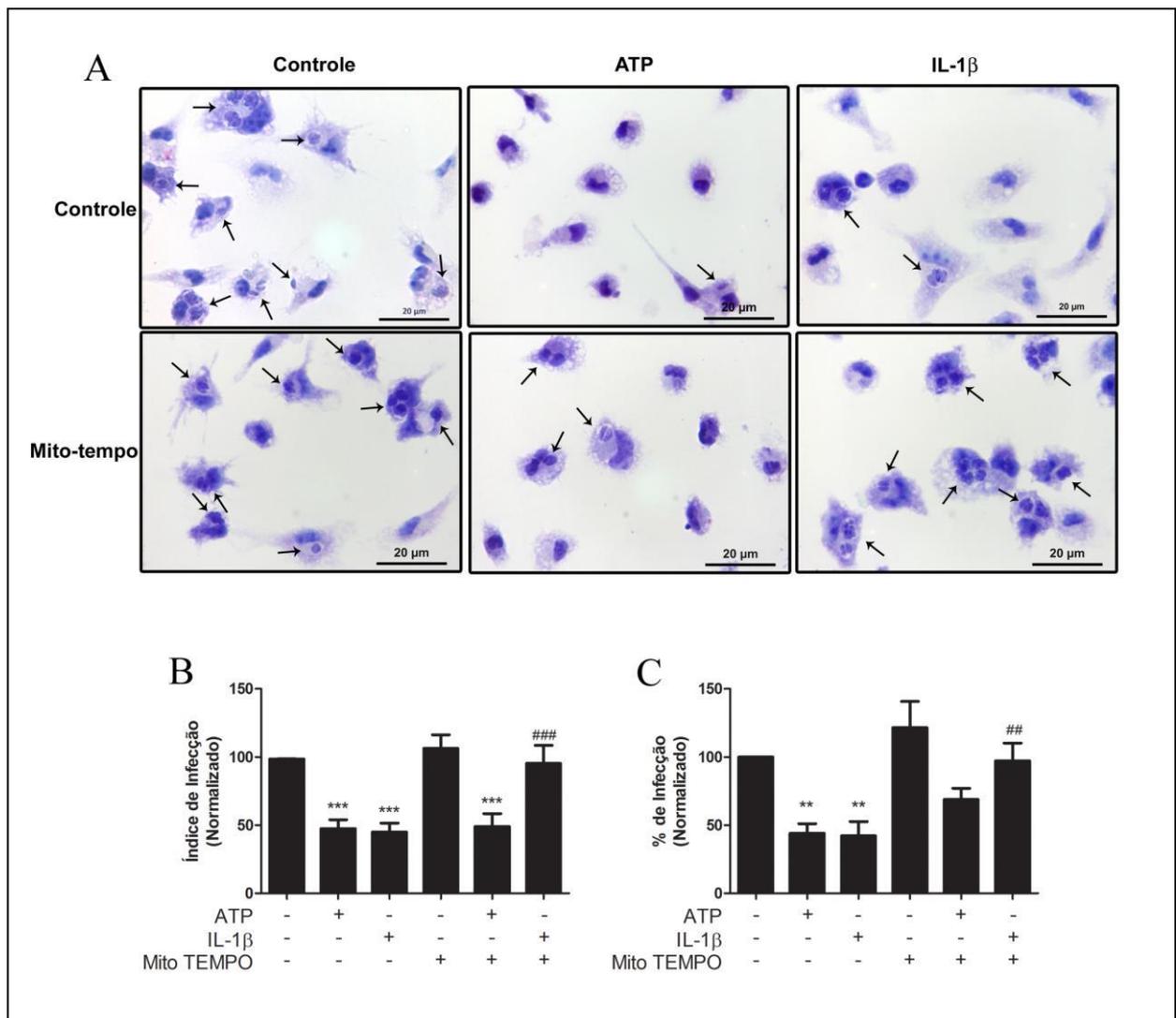


Figura 14 – Efeito do controle da carga parasitária via IL-1β dependente de mtROS Macrófagos peritoneais de camundongos C57Black/6 infectados com *T. gondii* (cepa RH), MOI: 3, por 2 h. As células foram incubadas com 100 nM de mito TEMPO por 30 min., e em seguida foram tratadas com 1 mM ATP ou 1 nM IL-1β recombinante, por 30 min. (A) Micrografia da cultura. Setas indicam células infectadas. Fotos obtidas pelo microscópio Primo Star, Zeiss. (B) Gráfico do índice de infecção e (C) gráfico de porcentagem de infecção, apresentando média e desvio de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Gráficos apresentam média de 3 experimentos independentes. (*) significativo em relação ao controle e (#) significativo em relação ao efeito do tratamento (*) $p < 0,05$; (**/ ##) $p < 0,01$; (***/ ###) $p < 0,001$.

5.6 NADPH oxidase medeia o efeito antiparasitário induzido por ATP em macrófagos infectados por *T. gondii*.

Considerando a mitocôndria e a NADPH oxidase as duas principais fontes de ROS em fagócitos, fomos analisar qual seria a participação da NADPH oxidase no controle da infecção mediado pelo receptor P2X7 uma vez que a participação do mtROS foi descartada nos experimentos anteriores.

