



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PAULA FERNANDA COSTA DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DE TOXOPLASMA GONDII E ARMADILHAS
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EM CÉLULAS
MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE GATOS.**

**ILHÉUS – BAHIA
2021**

PAULA FERNANDA COSTA DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DE TOXOPLASMA GONDII E ARMADILHAS
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EM CÉLULAS
MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE GATOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Santa Cruz, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Clínica e Sanidade
Animal

Orientador: Prof Dr. Alexandre Dias
Munhoz

**ILHÉUS – BAHIA
2021**

PAULA FERNANDA COSTA DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DE TOXOPLASMA GONDII E ARMADILHAS
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EM CÉLULAS
MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE GATOS**

Ilhéus – BA, __/__/2021

Prof. Dr. Alexandre Dias Munhoz – Dsc
UESC/DCAA
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Fabiana Lessa Silva – Dsc
UESC/DCAA

Dra. Luciana Carvalho Lacerda – Dsc
Célula Laboratório Veterinário

Prof. Dr. Uillians Volkart de Oliveira – Dsc
Faculdade de Ciências Sociais Aplicadas - FACISA

**ILHÉUS – BAHIA
2021**

“O bọ okan ki ja ọmọ logun, Ọya ni emi iyo ẹ.”

Oriki lorubá

AGRADECIMENTOS

Por trás de toda conquista carrego a gratidão à minha ancestralidade. Obrigada, minha mãe Oyá Igbalé por toda força e bons ventos que me trouxe, por toda sua benção, acolhimento e amor. Ao meu pai Ajagunã por ter sempre me protegido e abençoado. Obrigada toda jurema sagrada, Dona Maria Padilha, todos os encantados e todos os mestres.

À minha filha o maior agradecimento. Ela quem me trouxe a paciência que nunca tive, me ensinou a respeitar meus limites, me apresentou um novo mundo e me transformou em uma nova pessoa. A Rodolfo, meu marido, todo meu amor, gratidão e carinho, por ter tido paciência em meus momentos de estresse, por ter aguentado tanto tempo longe de mim nessa fase e por ter me ajudado, como sempre. Vocês são as razões da minha vida!

Obrigada a minha mãe Lêda por sempre ter sido meu suporte, meu colo e minha força. Sua ajuda foi imprevisível para eu conseguir o que consegui. A meu pai Jailson e meu irmão Guilherme, meu protetores, mentores, amigos e ídolos. Eu amo vocês.

Ao meu orientador por toda paciência, empatia, acolhimento, principalmente nessa reta final. Mesmo sem o conhecer, percorri 800km para ser sua orientada e passei a admirá-lo. Munhoz, levarei-o sempre comigo com muito carinho na memória.

À Aisla e Gabriela por terem feito tanto por mim, por toda a ajuda ímpar, todos os ensinamentos e companheirismo da rotina. Sentirei saudades de vocês. À professora Jane Santos pelos ensinamentos, pela disponibilidade e por toda contribuição.

A Luciano, Juciene, Jullyana e José por toda força e ajuda que me deram em todos os experimentos.

À Maíra, Amanda, João, Reizane, Áquila, Larissa, Will e Lucas por terem me acompanhado e feito sorrir nessa jornada.

A Caio e Esdras, meus irmãos e amigos, que mesmo distantes nunca me deixaram sozinha e me acalmaram quando eu me sentia desamparada na Bahia.

Ao meu pai Junior de Ajagunã por ter me aconselhado, me guiado, me abraçado em momentos difíceis e ter feito tanto por mim, principalmente nesse período.

À minha sogra e minhas cunhadas, Patrícia, Ariane e Aline por todo suporte nessa fase de escrita.

À todos que torceram por mim, que fizeram parte direta ou indiretamente.

À mim por não ter desistido quando o desespero bateu.

Obrigada a todos!

INFLUÊNCIA DE TOXOPLASMA GONDII E ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS EM CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE GATOS

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo esclarecer os mecanismos de defesa de células mononucleares do sangue periféricos gatos expostos a taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, bem como tratadas com armadilhas extracelulares de neutrófilos *in vitro*. Células mononucleares do sangue de periférico de gatos foram testadas quanto a sua viabilidade pelo ensaio de MTT e dosagem de LDH e expressão das citocinas IFN γ , IL-1 β , IL-12 e IL-10 pela RT-qPCR. Os resultados demonstraram que (i) a viabilidade de células mononucleares do sangue de periférico de gatos estimulados com *T. gondii* diminuiu significativamente após 48 horas ($p < 0,05$) e as NETs promovem citotoxicidade a partir de 24 horas de interação ($p < 0,01$); (ii) Aumento significativo na produção de IFN γ pelas células mononucleares estimuladas com *T. gondii* no tempo 24 horas ($p = 0,0149$); (iii) Elevada expressão de IL-1 β nas células estimuladas com *T. gondii* ($p = 0,0163$) e tratadas com NETs ($p = 0,0494$) durante 48 horas; (iv) Regulação positiva da expressão de IL-10 em células estimuladas com *T. gondii* a partir de 48 horas ($p = 0,0376$). Esses resultados sugerem que a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico de gatos é afetada pela infecção com *T. gondii in vitro*, após 48 horas, além de apresentar uma forte expressão de IL-1 β e IL-10. Além disso, células mononucleares de gatos tratadas armadilhas extracelulares de neutrófilos *in vitro* confere uma diminuição da viabilidade das células e uma modulação positiva para IL-1 β .

Palavras-chave: PBMC. Felinos. Imunidade. Parasito

TOXOPLASMA GONDII INFLUENCE AND NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF CATS

ABSTRACT

The aim of this study was to clarify the defense mechanisms of Peripheral Blood Mononuclear Cells in cats exposed to *Toxoplasma gondii* tachyzoites, as well as treated with Neutrophil Extracellular Traps *in vitro*. Peripheral Blood Mononuclear Cells of cats were tested for their viability by MTT and LDH assay, and expression of cytokines IFN γ , IL-1 β , IL-12 and IL-10 by RT-qPCR. The results showed that (i) the viability of peripheral blood mononuclear cells from cats stimulated with *T. gondii* significantly decreased after 48 hours ($p < 0.05$) and NETs promote cytotoxicity after 24 hours of interaction ($p < 0.01$); (ii) Significant increase in the production of IFN γ by mononuclear cells stimulated with *T. gondii* over 24 hours ($p = 0.0149$); (iii) Elevated expression of IL-1 β in cells stimulated with *T. gondii* ($p = 0.0163$) and treated with NETs ($p = 0.0494$) for 48 hours; (iv) Up-regulation of IL-10 expression in cells stimulated with *T. gondii* from 48 hours onwards ($p = 0.0376$). These results suggest that the viability of peripheral blood mononuclear cells from cats is affected by infection with *T. gondii in vitro*, after 48 hours, in addition to presenting a strong expression of IL-1 β and IL-10. In addition, mononuclear cells from cats treated with neutrophil extracellular traps *in vitro* provides a decrease in cell viability and a positive modulation for IL-1 β .

Keywords: PBMC. Feline. Immunity. Parasite

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET)..... | 10 |
| Figura 2. Processo de separação de PBMC e PMN em dois gradientes de densidade Ficoll Histopaque..... | 36 |
| Figura 3. Viabilidade de PBMC de gatos expostos ao <i>T.gondii</i> ou tratados com NETs avaliadas pelos métodos de MTT e LDH..... | 41 |
| Figura 4. Expressão relativa das citocinas IFN γ , IL-1 β , IL-12p40 e IL-10 de PBMC de gatos expostos ao <i>T.gondii</i> ou tratadas com NETs..... | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos para os genes alvo no estudo..... | 40 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------------|--|
| μl | Microlitro(s) |
| μg | Micrograma(s) |
| μm | Micrometro(s) |
| % | Porcentagem |
| °C | Graus celsius |
| AMA1 | Antígeno-1 da membrana apical |
| CCL2 | Quimiocina CCL2 |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| COX 2 | Ciclo oxigenase 2 |
| CXCL2 | Quimiocina CXC2 |
| DNA | Acido desoxirribonucleico |
| DPI | <i>diphenylene iodonium</i> |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático |
| ETs | Armadilhas Extracelulares |
| FeLV | Vírus da Leucemia Felina |
| FIV | Vírus da Imunodeficiência Felina |
| GRAs | Proteínas de grânulos densos |
| GTP | Trifosfato de Guanosina |
| H ₃ PO ₄ | Acido Fosfórico |
| HAI | Hemaglutinação Indireta |
| IFN-γ | Interferon γ |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL-1β | Interleucina 1β |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-12p40 | Interleucina 12p40 |
| IL-21 | Interleucina 21 |
| IL-37 | Interleucina 37 |
| iNOS | Oxido Nítrico sintetase |
| LAT | Teste de Aglutinação em Látex |
| LPS | Lipopolisacarídeo |
| MAT | Teste de Aglutinação Modificado |
| MCP-1 | <i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i> |
| mg | Miligrama(s) |
| MIP-2 | <i>Macrophage Inflammatory Protein 2</i> |
| mL | Mililitro(s) |

| | |
|-----------------|--|
| MTT | (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato |
| NEED | diamina-di-hidroclorido naftaleno |
| NET | Armadilhas Extracelulares de Netrófilos |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| nm | Nanometro |
| NO | Oxido Nítrico |
| NO ₂ | Dióxido de Nitrogênio |
| O ₂ | Oxigênio |
| PBMC | Células Mononucleares do Sangue Periférico |
| PMN | Células Polimorfonucleares |
| PCR | Reação em Cadeia Polimerase |
| PMA | Phorbol 12-myristate 13-acetate |
| RNA | Acido Ribonucleico |
| RNS | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| RIFI | Reação de Imunofluorescência Indireta |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigenio |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulphate |
| STAT3 | Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 |
| <i>T.gondii</i> | <i>Toxoplasma gondii</i> |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral α |
| TNF- β | Fator de Necrose Tumoral β |
| UESC | Universidade Estadual de Santa Cruz |
| v | Volume |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 19 |
| 2.1 | Objetivo Geral..... | 19 |
| 2.2 | Objetivos Específicos..... | 19 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 20 |
| 3.1 | Toxoplasma gondii..... | 20 |
| 3.1.1 | Epidemiologia..... | 20 |
| 3.1.2 | Ciclo biológico..... | 20 |
| 3.1.2.1 | Taquizoitos..... | 21 |
| 3.1.2.1.1 | Invasão celular..... | 21 |
| 3.1.2.2 | Bradizoitos..... | 22 |
| 3.1.2.3 | Oocistos..... | 23 |
| 3.1.3 | Sinais Clínicos..... | 23 |
| 3.1.4 | Diagnóstico..... | 24 |
| 3.1.5 | Prevenção e controle..... | 24 |
| 3.2 | Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)..... | 24 |
| 3.2.1 | Estrutura..... | 25 |
| 3.2.2 | Estimulação..... | 25 |
| 3.2.3 | Interação com outros tipos celulares..... | 26 |
| 3.2.4 | Interação com microorganismos..... | 28 |
| 3.2.5 | NETs e doenças autoimunes..... | 29 |
| 3.2.6 | Armadilhas Extracelulares (ETs) em outros tipos celulares..... | 29 |
| 3.3 | Imunidade e Toxoplasma gondii..... | 30 |
| 3.3.1 | Resposta imune inata..... | 30 |
| 3.3.1.1 | Resposta celular..... | 31 |
| 3.3.1.2 | Citocinas..... | 32 |
| 3.3.2 | Resposta imune adaptativa..... | 33 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 35 |
| 4.1 | Seleção dos animais, colheita das amostras e hemograma | 35 |
| 4.2 | Purificação das células..... | 35. |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2.1 | PBMC..... | 35 |
| 4.2.1 | Neutr3filos..... | 36. |
| 4.3 | Cultivo de <i>Toxoplasma gondii</i> | 37 |
| 4.4 | Obten3o do sobrenadante da Intera3o de Neutr3filos com taquizo3itos de <i>Toxoplasma gondii</i> | 37 |
| 4.5 | Avalia3o da viabilidade do PBMC..... | 37 |
| 4.5.1 | Ensaio MTT..... | 37 |
| 4.5.2 | Dosagem de Lactato Desidrogenase (LDH)..... | 38 |
| 4.6 | Quantifica3o da produ3o de NO..... | 38 |
| 4.7 | Avalia3o da express3o das citocinas TNF- α , IL-1, IL-10 e IL-12 p40 e IFN- γ por PCR em tempo Real (RT-PCR)..... | 39 |
| 4.8 | An3lise de dados..... | 40 |
| 5 | RESULTADO..... | 41 |
| 5.1 | Viabilidade de PBMC..... | 41 |
| 5.2 | Express3o de citocinas por PBMC de gatos estimulados com taquizo3itos de <i>T. gondii</i> ou tratados com NETs | 42 |
| 6 | DISCUSS3O..... | 46 |
| 7 | CONCLUS3O..... | 51 |
| | REFER3NCIAS..... | 52 |
| | ANEXO 1 | 63 |
| | ANEXO 2 | 64 |
| | ANEXO 3..... | 65 |
| | ANEXO 4 | 66 |
| | ANEXO 5 | 67 |
| | ANEXO 6 | 68 |

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasmose é uma doença zoonótica cosmopolita causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* que acomete humanos, animais domésticos e selvagens (SUKTHANA, 2006). Os gatos, hospedeiros definitivos desse parasito, podem se infectar ao se alimentar com carne crua contendo cistos com bradizoítos (TENTER et al., 2000). A prevalência de gatos infectados combinada com a ocorrência de oocistos em amostras de solo, torna essa espécie fonte de investigações acerca dos riscos à saúde pública ((HATAM-NAHAVANDI et al., 2021).

Neutrófilos e monócitos são os dois primeiros tipos celulares recrutados pelo *T. gondii* para o local de infecção (BARTNECK et al., 2010; ABDALLAH et al., 2012; GOLDSZMID et al., 2012). Contando com mecanismos oxidativos após a fagocitose, os neutrófilos conseguem eliminar microrganismos eficientemente (LEHRER; GANZ, 1999). Outra habilidade dos neutrófilos consiste na eliminação de patógenos (incluindo o *T. gondii*) no meio extracelular, através da formação de rede extracelulares dotadas de componentes da célula (BRINKMANN et al., 2004; ABDALLAH et al., 2012; LACERDA et al., 2019).

