

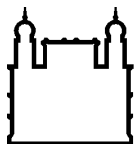
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA LIBERAÇÃO  
DE ARMADILHAS EXTRACELULARES NEUTROFÍLICAS (NETs) EM RESPOSTA  
A INFECÇÃO *IN VITRO* POR *TOXOPLASMA GONDII* E SEU PAPEL NO  
CONTROLE DA CARGA PARASITÁRIA**

**ISABELA SILVA MACEDO**

Rio de Janeiro  
Agosto/2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**ISABELA SILVA MACEDO**

Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na liberação de armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs) em resposta a infecção *in vitro* por *Toxoplasma gondii* e seu papel no controle da carga parasitária

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Orientador:** Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto

**RIO DE JANEIRO**

Agosto/2022

Macedo, Isabela Silva.

Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na liberação de armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs) em resposta a infecção *in vitro* por *Toxoplasma gondii* e seu papel no controle da carga parasitária / Isabela Silva Macedo. - Rio de Janeiro, 2022.

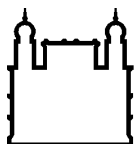
xv, 99f. f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientador: Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto .

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Carga parasitária. 2. Mecanismos moleculares. 3. Videomicroscopia. 4. armadilhas extracelulares neutrofílicas. 5. *Toxoplasma gondii*. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: ISABELA SILVA MACEDO***

**ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA LIBERAÇÃO  
DE ARMADILHAS EXTRACELULARES NEUTROFÍLICAS (NETs) EM RESPOSTA  
A INFECÇÃO *IN VITRO* POR *TOXOPLASMA GONDII* E SEU PAPEL NO  
CONTROLE DA CARGA PARASITÁRIA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto**

**Aprovada em: 11/08/2022**

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra. Veronica Schmitz - Presidente (IOC-FIOCRUZ)**

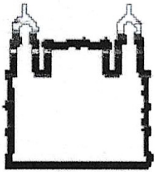
**Prof. Dr. Renato daMatta (UENF)**

**Profa. Dra. Karina Toledo (UNESP)**

**Profa. Dra. Elvira Saraiva (IMPG-UFRJ)**

**Profa. Dra. Helene Barbosa – (IOC-FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 11 de Agosto de 2022




Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de **Isabela Silva Macedo**, sob orientação do Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto. Ao décimo primeiro dia do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: "**Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na liberação de armadilhas extracelulares neutrofilicas (NETs) em resposta a infecção *in vitro* por *Toxoplasma gondii* e seu papel no controle da carga parasitária**", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Estudos Bioquímicos e Moleculares de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Verônica Schmitz Pereira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Karina Alves de Toledo – UNESP/SP, Dr. Renato Augusto DaMatta – UENF/RJ, e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Helene Santos Barbosa- IOC/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Elvira Maria Saraiva Chequer Bou-Habib - UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovada da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 11 de agosto de 2022.

  
Dr<sup>a</sup>. Verônica Schmitz Pereira (Presidente da Banca):

  
Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador do Programa):

**Aos meus pais, por todo apoio.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu orientador Rubem Menna-Barreto, que me aceitou como sua aluna, possibilitando a realização desse projeto de mestrado. Obrigada por ter sido um orientador presente durante esse processo, sempre disponível para o que eu precisasse.

Ao Dr. Rafael Mariante, que me orientou na iniciação científica, e me deu todo apoio para que eu continuasse essa jornada no mestrado. Obrigada por sempre me incentivar e participar também nesse projeto durante o mestrado, com toda a sua dedicação e contribuição.

Agradeço imensamente a Sandra Maria, técnica do Laboratório de Biologia Estrutural, que esteve presente desde o meu projeto de iniciação científica, sempre muito carinhosa e disposta a ajudar no que eu precisasse, me tirando várias dúvidas e me ensinando tudo o que estivesse ao seu alcance. Esse projeto não teria sido o mesmo sem ela!

Aos meus familiares e amigos fora do IOC que sempre confiaram em mim e acreditaram que eu conseguiria finalizar o mestrado. Apesar das dificuldades, inseguranças e falta de esperança, nunca faltou suporte, amor e muito incentivo. Agradeço em especial aos meus pais, por desde pequena me ensinarem os valores mais importantes, sempre me apoiando e estando ao meu lado nas minhas decisões. Obrigada por sempre confiarem e acreditarem em mim.