Neste contexto, infectamos macrófagos peritoneais com *T. gondii*, após infecção foi realizado o tratamento com ATP ou IL-1 β recombinante. Foi observado um papel importante do ATP e de IL-1 β no controle da carga parasitária, como já visto anteriormente. Foi realizado, também, o tratamento com inibidor específico da NADPH oxidase – apocinina [1 μ M] – para avaliar se o efeito do ATP está ligado com essa enzima. Após o tratamento, foi observada a reversão do efeito do ATP no controle da carga parasitária, o que nos indica a participação da NADPH oxidase no controle parasitário desencadeado pela ativação do receptor P2X7. Curiosamente, o efeito da IL-1 β também necessita da NADPH oxidase, como foi mostrada pela micrografia (**Figura 14 A**), e confirmado pela quantificação do índice (**Figura 14 B**) e porcentagem (**Figura 14 C**) de infecção.

Este resultado sugere que a ativação do receptor P2X7 via ATP, atua na eliminação de *T. gondii*, principalmente com a produção de ROS pela enzima NADPH oxidase.

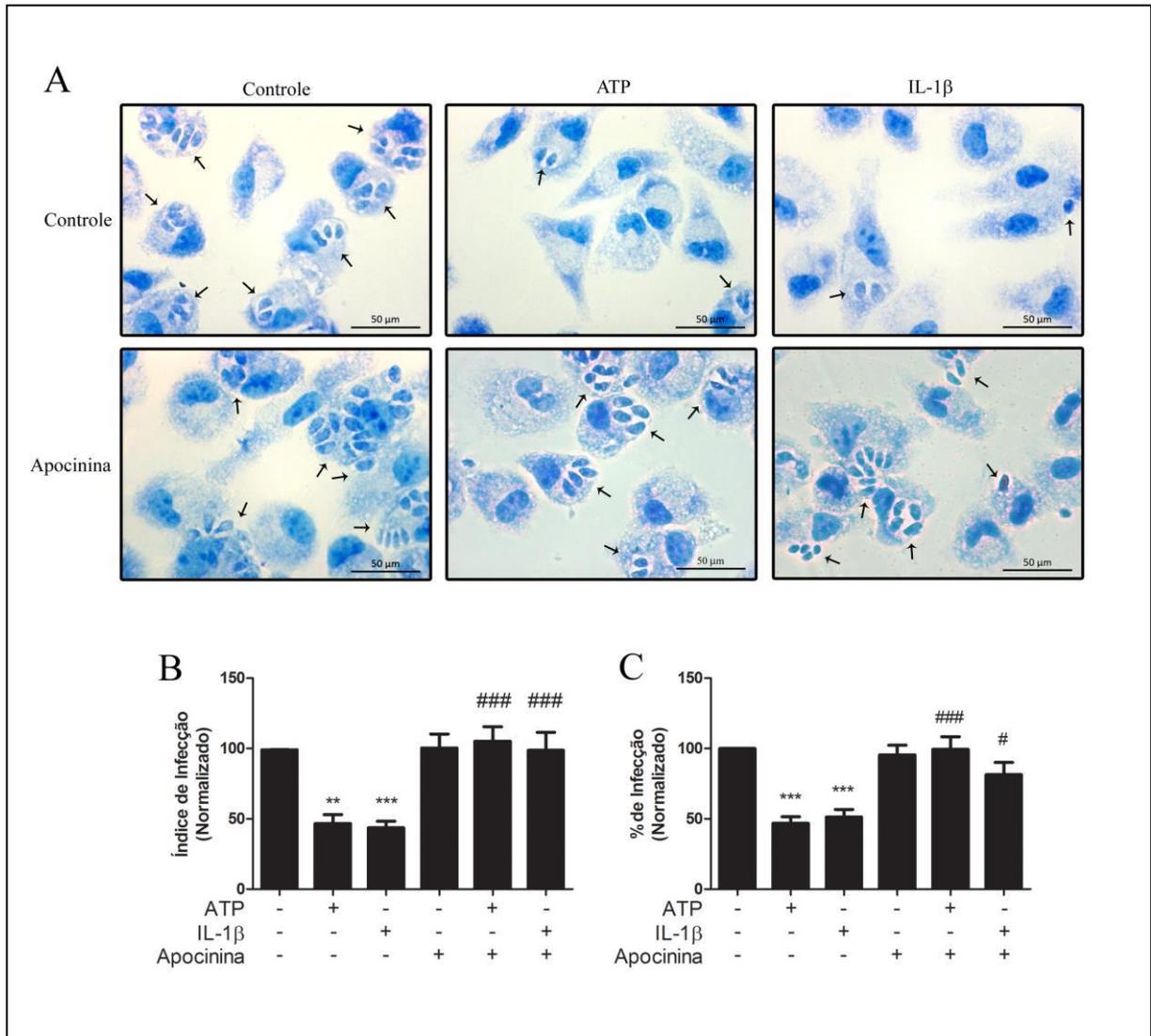


Figura 15 - NADPH oxidase participa da ação microbicida induzida por ATP. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Black/6 infectados com *T. gondii* (cepa RH), MOI: 3, por 2 h. As células foram incubadas com 1 μ M de Apocinina por 30 min., e em seguida foram tratadas com 1 mM ATP ou 1 nM IL-1 β recombinante, por 30 min. (A) Micrografia da cultura. Setas indicam células infectadas. Fotos obtidas pelo microscópio Axionplan - Zeiss. (B) Gráfico do índice de infecção e (C) gráfico de porcentagem de infecção, apresentando média e desvio de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. (*) significativo em relação ao controle e (#) significativo em relação ao efeito do tratamento (*) $p < 0,05$; (**/ ##) $p < 0,01$; (***/ ###) $p < 0,001$.