Monócitos são essenciais para o desenvolvimento da imunidade contra o *T. gondii*, sendo fonte de IL-12, IL-1 e TNF α (PANDORI et al., 2019; ROBBEN et al., 2005). Ainda que neutrófilos não sejam essenciais na susceptibilidade do hospedeiro ao *T. gondii*, são capazes de produzir IL-12, além de ativar e contribuir com a migração de monócitos inflamatórios (SOEHNLEIN et al., 2008; DUNAY, et al., 2010). A liberação de IL-12 estimula a produção de IFN γ por células NK e linfócitos T, citocina chave no controle intracelular contra *T. gondii* (SUZUKI et al., 2010). O estabelecimento da cronicidade da toxoplasmose depende do equilíbrio das respostas orquestradas por linfócitos T CD4 e CD8 (KHAN et al., 2019). Linfócitos T CD8, bem como IFN γ , podem promover uma resposta protetiva contra infecção por *T. gondii* (KHAN et al., 1994), sendo essa proteção precedida pela ação de linfócitos T CD4 que contribuem para manutenção a longo prazo de CD8 (LAIDLAW et al., 2016). Linfócitos T CD8 também foram apontados como produtores de IFN γ em infecções crônicas por *T. gondii* (GAZZINELLI et al., 1991).

Ao trabalhar com PBMC *in vitro*, podemos verificar as respostas de monócito e linfócitos ((AUTISSIER et al., 2010; SZABO; FINNEY 2017), além de conseguirmos mimetizar interações entre células durante infecções, porém essa fração celular não é útil para simular condições *in vivo* (DAVILA; RIOS 2019).

Buscando compreender melhor os mecanismos da resposta imunológica de gatos infectados por *Toxoplasma gondii in vitro*, assumimos que gatos respondem similarmente aos humanos e camundongos em relação a viabilidade celular e padrão de citocinas expressas. Além disso, procuramos avaliar se as NETs podem estimular um perfil inflamatório em PBMC de gatos como visto em outras espécies com doenças autoimunes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a interação de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de gatos quando desafiados por taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

2.2 Objetivos Específicos

a. Avaliar a viabilidade celular de PBMC de gatos co-cultivados com taquizoítos de *T. gondii* ou tratadas com o sobrenadante da interação dos neutrófilos com o parasito;

b. Quantificar a produção de óxido nítrico de PBMC de gatos co-cultivados com taquizoítos de *T. gondii* ou tratadas com o sobrenadante da interação dos neutrófilos com o parasito;

c. Determinar a expressão gênica das citocinas IL-1, IL-12p40, IL-10, TNF- α e IFN- γ de PBMC de gatos co-cultivadas com taquizoítos de *T. gondii*, ou tratadas com o sobrenadante da interação dos neutrófilos com o parasito.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Toxoplasma gondii*

3.1.1 Epidemiologia

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório, coccídio pertencente ao filo Apicomplexa, agente etiológico da Toxoplasmose, zoonose de distribuição mundial com altas taxas de prevalência na população humana (TENTER et al., 2000). Os felídeos são essenciais para a manutenção do parasito, pois são os únicos hospedeiros definitivos, sendo, portanto, um dos disseminadores dessa enfermidade (DUBEY et al., 1995).

Um levantamento realizado por Montazeri revela que entre os anos de 1967 a 2017 houve uma soroprevalência mundial de 35% em gatos domésticos e 59% em felinos selvagens, onde o Brasil ocupa o primeiro lugar no número de publicações envolvendo em gatos e felinos selvagens (29 e 5 estudos, respectivamente) com prevalência variando de 29% a 73%, sendo esses resultados mais altos do que os encontrados na sorologia humana (GARCIA et al., 1999; SOUZA et al., 2018). A diversa variação apresentada pode ser devido a fatores climáticos, geográficos, hábitos alimentares, tempo entre os estudos, entre outros, mostrando uma variedade na cadeia de transmissão da enfermidade (NEVES et al., 2005).

3.1.2 Ciclo biológico

Gatos excretam cerca de 2 a 20 milhões de oocistos por dia durante 3 a 5 dias após a infecção, embora esse período possa se estender até 20 dias, são eliminados em maior número por animais mais jovens e sofrem variações sazonais, com maior eliminação no outono e inverno (DUBEY, 1976; DUBEY et al., 1995; SIMON et al., 2018). Gatos são capazes de se reinfectar com genótipos diferentes, eliminando menos oocistos no ambiente na segunda infecção, entretanto, com a imunidade diminuindo ao

longo dos anos, a excreção de oocistos aumenta nas infecções seguintes, mesmo que permaneça altas as concentrações de anticorpos dos animais (ZULPO et al., 2018).

Toxoplasma gondii possui ciclo de vida heteroxeno facultativo com duas fases distintas: assexuada e sexuada. A fase assexuada ocorre nos tecidos dos hospedeiros intermediários, como mamíferos e aves, bem como nos hospedeiros definitivos (felídeos), por meio da endodiogenia. Esses hospedeiros se infectam após o consumo de oocistos ou cistos contendo bradizoítos em carnes mal cozidas. No ciclo sexuado, o parasito invade enterócitos dos felídeos, formam trofozoítos, posteriormente ocorre a esquizogonia com produção de merozoítos e depois a gametogonia e por fim, com a interação dos macro e microgametas, origina-se o zigoto, chamado de oocisto (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Dentro dos ciclos assumem três estágios infectivos: Taquizoítos, Bradizoítos e Oocistos.

3.1.2.1 Taquizoítos

Os taquizoítos representam a forma multiplicativa e ativa do parasito, penetrando ativamente em células nucleadas do hospedeiro e se multiplicando. Após sua multiplicação os parasitos rompem a célula, infectam outras células podendo alcançar a circulação sanguínea, com disseminação para diferentes células do corpo do animal (TENTER et al., 2000).

3.1.2.1.1 Invasão celular

A invasão celular é facilitada por organelas presentes no polo apical do parasito que interagem entre si, como proteínas do micronema, roptrias e proteínas de grânulos densos (GRAs) (SIBLEY, 2004). O micronema é composto por proteínas que promovem a adesão, motilidade, invasão e saída do parasito em células, além de serem sinalizadoras nesse processo. Mital e colaboradores em 2005 mostraram uma dependência entre roptrias e micronema, onde a deficiência do antígeno-1 da membrana apical (AMA1), uma proteína do micronema, leva a um defeito na secreção das roptrias,

reduzindo assim a invasão. Roptrias são organelas secretoras presentes em 8 a 12 unidades nos taquizoítos, capazes de auxiliar o transporte do parasita para o interior das células, além de carrear proteínas diretamente para o citoplasma e ajudar na sobrevivência do mesmo (KEMP et al., 2013).

No processo de ingresso, os taquizoítos utilizam lipídeos da membrana plasmática do hospedeiro para a formação de um ambiente seguro para sua multiplicação no meio intracelular, denominado vacúolo parasitóforo, evitando a fusão com organelas ácidas do lisossomo. Proteínas de grânulos densos possibilitam a difusão de moléculas externas para o interior do vacúolo, permitindo ao parasito a utilização de material do hospedeiro para o seu metabolismo (CLOUGH; FRICKEL, 2017).

Filamentos de actina presentes nesse protozoário contribuem para sua motilidade quando associados à proteína *Profilin*, auxiliam o processo de invasão celular e multiplicação do parasito, sendo essenciais para ativação do receptor toll-like 11 na célula hospedeira, que por sua vez sinaliza a liberação de IL-12, citocina importante para estabelecimento da resposta imune contra patógenos (PLATTNER et al., 2008).

3.1.2.2 Bradizoítos

Com a resposta do sistema imune, e o estabelecimento de uma infecção crônica, os taquizoítos aos poucos vão se diferenciando em bradizoítos, estágio marcado pela lenta replicação dentro de cistos localizados comumente em tecidos musculares ou nervoso. Nessa fase o *T. gondii* possui baixo metabolismo, motilidade e diminuição de organelas secretoras, mantendo a capacidade de infectar novas células mesmo que em menor número (DZIERSZINSKI et al., 2004).

Além da ativação de interleucinas e quimiocinas, a indução da transformação de taquizoítos para bradizoítos pode surgir em resposta ao estresse celular, mudança de pH e temperatura (WEISS et al., 1998). Os cistos caracterizam uma infecção crônica e podem permanecer latente no hospedeiro por toda a vida. Em pacientes com comprometimento imune, esses cistos podem se romper e causar uma reinfecção (DENKERS, 1998).

3.1.2.3 Oocistos

Após o ciclo sexuado do parasita há a formação do zigoto, o oocisto, e este liberado no lúmen intestinal após ruptura celular. Cada oocisto possui dois esporocistos, contendo em seu interior 4 esporozoítos (DUBEY et al., 1998). Os oocistos são liberados junto as fezes de felídeos, uma vez no ambiente os esporocistos tornam-se infectantes por meio da esporulação, que ocorre em temperatura entre 20°C a 30°C e na presença de oxigênio e podem permanecer infectantes até 18 meses. Os humanos e outros animais podem se infectar com o contato direto com os oocistos nas fezes, mas também podem adquirir a infecção com solo, água e vegetais contaminados (HERNANDEZ-CORTAZAR et al., 2017; SLANY et al., 2019).

3.1.3 Sinais clínicos

Grande parte dos gatos são assintomáticos (ELMORE et al., 2010; CALERO-BERNAL; GENNARI, 2019). Quando há a presença de sinais, costumam ser encontrados felinos anoréxicos, letárgicos e com febre, que pode culminar em hipotermia e morte (DUBEY et al., 1995). A manifestação felina mais importante é a pneumonia (DUBEY; JONES, 2008; CALERO-BERNAL; GENNARI, 2019). Sinais oculares como uveíte pode também ser associado a toxoplasmose felina, bem como polipneia e dispnéia, e em casos mais graves icterícia, efusão peritoneal e até sinais neurológicos. A diarreia pode ocorrer em 10% a 20% dos gatos devido ao ciclo intestinal (BOWMAN et al., 2002; ETTINGER et al., 2004; NORSWORTHY et al., 2009).

Nessa espécie a forma clínica grave é mais observada em animais recém-nascidos infectados por via transplacentária ou imediatamente no pós-parto. Assim como os humanos, os felinos podem apresentar sinais clínicos na fase aguda da infecção, sendo os mais comprometidos aqueles com doenças concomitantes e baixa imunidade, a exemplo gatos portadores do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV) (DAVIDSON et al., 1993).

3.1.4 Diagnóstico

Nenhuma das alterações clínico-epidemiológicas são suficientes para confirmar o diagnóstico (ETTINGER et al., 2004; DUBEY, 2006), por isso é necessário a confirmação com as técnicas sorológicas, podendo ser utilizados os métodos de Hemaglutinação Indireta (HAI), Teste de Aglutinação Modificado (MAT), Teste de Aglutinação em Látex (LAT), e os mais utilizados: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (DUBEY et al., 1995; DABRITZ; CONRAD, 2010; DUBEY, 2010).

3.1.5 Prevenção e controle

Para prevenir e controlar a enfermidade em felinos é necessário conscientizar os tutores sobre recolha correta das fezes e castração para reduzir a superpopulação desses gatos, devendo também ser alimentados exclusivamente de ração seca ou alimentação bem cozida, evitar que o animal realize caça, bem como controlar o ambiente desses gatos retirando os hospedeiros intermediários como roedores sinantrópicos (TENTER et al., 2000; DABRITZ; CONRAD, 2010; ELMORE et al., 2010)

Manter a saúde desses animais é importante para impedir o ciclo de transmissão entre felino e humano (MANI; MAGUIRE, 2009).

3.2 Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

Neutrófilos são células de primeira linha de defesa, migrando para o local de inflamação ou tecido infectado, ali eliminando patógenos e/ou liberando sinalizadores para o recrutamento de outros leucócitos. O combate aos microrganismos pelos neutrófilos é realizado a partir de mecanismos oxidativos e independentes de oxigênio, como a expressão de ROS no primeiro caso e a fagocitose, que resulta em morte do microrganismo exposto a enzimas, proteases e peptídeos (LEHRER; GANZ, 1999).

As armadilhas extracelulares de neutrófilos foram descritas inicialmente por Brinkmann (2004), onde neutrófilos humanos apresentaram uma nova habilidade em eliminar bactérias diferente de necrose ou apoptose quando ativados. Posteriormente outros pesquisadores buscaram evidências da produção das armadilhas extracelulares de neutrófilos sob estímulos de outros microrganismos, em outros tipos celulares e em outras espécies, como bovinos, peixes e galinhas (PALIC et al., 2007; CHUAMMITRI et al., 2009; URBAN et al., 2009; AULIK et al., 2010)

3.2.2 Estrutura

Compostas por filamentos de 15 a 17 nm de DNA e proteínas derivadas de seus grânulos, as armadilhas são produzidas por alguns neutrófilos em resposta a integrinas, induzidas pela presença de microrganismos como bactérias ou componentes, vírus, protozoários e fungos, anticorpos, interleucinas, entre outros estímulos.

As proteínas que compõem as armadilhas são 70% as histonas, logo após a elastase, mieloperoxidase, catepsina G, leucócito proteinase 3, lactoferrina, gelatinase, lisozima C, calprotectina, defensinas, azurocidina e catelicinas (URBAN et al., 2006). As teias extracelulares são capazes de aprisionar patógenos e acredita-se que elas conseguem eliminá-los a partir da atividade tóxica das proteínas e enzimas presentes nas estruturas.

3.2.3 Estimulação

As NETs são formadas a partir de estímulos que ativam os neutrófilos. Uma vez seus receptores estimulados, a célula inicia a ativação da NADPH oxidase, formando ROS, este sinalizando moléculas, induzindo a formação de armadilha e morte celular. A dependência de ROS para a liberação das NETs foi demonstrada por Fuchs e colaboradores (2007), onde utilizaram inibidor da NADPH oxidase (diphenylene iodonium - DPI) e constataram o bloqueio da formação de ROS e consequentemente de NETs. Ainda nesse trabalho eles demonstraram que pacientes portadores de doença granulomatosa crônica, que não produzem ROS quando estimulados por PMA devido a uma mutação, também não são capazes de gerar NETs.

No início do processo, a elastase e a mieloperoxidase são liberadas dos grânulos, migrando para o núcleo, onde a primeira interage com a histonas degradando-as e descondensando a cromatina, e a segunda aumenta essa atividade (PAPAYANNOPOULOS, 2018). O núcleo passa a perder a integridade de sua estrutura, lançando a cromatina no citoplasma em contato com proteínas e enzimas derivadas dos grânulos.