Aos meus amigos Marcos Vinícius e Jéssica Souza, com quem pude compartilhar as angústias e alegrias do mundo acadêmico desde 2018. Iniciar o mestrado de forma remota, e depois, presencialmente sem vocês por perto foi difícil, mas mesmo de longe, sem vocês toda essa caminhada não teria sido a mesma. Obrigada por continuarem presentes em minha vida e acreditarem em mim.

Aos alunos do Laboratório de Biologia Celular e Laboratório de Biologia Estrutural pela ajuda e amizade durante esses dois anos. Voltar para a bancada depois de tanto tempo longe devido a pandemia foi difícil e desafiador, mas com a presença e ajuda de todos me senti muito acolhida e mais tranquila. Acredito que um ponto positivo encontrado na pandemia, para mim, foi me aproximar das pessoas com que convivía, ajudar e ser ajudada, e saber que conseguimos passar por esse momento tão difícil sempre apoiando e ajudando uns aos outros.

À todos aqueles que fizeram parte e se tornaram colaboradores do projeto, tornando possível o desenvolvimento desse estudo. Em especial Dr. Rafael Mariante

do Laboratório de Biologia Estrutural e o Dr. Flávio Lara do Laboratório de Microbiologia Celular da Fiocruz e também a Dr<sup>a</sup> Helene Barbosa que me recebeu de braços abertos no Laboratório de Biologia Estrutural desde a iniciação científica, e continuou contribuindo muito para minha formação.

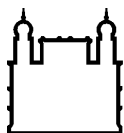
À toda a coordenação, comissão, secretaria e representantes da Pós-Graduação em Biologia Parasitária, em especial Dr. André Luiz Roque, Dr<sup>a</sup>. Roberta Olmo Pinheiro, Dr<sup>a</sup>. Monick Lindenmeyer, Rita Gomes, Aline Tátilla e Hugo Amorim, por todo apoio e tempo disponibilizados, sempre estarem atentos às necessidades dos alunos e desde o começo se mostrarem presentes.

À todos os professores que participaram das disciplinas oferecidas pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária por todos os ensinamentos e dedicação durante a pandemia, por proporcionarem excelentes aulas e se esforçarem ao máximo para que todo o conteúdo necessário fosse entregue aos alunos, apesar das adversidades.

À Fiocruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e demais agências de fomento que financiaram o estudo com auxílio a pesquisa ou bolsa de estudo.



**"A ciência é mais que um corpo de conhecimento, é uma forma de pensar, uma forma cética de interrogar o universo, com pleno conhecimento da falibilidade humana." (Carl Sagan)**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

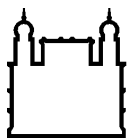
ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA LIBERAÇÃO DE ARMADILHAS EXTRACELULARES NEUTROFÍLICAS (NETs) EM RESPOSTA A INFECÇÃO *IN VITRO* POR *TOXOPLASMA GONDII* E SEU PAPEL NO CONTROLE DA CARGA PARASITÁRIA