6 DISCUSSÃO

O *T. gondii* é um parasito que apresenta uma alta soroprevalência mundial. Estima-se que na América do Sul 40-80% da população esteja infectada, sendo que o Brasil apresenta uma soroprevalência de mais de 60%, com a presença de cepas atípicas causando doenças em pacientes imunocompetentes (Pappas, Roussos e Falagas, 2009). Durante a entrada na célula hospedeira o *Toxoplasma* é capaz de alterar a resposta do hospedeiro a fim de estabelecer a infecção. A modulação do hospedeiro envolve o bloqueio da fusão do lisossomo ao vacúolo parasitóforo, alteração da produção de citocinas e o bloqueio da resposta antioxidante, a fim de se livrar dos mecanismos microbicidas da célula hospedeira (Kwok, LY., et al., 2004; Hunter e Sibley, 2012). As moléculas do parasito auxiliam na modulação do hospedeiro são bem conhecidas, destacando-se a ROP-16, ROP-18, ROP-2 e as enzimas antioxidantes como TgSOD2 e TgPrx1 (Kwok, LY., et al., 2004; Khaminets A., et al., 2010; Butcher BA., et al., 2011).

A ativação do receptor P2X7 tem se mostrado um importante mecanismo de defesa contra o *Toxoplasma*, tanto em humanos, quanto em camundongos. Nosso grupo mostrou que macrófagos peritoneais de Balb/c, o tratamento com ATP leva a produção de ROS (Correa, G., et al., 2010). O perfil inflamatório de células derivadas de Balb/c está relacionado com um perfil Th2 com baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-4, associado a um perfil anti-inflamatório, já camundongos C57Black/6 apresentam um perfil inflamatório Th1, gerando uma maior produção de IL-12 e IFN- γ (Watanabe, H., et al., 2004). No nosso trabalho avaliamos esse efeito em macrófagos de camundongos C57Black/6 WT e P2X7^{-/-}, visto que o perfil inflamatório desse camundongo está diretamente relacionado à resposta imune importante para o controle da infecção por *T. gondii* (Dupont, C., Christian, D. e Hunter., C., 2012). Vimos que os macrófagos de C57Black/6 respondem ao ATP produzindo ROS de diferentes fontes, mesmo após a infecção.

As formas infectivas do *T. gondii* apresentam diferenças metabólicas. Os taquizoítos se replicam rapidamente sendo capazes de gerar energia para sua sobrevivência através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e cadeia respiratória (Vercesi A.E., et al., 1998). Já os bradizoítos apresentam apenas a via glicolítica (Denton H., et al., 1996). Porém essas vias de obtenção de energia são incompletas, sendo necessária a ligação do VP com a mitocôndria e o retículo endoplasmático da célula hospedeira, a fim de obter moléculas importantes como ATP, para seu desenvolvimento (Oliveira H.C., 2014). Nossos dados

mostraram que o *Toxoplasma* foi capaz de modular negativamente a produção basal de ROS mitocondrial, esse efeito pode estar relacionado com a íntima ligação entre o vacúolo parasitóforo à mitocôndria.

O receptor P2X7 é capaz de ativar diferentes vias inflamatórias como produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-18), fusão lisossomal, apoptose e produção de ROS (Miller, CM., et al., 2011). A ativação do P2X7 tem se mostrado importante durante a infecção por *T. gondii* tanto em humanos quanto em camundongos (Correa, et al., 2010; Lees, MP., et al., 2010). Experimentos *in vitro* mostram que o tratamento com ATP é capaz de controlar a proliferação de *Toxoplasma*, tendo a participação do receptor P2X7 (Correa, et al., 2010). Nossos dados mostram que macrófagos peritoneais de camundongos C57Black/6 WT, após o tratamento com ATP são capazes de controlar a carga parasitária, durante a infecção por *T. gondii*. Entretanto, macrófagos de animais P2X7^{-/-} não são capazes de responder ao tratamento com ATP, mostrando que o efeito antiparasitário desencadeado por ATP é via ativação do receptor P2X7.

Durante a infecção por *Leishmania*, a ativação do receptor P2X7 gera a produção de ROS, e esse mecanismo pode estar envolvido no controle da carga parasitária (Coutinho-Silva R., et al., 2009). A ativação do receptor P2X7 é capaz de reforçar os mecanismos microbicidas da célula hospedeira não permitindo o escape do *T. gondii* da fusão lisossomal, acidificação do vacúolo parasitóforo e produção de ROS (Correa G., et al., 2010).