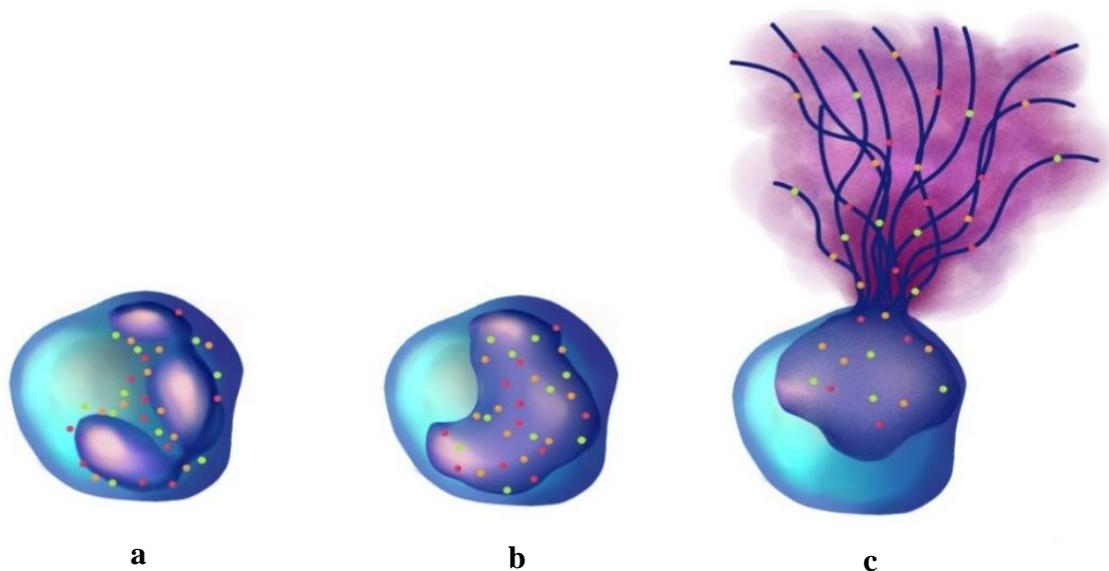


Figura 1. Formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET). Após estímulo, os grânulos de proteínas e enzimas migram para o núcleo (a), descondensam a cromatina, o núcleo perde a integridade, fazendo com que a cromatina e o conteúdo dos grânulos entrem em contato entre si (b). Por fim ocorre a ruptura da membrana plasmática e as redes são lançadas para o meio extracelular (c). **Fonte:** arquivo pessoal.

Após a interação dos componentes as armadilhas são lançadas para o meio extracelular (FUCHS et al., 2007). A formação das NETs pode ou não acarretar na morte celular. Quando permanecem vivos, os neutrófilos fazem uso do DNA mitocondrial para a formação das armadilhas (YOUSEFI et al., 2009).

3.2.4 Interação com outros tipos celulares

Macrófagos podem interagir com as NETs fagocitando e degradando-as por meio de DNases, processo que se intensifica quando realizados por macrófagos pró-

inflamatórios. Um estudo realizado em ratos com trombose observou que a utilização de citocalasina C e Imipramina (inibidores da polimerização dos filamentos de actina) bloqueiam a pinocitose feita por macrófagos, logo conseguem diminuir a degradação das NETs e aumentar a presença dessas armadilhas dentro de trombos, indicando que os níveis de macrófagos pró-inflamatórios e NETs são inversamente proporcionais nesses casos (HAIDER et al., 2020).

Outra associação dos macrófagos com NETs foi apresentada por Chen e colaboradores (2018), em que as NETs conseguiriam induzir a pirocitose em macrófagos, um tipo de morte celular dependente de caspase 1 e ativadas por respostas pró-inflamatórias a patógenos, em locais com sepse. A formação de NETs parece estar associada ao redirecionamento da resposta dos macrófagos, uma vez que digeridas por enzimas ou bloqueadas, inibem a resposta inflamatória exacerbada, podendo reverter o estado de pacientes com aterosclerose associada a diabetes (JOSEFS et al., 2020), podem também alterar a expressão de citocinas e quimiocinas de macrófagos e células dendríticas na presença de LPS aumentando a secreção de IL-1 β ((LAZZARETTO; FADEEL, 2019). Dunay e colaboradores (2008) corroboraram com esses resultados quando demonstraram que NETs podem recrutar monócitos inflamatórios a partir da quimiocina CCR2 e também melhorar a resposta imune desse tipo celular.

3.2.5 Interação com microrganismos

As NETs estão relacionadas a várias doenças infecciosas devido sua capacidade de capturar e eliminar patógenos, sendo m mecanismo benéfico ao hospedeiro. Já foi demonstrado a interação das NETs com bactérias (*Staphylococcus aureus*, *streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis*), fungos (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*), Vírus (HIV, Influenza H1N1, SARS-CoV-2) e protozoários (*Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis*) (DELGADO-RIZO et al., 2017). As NETs quando interagem com esses patógenos podem modularem negativamente a resposta imune, diminuindo a expressão de citocinas inflamatórias,

proliferação e recrutamento de células T CD4 (BARRIENTOS et al., 2014).

Guimarães-Costa e colaboradores (2017) também relataram modulações negativas na resposta imune, onde a NET resultante da interação entre neutrófilos e *Leishmania amazonensis* influenciam na diferenciação de monócitos em células dendríticas durante a infecção por este protozoário, interrompendo o processo e levando-os a diferenciar-se em macrófagos anti-inflamatórios. Ainda, esses monócitos infectados por *L. amazonensis* e tratados com NETs tiveram uma redução na capacidade de eliminar o parasito, visto que houve um aumento na liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TNF- β) em confronto a citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6).

Atrelado a essas evidências, Zuo e colaboradores (2020) buscaram associar níveis de NETs em pacientes acometidos pelo vírus SARS-CoV-2, visto que uma das consequências causadas por esse vírus consiste em síndromes respiratórias com envolvimento de trombos em vasos, onde pacientes infectados exibiam níveis mais elevados de NETs quando comparados ao grupo controle, com pacientes com sintomas mais severos e com comorbidades, sugerindo que as NETs podem ser importantes na patogenia da doença.

Uma vez infectados por *Leishmania*, neutrófilos de gatos também foram capazes de produzir NETs. Gatos infectados naturalmente com o vírus da Leucemia Felina (FeLV) apresentaram decréscimo da eficiência da imunidade contra *Leishmania*, sugerindo que isso ocorra devido à resposta exacerbada dos neutrófilos, e que esses impeçam que outros tipos celulares sejam responsivos a novos estímulos devido a capacidade imunomodulatória das NETs (WARDINI et al., 2010). Semelhante aos achados anteriores, Lacerda et al (2019) e Macedo et al (2020) pesquisaram se as NETs poderiam alterar o curso da infecção por *T. gondii* em gatos. Em ambas pesquisas os neutrófilos de gatos produziram NETs quando estimulados pelo parasito e que as armadilhas são capazes de afetar negativamente a infectividade do *T. gondii*.

3.2.6 NET e doenças autoimunes

As NETs foram correlacionadas a doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas, como psoríase, aterosclerose e aterotrombose, devido a sua capacidade de estimular resposta inflamatória no hospedeiro e formação de trombos com ativação de plaquetas (FUCHS et al., 2010; PINEGIN et al., 2015; DÖRING et al., 2017). NETs possuem proteínas tóxicas e citotóxicas, e também podem causar uma disfunção no tecido do endotélio vascular. Doenças inflamatórias pulmonares contam com um infiltrado de neutrófilos que por sua vez realizam a NETose, causando lesão local, coagulação e trombose (CHENG; PALANIYAR, 2013).

3.2.7 Armadilhas Extracelulares (ETs) em outros tipos celulares

Eosinófilos são células presentes em processos infecciosos, inflamatórios e principalmente alérgicos. Eosinófilos liberam a cromatina descondensada no meio extracelular junto com grânulos de proteínas livres, intactos e ainda funcionais, independente da ligação com a rede contendo material genético, com efeito de longa duração e mais estáveis quando comparados às armadilhas de neutrófilos. Nos eosinófilos a liberação das ETs pode ou não culminar em morte celular (UEKI et al., 2013, 2016).

Em 1997, Cheng e colabores demonstraram o depósito anormal dos grânulos de eosinófilos na pele de pacientes acometidos por dermatite atópica, uma inflamação autoimune caracterizada pela presença de lesões cutâneas, onde as lesões crônicas foram atribuídas à presença das proteínas dos grânulos, essas que podem causar danos ao tecido. Anos depois esse depósito foi elucidado como parte das armadilhas extracelulares produzidas por eosinófilos.

Mastócito é outro tipo celular presente em inflamações e alergias e foi demonstrado em 2008 por Köckritz-Blickwede e colaboradores dotado de armadilhas extracelulares como um dos mecanismos antimicrobianos. As redes extracelulares de

mastócitos são constituídas por DNA, histonas, triptase e catelicidina IL-37 e liberadas após a morte da célula quando infectadas ou estimuladas.

Linfócitos T, tanto CD4 quanto CD8, mostram-se capazes de produzirem armadilhas extracelulares de forma similar aos do neutrófilos, entretanto a produção das redes independe de estímulo. Quando estimuladas a presença das armadilhas duplicam em quantidade comparadas aos linfócitos não estimulados (KOH, 2015).

Macrófagos, monócitos e basófilos também são capazes de produzir ETs em um processo semelhante aos outros tipos celulares, porém os basófilos não mostraram dependência da NADPH oxidase para a produção de ROS e armadilhas, e sua produção não culmina necessariamente em morte celular (BARTNECK et al., 2010; MORSHED et al., 2014).

3.3 Imunidade e *Toxoplasma gondii*

3.3.2 Resposta imune inata

A resposta imunológica adaptativa do hospedeiro a uma infecção por *T.gondii* é dependente da interação entre o parasito e o hospedeiro, e principalmente do estabelecimento da resposta imune inata. Quando ocorre a infecção oral por oocistos em camundongos e humanos, o parasito infecta fibroblastos e células epiteliais no intestino, estimulando a liberação da MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*) e MIP-2 (*Macrophage Inflammatory Protein 2*), respectivamente, e da quimiocina IL-8 em ambas as células quando lisadas, ocasionando um infiltrado inflamatório de neutrófilos, contribuindo também no recrutamento de linfócitos e monócitos (DENNEY et al., 1999; BRENIER-PINCHART et al., 2000; OHTSUKA et al., 2001). Além dessas proteínas, quimiocinas como CCL2 e CXCL2 fazem parte dos sinalizadores que induzem a migração de células de defesa para o local de infecção (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000).

3.3.2.1 Resposta celular

Em humanos e em camundongos, os monócitos são capazes de produzir IL-1, NO, IL-12 e TNF e controlar a replicação de parasitas, iniciando a resposta celular em infecções orais. Essas células possuem atividade fagocítica, e quando migrados para um tecido se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas apresentadoras de antígenos, que podem estimular e interagir com células T, críticas para a imunidade inata e adquirida (MULLER; RANDOLPH, 1999; GEISSMANN et al., 2003; SERBINA et al., 2008).

A carga parasitária pode influenciar a resposta celular do hospedeiro, quando em alta quantidade os taquizoítos infectam mais neutrófilos entre as células hematopoiéticas e nelas possuem um tempo de replicação maior, o contrário é observado em monócitos e células dendríticas. Nessas situações, ocorre um influxo de neutrófilos na lâmina própria do intestino delgado, e, assim como monócitos, esse tipo celular também é capaz de produzir IL-12 e TNF, mas não conseguem evitar a disseminação do parasito isoladamente, causando danos teciduais no intestino (BLISS et al., 1999; DUNAY et al., 2008). Ao ganhar a circulação sanguínea, o parasito dissemina-se para outros órgãos sendo carregados por células nucleadas, como neutrófilos, células dendríticas e monócitos.

Neutrófilos (bem como monócitos) são capazes de lisar taquizoítos no meio extracelular, partes desses parasitos lisados ou danificados podem servir como antígenos a serem apresentados por células dendríticas, que são em seguida recrutados no local de infecção, ao complexo principal de histocompatibilidade (CHANNON et al., 2000). Neutrófilos e monócitos, são capazes de liberar IL-12, citocina que exerce um *feedback* positivo, estimulando ainda mais sua síntese.

3.3.2.2 Citocinas

A IL-12 é essencial para o desenvolvimento da imunidade do tipo th1, estimulando a produção de células T CD4+, CD8+ citotóxicas, e NK, e quando associada a TNF- α desencadeia a produção de IFN- γ por essas células. A presença dessa citocina já foi demonstrada como importante para diminuição da morbidade e aumento da sobrevivência em ratos na fase aguda da infecção por *T. gondii* (KHA et al., 1994), sua deficiência acarreta diminuição dos níveis de IFN- γ , aumentando a susceptibilidade a infecção (YAP et al., 2000).

O IFN- γ pode estimular diversos genes necessários para o controle do parasito, estes genes podem expressar diversas respostas no hospedeiro, como inanição de nutrientes mediada por células, destruição de células infectadas, além de regular a expressão de genes da GTPases, que localizam o vacúolo parasitóforo e conseguem liberar os parasitos no citoplasma com a modificação na integridade da membrana, tornando-o exposto a mecanismos oxidativos celulares (MARTENS et al., 2005; DEGRANDI et al., 2013).

O IFN- γ pode ser produzido por células NK quando ainda não há produção desse pelas células T, pelas células TCD8+ e células T auxiliares Th1 CD4+. Alguns pesquisadores já demonstraram a utilização da detecção de IFN- γ para infecção agudas ou crônicas, frente a exposição ao parasito ou antígenos dele, em humanos, camundongos e gatos (CHAPEY et al., 2010; YIN et al., 2015a, 2015b).

Macrófagos ativados pelo IFN- γ em conjunto com TNF- α inibem a replicação do parasito por meios de mecanismos oxidativos intracelulares, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Por meio da ação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) que converte L-arginina em L-citrulina, há liberação do óxido nítrico (NO), que além de ser uma molécula mensageira, pode interagir com um superóxido (O_2^-), formando composto citotóxico que impede o ciclo respiratório celular pela inibição do citocromo c oxidase (BROWN, 2001). Entretanto camundongos deficientes da enzima iNOS mostram susceptibilidade intermediária ao *T.gondii*, uma vez que os animais sobrevivem a infecção aguda e restringem o seu crescimento, demonstrando que

o óxido nítrico não é essencial na limitação da proliferação do parasito em estágio agudo, porém, em 3 a 4 semanas pós-infecção, foi detectado um comprometimento da integridade do sistema nervoso central, resultado da interferência no controle da replicação do parasita no local, indincando a importância desse óxido em infecções crônicas. Como resposta dessa deficiência há um aumento compensatório de IFN- γ , que utiliza de outros mecanismos citotóxicos para eliminação do parasito (SCHARTON-KERSTEN et al., 1997).

A interleucina-1 β (IL-1 β) produzida por monócitos e macrófagos, é uma citocina pró-inflamatória que também pode participar do ciclo oxidativo intracelular, induzindo a expressão de iNOS, além de aumentar a expressão de TNF- α em macrófagos e células dendríticas, que por sua vez induz outras proteínas inflamatórias (DINARELLO, 2005), entretanto ela é responsável também pela indução da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), uma enzima presente em processos inflamatórios que foi apontada em estudo recente como mediador envolvido na susceptibilidade de roedores e humanos ao *T.gondii* (PEREIRA et al., 2019).

3.3.3 Resposta imune adaptativa

A resposta adquirida tem início com as ações sinérgicas entre linfócitos T CD4+ e CD8+, onde o primeiro está presente na fase aguda tardia da doença, auxilia na imunidade a longo prazo e possui dois subgrupos (th1 e th2) e o segundo desempenha papel efetor primário, tem atividade citotóxica e tem papel importante no estágio crônico da doença (SUZUKI et al., 2010). Enquanto a resposta th1 envolve a expressão de citocinas pró-inflamatórias contra patógenos e auxilia a efetividade de linfócitos TCD8+, a resposta th2 é representada por citocinas de regulação, inibindo e modulando a resposta th1.