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Isabela Silva Macedo**

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório presente no mundo todo, infectando de forma crônica cerca de um terço da população. A ação do sistema imune contra o parasito é essencial para impedir sua disseminação no organismo e evitar graves consequências. As armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs) formam um mecanismo de defesa mediada por neutrófilos que consiste no descondensamento da cromatina que, associada a histonas e peptídeos antimicrobianos, é liberada para o meio extracelular, aprisionando e matando patógenos. Atualmente se sabe que existe duas formas distintas de liberação de NET: rápida/vital e clássica/tardia. A NET rápida é liberada após poucos minutos de indução e mantém a viabilidade do neutrófilo, permitindo a realização de outras funções, enquanto a NET clássica ocorre após algumas horas de indução, levando ao rompimento da membrana celular e consequente a morte do neutrófilo. Esse mecanismo foi demonstrado por neutrófilos de diversos hospedeiros intermediários e definitivo do *T. gondii*, porém o papel das NETs produzidas por neutrófilos humanos em resposta ao parasito e os mecanismos envolvidos no processo ainda necessitam de mais esclarecimento. Sendo assim, nosso objetivo com este trabalho foi caracterizar a produção de NET por neutrófilos humanos em resposta ao *T. gondii* e seu impacto no controle da carga parasitária. Neutrófilos humanos de indivíduos saudáveis foram incubados com taquizoítos da cepa RH (MOI 5:1) por 15 e 180 minutos, representando NET rápida e clássica, respectivamente. Após infecção, sobrenadantes foram coletados e DNA foi quantificado por PicoGreen. Em paralelo, células foram fixadas e processadas para microscopia de imunofluorescência e eletrônica de varredura (MEV). Ensaio de viabilidade e infectividade do parasito foram realizados após interação entre célula e parasito. Nossos resultados mostram que taquizoítos induzem a liberação de NET rápida e clássica por neutrófilos humanos, sendo essas compostas por DNA, histona H1 e mieloperoxidase, com a presença de vacúolos autofágicos, evidenciadas por microscopia de imunofluorescência. A interação analisada por MEV apontou dois fenótipos distintos das NETs nos tempos avaliados, ambos eficientes na associação com o parasito. Através de ensaio com inibidores farmacológicos confirmamos a participação de PAD4 e elastase neutrofílica para liberação de NET clássica e cálcio, ROS, PI3K $\gamma$  e PI3K $\delta$  para NET rápida, sugerindo possível participação de autofagia. Por fim, demonstramos que apesar de aparentar aprisionar os parasitos, as NETs não afetam viabilidade e infectividade do mesmo. Em conjunto, estes dados contribuem com a compreensão de um mecanismo importante da imunidade inata no enfrentamento ao *T. gondii*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETS)  
AGAINST IN VITRO INFECTION OF *TOXOPLASMA GONDII* AND ITS ROLE ON PARASITIC LOAD  
CONTROL

### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

**Isabela Silva Macedo**

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan present worldwide, chronically infecting about one third of the world's population. The action of the immune system against the parasite is essential to prevent its dissemination through the organism and avoid serious consequences. Neutrophil extracellular traps (NETs) form a mechanism of defense mediated by neutrophils that consists of the decondensation of chromatin that, associated with histones and antimicrobial peptides, is released to the extracellular environment, entrapping and killing pathogens. Currently, it is known that there are two distinct forms of NET release: rapid/vital and classic/late. Rapid NET is released after a few minutes of induction and maintains neutrophil viability, allowing the performance of other functions, while classic NET occurs after a few hours of induction, resulting in cell membrane disruption and consequent neutrophil death. This mechanism has been demonstrated by neutrophils from several intermediate and definitive hosts of *T. gondii*, but the role of NETs produced by human neutrophils in response to the parasite and the mechanisms involved in the process still deserve further exploitation. Therefore, our objective with this work was to characterize the production of NET by human neutrophils in response *T. gondii* and its impact on parasite burden control. Human neutrophils from healthy subjects were incubated with tachyzoites of the RH strain (MOI 5:1) for 15 and 180 minutes, representing rapid and classic NET, respectively. After infection, supernatants were collected and DNA was quantified by PicoGreen. In parallel, cells were fixed and processed for immunofluorescence and scanning electron microscopy (SEM). Parasite viability and infectivity assays were performed after cell-parasite interaction. Our results show that tachyzoites induce rapid and classic NET release by human neutrophils, which are composed of DNA, histone H1 and myeloperoxidase, with the presence of autophagic vacuoles, evidenced by immunofluorescence microscopy. The interaction analysed by SEM showed two distinct phenotypes of the NETs in the evaluated times, both efficient in association with the parasite. Through assays with pharmacological inhibitors, we confirmed the participation of PAD4 and neutrophil elastase for the release of classic NET, and calcium, ROS and PI3K for rapid NET, suggesting possible participation of autophagy. Lastly, we demonstrated that despite appearing to entrap the parasites, NETs don't affect their viability and infectivity. Together, these data contribute to the understanding of an important mechanism of innate immunity in the fight against *T. gondii*.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose.....	16
1.2 Resposta imune e liberação de armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs).....	19
1.3 NET em resposta a protozoários.....	23
1.3.1 NET em resposta ao <i>Toxoplasma gondii</i> .....	24
1.4 Justificativa.....	27
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1 Isolamento de neutrófilos sanguíneos humanos.....	29
3.2 Determinação do grau de pureza dos neutrófilos isolados.....	29
3.3 Isolamento de taquizoítos de <i>T. gondii</i> .....	30
3.4 Indução e inibição da produção de NET.....	31
3.5 Avaliação da viabilidade de neutrófilos.....	32
3.6 Quantificação de NET.....	32
3.7 Caracterização estrutural e molecular das NETs.....	33
3.7.1 Microscopia de fluorescência.....	33
3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	33
3.8 Produção de meio condicionado rico em NET.....	34
3.9 Ensaio de infectividade dos taquizoítos.....	34
3.10 Processamento das lamínulas de infectividade.....	35
3.11 Análise do índice de infecção de células VERO.....	35
3.12 Ensaio de viabilidade dos taquizoítos.....	35
3.13 Análise estatística.....	36
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>37</b>
4.1 Neutrófilos humanos liberam NET rápida e clássica em respostas a taquizoítos de <i>T. gondii</i> .....	37