O aumento da produção de ROS na célula hospedeira leva a destruição e morte do *T. gondii* (Portes, J.A., et al., 2015). No nosso trabalho observamos que o efeito da ativação do receptor P2X7 no controle da carga parasitária envolve ROS produzido pela ativação da NADPH oxidase, e que o efeito de mtROS é importante de forma indireta, pois medeia a secreção e concomitantemente com o efeito microbicida da citocina IL-1 β , após a ativação de P2X7, revisado por Schroder K. e Tschopp J., 2010 e confirmada em nossos resultados.

No contexto da infecção por *Porphyromonas gingivalis*, o receptor P2X7 induz a ativação e caspase-1 e secreção de IL-1 β (Almeida-da-Silva C.L.C., et al., 2016). Durante a fase aguda da infecção por *T. gondii*, a presença do receptor P2X7 se mostrou importante para o controle da infecção e produção de IL-1 β (Corrêa, G., et al., 2016). Além da ativação do receptor P2X7, a produção de ROS por diferentes fontes, também tem se mostrado importante para a secreção de IL-1 β por células fagocíticas (Hamanaka R.B. e Chandel N.S., 2010; Gabelloni M.L, 2013). Nosso trabalho mostrou que a ativação

do receptor P2X7, no contexto da infecção por *T. gondii* induz a secreção de IL-1 β durante a infecção, sendo dependente de ROS mitocôndrial.

7 CONCLUSÃO

Nosso trabalho conclui que a ativação do receptor P2X7 é importante para o controle da infecção por *T. gondii* através da produção de distintas fontes de ROS. Nossos resultados indicam que ATP atua diretamente na redução da carga parasitária, através da produção de ROS pela NADPH oxidase. Já o mtROS participa da secreção de IL-1 β induzida pela ativação do receptor P2X7 (**Figura 16**).

A citocina IL-1 β secretada após ativação do receptor P2X7 desencadeia outro mecanismo de eliminação de *Toxoplasma*, reduzindo a carga parasitária em macrófagos murinos via ROS da NADPH oxidase e mtROS.

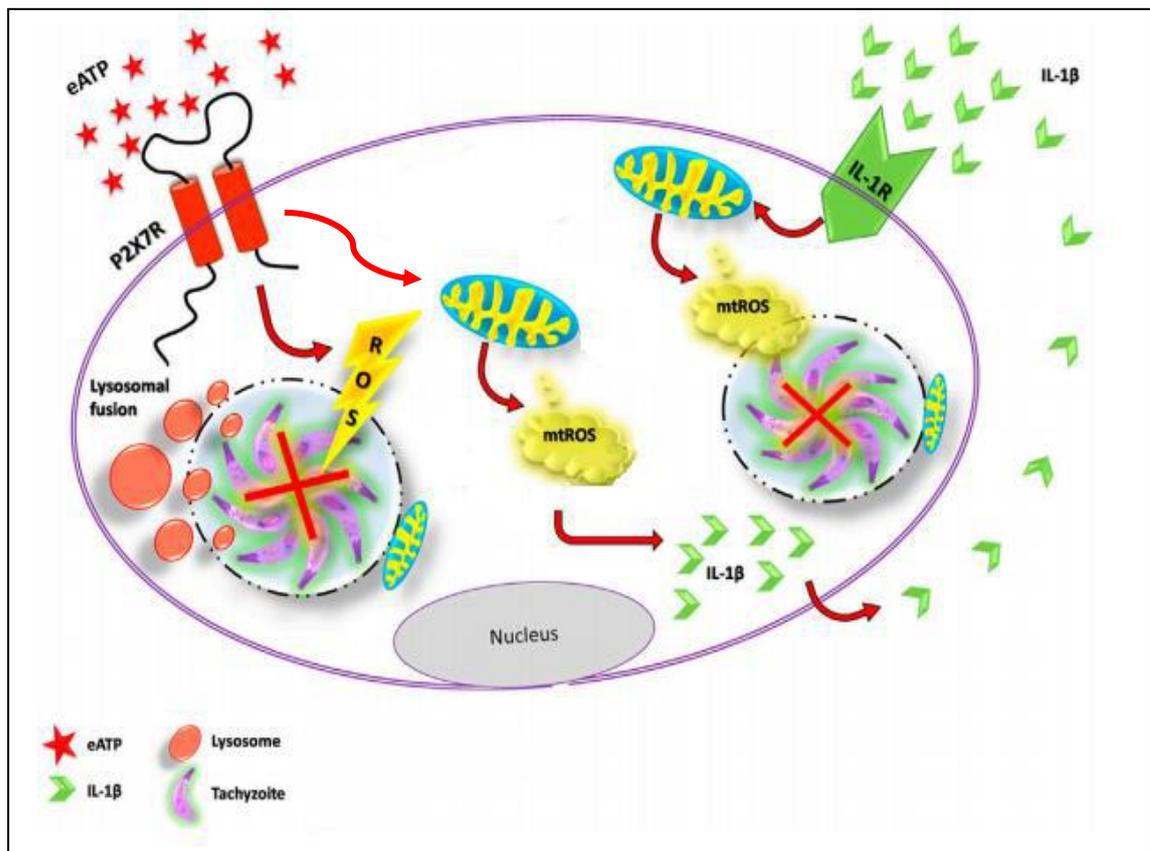


Figura 16 – Mecanismo proposto para o controle da infecção mediado pelo receptor P2X7. A ativação do receptor P2X7 via ATP, gera produção de ROS que culmina na morte do parasita e ativação de inflamassoma NLRP3, com consequente secreção de IL-1 β , que ao ser reconhecida pelo seu receptor, induz a morte do parasito via mtROS (Adaptada de: Moreira-Souza A.C.A., *et al.*, 2017)

8 PERSPECTIVAS

- Explorar a participação de ROS da NADPH oxidase no efeito antiparasitário do receptor P2X7 em macrófagos de animais *knockout* para GP91 (NOX2), (subunidade principal da NADPH oxidase);
- Avaliar a expressão das subunidades p67^{phox} e p47^{phox} em macrófagos infectados com *T. gondii*, após ativação do receptor P2X7;
- Analisar a participação de distintas fontes de ROS na secreção de IL-1 β induzida pela ativação do receptor P2X7, em macrófagos infectados com *T. gondii*;
- Avaliar se ocorre a participação de ROS na fusão lisossomal induzida pela ativação do receptor P2X7, em macrófagos infectados com *T. gondii*;
- Avaliar a participação de ROS na fusão lisossomal induzida pela ativação do receptor P2X7, em macrófagos de camundongos *knockout* para o receptor de IL-1 (IL-1r^{-/-}) infectados com *T. gondii*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrews J.F. e Barik S., 2010. Intracellular growth of *Toxoplasma gondii* requires association with respiration-competent mitochondria. The FASEB Journal vol. 24 no. 1 Supplement 510.1
2. Almeida-da-Silva C.L.C., Morandini A.C., Ulrich H., Ojcius D.M., Coutinho-Silva R. (2016). Purinergic signaling during *Porphyromonas gingivalis* infection. Biomed J. 39(4):251-260.
3. Baum, Jake., Papenfuss, Anthony T., Speed, Terence P. e Cowman, Alan F. (2006) Nature Reviews Microbiology 4, 621–628.
4. Black MW, Boothroyd JC. (2000). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64(3):607-623.
5. Blader, I.J. and Saeij, J.P. (2009). Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. APMIS. 117: 458-476.
6. Burnstock G. (1972). Purinergic Nerves. Pharmacological Reviews, 24 (3) 509-581
7. Burnstock G. (2004). Introduction: P2 Receptors. Current Topics in Medicinal Chemistry, 4, 793-803.
8. Burnstock, G. (2007). Review - Purine and pyrimidine receptors. Cell Mol Life Sci. 64(12):1471-83.
9. Butcher, BA., Fox BA, Rommereim LM, Kim SG, Maurer KJ, Yarovinsky F, Herbert DR, Bzik DJ, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* Rhoptry Kinase ROP16 Activates STAT3 and STAT6 Resulting in Cytokine Inhibition and Arginase-1-Dependent Growth Control. PLoS Pathog. 2011 Sep;7(9):e1002236
10. CDC (2017). Toxoplasmosis (*Toxoplasma* infection) - Epidemiology & Risk Factors. Disponível em <<https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>>. Acesso em 30/05/2017.
11. Chatterjee S., Rana R., Corbett J., Kadiiska M.B., Goldstein J. e Mason R.P. (2012). P2X7 Receptor-NADPH Oxidase-Axis Mediates Protein radical Formation And Kupffer Cell Activation in Carbon Tetrachloride Mediated Steatohepatitis in Obese Mice. Free Radic Biol Med. 52(9): 1666–1679.
12. Chaves M.M., Marques-da-Silva C., Monteiro A.P.T., Canetti C. e Coutinho-Silva R. (2014). Leukotriene B4 Modulates P2X7 Receptor–Mediated *Leishmania amazonensis* Elimination in Murine Macrophages. J Immunol. 192 (10) 4765-4773.
13. Chaves SP, Torres-Santos EC, Marques C, Figliuolo VR, Persechini PM, Coutinho-Silva R, Rossi-Bergmann B. (2009). Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. Microbes Infect. Sep;11(10-11):842-9.
14. Clay G.M., Sutterwala F.S. e Wilson M.E. (2014). NLR proteins and parasitic disease. Immunol Res 59:142-152.
15. Correa, G., Marques da, S.C., de Abreu Moreira-Souza, AC, Vommaro, R.C., and Coutinho-Silva, R. (2010). Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. Microbes.Infect.. 12: 497-504.
16. Corrêa G, Almeida Lindenberg C, Moreira-Souza AC, Savio LE, Takiya CM, Marques-da-Silva C, Vommaro RC, Coutinho-Silva R. (2016) Inflammatory early events associated to the role of P2X7 receptor in acute murine toxoplasmosis. Immunobiology. Apr;222(4):676-683.
17. Coutinho-Silva R., Persechini P.M., Bisaggio R.D., Perfettini J.L., Neto A.C., Kanellopoulos J.M., Motta-Ly I., Dautry-Varsat A. e Ojcius D.M. (1999). P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. Am J Physiol. 276(5 Pt 1):C1139-47.
18. Coutinho-Silva, R., Stahl, L., Raymond, MN., Jungas, T., Verbeke, P., Burnstock, G., Darville, T. e Ojcius DM. (2003). Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X 7 R-dependent phospholipase D activation. Immunity, Vol. 19, 403–412.
19. Coutinho-Silva, R., Monteiro da, C.C., Persechini, P.M., and Ojcius, D.M. (2007). The role of P2 receptors in controlling infections by intracellular pathogens. Purinergic.Signal. 3: 83-90.
20. Coutinho-Silva R., Corrêa G., Sater A.A. e Ojcius D.M. (2009) The P2X7 receptor and intracellular pathogens: a continuing struggle. Purinergic Signalling 5(2):197-204.