A ausência das células T CD4 leva a diminuição de IFN- γ no organismo, conseqüentemente aumenta a carga parasitária nos tecidos, além de suprimir a funcionalidade de células T CD8 de memória em infecções crônicas a partir da supressão de IL-2 e IL-21 (KHAN et al., 2019). A existência de um comprometimento da atividade

de células T CD4 e CD8 pode resultar em uma reativação por *T. gondii* em estágio latente (HWANG et al., 2016).

Além dos monócitos e linfócitos B, células T CD4 produzem IL-10, uma citocina reguladora com efeitos anti-inflamatórios que faz parte da resposta th2. A produção de IL-10 limita a ação inflamatória exacerbada que pode prejudicar o hospedeiro, impedindo respostas autoimunes, inibe apoptose de células infectadas por meio de um transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), prevenindo então a produção de citocinas pro-inflamatórias em gatos (CAI et al, 2014; LEVY et al., 2004; SUZUKI et al., 2000). O envolvimento de IL-10 produzido por linfócitos B foi demonstrado por Jeong e colaboradores (2016) como contribuinte para a supressão da imunidade celular contra *T. gondii*, estabelecimento da infecção crônica e formação de cistos cerebrais em camudongos.

Quando deficiente de produção de IL-10, o hospedeiro apresenta um aumento da resposta inflamatória no cérebro e baço durante a fase crônica, com expressão de IL-12 e IFN- γ e infiltrado neutrofílico nesses órgãos (O'BRIEN et al., 2019). Uma vez bloqueando a resposta inflamatória, a IL-10 mostra-se importante não somente para a limitação da inflamação, mas também na manutenção da fase crônica da infecção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos animais, colheita das amostras e realização do hemograma

Foram selecionados oito gatos hípidos (5 machos e 3 fêmeas), castrados e adultos. Amostras sanguíneas (5mL) foram coletadas utilizando agulhas descartáveis (25 x 8 mm) em seringas contendo heparina (5 μ L) através da venopunção da jugular dos animais, e submetidas a purificação celular em no máximo 1 hora. Em ma alíquota da amostra foi realizado hemograma por meio do contador hematológico (ABX VET-Horiba®) e confecção de esfregaço sanguíneo em lâminas utilizando o corante Giemsa em células fixadas. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz (CEUA-UESC) com o protocolo 024/15.

4.2 Purificação de células

Neutrófilos e células mononucleares periféricas (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMC) do sangue colhido foram isolados por meio da centrifugação por gradiente de densidade utilizando meio Ficoll Histopaque® 1,077 e 1,119 respectivamente, na proporção de 1, 25:1 (sangue:Ficoll) (Figra 2). As células foram centrifugadas a 400 xg durante 30 minutos, com temperatura entre 18 e 21 °C.

4.2.1 PBMC

Após a centrifugação foi coletado halo correspondente ao PBMC (fração superior ao Ficoll 1,077) e o material ressuspenso em 14 mL de solução salina refrigerada, sendo lavadas duas vezes a 400 xg por 10 minutos a 18°C. Após as centrifugações, PBMC foi ressuspenso em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antimicótico (10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 μ g/mL de streptomina e 25 μ g/mL de anfotericina B), quantificados em câmara de Neubauer e a viabilidade avaliada pela exclusão do azul de Trypan (Sigma-Aldrich) com 90% de células íntegras. As células foram ajustadas para 2 x 10⁵/poço e cultivadas em placas de

96 poços, em duplicata durante 24 horas, antes dos estímulos.

4.2.2 Neutrófilos

O halo de neutrófilos (células polimorfonucleares - PMN) foi coletado na fração entre o Ficoll 1,077 e 1,119, ressuspensos em 14 mL de solução salina e lavado 3 vezes a 400 xg por 10 minutos a 23°C. Para as hemácias remanescentes no anel, foi adicionado solução de lise ACK (8,29g NH₄Cl 0,15M, 2g KHCO₃ 1 mM, 0,074g Na₂EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) por 3 min em homogeneização, e lavadas por mais duas vezes, posteriormente ressuspensando-as em 1mL de meio RPMI1640, quantificadas e viabilidade analisada pela exclusão do azul de Trypan (Sigma-Aldrich) em câmara de Neubauer. As células foram ajustadas para 5 x 10⁵/poço e cultivadas em placas de 96 poços.

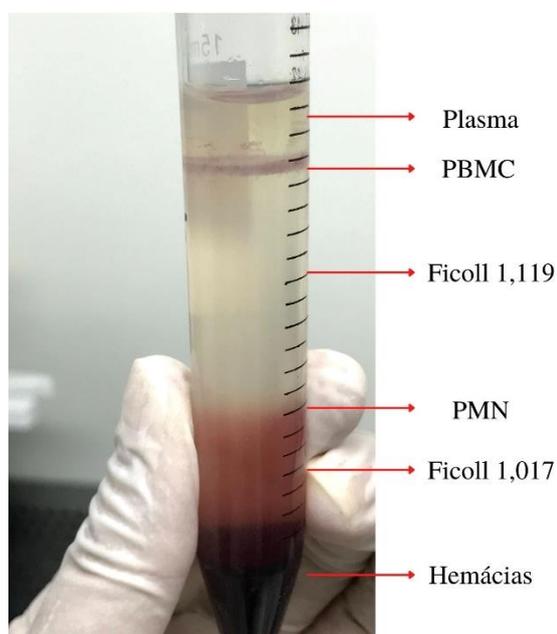


Figura 2. Processo de separação de PBMC e PMN em dois gradientes de densidade Ficoll Histopaque. **Fonte:** arquivo pessoal.

4.3 Cultivo de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* foram mantidos em monocamadas de célula Vero em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antimicótico (10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de streptomomicina e 25 µg/mL de anfotericina B) em garrafas de cultivo celular, renovadas a cada 48 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂. A purificação dos taquizoítos foi feita coletando todo conteúdo da garrafa de cultivo celular em agulha de 22G, seguido pela filtração em filtros de seringa com poro de 5µm e lavagem em solução fisiológica. Os taquizoítos foram ressuspensos em meio RPMI 1640, quantificados em câmara de Neubauer e viabilidade analisada pela exclusão do azul de Trypan (Sigma-Aldrich) com 90% de integridade.

4.4 Obtenção do sobrenadante da Interação de Neutrófilos com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Neutrófilos (5 x 10⁵/poço) foram estimulados com taquizoítos de *T. gondii* na proporção de 1:5 (célula:parasito) durante 3 horas (5% CO₂/37°C). Após, a incubação a placa foi centrifugada a 400xg por 5 minutos e sobrenadante coletado (Lacerda et al., 2019). O DNA presente no sobrenadante das co-culturas foi quantificado em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000) (Anexo 4), 50µg adicionado nos poço com PBMC e incubados durante 24 e 48 horas (5% CO₂/37°C).

4.5 Avaliação da Viabilidade do PBMC

4.5.1 Ensaio MTT

Para avaliação da viabilidade do PBMC foram constituídos 4 grupos. O primeiro grupo foi constituído apenas por PBMC (2 x 10⁵/poço), o segundo grupo PBMC + Lipopolissacarídeo (LPS -100ng/poço), o terceiro grupo PBMC + taquizoítos de *T.*

gondii (1 célula:3parasitos) e o quarto grupo PBMC + LPS (100ng/poço) + taquizoítos de *T. gondii* (1 célula:2 parasitos) durante 24 e 48 horas. Após esses períodos foi adicionado 20 µL de solução de MTT 5mg/mL (Brometo de 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) nos poços e as células incubadas durante 4 horas a 37°C/5%Co₂. Em seguida o sobrenadante foi descartado e células lisadas com dimetilformamida (150 µL) em água com SDS 10% (1:1 v/v) (Mosmann, 1983).

A viabilidade celular foi determinada pela leitura da absorbância realizada a 570 nm em leitor de microplaca. Os testes foram realizados em duplicata e em seguida normalizados conforme a fórmula: % Viabilidade Celular = (Absorbância das células das amostras – Absorbância do branco/ Absorbância de células controle positivo – Absorbância do branco) x 100.

4.5.2 Dosagem de lactato desidrogenase (LDH)

Para a avaliação foram constituídos 5 grupos. O primeiro grupo foi constituído apenas por PBMC (2 x 10⁵/poço), o segundo grupo PBMC + Lipopolissacarídeo (LPS - 100ng/poço), o terceiro grupo PBMC + taquizoítos de *T. gondii* (1 célula:2 parasitos), o quarto grupo PBMC + LPS (100ng/poço) + taquizoítos de *T. gondii* (1 célula:2 parasitos), e o quinto grupo PBMC + NET (100 ng/poço) em placas de 96 poços durante 24 e 48 horas (5% CO₂/37°C). Após o período, o sobrenadante foi coletado e armazenado em eppendorf de 0,5mL em freezer – 80°C. Para o processamento, as amostras foram descongeladas lentamente a temperatura ambiente e em seguida avaliadas quanto a liberação de LDH. Para determinar o percentual da atividade da LDH, foi seguido as instruções do fabricante (LDH UV – Bioclin - Quibasa Química Básica, Belo Horizonte, Brasil).

4.6 Quantificação da produção de NO

A determinação da produção de NO foi realizada indiretamente pela quantificação do nitrito (NO₂) resultante de sua oxidação no sobrenadante pela reação colorimétrica de Griess (HIBBS, 1989) nos 5 grupos em cultivo durante 24 e 48 horas:

PBMC (2×10^5 /poço), PBMC + Lipopolissacarídeo (LPS -100ng/poço), PBMC + taquizoítos de *T. gondii* (1 célula:3 parasitos), PBMC + LPS (100ng/poço) + taquizoítos de *T. gondii* (1 célula:3 parasitos) e PBMC + NET (50 ng/poço). Para tanto, após o período incubatório, as placas foram centrifugadas, sobrenadante coletado e armazenado em eppendorf de 0,5mL em freezer -80°C até o processamento. As amostras foram lentamente descongeladas, combinadas em placas de 96 poços, 70 uL da amostra com 70 uL do reagente de Griess na proporção de 1:1 de 1% de sulfanilamida em 2,5% de H₃PO₄ e 0,1% de diamina-di-hidroclorido naftaleno (NEED) em 2,5% de H₃PO₄. Após 10 minutos foi comparada a absorbância a 540 nm das diferentes amostras, com os valores da curva padrão obtida pela dosagem de nitrito de sódio diluído em meio RPMI em concentrações que variam de 0,195313 a 200uM.

4.7 Avaliação da expressão das citocinas TNF- α , IL-1, IL-10 e IL-12 p40 e IFN- γ por PCR em tempo Real (RT-PCR)

A quantificação da expressão de citocinas foi realizada nos 5 grupos sob tratamento e estímulo durante 24 e 48 horas: PBMC (2×10^5 /poço), PBMC + Lipopolissacarídeo (LPS -100ng/poço), PBMC + taquizoítos de *T. gondii* (1 célula:3 parasitos), PBMC + LPS (100ng/poço) + taquizoítos de *T. gondii* (1 célula:3 parasitos) e PBMC + NET (50 ng/poço). Para tanto, após o tempo de interação, as placas foram centrifugadas (400xg por 5 minutos a 23°C), e as células presentes no fundo da placa foram ressuspensas em 200 μ L de TRIzol (Invitrogen™), homogeneizadas vigorosamente, transferidas para tubos tipo eppendorfes livres de DNase e RNase, e armazenadas em freezer -80°C. As amostras conservadas em TRIzol tiveram o RNA extraído pelo método do Trizol, conforme descrito no Anexo 1. Após a extração, o RNA das amostras foi quantificado em aparelho nanodrop e estas submetidas a construção de cDNA pelo protocolo de transcriptase reversa usando o kit SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (Invitrogen™) conforme recomendações do fabricante no Anexo 2. O cDNA foi utilizado para avaliar a expressão g de Interleucina-1 beta (IL-1 β), Interleucina-12 (subunidade p40), Interleucina-10 (IL-10) e Interferon gama (INF- γ)

(Tabela 1) em qPCR utilizando o PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, na plataforma AB 7500 fast (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) (Anexo 3). A fórmula a seguir foi utilizada para comparação dos níveis de expressão dos genes de interesse (G.I.) entre os grupos controle e experimental:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ G.I. Controle} - Ct \text{ GAPDH Controle}) - (Ct \text{ G.I. Experimental} - Ct \text{ GAPDH Experimental})]$$

Os resultados foram expressos em termos de variação usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os oligonucleotídeos alvos estão descritos na Tabela 1 e foram selecionados usando o sistema BLAST.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos para os genes alvo no estudo

| Gene alvo | Foward | Reverse |
|---------------|-----------------------|-----------------------|
| IL-1 β | GCAGCCATACAGTCACAGGA | CGAAGCTCGTATGAGCCAGA |
| IL-10 | TGGGGAACGAAACATCCAG | AGGTATGACCGGGTTCTCCA |
| IL-12p40 | GTGGCTGACGGCAATCAGTA | TTCTCTGCTGAGAGTGTCGC |
| IFN- γ | TGGGTCGCTTTTCGTAGACA | ATGCTCCTTTGAATGCGCTG |
| GAPDH | TGGCCTCCAAAGAGTAAGAGC | CTCAAGTGTGTTGGGTGACGA |

4.8 Análise de dados

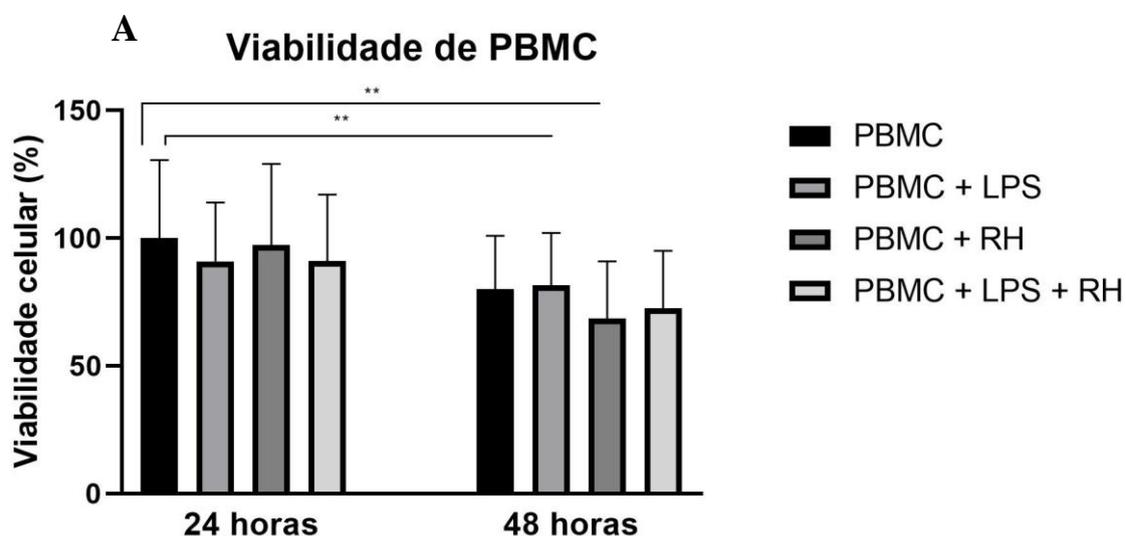
Os resultados foram analisados por estatística não-paramétricas utilizando o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal Wallis. Para os demais foi realizada uma análise descritiva. A análise de dados foi realizada pelo GraphPad Prism 5.03 software.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular de PBMC

No ensaio de MTT foi observado que o PBMC de gatos estimulados com os taquizoítos durante 48 horas, com ou sem associação com o LPS, apresentaram uma diminuição significativa da sua viabilidade quando comparado ao controle ($p < 0,01$) (Figura 3). A viabilidade em culturas de PBMC puro ou estimulados com LPS não apresentaram diminuição significativa.