4.2	DNA, histona e mieloperoxidase compõem a estrutura das NETs induzidas por <i>T. gondii</i> .....	38
4.3	Aspecto ultraestrutural das NETs liberadas em resposta a <i>T. gondii</i> .....	41
4.4	Liberação de NET depende de viabilidade de taquizoítos .....	45
4.5	Liberação de NET clássica humana em resposta ao <i>T. gondii</i> é parcialmente dependente de elastase neutrofílica e PAD4 .....	46
4.6	Cálcio intracelular e ROS participam da liberação de NET rápida humana em resposta a <i>T. gondii</i> .....	48
4.7	Inibidor da via de MEK não altera produção de NET rápida e clássica induzidas por <i>T. gondii</i> .....	50
4.8	Liberação de NET rápida em resposta a <i>T. gondii</i> é parcialmente dependente de autofagia .....	51
4.9	NET de neutrófilo humano não afeta viabilidade de <i>T. gondii</i> .....	54
4.10	NET humana não afeta infectividade de <i>T. gondii</i> .....	57
5	DISCUSSÃO .....	60
6	CONCLUSÕES .....	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
8	PUBLICAÇÕES .....	81
	8.1 Extracellular Traps Released by Neutrophils from Cats are Detrimental to <i>Toxoplasma gondii</i> Infectivity.....	81
	8.2 Different Drugs, Same End: Ultrastructural Hallmarks of Autophagy in Pathogenic Protozoa.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Ultraestrutura do <i>Toxoplasma gondii</i>	16
FIGURA 1.2 - Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	17
FIGURA 1.3 - Visão geral da liberação de NETs	21
FIGURA 1.4 - Liberação de NET clássica e rápida	22
FIGURA 3.1 - Purificação de neutrófilos humanos	30
FIGURA 4.1 - Quantificação de DNA-NET em resposta a PMA	37
FIGURA 4.2 - Quantificação de DNA-NET em resposta a <i>T. gondii</i>	38
FIGURA 4.3 - Composição das NETs em resposta a <i>T. gondii</i>	39
FIGURA 4.4 - Associação do <i>T. gondii</i> à estrutura das NETs	40
FIGURA 4.5 - Aspecto ultraestrutural da interação entre NET e <i>T. gondii</i>	42
FIGURA 4.6 - Aspecto ultraestrutural da estrutura da NET rápida	43
FIGURA 4.7 - Aspecto ultraestrutural da estrutura da NET clássica	44
FIGURA 4.8 - Quantificação de DNA-NET em resposta a <i>T. gondii</i> fixado	45
FIGURA 4.9 - Quantificação de DNA-NET com tratamento por citocalasina D	46
FIGURA 4.10 - Quantificação de DNA-NET produzida com tratamento com inibidores de elastase neutrofilia e mieloperoxidase	47
FIGURA 4.11 - