

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Julia Resende de Oliveira

Inibição sistêmica do proteossomo aumenta a sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados por *Toxoplasma gondii*

Campos dos Goytacazes – RJ
Abril de 2017

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Julia Resende de Oliveira

Orientador: Renato Augusto DaMatta

Inibição sistêmica do proteossomo aumenta a sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados por *Toxoplasma gondii*

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Campos dos Goytacazes – RJ

Abril de 2017

Julia Resende de Oliveira

Inibição sistêmica do proteossomo aumenta a sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados por *Toxoplasma gondii*

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 28 de abril de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Alba Lucinia Peixoto Rangel
Professora Associada - LBR/CBB/UENF

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro
Professor Associado - LBR/CBB/UENF

Prof. Dr. João Luiz Mendes Wanderley
Professor Adjunto - UFRJ/Macaé

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta
Orientador - Professor Associado - LBCT/CBB/UENF

“Você nunca é tão velho que não possa vencer novamente ou que não possa sonhar novamente.”

C.S. Lewis
IV

Agradecimentos

- Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me confortar nos momentos difíceis e me dar força para continuar esta longa caminhada.
- Aos meus pais, Norma e Juarez, pelo amor incondicional, estímulo e sacrifícios. E minha irmã Giovanna, pela compreensão e apoio. Vocês, minha família, são meu maior orgulho.
- Ao professor Renato DaMatta, pela paciência na orientação, confiança e incentivo. Minha formação, profissional e pessoal, não teria sido a mesma sem sua pessoa.
- Aos amigos e companheiros de universidade, Mariana Vidaurre, Viviane Campos, Marianne Caiado, Matheus de Freitas, Beatriz Muniz e Luísa Viana, pela alegria e apoio, constantes na correria de cada semestre.
- A Davi Schilling, pelo amor, paciência e por sua capacidade de me trazer paz.
- Aos amigos, Amanda Ribeiro, Brunele Meirelles, Fernanda Dinucci, Gabriel Santos e Cauê Issa, pelos risos, conselhos e por estarem sempre ao meu lado apesar da distância.
- A colaboração do Hospital Santa Maria, Jéssica Motta e Dr. Frederico Barbosa, sem os quais o desenvolvimento deste projeto não teria sido possível.
- Aos companheiros de laboratório, Fernanda de Souza, Natália Almeida, Thiago Torres, Joaquim Xavier, Thiago Alves e Tâmara Ribeiro, pela amizade e ajuda ao longo dos anos de convivência. Em especial a Juliana Azevedo e Gabriel Rabello, pelo carinho e ensinamentos essenciais para meu crescimento acadêmico.
- Aos técnicos e funcionários do LBCT, Rosemary Maciel, Adriana Martins, Darly Keller, Fábio Conceição, Paulo Sérgio e Maurício de Oliveira, pelo treinamento, dedicação e ajuda.
- As instituições de fomento, CNPq, FAPERJ, UENF e CAPES, que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Sumário

Lista de abreviaturas	VIII
Lista de figuras e tabelas	IX
Resumo	XII
Abstract	XIII
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	2
2.1.1. O parasito.....	2
2.1.2. Ciclo biológico	4
2.1.3. Toxoplasmose.....	7
2.2. Sistema proteossomo-ubiquitina.	8
2.2.1. Estrutura e função do proteossomo 26S.....	8
2.2.2. Inibidores de proteossomo.	11
2.2.3. Proteossomo e protozoários.	13
2.3. Resposta imunológica de camundongos frente à infecção por <i>Toxoplasma gondii</i>	15
2.4. Óxido nítrico sintase induzida e óxido nítrico	17
3. Justificativa.....	19
4. Objetivos	20
4.1. Objetivo geral	20
4.2. Objetivos específicos	20
5. Material e métodos.....	20
5.1. Desenho experimental	20
5.2. Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais.....	20
5.3. Manutenção da cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
5.4. Interação de <i>Toxoplasma gondii</i> com macrófagos para avaliação dos inibidores de proteossomo	21
5.5. Infecção experimental dos camundongos	22
5.6. Tratamento com inibidor da via do proteossomo	22
5.7. Análise da sobrevivência.....	22

5.8. Determinação do número de leucócitos e taquizoítos do lavado peritoneal de camundongos.....	22
5.9. Produção de NO de macrófagos de camundongos infectados e tratados	22
5.10. Estatística.....	23
6. Resultados	23
6.1. Sobrevivência de camundongos infectados e tratados com inibidores de proteossomo	23
6.2. Participação do proteossomo na produção de nitrito em macrófagos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i>	26
6.3. Efeito do Bortezomibe no número de taquizoitos e leucócitos durante a infecção experimental de camundongos Swiss e C57BL/6.....	27
6.4. Avaliação da produção de nitrito após tratamento com Bortezomibe.....	32
7. Discussão.....	33
8. Conclusão	36
9. Referências bibliográficas	37

Lista de abreviaturas

DMEM: Meio de *Eagle* modificado por Dulbecco

PBS: Solução salina tamponada por fosfato

SFB: Soro fetal bovino

NOS: Óxido nítrico sintase

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

TGF- β : Fator de crescimento transformante beta

LPS: Lipopolissacarídeo

IFN- γ : Interferon gamma

NF- $\kappa\beta$: Fator nuclear kappa beta

RH: Cepa de *Toxoplasma gondii*, tipo I, de característica de alta patogenicidade

IL-12: Interleucina-12

Lista de figuras e tabelas

Esquema 1: Morfologia geral de taquizoíto (A) e bradizoíto (B) de <i>Toxoplasma gondii</i> . Filo Apicomplexa caracterizado pela presença do complexo apical, estrutura localizada na região anterior do corpo do parasito composta por anéis apicais e polares, e conoide, essenciais na invasão da célula hospedeira. Outras organelas típicas de células eucarióticas estão presentes assim como organelas típicas do filo, como apicoplasto. Traduzido de Dubey <i>et al.</i> , (1998).	Pag. 3
Esquema 2: Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> . Rotas de transmissão entre os hospedeiros definitivos e intermediários e as três formas infectivas. Oocistos produzidos no intestino delgado de felídeos se tornam maduros e infecciosos após serem excretados junto com as fezes e atingirem o meio ambiente. A infecção em humanos ocorre principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminados com cistos teciduais ou oocistos. A transmissão fetal, outra importante forma de infecção, ocorre devido a capacidade de taquizoítos atravessarem a placenta e infectarem órgãos fetais (Moura <i>et al.</i> , 2009).	Pag. 6
Esquema 3: Estrutura dos complexos 20S e 19S. A região central 20S possui estrutura em forma de barril com suas extremidades cobertas pelas partículas regulatórias 19S. O complexo 19S reconhece a proteína marcada com caudas de poliubiquitina e a desdobra, permitindo sua entrada no poro proteolítico seguida da proteólise pelo complexo 20S. Traduzido de Wang e Maldonado (2006).	Pag. 10
Esquema 4. Estrutura do proteossomo 26S. Bortezomibe se liga especificamente e de maneira reversível ao sítio semelhante à quimiotropsina do complexo 20S proteossomo. Modificado de Velcade, 2003.	Pag. 12

Esquema 5: Expressão da enzima NOS. O surgimento de infecções induz a expressão da óxido nítrico (NO) sintase (NOS) via citocinas pró-inflamatórias e produtos de micro-organismos, como lipopolissacarídeo (LPS), que desencadeiam a tradução e expressão dessa enzima. Este processo resulta no aumento da produção de NO na célula gerando efeitos sobre o endotélio vascular e apresentando função microbicida. Uma vez a NOS expressa, ocorrerá a conversão de L-Arginina em L-Citrulina com consequente produção de NO. Modificado de Weiss <i>et al.</i>, (2012).	Pag. 18
Figura 1: Sobrevivência de camundongos C57BL/6 (A) e Swiss (B) infectados intraperitonealmente com <i>T. gondii</i> e tratados ou não com Bortezomibe.	Pag. 24
Figura 2: Sobrevivência de camundongos C57BL/6 (A) e Swiss (B) infectados intraperitonealmente com <i>T. gondii</i> e tratados ou não com MG132.	Pag. 25
Figura 3: Produção de óxido nítrico (μM) de macrófagos peritoneais ativados com IFN-γ e LPS por 24 h. As células foram incubadas com Bortezomibe ou MG132 por 1 h, infectadas, cultivadas por 6 h e óxido nítrico avaliado. *Significativamente diferente pelo teste ANOVA em relação ao controle ($P < 0.05$).	Pag. 26
Figura 4: Número de taquizoítos de <i>T. gondii</i> em camundongos C57BL/6 (A) e Swiss (B) infectados experimentalmente com taquizoítos (cepa RH) e tratados ou não com Bortezomibe. *Significativamente diferente ($P < 0.05$).	Pag. 28
Figura 5: Microscopia óptica de contraste de fase do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. gondii</i> e tratados (A) ou não com Bortezomibe (B). Taquizoitos (setas) foram vistos em menor número no grupo controle em relação ao grupo tratado.	Pag. 29

Figura 6: Número de leucócitos do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 (A) e Swiss (B) infectados com <i>T. gondii</i> e tratados ou não com Bortezomibe. Maior quantidade de leucócitos foi observada no grupo controle no 4° dia pós-infecção. *Significativamente diferente ($P < 0.05$).	Pag. 31
Figura 7: Produção de óxido nítrico (μM) de macrófagos obtidos de camundongos Swiss ou C57BL/6, infectados com <i>T. gondii</i> e tratados ou não com Bortezomibe no 4° dia de infecção. Os macrófagos foram cultivados por 24h na presença de ativadores e óxido nítrico do sobrenadante dosado.	Pag. 32

Resumo

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório, causador da toxoplasmose, capaz de se multiplicar em praticamente todas as células nucleadas de seus hospedeiros. Durante a infecção, *T. gondii* utiliza diversos mecanismos de evasão, como a inibição da produção de óxido nítrico (NO) que atua como potente agente microbicida. Macrófagos ativados com interferon-gamma e lipopolissacarídeo produzem NO via a enzima NO sintase induzida (iNOS), porém, a infecção por *T. gondii* é capaz de inibir a produção de NO pela degradação da iNOS através da via do proteossomo. Foi demonstrado que a inibição farmacológica dessa via impede a degradação da iNOS durante a infecção *in vitro*. A hipótese desse trabalho foi que a inibição sistêmica do proteossomo torna os camundongos mais resistentes a infecção. Objetivou-se verificar a relevância da via do proteossomo na infecção *in vivo* por *T. gondii*. Para tal, camundongos foram infectados via intraperitoneal com taquizoítos de *T. gondii* e tratados com os inibidores de proteossomo Bortezomibe e MG132. Foi avaliado a sobrevivência dos camundongos, quantidade de taquizoítos e leucócitos na cavidade peritoneal, e produção de NO de macrófagos peritoneais dos animais infectados após diferentes dias de tratamento. O tratamento *in vitro* de macrófagos com Bortezomibe foi capaz de reverter a baixa produção de NO causada pela infecção. Camundongos C57BL/6 infectados tratados com Bortezomibe apresentaram aumento de sobrevida, drástica redução na quantidade de taquizoítos e os macrófagos obtidos do lavado peritoneal apresentaram tendência de maior produção de NO. No entanto, o mesmo tratamento não teve efeito em camundongos Swiss e foi possível verificar menor fluxo de leucócitos nesses animais ao longo da infecção. Apesar dos distintos comportamentos entre as linhagens de camundongos, esses resultados indicam que a degradação da iNOS pelo proteossomo pode ser relevante na infecção por *T. gondii*, sugerindo a utilização de inibidores da via do proteossomo como possível tratamento contra a toxoplasmose experimental.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, proteossomo, óxido nítrico sintase induzida, óxido nítrico.

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite, that causes toxoplasmosis, capable of multiplying in practically all nucleated cells of its hosts. During infection, *T. gondii* uses many evasion mechanisms, such as the inhibition of nitric oxide (NO) production, which acts as a potent microbicidal agent. Macrophages activated with interferon-gamma and lipopolysaccharide produce NO via the inducible NO synthase enzyme (iNOS), however, *T. gondii* infection inhibits NO production by iNOS degradation through the proteasome pathway. Previous studies have shown that pharmacological inhibition of the proteasome prevents degradation of iNOS during infection *in vitro*. The hypothesis of this study was that the systemic inhibition of the proteasome turns mice more resistant to infection. The aim of this study was to verify the relevance of the proteasome pathway in *T. gondii* infection *in vivo*. For this, mice were infected with tachyzoites of *T. gondii* and treated with proteasome inhibitors Bortezomibe and MG132. We evaluated the survival of mice, number of tachyzoites and leukocytes in the peritoneal cavity, and NO production of peritoneal macrophages from infected animals after different days of treatment. The *in vitro* treatment of macrophages with Bortezomib was able to reverse the lower NO production caused by the infection. C57BL/6 infected mice treated with Bortezomib showed increased survival, drastic reduction in the amount of tachyzoites and macrophages obtained from peritoneal lavage showed a tendency of higher NO production. However, the same treatment had no effect in Swiss mice and it was possible to verify a lower leukocyte flow in these animals throughout the infection. Despite the different behaviors between the lineages of mice, these results indicate that iNOS degradation by the proteasome may be relevant in *T. gondii* infection, suggesting the use of proteasome inhibitors as a possible treatment against experimental toxoplasmosis.

Key words: *Toxoplasma gondii*, proteasome, inducible nitric oxide synthase, nitric oxide.

1. Introdução

Toxoplasmose é uma zoonose de grande importância médica e veterinária que acomete cerca de um terço da população mundial e tem como agente etiológico o parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (Tenter *et al.*, 2000). Esse protozoário, membro do filo Apicomplexa, infecta as células hospedeiras de forma ativa e é capaz de parasitar diversos tecidos (Pfaff *et al.*, 2005). *T. gondii* apresenta ciclo de vida complexo, sendo os membros da família Felidae seus hospedeiros definitivos e os demais animais endotérmicos os hospedeiros intermediários (Webster *et al.*, 2013).

Após invadir as células do hospedeiro, *T. gondii* reside no vacúolo parasitóforo cuja membrana é formada principalmente por proteínas e lipídios da célula hospedeira, mas também por elementos do parasito adquiridos durante o processo de invasão (Suss-Toby *et al.*, 1996). O vacúolo parasitóforo permite ao parasito sequestrar nutrientes da célula hospedeira e previne sua degradação pelos lisossomos (Jones e Hirsch, 1972). Este foi o primeiro mecanismo de evasão do sistema microbicida descrito para *T. gondii*.

A exposição de fosfatidilserina por *T. gondii* também foi demonstrada como mecanismo de evasão deste parasito (Seabra *et al.*, 2004). Células apoptóticas expõem fosfatidilserina na superfície celular, um fosfolípideo de membrana que quando reconhecido por macrófagos induz a produção do fator de crescimento transformante beta (TGF- β), desativando essas células (Ashcroft, 1999). Portanto, *T. gondii* mimetiza uma célula apoptótica expondo fosfatidilserina em sua membrana e invade macrófagos de maneira ativa, induzindo a degradação da óxido nítrico (NO) sintase induzida (iNOS) e consequente inibição da produção de NO, burlando esse sistema microbicida (Seabra *et al.*, 2002; 2004; Guillermo e DaMatta, 2004; Santos *et al.*, 2011; Padrão *et al.*, 2014). A iNOS não é constitutivamente expressa, mas pode ser induzida em diferentes tipos celulares por diferentes citocinas (Hevel *et al.*, 1991). Quando induzida em macrófagos, a enzima produz NO, molécula gasosa que atua inibindo diversas vias bioquímicas, sendo essa a base da sua ação citotóxica contra micro-organismos parasitos como *T. gondii* (Adams *et al.*, 1990) e células cancerígenas (Nathan e Hibbs, 1991).

Proteínas são reguladas de diversas maneiras nas células, incluindo a via do proteossomo (Davies, 2001). Experimentos *in vitro* com macrófagos ativados infectados com *T. gondii* e tratados com inibidores de proteossomo indicam que esta via é responsável pela degradação da iNOS (Padrão *et al.*, 2014). Portanto, é possível que a inibição farmacológica do proteossomo de camundongos torne os animais mais resistentes a infecção pelo parasito, pois as células infectadas continuarão expressando iNOS, produzindo NO e controlando o crescimento de *T. gondii*. Isso pode resultar em possível controle efetivo do parasito e, consequentemente, no aumento da sobrevivência de camundongos. Nesse trabalho, investigamos se inibidores de proteossomo alteram o curso da infecção de *T. gondii* em camundongos de duas linhagens.