Na análise da viabilidade a partir da dosagem do LDH de forma similar ao MTT, PBMC estimulados com taquizoítos, durante 48 horas, associados ou não ao LPS, apresentaram aumento na atividade de LDH quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Além disso, o grupo com PBMC estimulado com sobrenadantes ricos em NET por 24 e 48 horas, apresentaram uma elevação significativa da concentração de LDH ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) quando comparados com ao grupo controle 24 horas.



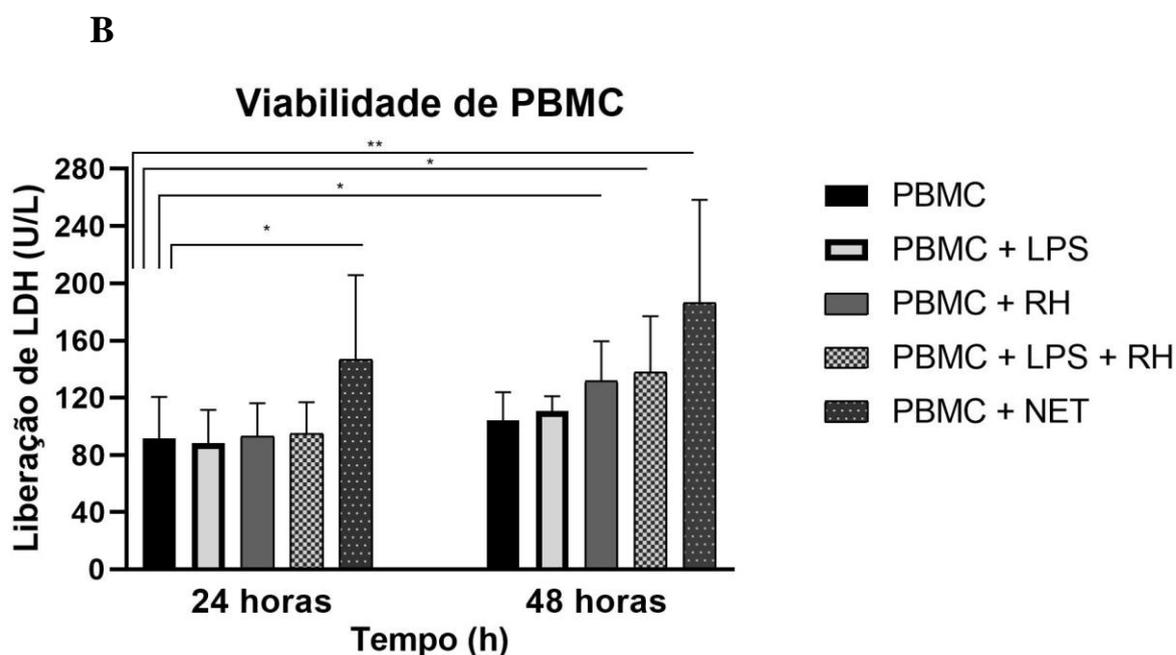


Figura 3. Viabilidade de PBMC de gatos expostos ao *T.gondii* ou tratados com NETs avaliadas pelos métodos de MTT e LDH. (A) PBMC (2×10^5 /poço) foram incubados sem estímulo (controle), com LPS (100ng/poço), com taquizoítos de *T. gondii* (proporção de 1:3), LPS associado ao *T. gondii* e com NETs (50ng/poço) durante 24 e 48 horas ($37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$). A absorbância foi lida em comprimento de onda de 570nm. Dados expressos como média \pm SEM. Diferenças significativas foram observadas em culturas de PBMC cultivadas com taquizoítos de *T. gondii* isolados ou associados ao LPS nos tempos 24 e 48 horas. (B) PBMC (2×10^5 /poço) foram incubados sem estímulo (controle), com LPS (100ng/poço), com taquizoítos de *T. gondii* (proporção de 1:3), LPS associado ao *T. gondii* ou com NETs (50 μg) durante 24 e 48 horas ($37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$). Os resultados foram expressos em U/L. Dados expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

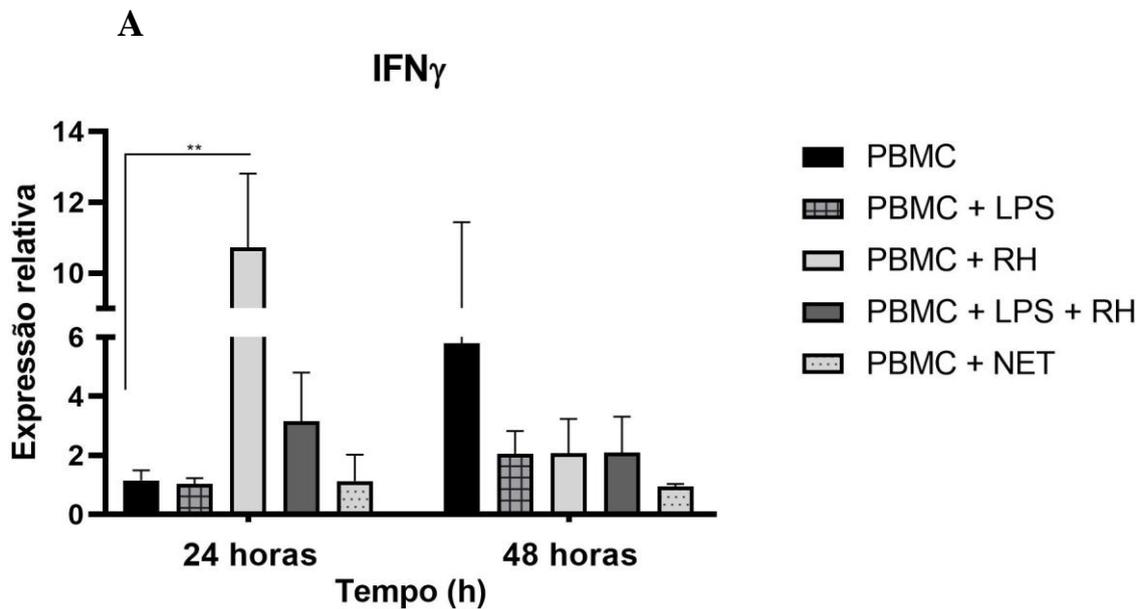
5.2 Expressão de citocinas por PBMC de gatos estimulados com taquizoítos de *T. gondii* ou tratados com NETs

Avaliando a expressão de $\text{IFN-}\gamma$, foi observado um aumento significativo nos grupos de PBMC de gatos estimulados com taquizoítos de *T.gondii* durante 24 horas quando comparados ao grupo controle 24 horas ($p=0,0149$) (Figura 4).

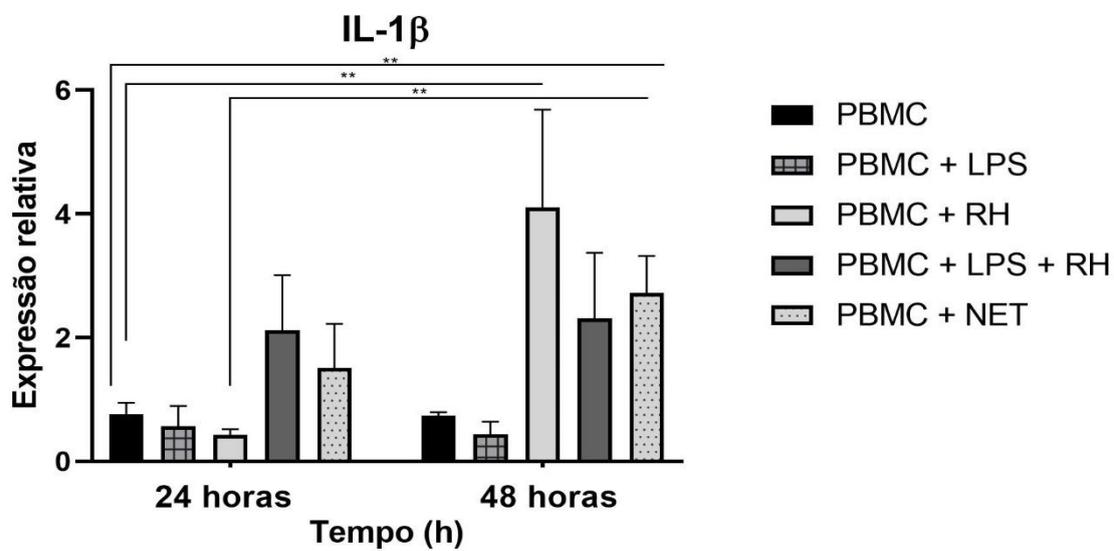
O grupo de PBMC estimulado com LPS e PBMC tratados com NET, ambos durante 48 horas, apresentaram níveis mais altos de $\text{IL-1}\beta$ em relação ao grupo controle 24 horas. Para IL-12 , apenas o grupo de PBMC estimulados como LPS durante 48 horas

expressaram significativamente aumento ($p=0,0151$) comparados ao grupo controle com 48 horas. Para o perfil anti-inflamatório, a dosagem de IL-10 foi significativa no grupo de PBMC estimulados com taquizoítos durante 48 horas comparados ao grupo controle 24 horas ($p=0,0376$).

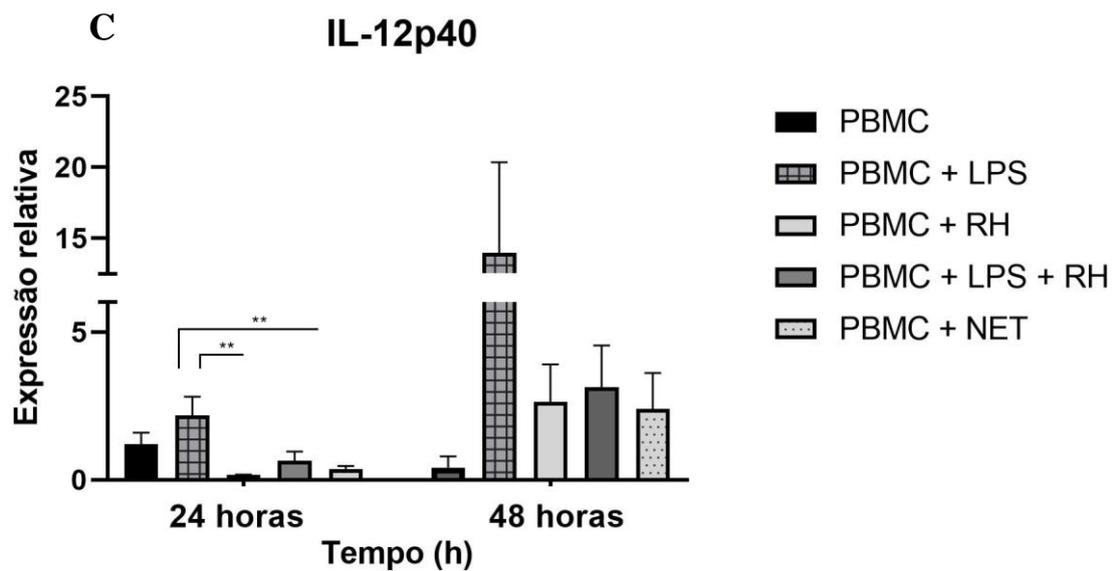
Como já esperado, houve apenas uma leve e não significativa expressão de IL-10 em todos os grupos no tempo 24 horas. O grupo de PBMC estimulado com *T.gondii* por 48 horas apresentou aumento significativo dessa citocina quando comparados ao grupo controle 24 horas ($p = 0,0376$).



B



C



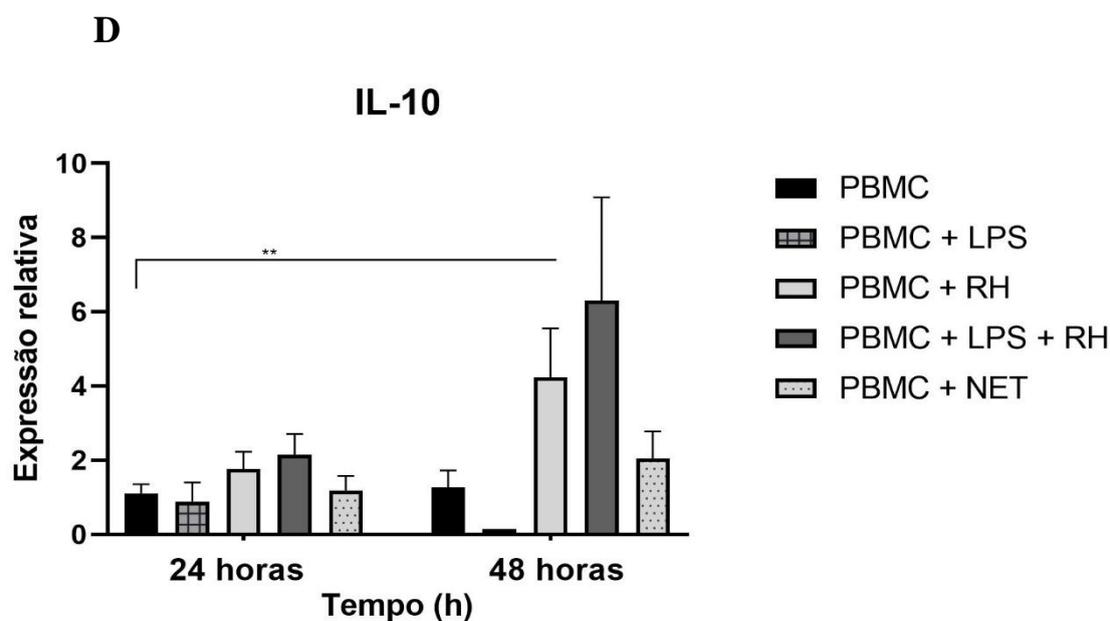


Figura 4. Expressão relativa das citocinas IFN γ , IL-1 β , IL-12p40 e IL-10 de PBMC de gatos expostos ao *T.gondii* ou tratadas com NETs. PBMC (2×10^5 /poço) foram plaqueados em placas de 96 poços e estimulados com LPS (100ng/poço), com taquizoítos de *T. gondii* (proporção de 1:3) ou LPS associado ao *T.gondii* ou tratados com NETs (50 μ g/poço) durante 24 e 48 horas (37°C/5% CO₂). O RNA total foi extraído utilizando TRIzol e o cDNA sintetizado com o kit SuperScript™ IV VILO™ Master Mix. As reações de PCR em tempo real foram realizadas na plataforma Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System, com utilização doPowerUp™ SYBR™ Green master mix (Applied Biosystems). Dados expressos como média \pm SEM. Diferenças significativas foram observadas em: (A) IFN γ : culturas de PBMC cultivadas com taquizoítos de *T. gondii* isolados durante 24horas. (B) IL-1 β : PBMC estimulados com *T. gondii* ou tratados com NETs durante 48 horas. (C) IL-12p40: PBMC estimulado com LPS (100ng/poço) durante 24 e 48 horas (D) PBMC estimulados com *T. gondii* durante 48 horas. Os resultados foram expressos em U/L. Dados expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$

6 DISCUSSÃO

O ensaio do MTT e dosagem de LDH foi utilizado nesse estudo para avaliar a viabilidade do PBMC de gatos sob variados estímulos. O ensaio MTT consiste em um ensaio colorimétrico que, indiretamente, determina a viabilidade celular a partir da redução do sal de tetrazólio pelas mitocôndrias de células metabolicamente ativas (MORGAN, 1998), enquanto o lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima encontrada no citosol de vários tipos de células nucleadas ou não, sendo liberada pela célula quando há algum dano ou morte celular (HENDERSON et al., 1985).

Bishop e colaboradores (1993) demonstraram que PBMC de gatos saudáveis cultivados isoladamente sofrem pouca alteração de viabilidade durante 24 e 48 horas incubados a 37 °C e 5% de CO₂, enquanto estimulados com Concaivalina A no tempo 48 horas, eles sofrem um aumento da porcentagem de células mortas. Estudos realizados com PBMC humano mostra comportamento semelhante, onde essas células puras ou estimuladas cultivadas por 24 e 48 horas (5% CO₂/37°C) não apresentaram diminuição significativa de sua viabilidade (DI GIAMPAOLO et al., 2021; KAYA et al., 2020; PATPAN et al., 2019).

O mesmo foi verificado no grupo de PBMC estimulado com LPS, que não apresentou uma redução significativa da viabilidade. Vários estudos mostraram que a viabilidade de células expostas ao LPS varia de acordo com o tipo celular e espécie, além da concentração do estímulo e o tempo de interação, onde quanto maior a concentração e tempo de exposição ao LPS, maior implicação na viabilidade (AN; CHO, 2021; CHOI et al., 2010; LIN et al., 2020; MENG et al., 2017; PINHO et al., 2011; ZOU et al., 2014).

As reduções significativas observadas nos grupos expostos a taquizoítos de *T. gondii* durante 48 horas podem estar associadas a infecção, multiplicação e destruição da célula parasitada. O tempo de multiplicação varia com o tipo celular infectado. Em

linfócitos o tempo de multiplicação é mais lento do que o observado em monócitos e células dendríticas, podendo levar mais de 24 horas para multiplicar-se e em seguida lisar a célula (CHANNON et al., 2000). A contagem diferencial de leucócitos (Anexo 5) pode explicar a diminuição significativa da viabilidade do PBMC exposto ao *T. gondii* apenas no tempo 48 horas, uma vez que uma maior proporção de linfócitos (70%) foi encontrada.

Os taquizoítos não promoveram perdas significativas em PBMC no tempo 24 horas, apontando que o fator tempo influencia nesses resultados. Como observado, o LPS isoladamente não configura um fator de perda de integridade em ambos os tempos, sugerindo que apenas o *T. gondii* exerça influência na viabilidade dessas células.

Adicionalmente, um grupo com PBMC de gatos foi tratado com o sobrenadante da interação entre neutrófilos e *T. gondii* (NET) e sua viabilidade analisada pela dosagem de LDH. Resultados semelhantes foram encontrados em outros tipos celulares em outras espécies quando tratados com NET, tratamento este que conferiu apoptose e necrose celular às células tratadas (FATEMI et al., 2021; NAKAZAWA et al., 2017; WEI et al., 2019). O grupo de PBMC tratados com NETs teve sua viabilidade analisada pelo ensaio de MTT, entretanto os valores da absorbância sofreram uma grande elevação, o que pode sugerir que o método não seja adequado para medição de viabilidade em células tratadas com NETs.

Tomados em conjunto, PBMC de gatos estimulados *T. gondii in vitro* durante 24 horas não configura uma perda na viabilidade dessas células, enquanto a estimulação durante 48 horas promove uma perda de integridade em relação ao grupo controle 24 horas.

Os ensaios de produção de óxido nítrico foram realizados nas culturas, porém nossos resultados não mostraram produção de NO em nenhum grupo, sugerindo que a técnica adotada não seja sensível para dosagem em baixas concentrações de NO (Anexo 6). Mais estudos devem ser realizados para confirmar se há ou não a produção de óxido nítrico em PBMC de gatos estimulados com LPS, *T. gondii* ou tratados com NETs.

A expressão de citocinas revelou um perfil inflamatório em PBMC em cocultura com *T. gondii* durante 24 horas, com uma fase de transição para anti-inflamatória às 48 horas.

IFN γ é uma citocina produzida em alta escala por células *Natural Killer* e linfócitos T frente a infecção por *Toxoplasma gondii* e compreende à principal citocina reguladora da replicação do parasito intracelular. A deficiência de IFN γ implica em uma maior susceptibilidade do hospedeiro ao *T. gondii*, sendo essa citocina essencial para o estabelecimento e manutenção da infecção crônica (SUZUKI et al., 1988). Estudo realizado em PBMC de porcos, a infecção com o parasito induziu uma forte expressão de IFN γ após 72 horas de interação (JENNES et al., 2017). IFN γ foi detectado em PBMC de gatos infectados *in vivo* com *T. gondii* (LEVY et al., 2004; YIN et al., 2015a). Em PBMC humanos vários estudos já demonstraram a expressão de IFN γ *in vitro* (CONG et al., 2011; MEIRA et al., 2014). Nesse estudo demonstramos que PBMC de gatos são capazes de produzir IFN γ quando desafiados *in vitro* durante 24 horas.

IL-12 são produzidos abundantemente em células dendríticas estimuladas com *T. gondii* e sua produção é essencial para a liberação de IFN γ . A deficiência dessa citocina pode prejudicar a resposta imune contra esse protozoário (GAZZINELLI et al., 1993). Em ensaios *in vivo* com gatos, a expressão alta de IL-12 foi encontradas em células do baço, células dos linfonodos mesentéricos e linfócitos T derivado de linfonodos (KOYAMA et al., 1999; LEVY et al., 2004). Nossos resultados revelam que PBMC de gatos infectados com taquizoítos de *T. gondii* não produzem quantidades significativas de IL-12. Esse evento pode ser explicado pela baixa proporção de células dendríticas na população do PBMC ou a alta expressão de IL-10 por esse grupo, que exerce feedback negativo para IL-12. Um leve aumento de IL-12 foi visto nos grupos desafiados com *T. gondii* por 48 horas, sugerindo que a expressão de IL-12 em PBMC de gatos dependam do tempo de estímulo na espécie.

Analisando em conjunto a expressão de IL-12 e IFN γ por grupos de células infectados com taquizoítos de *T. gondii* por 24 e 48 horas, uma relação pode ser estabelecida quando notamos uma diminuição de IFN γ no tempo 48 horas. Células NK produzem IFN γ quando ativadas por IL-12. Quando o hospedeiro sofre uma infecção

secundária por *T. gondii*, os linfócitos T de memória podem contribuir para a produção de IFN γ pelas células NK, porém em m número bem reduzido comparados a produção na presença de IL-12 (GAZZINELLI et al., 1993; IVANOVA et al., 2019)

As células modularam uma resposta pró-inflamatória após o estímulo com LPS. A elevada produção de IL-12p40 e a baixa produção de IL-10 por esse grupo em ambos os tempos sustenta a resposta pró-inflamatória.

Stich e Declue (2011) identificaram a produção de IL-1 β em sangue total de gatos estimulado com várias concentrações de LPS durante 24 horas. Nós encontramos produção de IL-1 β em PBMC de gatos cocultivados com LPS a 100ng durante 24 e 48 horas, porém não significativas. IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória produzido por monócitos, macrófagos e células dendríticas em resposta a microrganismos. Os diferentes sorotipos do *T. gondii* são reconhecidos de acordo com as proteínas presentes em sua membrana e sua identificação por células apresentadoras de antígenos. Isso influencia na expressão de citocinas sinalizadoras. Expressões mais altas de IL-1 β foram encontradas em PBMC de humanos infectados com o sorotipo I da *T. gondii* (MANTILLA-MURIEL et al., 2020). Ainda em humanos, já foi demonstrado a produção de IL-1 β por monócitos e também como inibidora da replicação de *T. gondii* in vitro (DIMIER; BOUT, 1993; GOV et al., 2017; WITOLA et al., 2011). Nossos resultados são semelhantes aos encontrados em humanos, onde os grupos de PBMC estimulados com taquizoítos de *T. gondii* expressaram nível significativo de IL-1 β após 48 horas de incubação quando comparados ao grupo controle, contribuindo assim para a resposta pró-inflamatória causada pela infecção in vitro em gatos.

IL-10 é uma citocina que integra as respostas anti-inflamatórias do sistema imune, atua durante a infecção por *Toxoplasma gondii* inibindo a resposta inflamatória exacerbada que pode ser maléfica ao hospedeiro. A expressão de IL-10 pelo grupo PBMC estimulado com *T. gondii* condiz com os baixos níveis de IFN γ desse mesmo grupo no tempo 48 horas, visto que essas citocinas são inversamente proporcionais (MALEFYT et al., 1991). Gazzinelli e colaboradores (1996) demonstraram em modelo murino, a resposta exacerbada de IFN γ , TNF α e IL-12 pode levar a necrose do fígado e intestino delgado levando o animal a morte, sendo a IL-10 a citocina limitante dessa

superprodução. A IL-10 é capaz de inibir a produção de IFN γ , diminuir a atividade de células T efectoras e de células apresentadoras de antígenos, além de ser pelo estabelecimento da infecção crônica (MALEFYT et al., 1991; TAGA;TOSATO, 1992; O'BRIEN et al., 2019).

A expressão de IL-1 β pelo grupo de PBMC tratados com o sobrenadante ricos em NETs durante 48 horas chama a atenção, quando comparamos esse grupo com PBMC estimulados com *T. gondii* 24 horas e LPS 48 horas. Trabalho recente realizado por Vanderbeke e colaboradores (2021) sugeriram neutrófilos ativado produzindo NETs, contribuem para uma maior expressão de IL-1 β em monócitos de paciente críticos com COVID-19. Resultado similar foi demonstrado por Soehnlein e colaboradores (2008) com neutrófilos impulsionando a atividade de monócitos. Uma resposta pró-inflamatória foi observada também por Carrillo-Vázquez e colaboradores (2020) quando houve a interação das NETs com linfócitos de pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico, contribuindo com a doença autoimune. Linfócitos em cultura de PBMC foram ativados e expressaram IFN γ . cocultivado com NET em trabalho realizado em 2012 por Tillack e colaboradores. Nossos resultados sugerem em PBMC de gatos tratados com NET podem estimular uma resposta pró-inflamatória, com elevada expressão de IL-1 β , supondo que pode ser advinda de monócitos ativados.

7. CONCLUSÃO

Células do sangue periférico de gatos (PBMC) infectadas por *Toxoplasma gondii* in vitro difere dos resultados encontrados em outros tipos celulares da mesma espécie in vivo quando avaliamos a expressão de IL-12 e IFN γ , onde houve baixa produção da primeira e curta produção no tempo da segunda, o que pode ser sugerida pelo envolvimento de outras células em ensaio in vivo e à presença expressiva de IL-10 após 48 horas.

Além disso, a alta produção de IL-1 β em grupos infectados, supõem que monócitos foram regulados positivamente a responder à infecção na ausência do IFN γ no tempo 48 horas.

Ao tratar PBMC de gatos com NETs, observamos um padrão inflamatório liderado pela produção de IL-1 β nesse grupo, sugerindo que as NETs podem potencializar a liberação dessa citocina nas células produtoras da mesma, como monócitos e macrófagos de gatos.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, D. S. A. et al. Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 2, p. 768–777, 2012.
- AN, J.; CHO, J. Wheat phytase can alleviate the cellular toxic and inflammatory effects of lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 114–124, 2021.
- AULIK, N. A. Mannheimia haemolytica and Its Leukotoxin Cause Neutrophil Extracellular Trap Formation by Bovine Neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4454–4466, 2010.
- AUTISSIER, P. et al. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. **Cytometry Part A**, v. 77, n. 5, p. 410–419, 2010.
- BARRIENTOS, L. et al. Neutrophil Extracellular Traps Downregulate Lipopolysaccharide-Induced Activation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 11, p. 5689–5698, 2014.
- BARTNECK, M. et al. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. **Nano Letters**, v. 10, n. 1, p. 59–64, 2010.
- BLISS, S. K. et al. Human Polymorphonuclear Leukocytes Produce IL-12, TNF- α , and the Chemokines Macrophage-Inflammatory Protein-1 α and -1 β in Response to Toxoplasma gondii Antigens. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, p. 7369–7375, 1999.
- BOWMAN, D. D. et al. **Feline clinical parasitology**. Iowa: Blackwell Science, Ed. 1, p. 469, 2002.
- BRENIER-PINCHART, M. P. et al. Toxoplasma gondii induces the secretion of monocyte chemotactic protein- 1 in human fibroblasts, in vitro. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 209, n. 1–2, p. 79–87, 2000.
- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.
- BROWN, G. C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1504, n. 1, p. 46–57, 2001.
- CAI, Y. et al. Toxoplasma gondii inhibits apoptosis via a novel STAT3-miR-17-92-Bim pathway in macrophages. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 6, p. 1204–1212, 2014.

CALERO-BERNAL, R.; GENNARI, S. M. Clinical toxoplasmosis in dogs and cats: An update. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. 54, p. 1–9, 2019.

CHANNON, J. Y.; SEGUIN, R. M.; KASPER, L. H. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 8, p. 4822–4826, 2000.

CHAPEY, E. et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 41–45, 2010.

CHEN, L. et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis article. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 6, p. 1-12, 2018.

CHENG, J. F. et al. Dermal eosinophils in atopic dermatitis undergo cytolytic degeneration. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 99, n. 5, p. 683-692, 1997.

CHENG, O. Z.; PALANIYAR, N. NET balancing: A problem in inflammatory lung diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2013.

CHOI, S. Y. et al. Anti-inflammatory effects of *Inonotus obliquus* in colitis induced by dextran sodium sulfate. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

CLOUGH, B.; FRICKEL, E. M. The *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole: An Evolving Host–Parasite Frontier. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 6, p. 473–488, 2017.

CONG, H. et al. Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis: Protective *Toxoplasma gondii* epitopes restricted by HLA-A*0201. **Vaccine**, v. 29, n. 4, p. 754–762, 2011.

DABRITZ, H. A.; CONRAD, P. A. Cats and toxoplasma: Implications for public health. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 34–52, 2010.

DAVIDSON, M. G. et al. Feline Immunodeficiency Virus Predisposes Cats to Acute Generalized Toxoplasmosis. **American Journal of Pathology**, v. 143, n. 5, p. 1486–1497, 1993.

DAVILA, J. A. A.; RIOS, A. H. D. An Overview of Peripheral Blood Mononuclear Cells as a Model for Immunological Research of *Toxoplasma gondii* and Other Apicomplexan Parasites. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 24, 2019.

DEGRANDI, D. et al. Murine Guanylate Binding Protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 1, p. 294–299, 2013.

DENKERS, E. Y. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection.pdf. v. 11, n. 4, p. 569–588, 1998.

DENNEY, C. F.; ECKMANN, L.; REED, S. L. Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 4, p. 1547–1552, 1999.

DI GIAMPAOLO, L. et al. Genotoxicity and immunotoxicity of titanium dioxide-embedded mesoporous silica nanoparticles (Tio2@msn) in primary peripheral human blood mononuclear cells (pbmc). **Nanomaterials**, v. 11, n. 2, p. 1–21, 2021.

DIMIÉR, I. H.; BOUT, D. T. Co-operation of interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α in the activation of human umbilical vein endothelial cells to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. **Immunology**, v. 79, n. 2, p. 336–338, 1993.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 β . **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12 SUPPL., p. 460–462, 2005.

DÖRING, Y.; SOEHNLEIN, O.; WEBER, C. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis. **Circulation Research**, v. 120, n. 4, p. 736–743, 2017.

DUBEY, J. P. Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. **Nature**, v. 262, n. 5565, p. 213–214, 1976.

DUBEY, J. P. et al. Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 887–893, 1995.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Heredity**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257–1278, 2008.

DUNAY, ILDIKO. Gr1+ (Ly6C+) Inflammatory Monocytes are Required for Mucosal Resistance to the Pathogen *Toxoplasma gondii*. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

DUNAY, et al.. Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1564–1570, 2010.

DZIERSZINSKI, F. et al. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 4, p. 992–1003, 2004.

ELMORE, S. A. et al. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190–196, 2010.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. **Tratado de medicina interna veterinária**. Ed. 5. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1038, 2004

FATEMI, A. et al. The impact of neutrophil extracellular trap from patients with systemic lupus erythematosus on the viability, CD11b expression and oxidative burst of healthy neutrophils. **BMC Immunology**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 2021.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231–241, 2007.

FUCHS, T. A. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 36, p. 15880–15885, 2010.

GARCIA, J. L. et al. Soroprevalência do *toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 91–97, 1999.

GAZZINELLI, R. T. et al. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 13, p. 6115–6119, 1993.

GAZZINELLI, R. T. et al., Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 1, p. 286-292, 1991.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71–82, 2003.

GOLDSZMID, R. S. et al. NK cell-derived interferon- γ orchestrates the cellular dynamics and differentiation of monocytes into inflammatory dendritic cells at the site

of infection. **iMMU**, v. 36, n. 6, p. 1047–1059, 2012.

GOV, L. et al. NLRP3 and potassium efflux drive rapid IL-1 β release from primary human monocytes during *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Immunology**, v. 199, n. 1, p. 2855–2864, 2017.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. Neutrophil extracellular traps reprogram IL-4/GM-CSF-induced monocyte differentiation to anti-inflammatory macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-12, 2017.

HAIDER, P. et al. Neutrophil Extracellular Trap Degradation by Differently Polarized Macrophage Subsets. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 40, n. September, p. 2265–2278, 2020.

HATAM-NAHAVANDI, K. et al. *Toxoplasma gondii* infection in domestic and wild felids as public health concerns: a systematic review and meta-analysis. **Nature Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.

HENDERSON, R. F. et al. New approaches for the evaluation of pulmonary toxicity: bronchoalveolar lavage fluid analysis. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 5, n. 3, p. 451-458, 1985

HERNANDEZ-CORTAZAR, I. B. et al. Presence of *Toxoplasma gondii* in Drinking Water from an Endemic Region in Southern Mexico. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 5, p. 288–292, 2017.

HWANG, S. J. et al. Blimp-1-mediated CD4 T cell exhaustion causes CD8 T cell dysfunction during chronic toxoplasmosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 9, p. 1799–1818, 2016.

IVANOVA, D. L.; MUNDHENKE, T. M.; GIGLEY, J. P. The IL-12 and IL-23 dependent NK cell response is essential for protective immunity against secondary *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Immunology**, v. 203, n. 11, p. 2944–2958, 2019.

JENNES, M. et al. Strain- and dose-dependent reduction of *Toxoplasma gondii* burden in pigs is associated with interferon-gamma production by CD8⁺ lymphocytes in a heterologous challenge model. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1–20, 2017.

JEONG, J. et al. Induction of IL-10-producing regulatory B cells following *Toxoplasma gondii* infection is important to the cyst formation. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 7, p. 91-97, 2016.

JOSEFS, T. et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage inflammation

and impair atherosclerosis resolution in diabetic mice. **JCI Insight**, v. 5, n. 7, p. 1–10, 2020.

KAYA, E. et al. In vitro Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms With Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. May, p. 1–13, 2020.

KEMP, L. E.; YAMAMOTO, M.; SOLDATI-FAVRE, D. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 4, p. 607–631, 2013.

KHAN, I. A.; HWANG, S.; MORETTO, M. *Toxoplasma gondii*: CD8 T cells cry for CD4 help. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–8, 2019.

KHAN, I. A.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1639–1642, 1994.

KOCKRIRZ-BICKWEDE, M. V.; NIZET, V. Innate immunity turned inside-out: Antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, n. 8, p. 775-783, 2009.

KOH, C.C. et al. Human CD8+ T Cells Release Extracellular Traps Co-Localized With Cytotoxic Vesicles That Are Associated With Lesion Progression and Severity in Human Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1-19, 2020.

KOYAMA, T. et al. Interleukin-12, Interferon- γ and Interleukin-4 Gene Expression in Cats Infected with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 7, p. 819–821, 1999.

LACERDA, L. C. et al. *Toxoplasma gondii* induces extracellular traps release in cat neutrophils. **Experimental Parasitology**, v. 207, p. 107770, 2019.

LIDLAW, B. J.; CRAFT, J.; KAECH, S. M. The multifaceted role of CD4+ T cells in the regulation of CD8+ T cell memory maturation. **Nature Review Immunology**, v. 16, n. 2, p. 102–111, 2016.

LAZZARETTO, B.; FADEEL, B. Intra- and Extracellular Degradation of Neutrophil Extracellular Traps by Macrophages and Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 8, p. 2276–2290, 2019.

LEHRER, R. I.; GANZ, T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, n. 1, p. 23–27, 1999.

LEVY, J. K. et al. Failure of FIV-infected cats to control *Toxoplasma gondii* correlates with reduced IL2, IL6, and IL12 and elevated IL10 expression by lymph node T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, n. 1–2, p. 101–111, 2004.

LIN, J. et al. The rCC16 Protein Protects Against LPS-Induced Cell Apoptosis and Inflammatory Responses in Human Lung Pneumocytes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1–14, 2020.

MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) and Viral IL-10 Strongly Reduce Antigen-specific Human T Cell Proliferation by Diminishing the Antigen-presenting Capacity of Monocytes via Down-regulation of Class II Major Histocompatibility Complex Expression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 915–924, 1991.

MANI, I.; MAGUIRE, J. H. Small Animal Zoonoses and Immunocompromised Pet Owners. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 24, n. 4, p. 164–174, 2009.

MANTILLA-MURIEL, L. E. et al. Serotyping, host genes and cytokines response in human ocular toxoplasmosis. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 1–7, 2020.

MARTENS, S. et al. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 3, p. 0187–0201, 2005.

MEIRA, C. S. et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- γ , TNF- α , and IL-10 levels. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–7, 2014.

MENG, X. et al. Carbon monoxide-releasing molecule-2 suppresses thrombomodulin and endothelial protein C receptor expression of human umbilical vein endothelial cells induced by lipopolysaccharide. v. 21, p. 0–6, 2017.

MITAL, J. et al. Conditional Expression of *Toxoplasma gondii* Apical Membrane Antigen-1 (TgAMA1) Demonstrates That TgAMA1 Plays a Critical Role in Host Cell Invasion. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 4341–4349, 2005.

MORSLED, M. et al. NADPH Oxidase-Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 11, p. 5314–5323, 2014.

MULLER, W. A.; RANDOLPH, G. J. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: Molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 66, n. 5, p. 698–704, 1999.

NAKAZAWA, D. et al. Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 6, p. 1753–1768, 2017.

- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. Ed. 11, São Paulo: Atheneu, p. 494, 2005
- NORSWORTHY, G. N. et al. **O paciente felino**. Ed. 3, São Paulo: Roca. p. 801, 2009.
- O'BRIEN, C. et al. IL-10 and ICOS differentially regulate T cell responses in the brain during chronic *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Immunology**, v. 202, n. 6, p. 1755–1766, 2019.
- OHTSUKA, Y. et al. MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine. **Gut**, v. 49, n. 4, p. 526–533, 2001.
- PANDORI, W. J. et al. *Toxoplasma gondii* activates a Syk-CARD9-NF- κ B signaling axis and gasdermin D-independent release of IL-1 β during infection of primary human monocytes. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 8, p. 1–24, 2019.
- PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 134–147, 2018.
- PATPAN, N. et al. The Effect of Transfusion-Dependent Thalassemia Patient's Serum on Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability. **Journal of Cell Death**, v. 12, p. 1–8, 2019.
- PEREIRA, A. C. A. et al. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors reduce *Toxoplasma gondii* infection and upregulate the pro-inflammatory immune response in calomys callosus rodents and human monocyte cell line. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1–20, 2019.
- PINEGIN, B.; VOROBEVA, N.; PINEGIN, V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 7, p. 633–640, 2015.
- PINHO, B. R. et al. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- PLATTNER, F. et al. *Toxoplasma* Profilin Is Essential for Host Cell Invasion and TLR11-Dependent Induction of an Interleukin-12 Response. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 2, p. 77–87, 2008.
- ROBBEN, P. M. et al. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 11, p. 1761–1769, 2005.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296,

2012.

SCHARTON-KERSTEN, T. M. et al. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 7, p. 1261–1273, 1997.

SERBINA, N. V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 421–452, 2008.

SIBLEY, L. D. Intracellular Parasite Invasion Strategies. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 248–253, 2004.

SIMON, J. A. et al. A multi-event capture-recapture analysis of *Toxoplasma gondii* seroconversion dynamics in farm cats. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.

SLANY, M. et al. *Toxoplasma gondii* in vegetables from fields and farm storage facilities in the Czech Republic. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 14, p. 1–12, 2019.

SOEHNLEIN, O. et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 1461–1471, 2008.

SOUZA, L. Z. et al. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados em Palotina, Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 20, n. 3, p. 123–126, 2018.

STICH, A. N.; DECLUE, A. E. Pathogen associated molecular pattern-induced TNF, IL-1 β , IL-6 and CXCL-8 production from feline whole blood culture. *Research in Veterinary Science*, v. 90, n. 2011, p. 59-63, 2011.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: Beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 3, p. 137–142, 2006.

SUZUKI, Y. et al. Interferon- γ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, n. 4851, p. 516–518, 1988.

SUZUKI, Y. et al. IL-10 Is Required for Prevention of Necrosis in the Small Intestine and Mortality in Both Genetically Resistant BALB/c and Susceptible C57BL/6 Mice Following Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 5375–5382, 2000.

SUZUKI, Y. et al. Removal of *Toxoplasma gondii* cysts from the brain by perforin-mediated activity of CD8⁺ T cells. **American Journal of Pathology**, v. 176, n. 4, p.

1607–1613, 2010.

SZABO, E. K.; FINNEY, A. M. C. *Toxoplasma gondii*: One Organism, Multiple Models. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 113-127, 2016.

TAGA, K.; TOSATO, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 4, p. 1143-1148, 1992.

TENTER, A. M. et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 3, p. 1217–1258, 2000.

TILLACK, K. et al., T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 3150-3159, 2012.

UEKI, S. et al. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. **Blood**, v. 121, n. 11, p. 2074–2083, 2013.

UEKI, S. et al. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 1, p. 258–267, 2016.

URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 668–676, 2006.

URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. 1–18, 2009.

VANDERBEKE, L. et al. Monocyte-driven atypical cytokine storm and aberrant neutrophil activation as key mediators of COVID-19 disease severity. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.

WARDINI, A. B. et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 1, p. 259–264, 2010.

WEI, Z. et al. Effects of neutrophil extracellular traps on bovine mammary epithelial cells in vitro. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–9, 2019.

WEISS, L. M. et al. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 7, p. 3295–3302, 1998.

WITOLA, W. H. et al. NALP1 influences susceptibility to human congenital

toxoplasmosis, proinflammatory cytokine response, and fate of *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 2, p. 756–766, 2011.

YAP, G.; PESIN, M.; SHER, A. Cutting Edge: IL-12 Is Required for the Maintenance of IFN- γ Production in T Cells Mediating Chronic Resistance to the Intracellular Pathogen, *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 2, p. 628–631, 2000.

YIN, Q. et al. Early detection of *Toxoplasma gondii*-infected cats by interferon-gamma release assay. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 145–149, 2015a.

YIN, Q. et al. Interferon-gamma release assay: An effective tool to detect early *Toxoplasma Gondii* infection in mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 2–10, 2015b.

YOUSEFI, S. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 11, p. 1438–1444, 2009.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. **Journal of Cultural Heritage**, v. 1, n. 2, p. 121–127, 2000.

ZOU, X. L. et al. A20 overexpression inhibits lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation, TRAF6 and CD40 expression in rat peritoneal mesothelial cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 6592–6608, 2014.

ZULPO, D. L. et al. *Toxoplasma gondii*: A study of oocyst re-shedding in domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 249, n. 51, p. 17–20, 2018.