21. Coutinho-Silva, R. and Ojcius, David M. (2012). Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. *Microbes and Infection* 14, 1271.
22. Cruz CM., Rinna A., Forman HJ., Ventura AL., Persechini PM., Ojcius DM. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem.* Feb 2;282(5):2871-9.
23. Dan Dunn J., Alvarez L.A, Zhang X. e Soldati T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol.* 6:472-85.
24. de Souza W. e Belfort Jr R. (2014). *Toxoplasmose e Toxoplasma gondii*/ organizado por Wanderley de Souza e Rubens Belfort Jr. – Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. CDD – 22 ed, pp. 77
25. Denkers E.Y. (2010). Toll-Like Receptor Initiated Host Defense against *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2010:737125.
26. Denton H., Roberts C.W., Alexander J., Thong K.W. e Coombs G.H. (1996). Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Lett* 137(1):103-8.
27. Dikalov, Sergey. (2011). “Crosstalk between Mitochondria and NADPH Oxidases.” *Free radical biology & medicine* 51.7: 1289–1301. PMC.
28. Dubey, J.P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* 126: 57-72
29. Dubey, JP., Lago, EG., Gennari, SM., Su, C. e Jones, JL. (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.* Sep;139(11):1375-424.
30. Dupont, C. D., Christian, D. A., & Hunter, C. A. (2012). Immune Response And Immunopathology During Toxoplasmosis. *Seminars in Immunopathology*, 34(6), 793–813.
31. Dupré-Crochet, Sophie., Erard, Marie., and Nüße, Oliver. (2013). ROS production in phagocytes: why, when and where?. *JLB.* vol. 94 no. 4 657-670.
32. El Ouaaliti M., Seil M. e Dehaye J.P. (2012). Activation of calcium-insensitive phospholipase A₂ (iPLA₂) by P2X7 receptors in murine peritoneal macrophages. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators.* Volume 99, Issues 3–4, Pages 116-123.
33. Fairbairn I.P., Stober C.B., Kumararatne D.S. e Lammas D.A. (2001). ATP-Mediated Killing of Intracellular Mycobacteria by Macrophages Is a P2X7-Dependent Process Inducing Bacterial Death by Phagosome-Lysosome Fusion. *J Immunol.* 167(6):3300-7.
34. Fang F.C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol.* 2(10):820-32.
35. Fang F.C. (2011). Antimicrobial Actions of Reactive Oxygen Species. *mBio* vol. 2 no. 5 e00141-11.
36. Ferguson, David J P. (2009). *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. vol.104, n.2.
37. Figliuolo, V. R., Chaves, S. P., Savio, L. E. B., Thorstenberg, M. L. P., Machado Salles, É., Takiya, C. M., D’Império-Lima, MR., Guedes, HLM., Rossi-Bergmann, B., e Coutinho-Silva, R. (2017). The role of the P2X7 receptor in murine cutaneous leishmaniasis: aspects of inflammation and parasite control. *Purinergic Signalling*, 13(2), 143–152.
38. Flamand N., Mancuso P., Serezani C.H. e Brock T.G. (2007). Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. *Cell Mol Life Sci.* 64(19-20):2657-70.
39. Furtado JM, Smith JR, Belfort R, Gattey D, Winthrop KL (2011). Toxoplasmosis: A Global Threat. *Journal of Global Infectious Diseases* - 3(3):281-284.
40. Gombault A., Baron L. e Couillin I. (2012). ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Frontiers in Immunology.* 3:414.
41. Guerra A.N., Gavala M.L., Chung H.S. e Bertics P.J. (2007). Nucleotide receptor signalling and the generation of reactive oxygen species. *Purinergic Signalling* 7;3(1-2):39-51.
42. Hamanaka, RB., Chandel, NS. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Volume 35, Issue 9, p 505-513.*
43. He Y., Hara H. e Núñez G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 41, No. 12

44. Hewinson J., Moore S.F., Glover C., Watts A.G. e MacKenzie A.B. (2008). A Key Role for Redox Signaling in Rapid P2X7 Receptor-Induced IL-1 β Processing in Human Monocytes. *J Immunol.* 180 (12) 8410-8420.
45. Hill,D. and Dubey,J.P. (2002).*Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin.Microbiol.Infect.*8: 634-640.
46. Hou,B., Benson,A., Kuzmich,L., DeFranco,A.L., and Yarovinsky,F.(2011) Critical coordination of innate immune defense against *Toxoplasma gondii* by dendritic cells responding via their Toll-like receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 108: 278-283.
47. Howe D.K. e Sibley L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases.* 172:1561-6.
48. Hughes, JP., Hatcher, JP. e Chessell, IP. (2007). The role of P2X7 in pain and inflammation. *Purinergic Signalling* 3:163–169.
49. Humphreys B.D., Rice J., Kertsey S.B. e DUBYAK G.R. (2000). Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J Biol Chem.*275:26791–26798
50. Hunter, Christopher A. and Simbley, L. David. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nature Reviews, Microbiology.* Vol. 10: 766 – 776.
51. Idzko, M., Ferrari, D. e Eltzschig, HK. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, vol 509, 310-317.
52. Innes,E.A. (2010). A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses.Public Health* 57: 1-7.
53. InvivoGen (2011). Damage-associated molecular patterns – Review. Disponível em <<http://www.invivogen.com/review-damage-associated-molecular-patterns>>. Acesso em: 27 de nov. 2017
54. Jones J, Lopez A, Wilson M. (2003). Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Physician.* 15;67(10):2131-8.
55. Kaebisch, C., Schipper, D., Babczyk, P. e Tobiasch, E. (2015). The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 13 75–84
56. Khaminets A., Hunn JP, Könen-Waisman S, Zhao YO, Preukschat D, Coers J, Boyle JP, Ong YC, Boothroyd JC, Reichmann G, Howard JC. (2010). Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol.* Jul;12(7):939-61.
57. Khan I.A., Matsuura T., Kasper L.H., (1994). Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infect Immun.* 62(5):1639-42.
58. Kusner D.J. e Adams J. (2000). ATP-induced killing of virulent Mycobacterium tuberculosis within human macrophages requires phospholipase D. *J Immunol.* 164(1):379-88.
59. Kwok, LY., Schlüter, D., Clayton, C., e Soldati, D. (2004). The Oxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidant injury. *Molecular Microbiology*, 51 (1), 47-61
60. Lazarowski,E.R., Boucher,R.C., and Harden,T.K. (2003), Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol.Pharmacol.* 64: 785-795.
61. Lees, MP., Fuller, SJ., McLeod, R., Bouter, NR., Miller, CM., Zarzewski, AM., Mui, EJ., Witola, WH., Coyne, JJ., Hargrave, AC., Jamieson, SE., Blackwell, JM., Wiley, JS. e Smith, NC. (2010). P2X₇ Receptor-Mediated Killing of an Intracellular Parasite, *Toxoplasma gondii*, by Human and Murine Macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 184.12 7040–7046. *PMC*
62. Martinon, F. (2010). Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur. J. Immunol.* 40: 595–653.
63. Miller CM, Boulter NR, Fuller SJ, Zakrzewski AM, Lees MP, Saunders BM, Wiley JS. e Smith NC. (2011) The Role of the P2X₇ Receptor in Infectious Diseases. *PLoS Pathog* 7(11): e1002212
64. Miller,C.M., Zakrzewski,A.M., Ikin,R.J., Boulter,N.R., Katrib,M., Lees,M.P., Fuller,S.J., Wiley,J.S., and Smith,N.C. (2011). Dysregulation of the inflammatory response to the parasite, *Toxoplasma gondii*, in P2X7 receptor-deficient mice. *Int.J.Parasitol.* 41: 301-308.
65. Miller, C. M., Zakrzewski, A. M., Robinson, D. P., Fuller, S. J., Walker, R. A., Ikin, R. J., Bao., SJ., Grigg, ME., Wiley, JS. e Smith, N. C. (2015). Lack of a Functioning P2X7 Receptor Leads to Increased Susceptibility to Toxoplasmic Ileitis. *PLoS ONE*, 10(6).