2. Revisão bibliográfica

2.1. *Toxoplasma gondii*

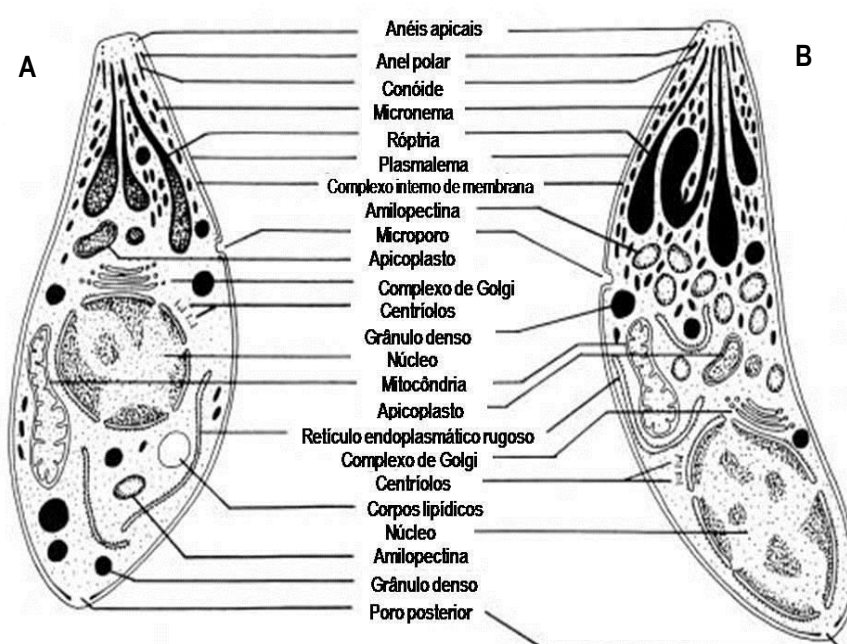
2.1.1. O parasito

T. gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um parasito coccídeo intracelular obrigatório capaz de se multiplicar em células nucleadas de seus hospedeiros, infectando-as de forma ativa (Souza *et al.*, 2009). Essa zoonose possui ampla distribuição no mundo, infectando de maneira crônica cerca de um terço da população mundial (Montoya e Liesenfeld, 2004). Este protozoário tem como hospedeiro definitivo membros da família Felidae e como hospedeiros intermediários a maioria dos animais homeotérmicos, incluindo o homem (Webster *et al.*, 2013).

Ao longo de todo o ciclo de vida, *T. gondii* assume três formas infecciosas: taquizoítos (rápida multiplicação) infectando células na fase aguda da doença, bradizoítos (lenta multiplicação) encontrados no interior de cistos teciduais durante a fase crônica e esporozoítos em oocistos (Schlüter, 2014). Estruturalmente, poucas diferenças podem ser observadas entre essas formas.

De modo geral essas formas são células polarizadas e alongadas, apresentando a região anterior ou apical afinada e a posterior arredondada. A região apical é caracterizada pela presença do complexo apical, estrutura formada por organelas secretoras especializadas (róptrias e micronemas) envolvidas no processo de invasão e adesão do parasito, e elementos do citoesqueleto que medeiam a

interação com componentes da superfície da célula hospedeira (anéis polares e conóide) (Melo *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2010). Na região mediana da forma taquizoíto encontra-se o núcleo e, acima deste, localizam-se o apicoplasto e complexo de Golgi. Já o bradizoíto apresenta o núcleo na região posterior (Figura 1). O parasito é envolto pela película, estrutura membranosa trilaminar que, em associação com os elementos do citoesqueleto, confere integridade estrutural ao *T. gondii* e permite que este se locomova e infecte as células ativamente (Ajioka e Soldati, 2007).



Esquema 1: Morfologia geral de taquizoíto (A) e bradizoíto (B) de *Toxoplasma gondii*. Filo Apicomplexa caracterizado pela presença do complexo apical, estrutura localizada na região anterior do corpo do parasito composta por anéis apicais e polares, e conóide, essenciais na invasão da célula hospedeira. Outras organelas típicas de células eucarióticas estão presentes assim como organelas típicas do filo, como apicoplasto. Traduzido de Dubey *et al.*, (1998).

Assim como bradizoítos, esporozoítos também apresentam o núcleo na região posterior do corpo do parasito. Ambas as formas possuem numerosos micronemas quando comparados a taquizoítos. Róptrias estão presentes em números semelhantes entre as formas, porém são mais alongadas e menos elétron-densas

em taquizoítos e esporozoítos. Outra diferença é a presença de grânulos de amilopectina em grande quantidade em bradizoítos (Figura 1) e esporozoítos. Acredita-se que esses grânulos sirvam de reserva energética para estas formas, que persistem viáveis por longos períodos (Dubey *et al.*, 1998).

Acredita-se que o sucesso da infecção desse parasito é devido principalmente à facilidade de transmissão para os hospedeiros intermediários (Blader e Saeij, 2009). Mesmo sendo capazes de infectar qualquer célula nucleada, taquizoítos apresentam tropismo por células dendríticas, monócitos e macrófagos, importantes alvos nas primeiras etapas da infecção. Cistos teciduais, onde a forma bradizoíto sobrevive e se replica, são formados preferencialmente em células do tecido muscular esquelético e do sistema nervoso central (Innes, 2010; Souza e Belfort, 2014). O processo de invasão da célula hospedeira tem início quando as formas infectivas sofrem reorientação e a região do complexo apical entra em contato com a membrana plasmática da célula (Kim e Weiss, 2004; Souza *et al.*, 2010). O próximo passo é a secreção das proteínas dos micronemas e róptrias, que participam da adesão do parasito à superfície celular e da formação do vacúolo parasitóforo. Essa estrutura, formada por lipídios da membrana da célula hospedeira e do próprio parasito, propicia um ambiente favorável à sobrevivência e multiplicação de *T. gondii* no citoplasma (Dubremetz, 1998).

2.1.2. Ciclo biológico

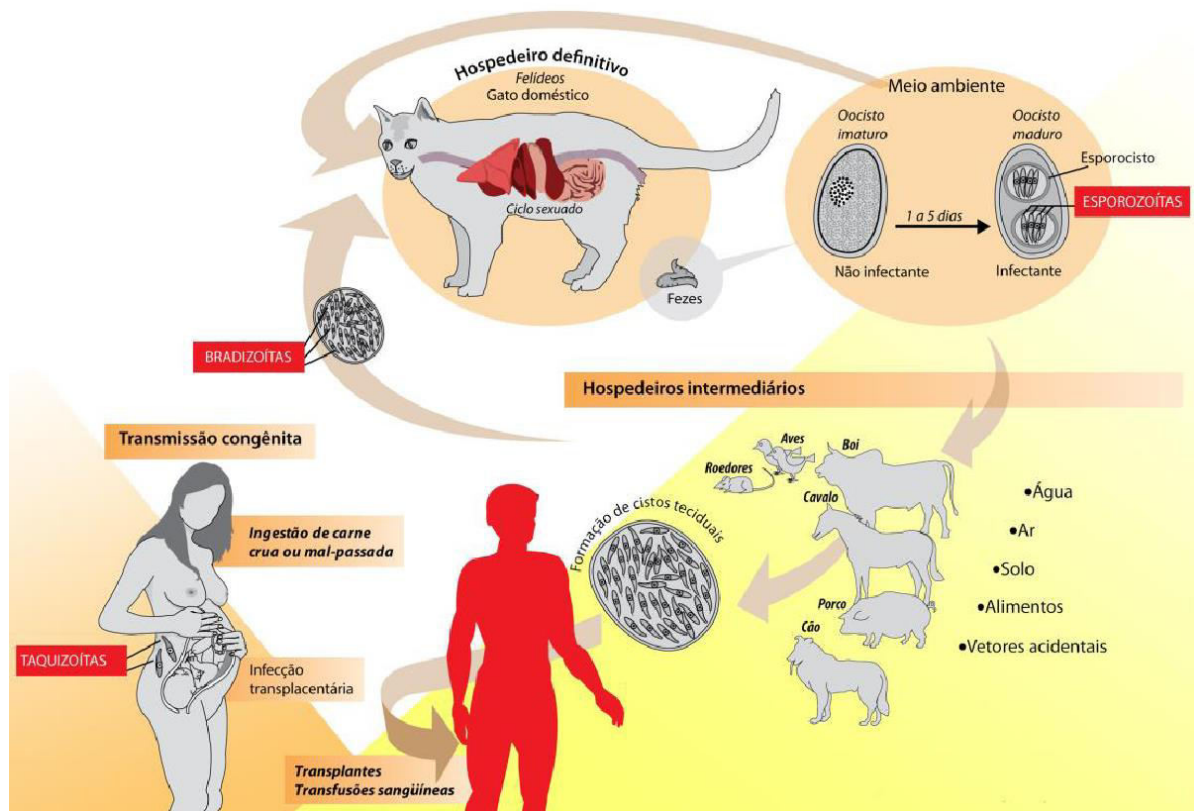
O ciclo de vida de *T. gondii* é caracterizado por ser heteroxênico facultativo; apresenta uma fase sexuada, que ocorre exclusivamente no intestino dos felídeos, e uma assexuada, que ocorre nas células dos hospedeiros intermediários e definitivo (Dubey, 2004). Gatos e outros felídeos adquirem o parasito após ingerir um dos três estágios infecciosos (Figura 2). Após a ingestão de oocistos ou cistos teciduais, a parede cística ou oocística é digerida por enzimas proteolíticas do estômago e intestino delgado. Bradizoítos ou esporozoítos liberados, respectivamente, penetram as células epiteliais intestinais e iniciam o ciclo de replicação assexuado seguido do ciclo sexuada de *T. gondii* (Hill *et al.*, 2005).

O ciclo sexuada ocorre em estágios enteroepiteliais, também conhecidos como esquizontes, que inicialmente se multiplicam sucessivas vezes formando merozoitos

até originarem gametas masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas). Gametas masculinos são flagelados e vão ao encontro de gametas femininos, ocorrendo a fertilização. A parede do oocisto é formada ao redor do zigoto que rompe os enterócitos e é liberado juntamente com as fezes dos felídeos na forma não esporulada (Speer e Dubey, 2005). Após 2-4 dias no ambiente, ocorre a esporulação gerando em cada oocisto dois esporocistos que contêm quatro esporozoítos. Os oocistos excretados permanecem viáveis por longos períodos no meio ambiente (Schlüter, 2014).

Enquanto alguns bradizoítos ou esporozoítos invadem as células do epitélio intestinal dos felídeos e produzem oocistos sexuadamente, outros atravessam essas células, se convertem em taquizoítos e se multiplicam nas células da lâmina própria. Em poucas horas de infecção, taquizoítos se dispersam para tecidos extra-intestinais através da linfa e sangue, invadindo e se replicando em diferentes células do hospedeiro até que estas lise (Freyre *et al.*, 1989). Ocorrem repetidos ciclos de invasão, multiplicação e lise da célula hospedeira (ciclo lítico), geralmente resultando em inflamação devido a necrose tecidual, até que o parasito entre em latência. Este estado é caracterizado pela conversão de taquizoítos em bradizoítos, que passam a se multiplicar de maneira lenta formando cistos teciduais (Weiss e Kim, 2007; Dubey, 1996).

O ciclo extra-intestinal do parasito nos hospedeiros intermediários é semelhante ao ciclo em felídeos, com exceção dos estágios sexuais. A infecção por *T. gondii* nesses hospedeiros é adquirida majoritariamente pela ingestão de alimentos contaminados com cistos ou oocistos (Figura 2) (Miller *et al.*, 1972).



Esquema 2: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Rotas de transmissão entre os hospedeiros definitivos e intermediários e as três formas infectivas. Oocistos produzidos no intestino delgado de felídeos se tornam maduros e infecciosos após serem excretados junto com as fezes e atingirem o meio ambiente. A infecção em humanos ocorre principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminados com cistos teciduais ou oocistos. A transmissão fetal, outra importante forma de infecção, ocorre devido a capacidade de taquizoítos atravessarem a placenta e infectarem órgãos fetais (Moura *et al.*, 2009).

Após serem ingeridos pelo hospedeiro intermediário, bradizoítos ou esporozoítos invadem as células, se transformam em taquizoítos, se multiplicam nas células hospedeiras levando ao ciclo lítico, se disseminam pela circulação e se desenvolvem em outros tecidos (Black e Boothroyd, 2000; Blader e Saeij, 2009). Estes taquizoítos irão invadir as células do hospedeiro por penetração ativa e se multiplicar assexuadamente por repetidas endodiogenias, forma especializada de reprodução na qual duas células filhas são formadas dentro da célula mãe (Dubey *et al.*, 1998). A resposta imune do hospedeiro afeta diretamente a fase de multiplicação rápida do

parasito, que passa a se multiplicar de forma lenta após conversão em bradizoíto (Coura, 2005).

A transmissão vertical também é uma relevante via de contaminação; o parasito infecta a placenta e, posteriormente, o feto (Dunn *et al.*, 1999). A infecção fetal é mais comum durante a fase aguda da parasitemia. No entanto, mesmo após esta fase podem persistir focos do parasito na placenta, que se multiplica e ganha acesso à circulação fetal na fase tardia da infecção materna levando a sérias complicações (Remington *et al.*, 2006).

Em casos de experimentação animal, camundongos infectados via oral comumente desenvolvem inflamação intestinal com morfopatologia semelhante as doenças inflamatórias intestinais humanas (IBD) (Egan *et al.*, 2012; Liesenfeld, 2002). Ao invadir os enterócitos, *T. gondii* induz resposta inflamatória do tipo Th1 ativada pela produção de quimiocinas e citocinas envolvidas na migração e ativação celular. Monócitos inflamatórios são rapidamente recrutados para o sítio de inflamação, produzindo interleucina-12, secretando fator de necrose tumoral alfa e regulando positivamente a expressão da iNOS em resposta a infecção. Em conjunto, estas respostas contribuem para o controle da replicação parasitária no íleo e sobrevivência do animal (Dunay *et al.*, 2008; 2010). No entanto, dependendo da cepa do parasito, carga parasitária e linhagem de camundongo, a infecção pode resultar em necrose celular com destruição da arquitetura dos vilos do íleo e consequente morte devido ao vazamento da microbiota intestinal para o peritônio (Liesenfeld, 2002).

2.1.3. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial causada por *T. gondii*. A infecção é adquirida principalmente pela ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos, liberados pelo hospedeiro intermediário, ou pelo consumo de cistos teciduais presentes em carne crua ou pouco cozidas (Robert-Gangneux e Dardé, 2012) (Figura 2). A transmissão também pode ocorrer pela via transplacentária durante a primoinfecção aguda materna, sendo esta responsável por problemas físicos e psico-motores característicos da toxoplasmose congênita (Hotop *et al.*, 2012). Acidentes laboratoriais, transplante de órgãos, transfusão

sanguínea e ingestão de leite cru constituem vias mais raras de infecção (Hill e Dubey, 2002; Remington *et al.*, 2011).

Fatores como a virulência da cepa, rota de infecção e competência da resposta imune do hospedeiro afetam diretamente a severidade da patologia (Rorman *et al.*, 2006). A infecção adquirida é benigna e auto-limitada em cerca de 80% dos pacientes imunocompetentes, sendo os sintomas mais recorrentes a cefaleia, dor de garganta, febre e mialgia. O sistema imune do hospedeiro restringe a replicação de *T. gondii*, mas é incapaz de eliminá-lo completamente do organismo (Halonen e Weiss, 2013). A toxoplasmose tende a ser mais grave em imunodeprimidos, podendo resultar na reativação de cistos devido à perda da capacidade de contenção da fase latente. Se não tratada de maneira adequada, o curso da doença pode ser fatal nesses pacientes (Cohen *et al.*, 2010).

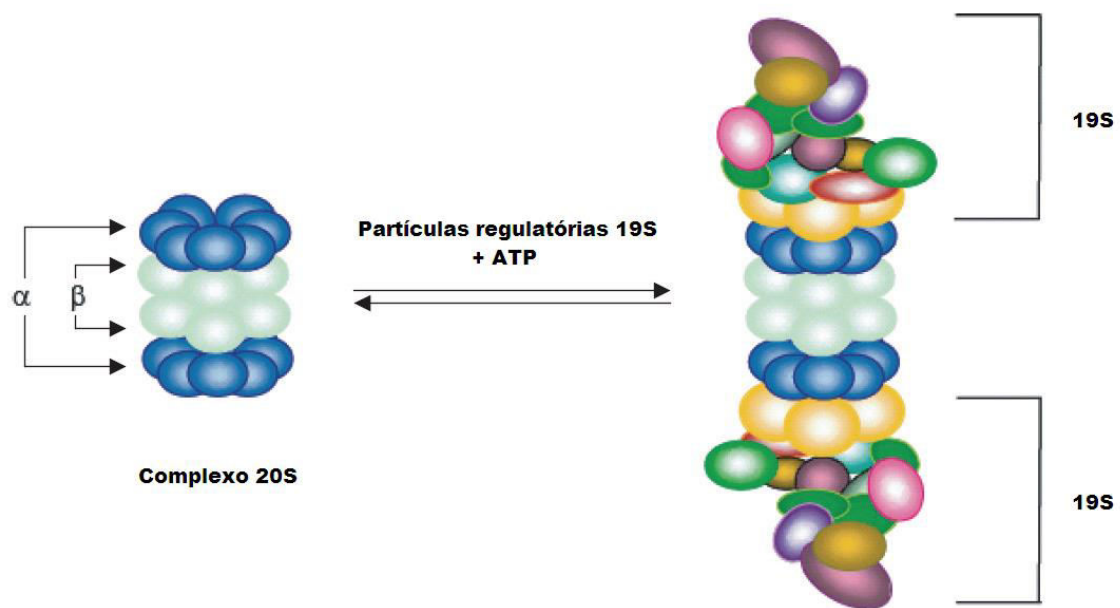
Atualmente, não existem vacinas eficazes para combater a infecção ou medicamentos que eliminem completamente a carga parasitária. O tratamento disponibilizado consiste na utilização de sulfadiazina e pirimetamina administrados conjuntamente e acompanhados da ingestão de ácido folínico (Haverkos, 1987; Remington *et al.*, 2011). Embora produza resultados satisfatórios, o tratamento apresenta alta toxicidade para o hospedeiro e age apenas durante a fase aguda da infecção, sendo ineficaz no combate à fase crônica (Mancini *et al.*, 2012; Souza e Belfort, 2014). Portanto, novos tratamentos farmacológicos ou terapias são requeridos.

2.2. Sistema proteossomo-ubiquitina

2.2.1. Estrutura e função do proteossomo 26S

O proteossomo é um complexo multienzimático dependente de ATP responsável pela degradação seletiva de proteínas no citosol e núcleo (Davies, 2001). Esse complexo protéico é essencial na manutenção da homeostase celular e está associado a funções como controle da transcrição, apresentação de antígenos, ciclo celular e modulação de receptores (Glickman e Ciechanover, 2002). Anomalias nesta estrutura podem levar ao desenvolvimento de doenças metabólicas, oncogênicas e neurodegenerativas (Balch *et al.*, 2008).

Estruturalmente, o proteossomo é composto por um elemento central 20S e duas partículas regulatórias ligadas às suas extremidades, denominadas 19S (Figura 3) (Kisselev e Goldberg, 2001). A porção 20S carrega a atividade catalítica da protease e possui uma estrutura em forma de barril composta por 14 subunidades do tipo α e 14 do tipo β dispostas em quatro anéis heptaméricos superpostos. Os dois anéis do tipo α na região externa do barril formam canais fechados através dos quais os substratos entram e os produtos saem do núcleo catalítico, além de fornecer sítios de ligação para partículas regulatórias como a porção 19S. O núcleo catalítico é formado pelos dois anéis internos do tipo β e é responsável pela atividade proteolítica (Berkers *et al.*, 2005; Tanaka, 2009). O proteossomo possui três atividades catalíticas distintas: semelhante à caspase, tripsina e quimiotripsina, e cada uma dessas atividades é correlacionada a ação de uma subunidade do tipo β individual ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$, respectivamente) (Berkers *et al.*, 2005). O reconhecimento de proteínas ubiquitinadas, desdobramento das mesmas e a posterior abertura do canal no complexo 20S, permitindo a entrada da proteína de-ubiquitinada, são processos controlados pelo complexo 19S. Esses elementos se associam para a formação de um complexo maior, denominado proteossomo 26S (Wang e Maldonado, 2006).



Esquema 3: Estrutura dos complexos 20S e 19S. A região central 20S possui estrutura em forma de barril com suas extremidades cobertas pelas partículas regulatórias 19S. O complexo 19S reconhece a proteína marcada com caudas de poliubiquitina e a desdobra, permitindo sua entrada no poro proteolítico seguida da proteólise pelo complexo 20S. Traduzido de Wang e Maldonado (2006).

O proteossomo degrada preferencialmente proteínas previamente marcadas com cadeias de poliubiquitina (Coux *et al.*, 1996). A marcação da proteína pelo processo de ubiquitinação envolve a ação das enzimas ativadoras de ubiquitina, conjugadoras e ligadoras, E1, E2, e E3, respectivamente. O substrato ligado à cadeia de poliubiquitina é reconhecido por uma das subunidades 19S, o reconhecimento é seguido da hidrólise de ATP e desnaturação da proteína, induzindo seu deslocamento através do poro. O substrato transita pelo complexo 20S onde sofre hidrólises e produz pequenos peptídeos, que são também liberados pela subunidade 19S (Pickart e Cohen, 2004).

A ubiquitina é uma proteína com 76 resíduos de aminoácidos, altamente conservada em eucariotos (Nandi *et al.*, 1996). A ligação seletiva da ubiquitina a proteínas permite seu reconhecimento e degradação pelo proteossomo (Varshavsky, 2012). A ativação da ubiquitina é feita pela enzima E1 em um processo dependente de ATP. A ubiquitina ativada é então transferida para E2 que posteriormente se liga

a enzima E3, que se encontra ligada à proteína alvo a ser marcada para degradação. Desta forma, E2 transfere a ubiquitina para a proteína alvo via a E3. A conjugação sucessiva de ubiquitina durante este ciclo resulta na construção de uma cauda de poliubiquitina na proteína alvo e consequente reconhecimento e degradação da proteína pelo proteossomo (Ciechanover e Schwartz., 1998).

2.2.2. Inibidores de proteossomo

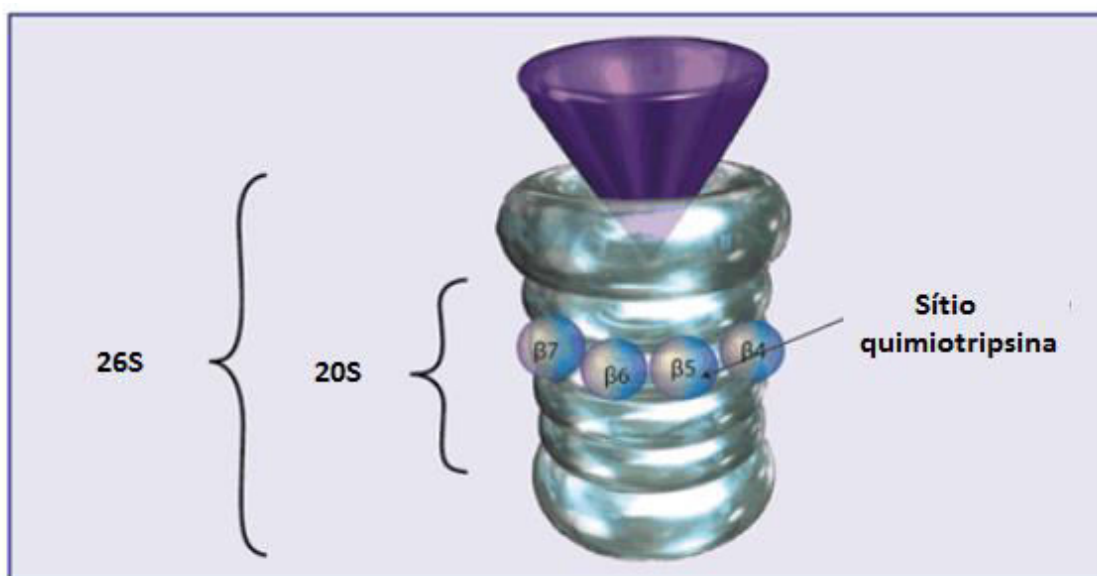
A identificação de inibidores de baixo peso molecular que podem entrar rapidamente nas células e inibir seletivamente a via do proteossomo permitiu grandes avanços no conhecimento das funções fisiológicas desta via de degradação. Sendo o principal responsável por controlar a qualidade das proteínas sintetizadas em todas as células eucarióticas, a inibição do proteossomo pode influenciar várias funções celulares. Nesse sentido, o uso de inibidores mostrou promover efeitos anti-inflamatórios, anticarcinogênicos (Chen *et al.*, 2005), antiproliferativos e apoptóticos em células com desenvolvimento anormal (King *et al.*, 1996; Hershko e Ciechanover, 1998).

Os primeiros tipos de inibidores sintéticos de proteossomo descobertos foram os peptídeos aldeídicos, como o MG115, ALLN e PSI, análogos de substratos e inibidores da atividade semelhante à quimiotripsina. O inibidor de proteossomo MG132, também classificado como peptídeo aldeídico, é capaz de inibir diferentes tipos de proteases, incluindo serina-proteases e calpaína. Esses inibidores são frequentemente utilizados em testes *in vitro* e *in vivo* e demonstram especificidade moderada ao proteossomo (Rock *et al.*, 1994; Lee e Goldberg, 1998).

Dentre os compostos de origem natural, um dos mais utilizados é a Lactacistina, estruturalmente diferente dos peptídeos aldeídicos. Este inibidor irreversível se liga covalentemente ao sítio ativo das subunidades β reduzindo a degradação de proteínas celulares e suprimindo a produção de peptídeos antigênicos de modo similar aos peptídeos aldeídicos, porém com maior grau de especificidade. (Craiu *et al.*, 1997; Tanaka, 2009). Ainda de origem natural, foram descritos derivados de epoxicetonas, com destaque à epoximicina que possui alta especificidade, não mostrando efeito de inibição frente a outras proteases (Tanaka, 2009).

Outra classe de inibidores sintéticos são os peptídeos boronatos, que se

mostraram os mais potentes inibidores da via do proteossomo devido sua alta especificidade e lenta dissociação (Adams *et al.*, 1998). O ácido borônico peptídico Bortezomibe, também conhecido como Velcade, liga-se preferencialmente ao sítio $\beta 5$ e, em menor extensão, ao $\beta 1$ do complexo 20S (Esquema 4). As diferenças de afinidade do inibidor pelos diferentes sítios ativos são devido as diferentes interações das cadeias laterais do inibidor com os resíduos específicos de cada cavidade do proteossomo (Berkers *et al.*, 2005).



Esquema 4. Estrutura do proteossomo 26S. Bortezomibe se liga especificamente e de maneira reversível ao sítio semelhante à quimiotripsina do complexo 20S proteossomo. Modificado de Velcade (2003).

Bortezomibe foi o primeiro inibidor proteossômico avaliado em humanos e aprovado pela FDA (United States Food and Drug Administration) em maio de 2003 para tratamento de pacientes com mieloma múltiplo, e está sendo utilizado clinicamente em mais de 85 países (Voorhees *et al.*, 2003; Cavo *et al.*, 2006). Este fármaco inibe a atividade semelhante à quimiotripsina do proteossomo, o que leva à degradação ineficiente de proteínas poliubiquitinadas, induzindo a apoptose celular (Elliott e Ross, 2001; Schwartz e Davidson, 2004).

Situações patológicas em que ocorrem ativações contínuas do fator nuclear kappa beta (NF- κ B), como durante estímulos epigenéticos de carcinógenos, podem

levar ao bloqueio de genes que regulam a apoptose celular, causando o prolongamento da vida de células afetadas e estimulando sua divisão. A inibição do proteossomo pelo Bortezomibe bloqueia a ativação de NF- κ B, desencadeando uma diminuição da proliferação celular e da produção de citocinas angiogênicas, induzindo a apoptose e inibindo a adesão da célula tumoral (Adams, 2004; Almeida e Barry, 2010).

Estudos recentes têm demonstrado o potencial de Bortezomibe como agente anti-inflamatório e contra micro-organismos patogênicos (Iyer e Rojas., 2008). Reynolds *et al.* (2007) mostraram que o composto é capaz de inibir o desenvolvimento intraeritrocitário de *P. falciparum*, bem como a síntese de DNA do parasito. A atividade do inibidor também foi investigada como possível tratamento para a doença do sono, causada pelo parasito *T. brucei*. O tratamento de células HL-60 inibiu atividade semelhante à quimiotripsina e tripsina do proteossomo em 100% e 90%, respectivamente, causando o mínimo de toxicidade e foi capaz de reduzir o crescimento do parasito de forma dose dependente. (Steverding e Wang, 2009).

A completa inibição proteossômica pode ocasionar efeitos tóxicos, uma vez que ocorre a inibição do ciclo celular, podendo levar ao acúmulo de proteínas anormais. Entretanto, a inibição parcial deste complexo não traz efeitos deletérios importantes, somente em tratamentos prolongados. Neste sentido, o uso de Bortezomibe se torna adequado no tratamento de patologias devido sua ação reversível e dose dependente (Tawa *et al.*, 1997).

2.2.3. Proteossomo e protozoários

A importância das atividades proteolíticas do sistema proteossomo-ubiquitina na regulação da homeostase celular tem sido demonstrada em um grande número de fungos e eucariotos e, mais recentemente, em protozoários parasitos (Paugam *et al.*, 2003). Uma das principais características do ciclo de vida de organismos patogênicos é a profunda alteração morfológica que sofrem durante seu desenvolvimento nos hospedeiros. Essas alterações, durante as quais a forma, tamanho e as estruturas do citoesqueleto devem se adaptar ao novo estágio, envolvem uma proteólise cuidadosamente controlada (Muñoz *et al.*, 2015).

Estudos com diferentes modelos descobriram que a inibição da função

proteossômica inibe estágios específicos de diferenciação morfológica em *Trypanosoma* spp., *Plasmodium* spp. e *Entamoeba* spp., e a replicação de *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. (Dahlmann, 2007). Foi demonstrado que o inibidor de proteossomo Lactacistina é capaz de inibir a diferenciação da forma tripomastigota de *T. cruzi* em amastigota e também de amastigotas em tripomastigotas (Gonzalez *et al.*, 1996). Resultados similares foram obtidos com outros protozoários, como *Plasmodium* spp. O tratamento de esporozoítos de *P. berghei* com inibidores do proteossomo inibe seu desenvolvimento em formas exoeritrocíticas *in vitro* e *in vivo*, mas não altera sua capacidade de invasão (Gantt *et al.*, 1998). A função dos proteossomos no desenvolvimento intracelular de parasitos também foi investigada em *T. gondii*. Ao contrário das células eucarióticas de vertebrados, nas quais o proteossomo está localizado tanto no núcleo como no citosol, em *T. gondii* este é restrito ao citosol (Paugam *et al.*, 2001). Shaw *et al.* (2000) mostraram que a Lactacistina não bloqueia a entrada de parasitos na célula hospedeira ou o estabelecimento em vacúolo parasitóforo, mas inibe o crescimento do parasito e o desenvolvimento das células-filhas, bem como a síntese de DNA.

Uma série de similaridades entre os proteossomos de organismos de diferentes classes já foram identificadas: o proteossomo 20S de muitos protozoários é semelhante em morfologia e tamanho ao proteossomo 20S isolado de arqueobactérias, leveduras e mamíferos. Estudos também identificaram similaridades entre a composição das subunidades do proteossomo de protozoários e eucariotos vertebrados, ambos contendo múltiplas subunidades α e β (Muñoz *et al.*, 2015). A principal diferença entre o proteossomo de alguns protozoários e mamíferos está relacionada a atividade peptidásica. Em mamíferos, a atividade principal é semelhante à quimiotripsina enquanto que nos tripanossomatídeos, a atividade é semelhante à tripsina (Paugam *et al.*, 2003). Essas diferenças possibilitam que o proteossomo sirva como um futuro alvo terapêutico. No entanto, o proteossomo de *T. gondii* apresenta baixa atividade semelhante à tripsina e se assemelha mais a células eucarióticas de vertebrados, dificultando o desenvolvimento de terapias que envolvam apenas o proteossomo do parasito (Paugam *et al.*, 2001).

2.3. Resposta imunológica de camundongos frente à infecção por *Toxoplasma gondii*

Infecções experimentais em camundongos são o ponto inicial para o estudo dos mecanismos de defesa frente à infecção por *T. gondii*. A facilidade de manutenção de linhagens isogênicas aliada a possibilidade de manipulação genética, obtenção de gerações em um curto prazo de tempo e a suscetibilidade da espécie ao parasito, tornaram o camundongo o modelo padrão para esse tipo de estudo (Saraf *et al.*, 2017).

A resposta imune desencadeada por *T. gondii* envolve mecanismos celulares e humorais, sendo a imunidade mediada por células a principal forma de controle da infecção (Denkers e Gazzinelli, 1998). Os neutrófilos e monócitos inflamatórios representam uma resposta precoce, sendo as primeiras células a chegar ao local da infecção. A liberação de interleucina-12 (IL-12) e TNF- α por essas células leva ao recrutamento e ativação de macrófagos e células dendríticas, que também passam a produzir IL-12 após contato com o parasito (Denkers *et al.*, 2004; Buzoni-Gatel *et al.*, 2006). A ausência dessa citocina aumenta a suscetibilidade de camundongos à infecção, resultando na menor produção de mediadores inflamatórios e maior replicação parasitária (Araújo *et al.*, 2001). O TNF- α desempenha uma ação sinérgica com IL-12 induzindo a produção de IFN- γ pelas células Natural Killer (Gazzinelli *et al.*, 1993). Na presença dessa citocina, macrófagos passam para o estado ativado e desenvolvem atividade citotóxica contra *T. gondii* (Sibley *et al.*, 1993). A inibição da replicação e destruição do parasito são resultado, principalmente, de mecanismos efetores não oxidativos representados pela produção de NO por macrófagos ativados com IFN- γ (Adams *et al.*, 1990; Schluter *et al.*, 1999).

As células dendríticas juntamente com macrófagos são responsáveis pela apresentação de antígenos de *T. gondii* aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ induzindo uma resposta do tipo Th1 (Correa *et al.*, 2007). Essas células atuam de forma sinérgica e são vitais para o fornecimento de imunidade protetora e sobrevivência de camundongos durante a fase crônica da infecção (Combe *et al.*, 2005). A secreção de IL-12 por linfócitos T CD4⁺ auxilia na atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ contra taquizoítos e células infectadas com *T. gondii* (Subauste *et al.*, 1991). A

depleção *in vivo* de linfócitos T CD8⁺ converte camundongos resistentes em suscetíveis ao parasito. Essas células se tornam uma importante fonte de IFN- γ na fase crônica da infecção induzindo a conversão de taquizoítos em bradizoítos e regulando a formação de cistos (Gazzinelli *et al.*, 1993).

A resposta imune contra o parasito parece depender, majoritariamente, das citocinas IL-12 e IFN- γ que atuam na ativação de células tanto na fase aguda quanto crônica da doença (Scott e Hunter, 2002). Outra citocina importante durante a infecção é a IL-10, sendo responsável pela supressão da resposta imune celular em humanos e camundongos (Lang *et al.*, 2007). IL-10 reduz a ativação de macrófagos, a síntese de IFN- γ por células T e NK e previne a diferenciação de clones Th1 (D'Andrea *et al.*, 1993). Os efeitos de IL-10 evitam uma inflamação exacerbada que pode levar o hospedeiro à morte, facilitando a sobrevivência de *T. gondii*. A imunossupressão exercida por IL-10 favorece uma relação estável e benéfica para o parasito e para o hospedeiro (Lang *et al.*, 2007).

A produção inicial de IFN- γ e outras citocinas pró inflamatórias é crucial para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa contra *T. gondii*. Anticorpos contra o parasito são prontamente sintetizados em resposta à infecção, tanto em seres humanos quanto em modelos experimentais (Asai *et al.*, 1992). As imunoglobulinas M irão atuar lisando taquizoítos extracelulares através da ativação do sistema complemento (Filisetti e Candolfi, 2004). Imunoglobulinas G de camundongos são compostas das subclasses IgG, IgG2a, IgG2b e IgG1. Fiorentino *et al.*, (1989) demonstrou que a produção de IL-12 e IFN- γ por células Th1 controla a produção de IgG2a e IgG2b enquanto células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10, controlando a produção de IgG1. Estas imunoglobulinas promovem uma citotoxicidade anticorpo-dependente (opsonização), tendo como alvo os antígenos de superfície do parasito (Correa *et al.*, 2007).

A resposta imune contra *T. gondii* é complexa variando em função da linhagem de camundongo estudada, dos locais anatômicos analisados, da cepa do parasito utilizada e da rota de infecção. Ao comparar linhagens de camundongos suscetíveis e resistentes à toxoplasmose aguda, foi possível observar níveis de IFN- γ séricos mais elevados em linhagens suscetíveis que nas resistentes (Schluter *et al.*, 1999). Essa elevada concentração de IFN- γ foi associada ao processo inflamatório

exacerbado caracterizado por edema e necrose tecidual intensa no fígado em camundongos C57BL/6. A migração de um número maior de macrófagos ao local de infecção nesses animais, e sua ativação pelas altas taxas de IFN- γ , levam a uma elevada expressão de iNOS com maior produção de NO. Também foi demonstrado menor produção de IgM e, apesar da ativação de macrófagos ocorrer em diferentes linhagens, células de Kupffer ativadas foram identificadas apenas em camundongos C57BL/6. Devido a sua maior suscetibilidade à infecção por *T. gondii*, os camundongos dessa linhagem se tornaram um dos modelos experimentais mais utilizados para estudo da doença e do parasito (McLeod *et al.*, 1989, Saraf *et al.*, 2017).

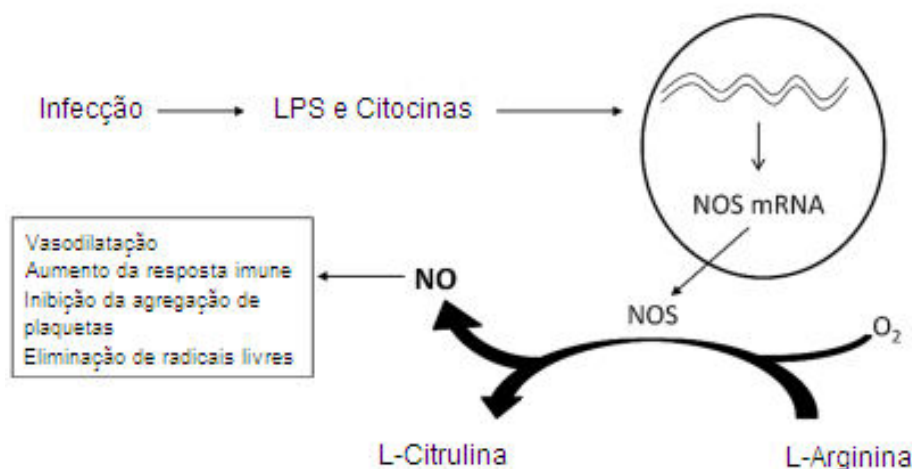
2.4. Óxido nítrico sintase induzida e óxido nítrico

NO é uma molécula gasosa tóxica, de meia vida curta, capaz de se difundir pelas membranas biológicas e alcançar diversos compartimentos intracelulares, e está associada a processos fisiológicos e patofisiológicos como vasodilatação, neurotransmissão e participação em respostas imunes (Keklikoglu *et al.*, 2008). A síntese de NO ocorre a partir da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina, em uma reação catalisada pela enzima NOS na presença de NADPH e outros co-fatores (Chokshi *et al.*, 2008).

Estruturalmente, as NOS compartilham uma estrutura molecular similar, sendo constituídas por um domínio oxigenase N-terminal e um domínio redutase C-terminal (Daff, 2010). O domínio oxigenase contém sítios de ligação para os co-fatores heme, tetraidrobiopterina, O₂ e para o substrato L-arginina, enquanto o domínio redutase contém sítios de ligação para NADPH e mononucleotídeo de flavina (FMN). O grupo FMN se liga ao domínio oxigenase através do domínio de ligação para calmodulina (Forstermann e Sessa, 2012).

Existem três isoformas de NOS, codificadas por diferentes genes e nomeadas de acordo com o local onde são encontradas. As isoformas NOS endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) são expressas constitutivamente e possuem domínios de ligação a calmodulina em uma forma cálcio dependente (Mayer, 1998). A terceira isoforma, iNOS, se liga com alta afinidade a calmodulina independente da presença de cálcio (Spratt *et al.*, 2007). Em contraste, a iNOS não é expressa sob condições normais,

sendo induzida durante infecções e processos inflamatórios (Figura 4).



Esquema 5: Expressão da enzima NOS. O surgimento de infecções induz a expressão da óxido nítrico (NO) sintase (NOS) via citocinas pró-inflamatórias e produtos de micro-organismos, como lipopolissacarídeo (LPS), que desencadeiam a tradução e expressão dessa enzima. Este processo resulta no aumento da produção de NO na célula gerando efeitos sobre o endotélio vascular e apresentando função microbicida. Uma vez a NOS expressa, ocorrerá a conversão de L-Arginina em L-Citrulina com consequente produção de NO. Modificado de Weiss *et al.*, (2012).

Quando induzida em macrófagos, iNOS catalisa a produção de NO, que atua no controle da replicação de parasitos e micro-organismos patogênicos (Bogdan *et al.*, 2000). Produtos microbianos, como LPS, e citocinas induzidas por parasitos estimulam a expressão de iNOS em células hospedeiras infectadas, resultando na produção prolongada de altos níveis de NO (Almeida *et al.*, 2000; Tachado *et al.*, 1997).

Em estudos com *Leishmania spp.* e *Plasmodium spp.*, NO foi capaz de mediar a morte dos parasitos em resposta a IFN- γ e TNF- α produzidos por células do sistema microbicida do hospedeiro (Liew e O'Donnell, 1993; Jeney *et al.*, 2014). Também foi demonstrado que, na ausência de NO, camundongos infectados cronicamente com *T. gondii* desenvolvem doença letal com carga parasitária elevada e inflamação cerebral (Khan *et al.*, 1997). Apesar do envolvimento de NO no controle de infecções, esta molécula pode ser danosa sobre o próprio organismo quando em grandes concentrações, tornando indispensável mecanismos que controlem sua

produção e diminuem seus efeitos. Muitas citocinas, como a IL-10 e TGF- β , possuem efeito antagônico ao IFN- γ , agindo para modular a produção de NO (Oswald *et al.*, 1992). Um dos mecanismos pelo qual TGF- β suprime a produção de NO em macrófagos é pela degradação da própria iNOS via proteossomo (MacMicking *et al.*, 1997; Padrão *et al.*, 2014). Em macrófagos estimulados com LPS e tratados com inibidores de proteossomo, é possível identificar drástica redução da expressão de iNOS (Musial e Eissa, 2001).

Durante a infecção de macrófagos, *T. gondii* é capaz induzir a produção de TGF- β por essas células via exposição de fosfatidilserina (Seabra *et al.*, 2004), um potente desativador que age de maneira autócrina (Ashcroft, 1999). O parasito mimetiza uma célula apoptótica e invade os macrófagos de maneira ativa, burlando o sistema microbicida destas células (Santos *et al.*, 2011) o que leva a inibição parcial da produção de NO devido a degradação iNOS via proteossomo (Seabra *et al.*, 2004; Padrão *et al.*, 2014).

3. Justificativa

Durante a infecção das células hospedeiras, *T. gondii* utiliza diversos mecanismos de evasão aos sistemas microbicidas. Um desses é a inibição da produção de NO, gás que atua como potente agente microbicida. Macrófagos ativados produzem NO via iNOS, porém, a infecção por *T. gondii* é capaz de induzir a degradação da iNOS (Padrão *et al.*, 2014) inibindo a produção de NO (Seabra *et al.*, 2002; 2004). Estudos do grupo demonstram que o proteossomo é responsável pela degradação da iNOS e que a inibição farmacológica *in vitro* dessa via impede a degradação da enzima durante a infecção (Padrão *et al.*, 2014). Verificar se a inibição sistêmica do proteossomo de camundongos é capaz de torná-los mais resistentes a infecção por *T. gondii* é relevante, pois proporciona a melhor compreensão do envolvimento desta via na resposta frente à infecção. Dessa forma, estamos contribuindo com o melhor entendimento da biologia da interação *T. gondii*-hospedeiro com possíveis reflexos em novas estratégias terapêuticas contra a toxoplasmose experimental.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

- ✓ Investigar o possível envolvimento da via do proteossomo em camundongos na infecção *in vivo* por *T. gondii*.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a sobrevivência de camundongos infectados com *T. gondii* tratados com inibidores da via do proteossomo;
- ✓ Verificar possíveis alterações na quantidade de taquizoítos de *T. gondii* e de leucócitos em camundongos infectados após o tratamento;
- ✓ Verificar a produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos infectados e tratados.

5. Material e Métodos

5.1. Desenho experimental

Esse projeto realizou infecções de camundongos por *T. gondii* pela via intraperitoneal com taquizoítas (cepa RH). Os experimentos foram realizados com camundongos Swiss e C57BL/6 obtidos no biotério central da UENF. Os camundongos infectados foram tratados com 2 inibidores de proteossomo: MG132 e Bortezomibe, cedido pelo Hospital Casa Santa Maria de Campos dos Goytacazes – RJ.

Para a infecção, os animais foram divididos em 2 grupos: a) infectado e b) tratado (com MG132 ou Bortezomibe). Para determinar a sobrevivência, cada grupo foi composto por 8 animais.

Após a determinação da sobrevivência, novos camundongos foram infectados e tratados. Os animais foram eutanasiados com CO₂ e analisados em dias da curva de sobrevivência que apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Os grupos foram compostos por 9 animais e em 3 dias distintos 3 animais de cada grupo foram eutanasiados e realizadas as análises.

5.2. Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais

Esse trabalho foi certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UENF, protocolo 259, intitulado “Síntese e avaliação da atividade de compostos de

coordenação na terapia da toxoplasmose”, emitido em 25 de setembro de 2014 e pelo protocolo 216, intitulado “Entrada e desenvolvimento do *Toxoplasma gondii* em macrófagos murinos ativados: efeito da opsonização por anticorpo ou componentes do complemento”, aditivo ao protocolo 99, com o mesmo título, em 25 de junho de 2013.

5.3. Manutenção da cepa RH de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos da cepa RH (Sabin e Feldman, 1948) foram mantidos por passagens sucessivas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss com idade entre 3 e 4 semanas. Após o período de 48 h o lavado peritoneal foi realizado com 5 mL de PBS para obtenção dos parasitos. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 x g, 10 min, 4°C, o sobrenadante descartado, sedimento ressuspensão em 1 mL de PBS e os parasitos quantificados em câmara de Neubauer.

5.4. Interação de *T. gondii* com macrófagos para avaliação dos inibidores de proteossomo

Macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal de camundongos Swiss com 10 mL de solução de Hank. As células foram centrifugadas a 500 x g, 4°C por 10 min, ressuspensas em 4 mL de DMEM e plaqueadas em placa de 24 poço. Após 1 h de aderência, as células foram lavadas com solução de Hank, ativadas com IFN- γ (100 U/mL) e LPS (0,1 μ g/mL) e cultivadas por 24 h com DMEM suplementado com 10% de SFB a 37°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Os macrófagos foram incubados por 1 h com os inibidores de proteossomo, Bortezomibe a 150 nM (Reynolds *et al.*, 2007) ou MG132 a 10 μ M (Yuan *et al.*, 2008), infectados com *T. gondii* utilizando a proporção de 10:1 parasitos por célula e cultivados por 6 h (Padrão *et al.*, 2014). Após esse cultivo, a produção de NO foi avaliada indiretamente medindo-se o nitrito nos sobrenadantes coletados (Griess *et al.*, 1982). 50 μ L do sobrenadante de cada poço foi colocado com o mesmo volume do reagente de Griess (1:1, de 0,1% N-1-nafti-etilnadiamina, Sigma – N-5889, em água destilada e 1% de sulfanilamida, Sigma – S-9251 em 5% de ácido fosfórico, Sigma – P5811) na placa de 96 poços. A absorbância foi lida a 540 nm. A concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão usando nitrito de sódio diluído em DMEM como padrão.