ANEXO 1

Protocolo de extração de RNA total pelo método do TRIzol

*Amostras conservadas em 100µL de Trizol Reagent, mantidas em tubos tipo eppendorf livre de DNase e RNase, armazenadas a -80°C

1. EXTRAÇÃO

- Descongelar a amostra, mantendo o tubo em contato direto com gelo;
- Adicionar 400 µL de TRIzol ao tubo e incubar em temperatura ambiente durante 5 minutos;
- Adicionar 200 µL de clorofórmio, agitar vigorosamente e incubar em gelo durante 3 minutos;

2. SEPARAÇÃO DAS FASES

- Centrifugar para separação das fases (4°C, 15 minutos, 12000xg);
- Transferir a fase aquosa para um novo tubo eppendorf (livre de DNase e RNase) com capacidade para 1,5mL previamente identificado;
- Adicionar 500 µL de isopropanol ao tubo contendo a fase aquosa;
- Incubar durante 30 minutos em freezer a -80°C;
- Descongelar os tubos, mantendo-os em gelo até a fase seguinte;

3. PRECIPITAÇÃO DO RNA – em duplicata

- Centrifugar durante 10 minutos, 12000xg, 4°C;
- Verter o sobrenadante em novo tubo tipo eppendorf (obtenção da amostra em duplicata) centrifugar novamente (10 minutos, 12000xg, 4°C), descartando o sobrenadante ao fim da centrifugação;
- Adicionar 1mL de etanol 75% ao precipitado e centrifugar (10 minutos, 10500xg, 4°C);
- Descartar o etanol por inversão do tubo, mantendo-os invertidos sob papel toalha durante 5 minutos, em temperatura ambiente;
- Ressuspender o precipitado em água ultra pura livre de DNase e RNase;

4. SOLUBILIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

- Manter os tubos em banho-Maria seco a 56°C durante 10 minutos;
- Quantificar o RNA em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000);
- Congelar o RNA total extraído em freezer a -80°C.

ANEXO 2

Protocolo para síntese do cDNA

- Kit utilizado: SuperScript™ IV VILO™ Master Mix
- Catálogo 11756050

Antes de iniciar, calcular o volume correspondente a de 1µg de RNA total para cada cDNA sintetizado.

1. Preparar o Master Mix para uma reação com volume final de 20µL:
 - 4µL de SuperScript™ IV VILO™ Master Mix
 - 1µg de RNA total
 - Ajustar o volume final com água ultrapura para 20µL de reação.
2. Homogenizar brevemente as amostras e colocá-las no termociclador com a seguinte programação:
 - 25°C por 10 minutos → Anelamento dos primers
 - 50°C por 10 minutos → Transcrição reversa do RNA
 - 85°C por 5 minutos → Inativação da enzima
3. Congelar o cDNA a -80°C.

ANEXO 3

Protocolo da RT-PCR em Tempo Real

KIT: PowerUp™ SYBR™ Green master mix (Applied Biosystems)

Reações realizadas no aparelho Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System, em placas de 96 poços para qPCR da Applied Biosystems, mantidas em gelo durante todo preparo das reações.

1. Preparar o MIX para o volume final de 20µL por reação:
 - 10 µL de PowerUp™ SYBR™ Green master mix (2x)
 - 1µL primer forward (10µM)
 - 1µL primer reverse (10µM)
 - 1 µL de cDNA (0,05µg)
 - 6,5 µL Água ultrapura livre de Nucleases.
2. Selar e centrifugar brevemente a placa e iniciar as reações com a seguinte programação:

| | Estágio | Temperatura | Repetições | Tempo |
|--------------------|----------------|--------------------|-------------------|--------------|
| Ativação da enzima | 1 | 95 °C | 1 | 10 minutos |
| Fechamento da fita | 1 | 95 °C | 1 | 2 minutos |
| Desnaturação | 2 | 95 °C | 40 | 15 segundos |
| Anelamento | | 55-60 °C | | |
| Extensão | | 72 °C | | 1 minuto |

Condições da curva de dissociação (Melt curve)

| Estágio | Temperatura | Tempo |
|----------------|--------------------|--------------|
| 1 | 95 °C | 15 segundos |
| 2 | 60 °C | 1 minuto |
| 3 | 95 °C | 15 segundos |

ANEXO 4

Quantificação de DNA em sobrenadantes da interação entre neutrófilos e *Toxoplasma gondii* em espectrofotometro Nanodrop

*Para alguns animais foi realizado *pool* de amostras de outros animais.

| Animal | Amostra/repetição | Concentração DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | 260/280 nm |
|----------|-------------------|--|------------|
| Animal 1 | a | 4,2 | 2,52 |
| Animal 1 | b | 4,9 | 2,77 |
| Animal 1 | c | 6,0 | 1,95 |
| Animal 1 | d | 4,6 | 3,56 |
| Animal 1 | e | 4,1 | 3,86 |
| Animal 1 | f | 0,8 | -1,02 |
| Animal 2 | a | 4,5 | 1,79 |
| Animal 2 | b | 4,5 | 1,68 |
| Animal 2 | c | 4,5 | 1,81 |
| Animal 2 | d | 2,4 | 1,69 |
| Animal 2 | e | 1,8 | 1,45 |
| Animal 2 | f | 1,7 | 1,64 |
| Animal 3 | a | 5,4 | 1,89 |
| Animal 4 | a | 1,8 | -1,3 |
| Animal 4 | b | 0,8 | -0,36 |
| Animal 4 | c | 1,6 | -0,86 |
| Animal 4 | d | 3,9 | -0,07 |
| Animal 4 | e | 1,1 | -0,25 |
| Animal 5 | a | 3,7 | 2,08 |
| Animal 5 | b | 2,7 | 3,28 |
| Animal 5 | c | 4,0 | 2,34 |
| Animal 5 | d | 3,1 | 5,03 |
| Animal 5 | e | 5,1 | 2,08 |
| Animal 5 | f | 3,1 | 2,78 |
| Animal 5 | g | 3,4 | 2,74 |
| Animal 5 | h | 3,4 | 2,73 |
| Animal 6 | a | 11,0 | 2,15 |
| Animal 6 | b | 7,4 | 2,53 |
| Animal 6 | c | 8,6 | 2,3 |
| Animal 6 | d | 8,0 | 2,47 |
| Animal 6 | e | 9,2 | 2,19 |
| Animal 7 | a | 17,9 | 0,98 |
| Animal 7 | b | 14,5 | 0,94 |
| Animal 7 | c | 15,2 | 0,98 |
| Animal 7 | d | 14,8 | 1,02 |
| Animal 7 | e | 14,1 | 0,97 |
| Animal 7 | f | 5,2 | 1,1 |
| Animal 7 | g | 4,5 | 1,09 |
| Animal 8 | a | 12,7 | 0,99 |
| Animal 8 | b | 13,4 | 0,99 |

ANEXO 5

Contagem diferencial de leucócitos - Resultados absolutos

| | Animal 1 | Animal 2 | Animal 3 | Animal 4 | Animal 5 | Animal 6 | Animal 7 | Animal 8 |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Leucometria Total | 13.500 | 15.500 | 17.100 | 6.300 | 13.800 | 8.300 | 4.200 | 8.400 |
| Segmentados | 5.940 | 8.990 | 9.576 | 3.400 | 8.542 | 4.233 | 5.796 | 4.300 |
| Linfócitos | 6.745 | 3.720 | 5.472 | 2.400 | 3.836 | 1.577 | 1.196 | 3.475 |
| Monócitos | 270 | 155 | NE | 110 | 190 | 83 | NE | 165 |
| Eosinófilos | 945 | 2.480 | 2.052 | 590 | 1.232 | 2.407 | 2.208 | 460 |
| Basófilos | NE | 155 | NE | NE | NE | NE | NE | NE |

Legenda: NE - Não encontrado

ANEXO 6

Resultados produção de Oxido Nítrico

ABSORBÂNCIAS

| 24 HORAS | | | | | | | |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Animal 1 | Animal 2 | Animal 3 | Animal 4 | Animal 5 | Animal 6 | Animal 7 | Animal 8 |
| PBMC | | | | | | | |
| 0,049 | 0,049 | 0,095 | 0,109 | 0,094 | 0,092 | 0,104 | 0,052 |
| PBMC + LPS | | | | | | | |
| 0,059 | 0,049 | 0,095 | 0,098 | 0,092 | 0,094 | 0,101 | 0,053 |
| PBMC + RH | | | | | | | |
| 0,092 | 0,094 | 0,095 | 0,097 | 0,088 | 0,089 | 0,108 | 0,105 |
| PBMC + LPS + RH | | | | | | | |
| 0,098 | 0,094 | 0,098 | 0,097 | 0,095 | 0,097 | 0,108 | 0,097 |
| PBMC + NET | | | | | | | |
| 0,098 | 0,092 | 0,09 | 0,104 | 0,087 | 0,09 | 0,101 | 0,094 |
| PBMC + NET + LPS | | | | | | | |
| 0,102 | 0,11 | 0,104 | 0,105 | 0,088 | 0,099 | 0,109 | 0,102 |
| PBMC + NET + RH | | | | | | | |
| 0,094 | 0,1 | 0,093 | 0,088 | 0,085 | 0,09 | 0,1 | 0,097 |
| PBMC + NET+LPS+RH | | | | | | | |
| 0,1 | 0,102 | 0,107 | 0,104 | 0,102 | 0,103 | 0,092 | 0,096 |
| PBMC + NET 100µg | | | | | | | |
| 0,094 | 0,105 | 0,09 | 0,088 | 0,102 | 0,09 | 0,113 | 0,113 |

| 48 HORAS | | | | | | | |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Animal 1 | Animal 2 | Animal 3 | Animal 4 | Animal 5 | Animal 6 | Animal 7 | Animal 8 |
| PBMC | | | | | | | |
| 0,054 | 0,049 | 0,098 | 0,098 | 0,096 | 0,096 | 0,109 | 0,052 |
| PBMC + LPS | | | | | | | |
| 0,058 | 0,05 | 0,107 | 0,108 | 0,106 | 0,106 | 0,103 | 0,05 |
| PBMC + RH | | | | | | | |
| 0,11 | 0,119 | 0,101 | 0,104 | 0,101 | 0,093 | 0,114 | 0,124 |
| PBMC + LPS + RH | | | | | | | |
| 0,113 | 0,106 | 0,099 | 0,108 | 0,102 | 0,108 | 0,094 | 0,1 |
| PBMC + NET | | | | | | | |
| 0,106 | 0,111 | 0,105 | 0,102 | 0,095 | 0,092 | 0,109 | 0,131 |
| PBMC + NET + LPS | | | | | | | |
| 0,12 | 0,105 | 0,113 | 0,114 | 0,098 | | | |
| PBMC + NET + RH | | | | | | | |
| 0,111 | 0,107 | 0,103 | 0,1 | 0,103 | | | |
| PBMC + NET+LPS+RH | | | | | | | |
| 0,116 | 0,117 | 0,107 | 0,111 | 0,105 | | | |
| PBMC + NET 100µg | | | | | | | |
| 0,125 | 0,119 | 0,099 | 0,101 | 0,105 | | | |

CONCENTRAÇÃO

| 24 HORAS | | | | | | | |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Animal 1 | Animal 2 | Animal 3 | Animal 4 | Animal 5 | Animal 6 | Animal 7 | Animal 8 |
| PBMC | | | | | | | |
| -1,075 | -1,075 | -3,264 | 0,1821 | -3,50972 | -4,00196 | -1,075 | -0,556 |
| PBMC + LPS | | | | | | | |
| 0,6059 | -1,7951 | -3,264 | -2,525 | -4,00196 | -3,50972 | -0,8347 | -4,74 |
| PBMC + RH | | | | | | | |
| -4,002 | -3,51 | -3,264 | -2,771 | -4,98644 | -4,74032 | -0,064 | -0,802 |
| PBMC + LPS + RH | | | | | | | |
| -2,525 | -3,51 | -2,525 | -2,771 | -3,2636 | -2,77136 | -0,064 | -2,771 |
| PBMC + NET | | | | | | | |
| -2,525 | -4,002 | -4,494 | -1,049 | -5,23256 | -4,4942 | -1,787 | -3,51 |
| PBMC + NET + LPS | | | | | | | |
| -1,541 | 0,4282 | -1,049 | -0,802 | -4,98644 | -2,27912 | 0,1821 | -1,541 |
| PBMC + NET + RH | | | | | | | |
| -3,51 | -2,033 | -3,756 | -4,986 | -5,7248 | -4,4942 | -2,033 | -2,771 |
| PBMC + NET+LPS+RH | | | | | | | |
| -2,033 | -1,541 | -0,31 | -1,049 | -1,54076 | -1,29464 | -4,002 | -3,017 |
| PBMC + NET 100µg | | | | | | | |
| -3,51 | -0,802 | -4,494 | -4,986 | -1,54076 | -4,4942 | 1,1666 | 1,1666 |

48 HORAS

| Animal 1 | Animal 2 | Animal 3 | Animal 4 | Animal 5 | Animal 6 | Animal 7 | Animal 8 |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| PBMC | | | | | | | |
| -0,5946 | -1,7951 | -6,974 | -6,974 | -7,4808 | -7,4808 | -1,0748 | -2,67 |
| PBMC + LPS | | | | | | | |
| 0,3658 | -1,555 | -4,6956 | -4,4424 | -4,9488 | -4,9488 | -1,555 | 1,3812 |
| PBMC + RH | | | | | | | |
| -3,936 | -1,6572 | -6,2148 | -5,4552 | -6,2148 | -8,2404 | -2,9232 | -0,3912 |
| PBMC + LPS + RH | | | | | | | |
| -3,1764 | -4,9488 | -6,7212 | -4,4424 | -5,9616 | -4,4424 | -7,9872 | -6,468 |
| PBMC + NET | | | | | | | |
| -4,9488 | -3,6828 | -5,202 | -5,9616 | -7,734 | -8,4936 | -4,1892 | 1,3812 |
| PBMC + NET + LPS | | | | | | | |
| -1,404 | -5,202 | -3,1764 | -2,9232 | -6,9744 | | | |
| PBMC + NET + RH | | | | | | | |
| -3,6828 | -4,6956 | -5,7084 | -6,468 | -5,7084 | | | |
| PBMC + NET+LPS+RH | | | | | | | |
| -2,4168 | -2,1636 | -4,6956 | -3,6828 | -5,202 | | | |
| PBMC + NET 100µg | | | | | | | |
| -0,138 | -1,6572 | -6,7212 | -6,2148 | -5,202 | | | |

Curva controle de óxido nítrico

| 24 horas | | | 48 horas | | |
|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|-------|
| Concentração | Absorbâncias | | Concentração | Absorbâncias | |
| 200 | 0,928 | 0,94 | 200 | 0,834 | 0,93 |
| 100 | 0,54 | 0,411 | 100 | 0,556 | 0,603 |
| 50 | 0,317 | 0,327 | 50 | 0,324 | 0,308 |
| 25 | 0,221 | 0,214 | 25 | 0,218 | 0,229 |
| 12,5 | 0,185 | 0,142 | 12,5 | 0,177 | 0,172 |
| 6,25 | 0,153 | 0,127 | 6,25 | 0,145 | 0,153 |
| 3,125 | 0,124 | 0,115 | 3,125 | 0,143 | 0,117 |
| 1,562 | 0,114 | 0,112 | 1,562 | 0,125 | 0,122 |

*Curvas de controle do nitrito 24 horas e 48 horas foram realizadas em placas distintas.