66. Moreira-Souza A.C.A., Almeida-da-Silva C.L.C., Rangel T.P., Rocha G. d.C., Bellio M., Zamboni D.S., Vommaro R.C. e Coutinho-Silva R. (2017). The P2X7 Receptor Mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through Canonical NLRP3 Inflammasome Activation and Reactive Oxygen Species Production. *Front. Immunol.* 8:1257
67. Nathan C. e Cunningham-Bussel A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol* 13:349-361.
68. Netea M.G., Simon A., van de Veerdonk F., Kullberg B.J., Van der Meer J.W. e Joosten L.A. (2010). IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog* 26;6(2):e1000661.
69. Oliveira, H.C. (2014). Envolvimento de mitocôndrias e do retículo endoplasmático da célula muscular esquelética na cistogênese de *Toxoplasma gondii*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 96f.
70. Panday, A., Sahoo, MK., Osorio, D. e Batra, S. (2015). NADPH oxidase: na overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & Molecular Immunology* 12, 5–23.
71. Pena H.F.J., Gennari S.M., Dubey J.P. e Su C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* Volume 38, Issue , Pages 561-569.
72. Portes J.A., Souza T.G., dos Santos T.A.T., da Silva L.L.R., Ribeiro T.P., Pereira M.D., Horn. JR. A., Fernandes C., DaMatta R.A., de Souza W. e Seabra S.H. (2015). Reduction of *Toxoplasma gondii* Development Due to Inhibition of Parasite Antioxidant Enzymes by a Dinuclear Iron(III) Compound. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. PMC, 59(12):7374-7386.
73. Ralevic,V. and Burnstock,G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol.Rev.* 50: 413-492.
74. Sabin, AB, Olitsky, PK. (1937). *Toxoplasma gondii* and obligate intracellular parasitism. *Science*, 85: 336-338.
75. Schieber, M. e Chandel, NS. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol.*; 24 (10): R 453-R 462.
76. Schroder K. e Tschopp J., (2010). The Inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.
77. Sibley, LD. (2003). *Toxoplasma gondii*: Perfecting an Intracellular Life Style. *Traffic*; 4: 581–586.
78. Skariah,S., McIntyre, M.K., and Mordue,D.G. (2010). *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol.Res.*107: 253-260.
79. Sonoda J., Laganière J., Mehl I.R., Barish G.D., Chong L.W., Li X., Scheffler I.E., Mock D.C., Bataille A.R., Robert F., Lee C.H., Giguère V. e Evans R.M. (2007). Nuclear receptor ERR alpha and coactivator PGC-1 beta are effectors of IFN-gamma-induced host defense. *Genes Dev.* 21(15):1909-20.
80. Souza, W e Belfort, B (2014). *Toxoplasmose e Toxoplasma gondii*. Organizado por Wanderley de Souza e Rubens Belfort Jr. – Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pp. 18-19;
81. Takikawa O., Kuroiwa T., Yamazaki F. e Kido R. (1988). Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J Biol Chem.* 263(4):2041-8.
82. Tenter, AM, Heckerth, AR, Weiss, LM. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30: 1217-1258.
83. Tschopp J., Schroder K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?. *Nat Rev Immunol.* 10(3):210-5.
84. Vercesi A.E., Rodrigues C.O., Uyemura S.A., Zhong L. e Moreno S.N. (1998). Respiration and oxidative phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 273(47):31040-7.
85. Watanabe, H., Numate, K., Ito, T., Takagi, K. e Matsukawa, A (2004). Innate Immune Response In Th1- And Th2-Dominant Mouse Strains. *SHOCK*, Vol. 22, No. 5, pp. 460–466.
86. West A.P., Shadel G.S. e Ghosh S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nature reviews Immunology.* 11(6):389-402.
87. Yang H.C., Cheng M.L., Ho H.Y. e Chiu D.T. (2011). The microbicidal and cyto regulatory roles of NADPH oxidases. *Microbes Infect.* 13(2):109-20.

88. Yang N., Farrell A., Niedelman W., Melo M., Lu D., Julien L., Marth G.T., Gubbels M.J. e Saeij J.P.J. (2013). Genetic basis for phenotypic differences between different *Toxoplasma gondii* type I strains. BMC Genomics, 14:467.
89. Yarovinsky F. (2014). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. Nat Rev Immunol. Feb;14(2):109-21.

ANEXO I

Lista de trabalhos apresentados, prêmios e artigos publicados durante a execução do projeto de monografia.

1. Apresentações de Trabalho

- 1.1 Ros Production and IL-1 β Secretion Mediates *Toxoplasma* Elimination After P2X7 Activation. (II Internacional Congress of Purinergic Signalling in South América, 2015 / XXXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnologia, Artística e Cultural da UFRJ, 2015 / XXI Semana de Microbiologia e Imunologia - UFRJ, 2015).
- 1.2 Mitochondrial ROS: Its Importance in the Elimination of *T. gondii* due Activation of P2X7 Receptor. (VI Brazilian Purine Club Meeting, 2016).
- 1.3 NADPH-Oxidase is the Main Source of ROS Induced by P2X7 Receptor Activation in *Toxoplasma gondii* Infected Macrophage. (XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2016).
- 1.4 Ros: Sua Importância na Eliminação de *T. gondii* Após a Ativação do Receptor P2X7 (XXXVIII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnologia, Artística e Cultural da UFRJ, 2016 / XXII Semana de Microbiologia e Imunologia - UFRJ, 2016).
- 1.5 P2X7 Receptor Control *Toxoplasma gondii* Infection Through ROS from NADPH-oxidase. (VII Brazilian Purine Club Meeting, 2017).
- 1.6 NADPH Oxidase Participa do Controle da Infecção por *Toxoplasma gondii*, Mediado Pelo Receptor P2X7. (XXXIX Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnologia, Artística e Cultural da UFRJ, 2017 / XXIII Semana de Microbiologia e Imunologia - UFRJ, 2017).

2. Premiações

- 2.1 Melhor trabalho da sessão de Imunologia, durante XXII Semana de Microbiologia e Imunologia - UFRJ, 2016;

- 2.2 Indicação para melhor trabalho do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, durante a XXXVIII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnologia, Artística e Cultural da UFRJ, 2016;
- 2.3 Melhor trabalho da sessão de Imunologia, durante XXIII Semana de Microbiologia e Imunologia - UFRJ, 2017;
- 2.4 Menção honrosa, durante a XXXIX Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnologia, Artística e Cultural da UFRJ, 2017.

3. Artigo Publicado

- 3.1 Moreira-Souza A.C.A., Almeida-da-Silva C.L.C., Rangel T.P., Rocha G. d.C., Bellio M., Zamboni D.S., Vommaro R.C. e Coutinho-Silva R. (2017). The P2X7 Receptor Mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through Canonical NLRP3 Inflammasome Activation and Reactive Oxygen Species Production. *Front. Immunol.* 8:1257.