5.5. Infecção experimental dos camundongos

Camundongos C57BL/6 e Swiss, fêmeas, de 5 a 6 semanas de idade, foram pesados para a formação de grupos uniformes (± 20 g). Os animais foram infectados via intraperitoneal através do inóculo de 0,1 mL de PBS contendo 1×10^3 taquizoítos.

5.6. Tratamento com inibidor da via do proteossomo

Os camundongos infectados conforme item 5.5 foram tratados com os inibidores de proteossomo MG132 ou Bortezomibe nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 11 pós-infecção. Os animais foram inoculados via intraperitoneal com 200 μ l da solução em PBS contendo 1 mg por Kg de peso dos inibidores (Jamart *et al.*, 2011; Beyar-Katz *et al.*, 2016).

5.7. Análise da sobrevivência

Após a infecção, os animais foram observados diariamente (manhã e tarde) por 15 dias, a fim de verificar alterações na sobrevivência e nos sinais clínicos. Animais achados em estado moribundo foram eutanasiados. Os dados foram anotados e foram montadas curvas de sobrevivência para cada grupo utilizando o estimador de sobrevivência de Kaplan-Meier (Kaplan e Meier, 1958).

5.8. Determinação do número de leucócitos e taquizoítos do lavado peritoneal

Os camundongos infectados intraperitonealmente foram eutanasiados em dias previamente determinados (2, 4 e 6) e foi realizado lavado peritoneal com 10 mL de solução Hank em cada animal, sendo 3 por grupo e por dia. Os lavados peritoneais dos animais infectados foram centrifugados a $500 \times g$, 10 min, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de DMEM, homogeneizado, e os leucócitos e taquizoítos contados em câmara de Neubauer.

5.9. Produção de NO de macrófagos de camundongos infectados e tratados

Da suspensão de células obtidas no item acima, os leucócitos foram plaqueados em solução contendo $2,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 24 poços por 2 h para adesão dos macrófagos, lavados 1 vez com Hank e cultivados com DMEM e 5% de SFB a 37°C na estufa de CO₂. Após 24 h de cultivo a produção de NO foi determinada no sobrenadante pelo reagente de Griess (item 5.3).

5.10. Estatística

A comparação estatística dos resultados obtidos da análise de sobrevivência foi conduzida pelo teste Log Rank utilizando $P < 0,0001$. Nos demais resultados, o teste ANOVA foi realizado para avaliar significância dos resultados utilizando $P < 0,05$.

6. Resultados

6.1. Sobrevivência de camundongos infectados e tratados com inibidores de proteossomo

Para determinar se os inibidores de proteossomo seriam capazes de tornar os camundongos mais resistentes a infecção, animais Swiss e C57BL/6 foram infectados com *T. gondii* e tratados ou não com Bortezomibe ou MG132. Animais C57BL/6 tratados com Bortezomibe apresentaram 80% de sobrevida até o 9° dia de infecção, atingindo 100% de mortalidade apenas no 14° dia diferente significativamente do grupo infectado não tratado (Figura 1 A). Porém, não foram observadas diferenças na sobrevida entre animais Swiss dos grupos controle e tratado com Bortezomibe, e todos sucumbiram até o 8° dia de infecção (Figura 1 B).

Além do aumento na sobrevida de camundongos C57BL/6 tratados, também foi possível observar diferenças entre os grupos no aparecimento dos primeiros sinais clínicos da infecção, sendo de forma tardia (a partir do 6° dia) no grupo C57BL/6 tratado com Bortezomibe e a partir do 3° dia no grupo dos camundongos Swiss.

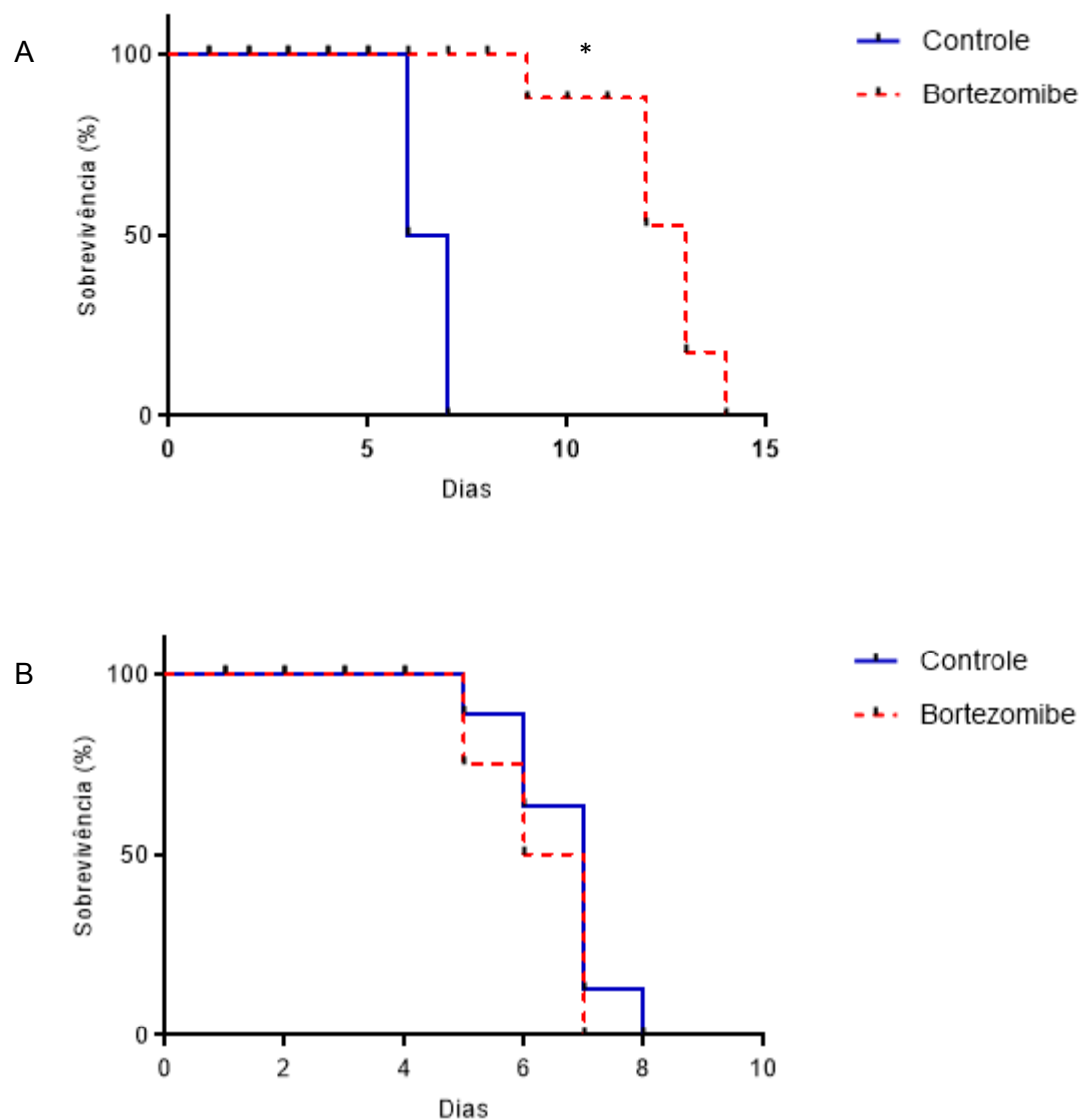


Figura 1: Sobrevivência de camundongos C57BL/6 (A) e Swiss (B) infectados intraperitonealmente com *T. gondii* e tratados ou não com Bortezomibe. *Significativamente diferente pelo teste Log Rank em relação ao controle ($P < 0.0001$).

A figura 2 A e B representam as sobrevivências dos camundongos C57BL/6 e Swiss, respectivamente, tratados ou não com o inibidor de proteossomo MG132. Não houve aumento significativo na sobrevivência dos grupos independente da linhagem de camundongo.

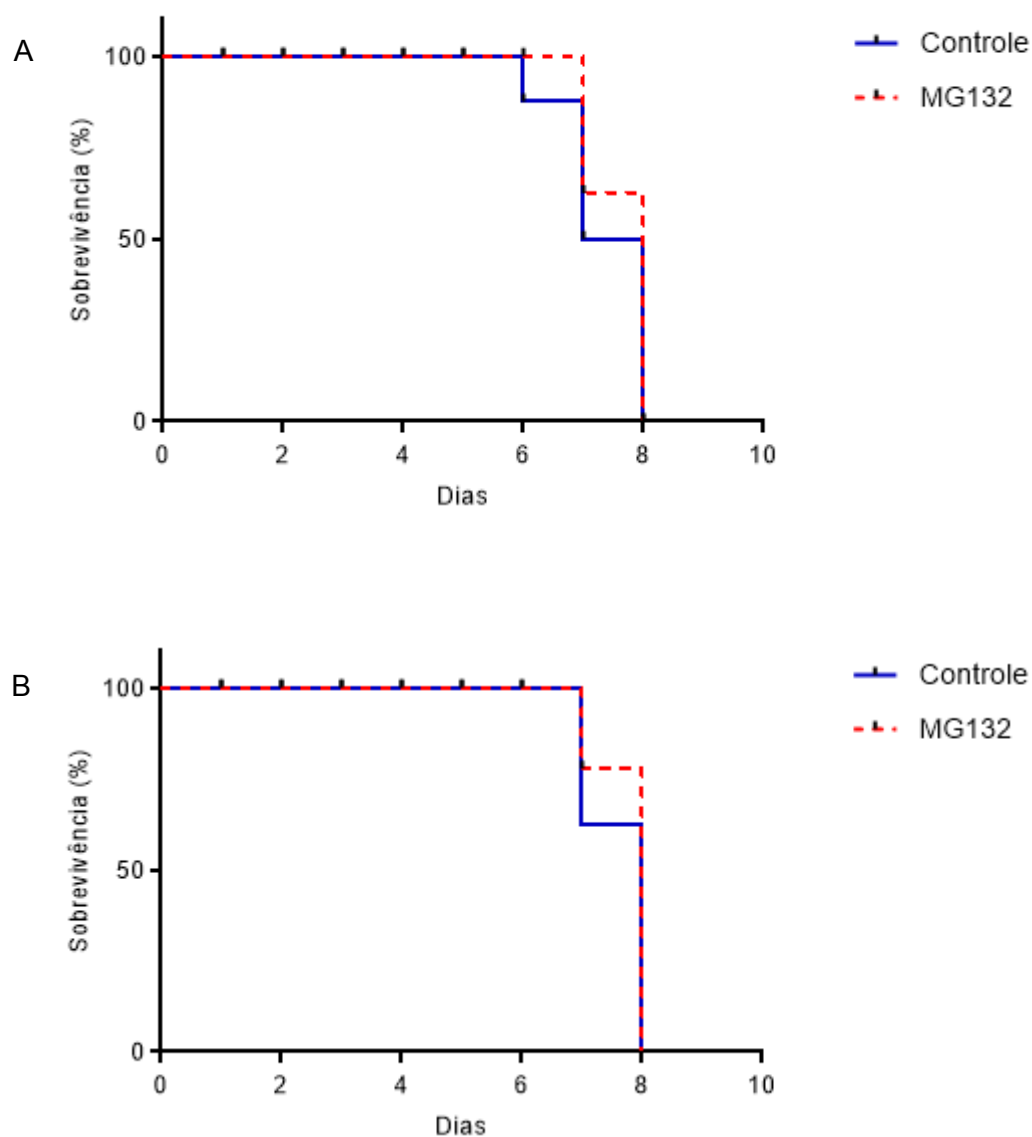


Figura 2: Sobrevivência de camundongos C57BL/6 (A) e Swiss (B) infectados intraperitonealmente com *T. gondii* e tratados ou não com MG132.

6.2. Participação do proteossomo na produção de nitrito em macrófagos infectados com *Toxoplasma gondii*

Para testar se os dois inibidores de proteossomo utilizados estavam funcionando, avaliou-se se a inibição farmacológica do proteossomo seria capaz de impedir a degradação da iNOS em macrófagos peritoneais de camundongo infectados com *T. gondii* conforme publicado pelo grupo (Padrão *et al.*, 2014). Macrófagos infectados com *T. gondii* e tratados com Bortezomibe tiveram produção de NO equivalente ao grupo controle não infectado, indicando que a iNOS permaneceu expressa apesar da infecção (Figura 3). Porém, o inibidor MG132 não foi capaz de reverter a inibição da produção de NO de macrófagos após a infecção.

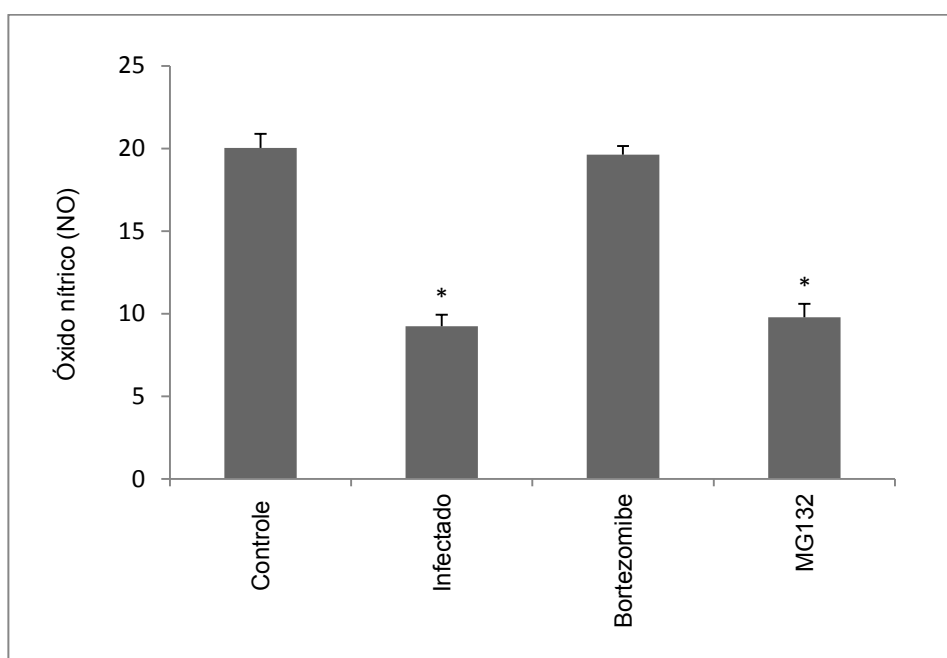


Figura 3: Produção de óxido nítrico (μM) de macrófagos peritoneais ativados com IFN-γ e LPS por 24 h. As células foram incubadas com Bortezomibe ou MG132 por 1 h, infectadas, cultivadas por 6 h e óxido nítrico avaliado. *Significativamente diferente pelo teste ANOVA em relação ao controle ($P < 0.05$).

6.3. Efeito do Bortezomibe no número de taquizoítos e leucócitos durante a infecção experimental de camundongos Swiss e C57BL/6

O número de taquizoítos obtidos do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 foi determinado nos dias 2, 4 e 6 pós-infecção dos grupos tratados ou não com Bortezomibe. Animais tratados apresentaram 98% de redução em relação ao grupo controle durante o pico de proliferação parasitária no 6º dia pós-infecção (Figura 4 A). No entanto, a quantidade de taquizoítos manteve-se elevada em ambos os grupos de camundongos Swiss, com redução comparada ao controle de apenas 6% no 4º dia pós-infecção e de 10,5% no 6º dia (Figura 4 B).

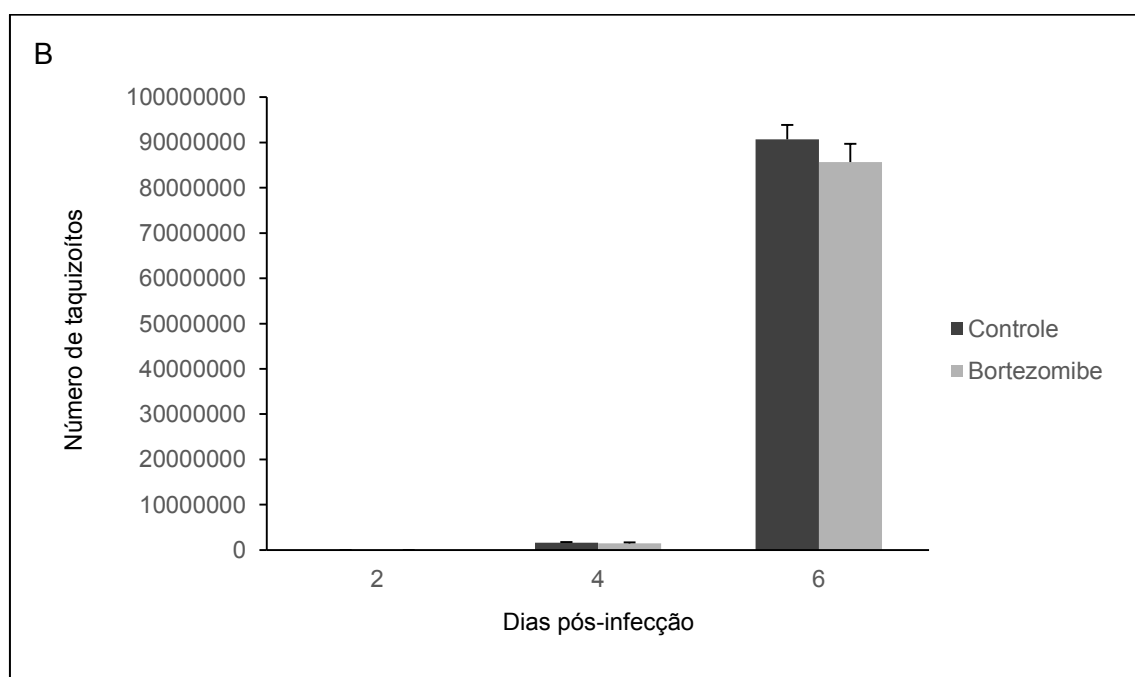
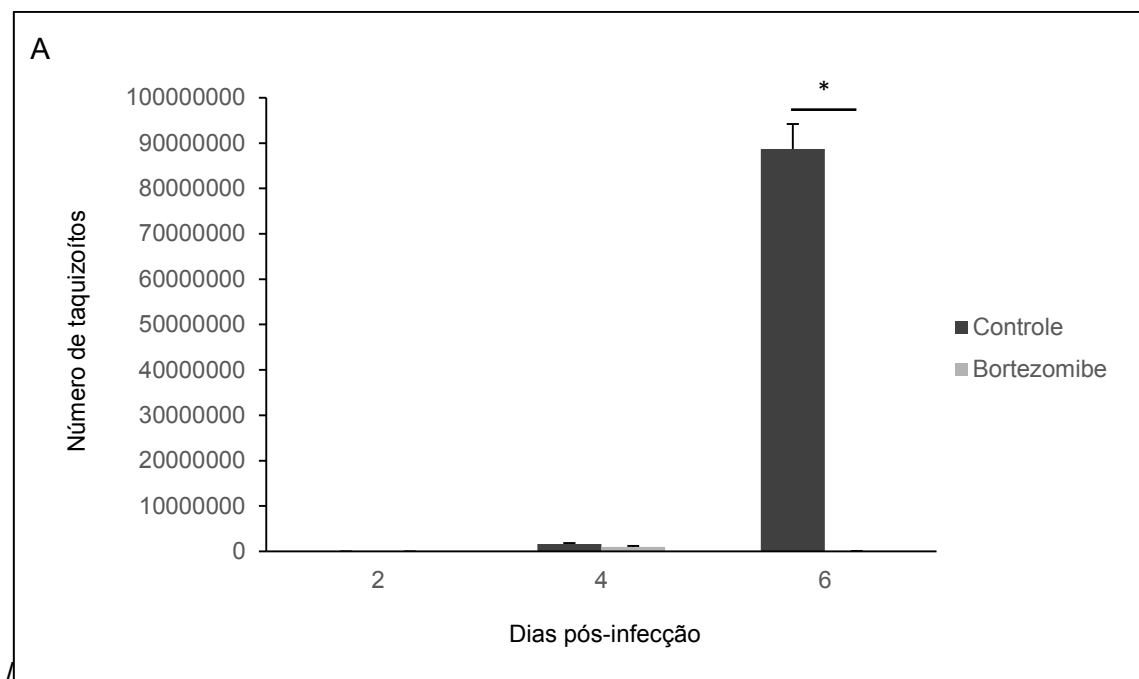


Figura 4: Número de taquizoítos de *T. gondii* em camundongos C57BL/6 (A) e Swiss (B) infectados experimentalmente com taquizoítos (cepa RH) e tratados ou não com Bortezomibe. *Significativamente diferente ($P < 0.05$).

Imagens por microscopia óptica de contraste de fase das células obtidas por lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 infectados no 6º pós-infecção ilustram as diferenças no número de taquizoítos entre os grupos tratados com Bortezomibe e não tratado (Figura 5). Os lavados peritoneais do grupo tratado apresentaram menor quantidade de taquizoítos (Figura 5 A) em relação ao grupo controle (Figura 5 B).

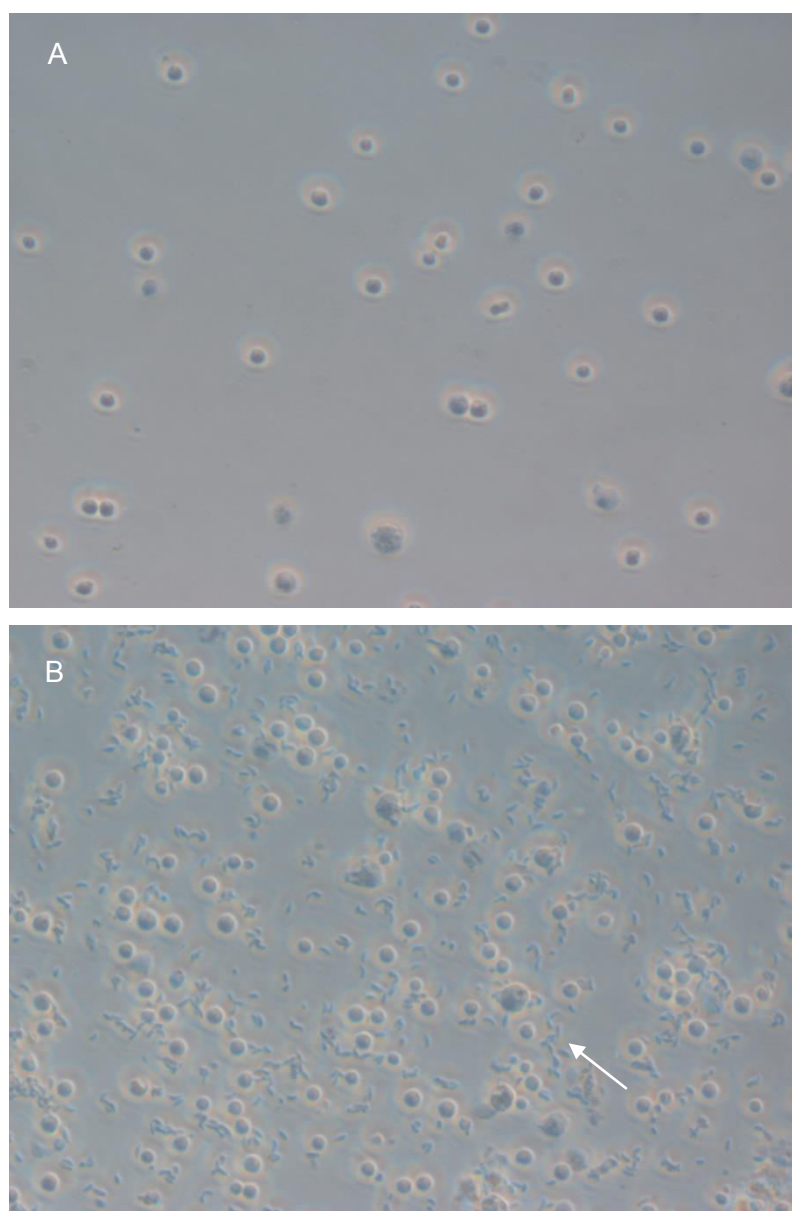


Figura 5: Microscopia óptica de contraste de fase do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* e tratados (A) ou não com Bortezomibe (B). Taquizoítos (setas) foram vistos em menor número no grupo controle em relação ao grupo tratado.

A figura 6 A e B mostram a quantidade de leucócitos obtidos de camundongos C57BL/6 e Swiss, respectivamente, infectados e tratados ou não com Bortezomibe. Nos animais C57BL/6 o grupo tratado apresentou uma tendência de aumento no número de leucócitos em relação ao controle (Figura 6 A). Porém, animais Swiss tratados apresentaram menor quantidade de leucócitos quando comparados ao controle no 4º dia pós-infecção, quando a taxa leucocitária do grupo controle aumentou drasticamente, coincidindo com o início da replicação parasitária (Figura 6 B). Em ambos os grupos, Swiss e C57BL/6, houve redução do número de leucócitos no 6º dia, durante o pico da replicação parasitária.

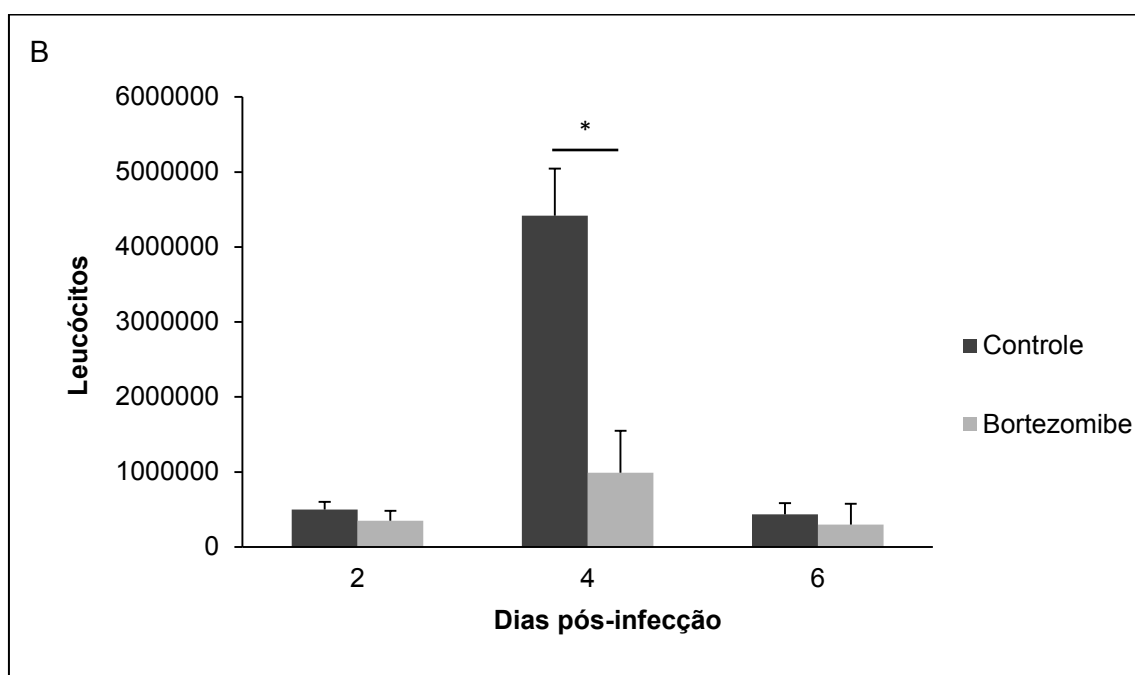
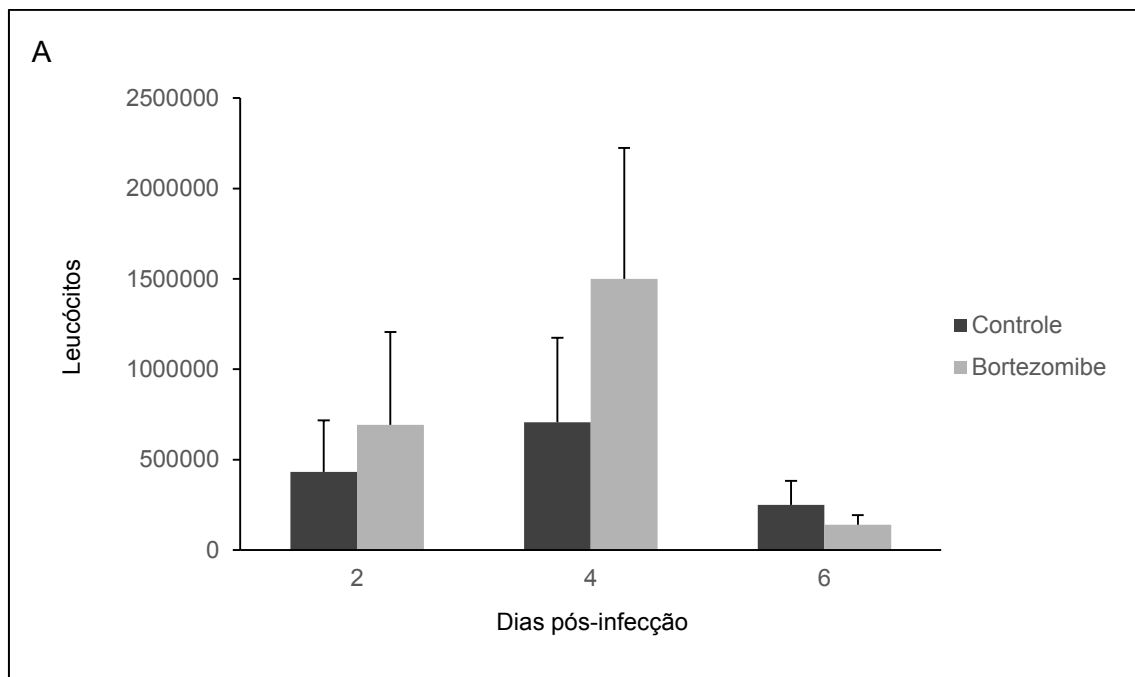


Figura 6: Número de leucócitos do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 (A) e Swiss (B) infectados com *T. gondii* e tratados ou não com Bortezomibe. Maior quantidade de leucócitos foi observada no grupo controle no 4º dia pós-infecção. *Significativamente diferente ($P < 0.05$).

6.4. Avaliação da produção de nitrito após tratamento com Bortezomibe

Para verificar se Bortezomibe seria capaz de impedir a degradação da iNOS, macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Swiss e C57BL/6 no 4º dia pós-infecção foram plaqueados e cultivados para posterior dosagem de NO. Os animais C57BL/6 tratados apresentaram uma tendência de maior produção de NO em relação aos animais dos demais grupos (Figura 7).

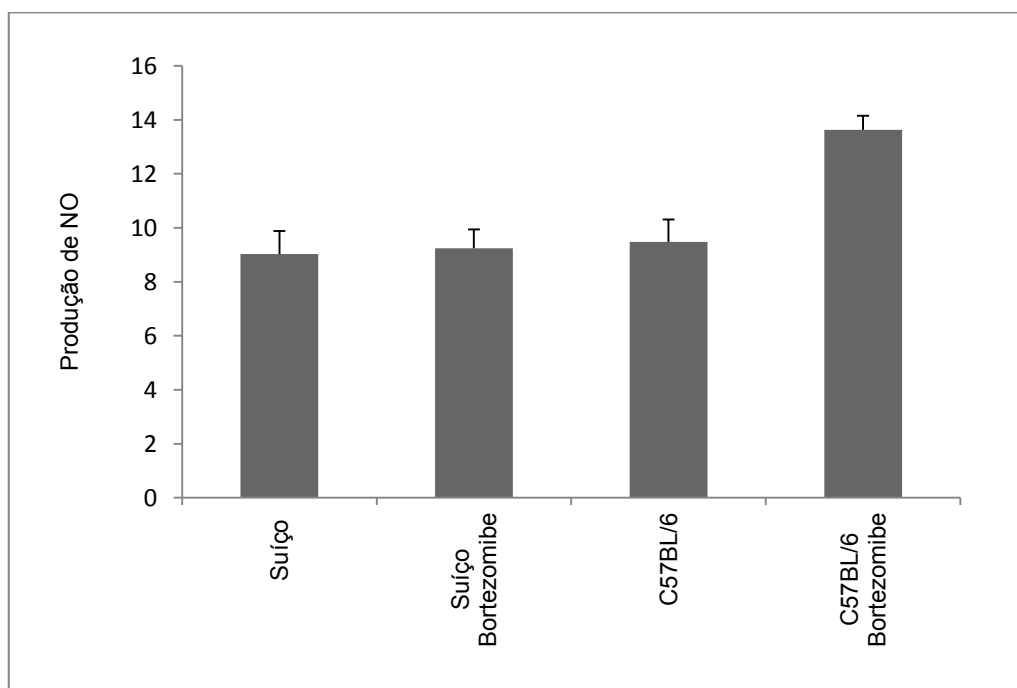


Figura 7: Produção de óxido nítrico (μM) de macrófagos obtidos de camundongos Swiss ou C57BL/6, infectados com *T. gondii* e tratados ou não com Bortezomibe no 4º dia de infecção. Os macrófagos foram cultivados por 24h na presença de IFN- γ e LPS e óxido nítrico do sobrenadante dosado.

7. Discussão

Durante a infecção das células hospedeiras, *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose, utiliza diversos mecanismos de evasão do sistema imunológico (Lambert e Barragan, 2010). A inibição da produção de NO, agente microbicida capaz de controlar a replicação de protozoários, é um dos principais mecanismos evasivos do parasito quando infectam macrófagos ativados (Seabra *et al.*, 2002; 2004). A baixa produção de NO deve-se a redução da expressão da iNOS causada pela sinalização autócrina de TGF- β em macrófagos infectados, que torna estas células menos microbicidas, induzindo a degradação da iNOS (Seabra *et al.*, 2004) via proteossomo (Padrão *et al.*, 2014) e permite a persistência do parasito na célula hospedeira. Desta forma, verificar se a inibição sistêmica do proteossomo de camundongos é capaz de alterar o curso da infecção por *T. gondii* é relevante, pois proporciona melhor compreensão do envolvimento desta via na infecção *in vivo*.

Para identificar se inibidores de proteossomo manteriam a expressão da iNOS em macrófagos infectados com consequente controle do crescimento do parasito via produção de NO tornando os camundongos mais resistentes a infecção, animais Swiss e C57BL/6 foram infectados com *T. gondii* e tratados ou não com os inibidores Bortezomibe e MG132. Durante o tratamento com Bortezomibe foi possível observar o aumento da sobrevida de animais C57BL/6 e o aparecimento das manifestações clínicas da infecção de forma tardia quando comparados ao grupo Swiss. Apesar desses animais terem a sobrevivência prolongada, 100% morreram até o 14º dia pós-infecção, possivelmente devido a focos parasitários no organismo ou ao processo inflamatório causado pela produção de NO. Portanto, o tratamento com Bortezomibe aumentou a sobrevida dos camundongos, mas não conseguiu eliminar totalmente o parasito. Ao contrário do observado no grupo C57BL/6 tratado, não houve diferença na sobrevivência entre os grupos de camundongos Swiss, indicando que o Bortezomibe não teve efeito contra a infecção nesta linhagem. Mais estudos são necessários para determinar a diferença do efeito do Bortezomibe nas duas linhagens de camundongos testadas. No entanto, o efeito do Bortezomibe pode ter sido mais evidenciado no C57BL/6 já que essa linhagem de camundongos tem resposta Th1 mais exacerbada em relação ao Swiss (Ferreira *et al.*, 2005). Provavelmente, no C57BL/6 a migração de monócitos inflamatórios foi maior do que

no Swiss e a reversão da inibição da expressão de iNOS causada pelo Bortezomibe mais eficiente nessa linhagem. O tratamento com o inibidor MG132 pareceu não alterar o curso da infecção, uma vez que não houve diferença na sobrevivência ou na manifestação clínica em ambas as linhagens de camundongo.

A fim de confirmar o funcionamento dos inibidores utilizados nos experimentos *in vivo*, macrófagos de camundongos foram cultivados e classicamente ativados por 24h, incubados com Bortezomibe ou MG132 e infectados com *T. gondii* para posterior dosagem da produção de NO. Macrófagos infectados e tratados com Bortezomibe produziram quantidades significativamente maiores de nitrito em relação aos macrófagos infectados sem inibidor ou aos tratados com MG132. A produção de nitrito obtida pelo tratamento com Bortezomibe foi equivalente à de macrófagos controle não infectados, indicando que o inibidor foi capaz de manter a iNOS expressa produzindo NO apesar da infecção. O dado com o uso do Bortezomibe confirma o obtido pelo grupo anteriormente no qual Lactocistina foi o inibidor de proteossomo usado mostrando a importância dessa via no mecanismo de escape envolvendo a inibição de NO (Padrão *et al.*, 2014). No entanto, a baixa quantidade de nitrito observada em macrófagos incubados com MG132 indicou que este inibidor pode não ser adequado para reverter a inibição de NO causada pela infecção por *T. gondii*. Outra possibilidade pode ser que a concentração de MG132 utilizada não tenha sido a correta para inibir o proteossomo. Esse dado possivelmente explica por que o tratamento com MG132 não aumentou a sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*. Devido a especificidade moderada deste inibidor, um tratamento com maior concentração pode ser necessário. No entanto, inibidores de proteossomo utilizados em grandes concentrações podem causar toxicidade celular (Rock *et al.*, 1994), dificultando o uso desta classe de inibidores para tratamentos *in vivo*.

A fim de avaliar o efeito da inibição do proteossomo na evolução da infecção por *T. gondii*, camundongos C57BL/6 e Swiss foram infectados com taquizoítos e tratados ou não com Bortezomibe. Como somente o Bortezomibe aumentou a sobrevivência de camundongos infectados, demos continuidade aos experimentos utilizando este inibidor. Camundongos foram eutanasiados e o número de taquizoítos e de leucócitos presentes no lavado peritoneal foi determinado. Os

animais C57BL/6 tratados com Bortezomibe apresentaram drástica redução da carga parasitária em relação ao controle no 6º dia, enquanto a quantidade de taquizoítos manteve-se elevada e sem diferenças significativas entre os grupos de animais Swiss. Imagens de macrófagos obtidos do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 capturadas no 6º dia pós-infecção exemplificaram a drástica redução na carga parasitária no grupo de animais tratados com Bortezomibe. Esse resultado sugere a importância do proteossomo na infecção por *T. gondii*. Pode ser que o Bortezomibe tenha revertido a inibição da expressão de iNOS nos tempos analisados e com isso controlado a replicação de *T. gondii*. Possivelmente camundongos C57BL/6 infectados e tratados com Bortezomibe apresentem grande quantidade de taquizoítos na véspera da morte (12º dia) equivalente ao controle não tratado. A diferença entre as linhagens quanto a resposta ao tratamento com Bortezomibe requer mais estudos e análises mais detalhadas serão realizadas em experimentos subsequentes.

Uma das hipóteses para a redução no número de taquizoítos e aumento da sobrevivência de camundongos C57BL/6 seria a ação do inibidor no proteossomo de *T. gondii*. Shaw *et al.* (2000) demonstrou que o pré-tratamento de taquizoítos com Lactacistina e MG132, apesar de não afetar o processo de invasão à célula hospedeira, é capaz de bloquear o crescimento do parasito, enquanto o tratamento de células HFF não teve efeito sobre seu desenvolvimento. Estudos sobre a importância do proteossomo em parasitos também observaram bloqueio da replicação parasitária com o uso de inibidores da via de degradação em outros protozoários (Gantt *et al.*, 1998; Dahlmann, 2007). No entanto, a alta quantidade de taquizoítos observada em animais Swiss tratados indicam que Bortezomibe não afeta, ou afeta de forma branda, o proteossomo de *T. gondii*. Dados obtidos por Steverding e Wang (2009) mostram que, diferente da Lactacistina, a ação de Bortezomibe é majoritariamente nas células do hospedeiro. O uso de Bortezomibe inibiu o proteossomo de células HL-60 em cerca de 100% enquanto a inibição do proteossomo de *T. brucei* foi de apenas 30%. Esse resultado coincide com a ausência de alterações na sobrevivência e na quantidade de taquizoítos em camundongos Swiss tratados. A diferença entre as linhagens quanto a resposta ao tratamento com Bortezomibe requer mais estudos e análises mais detalhadas serão

realizadas em experimentos subsequentes.

A quantidade de leucócitos obtida da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 infectados e tratados apresentou tendência de aumento quando comparada ao controle, enquanto em camundongos Swiss tratados notou-se menor migração de leucócitos em relação ao controle no 4º pós-infecção, início da replicação parasitária, quando houve drástico aumento na quantidade de leucócitos obtidos de camundongos Swiss não tratados. Nos grupos controle e tratado de ambas as linhagens houve redução na quantidade de leucócitos no 6º dia pós-infecção. A replicação progressiva dos taquizoítos leva a ruptura celular, explicando o baixo número de leucócitos observado no último dia de análise dos grupos. Nos animais C57BL/6 tratados, no entanto, a baixa quantidade de leucócitos possivelmente se deve a efeitos colaterais do tratamento, capaz de causar leucopenia (Velcade, 2003). Outra possível causa para a redução do número de leucócitos nesses animais seria a diminuição da carga parasitária no peritônio, que pode ter levado a redução do influxo de leucócitos ou a migração destes para locais onde tenha permanecido focos de replicação do parasito. A principal diferença entre as linhagens de camundongos utilizadas nos experimentos estaria na intensidade da inflamação frente a infecção. Camundongos C57BL/6, quando infectados com *T. gondii*, apresentam rápido recrutamento de monócitos inflamatórios e maior migração de macrófagos e linfócitos quando comparados a camundongos Swiss. Além disso, essa linhagem também apresenta maior produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ , e maior expressão de iNOS, o que torna a resposta imune destes animais mais do tipo Th1. A combinação de uma resposta pro-inflamatória maior e precoce a processos infecciosos, causa a morte desses animais no início da fase aguda, contrário do observado em camundongos Swiss (McLeod *et al.*, 1989; Schluter *et al.*, 1999). Efeitos imunossupressores causados pelo uso do Bortezomibe podem estar associados as diferenças observadas nas linhagens durante o tratamento (Pellom *et al.*, 2015). No C57BL/6 a replicação do parasito seria controlada de forma mais eficiente e o Bortezomibe pode reduzir a resposta Th1 facilitando a sobrevivência na fase aguda da doença, enquanto essa mesma redução prejudicaria a sobrevivência de camundongos Swiss devido a sua resposta mais lenta frente a infecção.

Para determinar se o tratamento com Bortezomibe seria capaz de impedir a degradação da iNOS via proteossomo, foi realizada a dosagem de NO de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57BL/6 e Swiss. A tendência de maior quantidade de nitrito produzida em camundongos C57BL/6 tratados com o inibidor sugere que a inibição do proteossomo *in vivo* é capaz de manter a expressão de iNOS nessas células, reduzindo a carga parasitária devido a produção de NO. Novos estudos são necessários para confirmar se a produção de NO é diferente significativamente entre esses grupos e para verificar a expressão da iNOS, determinando sua possível preservação após o tratamento com Bortezomibe.

A fim de melhor entender o papel do proteossomo na infecção *in vivo* por *T. gondii*, os próximos passos desse trabalho são: (a) realizar o RT-PCR para quantificar a carga parasitária no lavado peritoneal em baço e fígado em diferentes pontos da curva de sobrevivência dos camundongos; (b) determinar a expressão da iNOS por imunofluorescência e Western blotting em diferentes órgãos e células do lavado peritoneal de camundongos tratados; (c) realizar histologia, fenotipagem de leucócitos e dosagem sérica de citocinas para melhor compreender a diferença entre as linhagens de camundongos quanto a resposta aos tratamentos contra a infecção.

8. Conclusão

Camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* e tratados com o inibidor de proteossomo Bortezomibe apresentaram aumento na sobrevivência, retardamento das manifestações clínicas da infecção e redução da carga parasitária. Porém, o mesmo tratamento não apresentou efeito em camundongos Swiss infectados, sendo necessário melhor compreender a diferença entre as linhagens utilizadas. Nossos resultados sugerem que a inibição do proteossomo através de Bortezomibe possivelmente manteve a iNOS expressa em macrófagos de C57BL/6 produzindo NO e auxiliando no controle da infecção.

9. Referencias

- Adams, J.; Behnke, M.; Chen, S.; Cruickshank, A. A.; Dick, L. R.; Grenier, L.; Stein, R. L. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett.*, v.8, p.333-338, 1998.
- Adams, J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer.*, v.4,

- p.349-360, 2004.
- Adams, L. B.; Hibbs J. B.; Taintor, R. R.; Krahenbuhl, J. S.; Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol.*, v.144, p.2725-2729, 1990.
- Ajioka, J. W.; Soldati, D. *Toxoplasma Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: *Horizon Bioscience*, 2007.
- Almeida, C. A.; Barry, S. A. *Cancer: basic science and clinical aspects*. West Sussex: Wiley-Blackwell Publication, 2010.
- Almeida, I. C.; Camargo, M. M; Procopio, D. O.; Silva, L. S.; Mehlert, A.; Travassos, L. R. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *Embo J.*, v.19, p.1476-85, 2000.
- Araújo, M. I.; Bliss, S. K.; Suzuki, A.; Alcaraz, A.; Denkers, E. Y.; Pearce, E. J. Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice co-infected with *Schistosoma mansoni* and *Toxoplasma gondii*. *Infect Immunity.*, v.69, p.1454-1462, 2001.
- Asai, T.; Miura, S.; Sibley, L. D.; Okabayashi, A.; Suzuki, Y. High correlation in antibody titers between the Sabin-Feldman dye test and na enzyme-linked immunosorbent assay detecting immunoglobulin G antibodies to the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.*, v.30, p.1291-1293, 1992.
- Ashcroft, G. S. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect.*, v.1, p.1275-1282, 1999.
- Balch, W. E.; Morimoto, R. I.; Dillin, A.; Kelly, J. W. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, v.319, p. 916-919, 2008.
- Berkers, C. R.; Verdoes, M.; Lichtman, E.; Fiebiger, E.; Kessler, B. M.; Anderson, K. C.; Galardy, P. J. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat Methods.*, v.2, p.357-362, 2005.
- Beyar-Katz, O.; Magidey, K.; Ben-Tsedek, N.; Alishekevitz, D.; Timaner, M.; Miller, V.; Shaked, Y. Bortezomib-induced pro-inflammatory macrophages as a potential factor limiting anti-tumour efficacy. *J Pathog.*, v.239 p.262-273, 2016.
- Black, M. W.; Boothroyd, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.*, v.64, p.607-623, 2000.

- Blader, I. J.; Saeij, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS*, v.117, p.458-476, 2009.
- Bogdan, C.; Rollinghoff, M.; Diefenbach, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.*, v.12, p.64-76, 2000.
- Buzoni-Gatel, D.; Schulthess, J.; Menard, L. C.; Kasper, L. H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell Microbiol.*, v.8, p.535-544, 2006.
- Cavo, M. Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*, v.20, p.1341-1352, 2006.
- Chen, Y. W.; Huang, S. C.; Lin-Shiau, S. Y.; Lin, J. K. Bowman-Birk inhibitor abates proteasome functions and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis*, v.26, p.1296-1306, 2005.
- Chokshi, K. N.; Guner, Y. S.; Hunter, C. J.; Upperman, J.S.; Grishin, A.; Ford, H. R. Therole of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.*, v.32, p.92-99, 2008.
- Ciechanover, A.; Schwartz, A. L. The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v.95, p. 2727-2730, 1998.
- Cohen, J.; Opal, S. M.; Powderly, W. G. Infectious diseases.3th ed. Edinburgh: *Mosby*, 2010.
- Combe, C. L.; Curiel, T. J. ; Moretto, M. M.; Khan, I. A. NK cells help to induce CD8+- T cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4+ T cells. *Infect Immun.*, v.73, p.4913-4921, 2005.
- Correa, D.; Cañedo, I.; Ortiz, L. B.; Caballeroortega, H.; Rico-Torres, C. P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.*, v.29, p.651-660, 2007.
- Coura, J. R. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 2005.
- Coux, O.; Tanaka, K.; Goldeberg, A. L. Structureand functions of the 20S and 26S

- the proteasomes. *Ann Rev Biochem.*, v.65, p.801-47, 1996.
- Craiu, A.; Gaczynska, M.; Akopian, T.; Gramm, C. F.; Fenteany, G.; Goldberg, A. L.; Rock, K. L. Lactacystin and clasto-Lactacystin β -lactone modify multiple proteasome β -subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem.*, v.272, p.13437-13445, 1997.
- D'Andrea, A.; Aste-Amezaga, M.; Valiante, N. M.; MA, X.; Kubin, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon γ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.*, v.178, p.1041-1048, 1993.
- Daff, S. NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide*, v.23, p.1-11, 2010.
- Dahlmann, B. Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem.*, vol.8, 2007.
- Davies, K. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, v.83, p.301-310, 2001.
- Denkers, E.Y.; Gazzinelli, R.T. Regulation and function of T cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev.*, v.11, p.569-588, 1998.
- Denkers, E. Y.; Butcher, B. A.; Bennouna, S. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol.*, v.34, p.411-421, 2004.
- Dubey, J. P. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX): *University of Texas Medical Branch at Galveston*, 1996.
- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.*, v.11, p.267-299, 1998.
- Dubey, J. P. Toxoplasmosis- a waterborne zoonosis. *Exp Parasitol.*, v.126, p.57-72, 2004.
- Dubremetz, J. F. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends Microbiol.*, v.6, p.27-30, 1998.
- Dunay, I. R.; DaMatta, R. A.; Fux, B.; Presti, R.; Greco, A.; Colonna, M.; Sibley, L. D. Gr1⁺ inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, v.29, p.306-317, 2008.
- Dunay, I. R.; Fuchs, A.; Sibley, D. L. Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect Immun.*, v.78,

- p.1564-1570, 2010.
- Dunn, D.; Wallon, M.; Peyron, F.; Petersen, E.; Peckham, C.; Gilbert, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*, v.353, p.1829-1833, 1999.
- Egan, C. E.; Cohen, S. B.; Denkers, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. *Immunol Cell Biol.*, v.90, p.668-675, 2012.
- Elliott, P. J.; Ross, J. F. The proteasome. *American J Clin Pathol.*, v.116, p.637-646, 2001.
- Filisetti, D.; Candolfi, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.*, v.40, p.71-80, 2004.
- Fiorentino, B. F.; Bond, M. W.; Mosmann, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.*, v.170, p.2081-2095, 1989.
- Freyre, A.; Dubey, J. P.; Smith, D. D.; Frenkel, J. K. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J Parasitol.*, v.75, p.750-755, 1989.
- Forstermann, U.; Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.*, v.33, p.829-837, 2012.
- Gantt, S. M.; Myung, J. M.; Briones, M.R.; Li, W. D.; Corey, E. J.; Omura, S.; Nussenzweig, V.; Sinnis, P. Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium spp.* *Antimicrob Agents Chemother.*, v.41, p.2731-2738, 1998.
- Gazzinelli, R. T.; Hieny, S.; Wynn, T.A.; Wolf, S.; Sher, A. Interleukin-12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon-gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Nat Acad Sci U S A.*, v.90, p.6115-6119, 1993.
- Glickman, M. H.; Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.*, v.82, p.373-428, 2002.
- Gonzalez, J.; Ramalho, F. J.; Frevert, U.; Ghiso, J.; Tomlinson, S.; Scharfstein, J.; Corey, E. J.; Nussenzweig, V. Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of protozoan parasite. *J Exp Med.*, v.184, p.1909-1918, 1996.
- Griess, L.; Wagner, J.; Glogowski, P. L.; Skipper, J. S.; Wishnok, S. R. Analyses of

- nitrate, nitrite, and [15N] nitrite in biological fluids. *Anal Biochem.*, v.126, p.131-138, 1982.
- Guillermo, L. V. C.; DaMatta, R. A. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poult Sci.*, v.83, p.776-782, 2004.
- Halonen, S. K.; Weiss, L. M. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol.*, v.114, p.125-145, 2013.
- Hevel, J. M., White, K. A., Marietta, M. A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase: identification as a flavoprotein. *J Biol Chem.*, v.266, p.22789-22791, 1991.
- Haverkos, H. W. Assessment of therapy for toxoplasma encephalitis. *American J Med.*, v.82, p.907-14, 1987.
- Hershko, A.; Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.*, v.67, p.425-479, 1998.
- Hill, D.; Dubey, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.*, v.10, p.634-640, 2002.
- Hill, D.; Chirukandoth, S.; Dubey, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev.*, v.6, p.41-61, 2005.
- Hotop, A.; Hlobil, H.; Gross, U. Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.*, v.54, p.1545-1552, 2012.
- Innes, E. A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health*, v. 57, p.1-7, 2010.
- Iyer, S. S.; Rojas, M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther.*, v.8, p.569-581, 2008.
- Jamart, C.; Raymackers, J. M.; Li An, G.; Deldicque, L.; Francaux, M. Prevention of muscle disuse atrophy by MG132 proteasome inhibitor. *Muscle Nerve*, v.43, p.708-715, 2011.
- Jeney, V.; Ramos, S.; Bergman, M. L.; Bechmann, I.; Tischer, J.; Ferreira. A.; Oliveira, V.; Rebelo, S.; Cardoso, S.; Soares, M. P. Control of disease tolerance to malaria by nitric oxide and carbon monoxide. *Cell Rep.*, v.8, p.126-36, 2014.
- Jones, T. C.; Hirsch, J. G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles

- containing living parasites. *J Exp Med.*, v.136, p.1173-1194, 1972.
- Kaplan, E. L.; Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.*, v.53, 457-481, 1958.
- Keklikoglu, N.; Koray, M.; Kocaelli, H.; Akinci, S. iNOS Expression in oral and gastrointestinal tract mucosa. *Dig Dis Sci.*, v.53, p.1437-1442, 2008.
- Khan, I. A.; Schwartzman, J. D.; Matsuura, T.; Kasper, L. H. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci.*, v.94, p.13955-13960, 1997.
- Kim, K.; Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasito.*, v.34, p.423-432, 2004.
- King, R. W.; Deshaies, R. J.; Peters, J. M.; Kirschner, M. W. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*, v.274, p.1652-1659, 1996.
- Kisselev, A. F.; Goldberg, A. L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.*, v.8, p.739-758, 2001.
- Lambert, H.; Barragan, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cel Microbiol.*, v.12, p.292-300, 2010.
- Lang, C.; Grob, U.; Luder, G. K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.*, v.100, p.191-203, 2007.
- Liesenfeld, O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J Infect Dis.*, v.185, p.96-101, 2002.
- Liew, F. Y.; O'Donnell, C. A. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol.*, v.32, p.161-259, 1993.
- MacMicking, J.; Xie, Q. W.; Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol*, v., p.323-350, 1997.
- Mancini, D. T.; Assis, L. C.; Ramalho, T. C.; da Cunha, E. F. F.; França, T. C. C. Toxoplasmose: perspectivas no estudo de novos alvos terapêuticos. *Rev Virtual Quim.*, v.4, p. 434-455, 2012.
- Mayer, B. Structure and function of nitric oxide synthase. *Nitric Oxide: Biol Ch.*, v.2, p.390-91, 1998.
- McLeod, R.; Eisenhauer, P.; Mack, D.; Brown, C.; Filice, G.; Spitalny, G. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.*, v.142, p.3247-3255, 1989.

- Melo, E. J. T.; Mayerhoffer, R. O.; Souza, W. Hydroxyurea inhibits intracellular *Toxoplasma gondii* multiplication. *FEMS Microbiol Lett.*, v.185, p.79-82, 2000.
- Miller, N. L.; Frenkel, J. K.; Dubey, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J Parasitol.*, v.58, p.928-37, 1972.
- Montoya, J. G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet*, v.363, p.1965-1976, 2004.
- Moura, M. D.; Amendoeira, M. R. R.; Barbosa, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v.104, p.862-864, 2009.
- Muñoz, C.; Francisco, J.; Gutiérrez, B.; González, J. Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites, 2015.
- Musial, A.; Eissa, N. T. Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem.*, v.276, p.24268-24273, 2001.
- Nathan, C. F.; Hibbs, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.*, v.3, p.65-70, 1991.
- Oswald, I. P.; Gazzinelli, R. I.; Sher, A.; James, S. L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor b to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol.*, v.148, p.3578-3582, 1992.
- Padrão, J.; Cabral, G. R. C.; Silva, M. D. F. S.; Seabra, S. H.; DaMatta, R. A. *Toxoplasma gondii* infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. *Parasitol Int.*, v.63, p.659-663, 2014.
- Pfaff, A. W.; Georges, S.; Abou-Bacar, A.; Letscher-Bru, V.; Klein, J. P.; Mousli, M.; Candolfi, E. *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. *Immunol Cell Biol.*, v.83, p.483-489, 2005.
- Paugam, A.; Creuzet, C.; Dupouy-Camet, J.; Roisin, M.P. Evidence for the existence of a proteasome in *Toxoplasma gondii*: intracellular localization and specific peptidase activities. *Parasite*, vol.8, p.267-273, 2001.
- Paugam, A.; Bulteau, A. L.; Dupouy-Camet, J.; Creuzet, C.; and Friguet, B. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *Trends Parasitol.*, vol. 19, p. 55-59, 2003.
- Pellom Jr, S. T.; Dudimah, D. F.; Thounaojam, M. C.; Sayers, T. J.; Shanker, A. Modulatory effects of bortezomib on host immune cell functions. *Immunotherapy*,

- v.7. p.1011-1022. 2015.
- Pickart, C. M.; Cohen, R. E. Proteasome and their kin: proteases in machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v.5, p.177-187, 2004.
- Remington, J. S.; McLeod, R.; Thulliez, P.; Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.; Klein, G.; Wilson, C.; Baker, C. Infectious diseases of the Fetus and Newborn Infant. 6th ed. Philadelphia: *WB Saunders*, 2006.
- Remington, J. S.; McLeod, R.; Thulliez, P.; Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.; Klein, G.; Wilson, C.; Baker, C. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 7th ed. Philadelphia: *WB Saunders*, 2011.
- Reynolds, J. M.; El Bissati, K.; Brandenburg, J.; Günzl, A.; Mamoun, C. B. Antimalarial activity of the anticancer and proteasome inhibitor bortezomib and its analog ZL3B. *BMC Clin Pharmacol*, v.7, p13, 2007.
- Rock, K. L.; Gramm, C.; Rothstein, L.; Clark, K.; Stein, R.; Dick, L.; Hwang, D.; Goldberg, A. L. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell protein and the generation of the peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, v.78, p.761-771, 1994.
- Robert-Gangneux, F.; Dardé, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.*, v.25, p.264-96, 2012.
- Rorman, E.; Zamir, C. S.; Rilkis, I.; Bem-David, H. Congenital Toxoplasmosis – prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reprod Toxicol.*, v.21, p.458-472, 2006.
- Sabin, A. B.; Feldman, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma). *Science*, v.108, p.660-663, 1948.
- Santos, T. A.; Portes, J. D. E. A.; Damasceno-Sá, J. C.; Caldas, L. A.; De Souza W.; DaMatta, R. A.; Seabra, S. H. Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. *PLoS One*, v.6, 2011
- Saraf, P.; Shwab, E. K.; Dubey, J. P.; Su, C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Expe Parasitol.*, 2017.
- Schlüter, D.; Deckert-Schlüter, M.; Lorenz, E.; Meyer, T.; Röllinghoff, M.; Bogdan, C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral

- toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. *J Immunol.*, V.162, p.3512-3518, 1999.
- Schlüter, D. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol.*, v.304, p.917-929, 2014.
- Schwartz, R.; Davidson, T. Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib. *Oncology*, v.18, p.14-21, 2004.
- Scott, P.; Hunter, C. A. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol.*, v.14, p.69-81, 2002.
- Seabra, S. H.; Souza, W.; DaMatta, R. A. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. *Exp Parasitol.*, v.100, p.62-70, 2002.
- Seabra, S. H.; de Souza, W.; DaMatta, R. A. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine that induces a TGF- β autocrine effect orchestrating macrophages evasion. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.324, p.744–752, 2004.
- Shaw, M.K.; He, C. Y.; Roos, D. S.; Tilney, L. G. Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, vol.121, p.35-47, 2000.
- Sibley, L. D.; Pfefferkorn, E.R.; Boothroyd, J. C. Development of genetic systems for *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today.*, v.9, p.392-395, 1993.
- Souza, W.; DaMatta, R. A.; Attias, M. Brazilian contribution for a better knowledge on the biology of *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v.104, p.149-154, 2009.
- Souza, W.; Martins, D. E. S.; Lemgruber, L.; Attias, M.; Vommaro, R. C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. *Sci Med.*, v.20, p.131-143, 2010.
- Souza, W.; Belfort, JR. R. Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014.
- Speer, C. A.; Dubey, J. P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int J Parasitol.*, v.35, p. 193-206, 2005.
- Spratt, D.E.; Taiakina, V.; Palmer, M. Differential binding of calmodulin domains to constitutive and inducible nitric oxide synthase enzymes. *Biochemistry*, v.46,

- p.8288-8300, 2007.
- Steверding, D.; Wang, X. Trypanocidal activity of the proteasome inhibitor and anti-cancer drug bortezomib. *Parasites & vectors*, v.2, p.29, 2009.
- Subauste, C. S.; Koniaris, A. H.; Remington, J. S. Murine CD8+ cytotoxic T Lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J Immunol.*, v.147, p. 3955-3959, 1991.
- Suss-Toby, E.; Zimmerberg, J.; Ward, G. E. Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.93, p. 413-418, 1996.
- Tachado, S. D.; Gerold, P.; McConville, M.J.; Baldwin, T.; Quillici, D.; Schwarz, R.T.; Schofield, L. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol.*, v.156, p.1897–907, 1997.
- Tanaka, K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*, v.85, p.12-36, 2009.
- Tawa, N. E.; Odessey, R.; Goldberg, A. L. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerate proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest.*, v.100, p.197-203, 1997.
- Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R.; Weiss, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.*, v.30, p.1217-1258, 2000.
- Varshavsky A. The ubiquitin system, an immense realm. *Annu Rev Biochem.*, v.81, p.167-176, 2012.
- Velcade [bula inclusa]. Cambridge, Mass, Millenium Pharmacauticals. In., 2003.
- Voorhees, P. M.; Dees, E. C.; O'Neil, B.; Orlowski, R. C. The proteasome as a target of cancer therapy. *Clin Cancer Res.*, v.9, p.6316-6325, 2003.
- Wang, J.; Maldonado, M. A. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol.*, v.3, p.255-261, 2006.
- Webster, J. P.; Kaushik, M.; Bristow, G. C.; McConkey, G. A. *Toxoplasma gondii* infection, from predation to schizophrenia: can animal behaviour help us understand human behaviour? *J Exp Biol.*, v.216, p.99-112, 2013.
- Weiss, L. M.; Kim, K. *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan: perspectives and

methods. London: *Academic Press*, 2007.

Weiss, S. L.; Yu, M.; Jennings, L.; Haymond, S.; Zhang, G. Pilot Study of the Association of the DDAH2 2449G Polymorphism with Asymmetric Dimethylarginine and Hemodynamic Shock in Pediatric Sepsis. *PLoS One*, v.7, 2012.

Yuan, B. Z.; Chapman, J. A.; Reynolds, S. H. Proteasome inhibitor MG132 induces apoptosis and inhibits invasion of human malignant pleural mesothelioma cells. *Translational Oncol*, v.1, p.129-140, 2008.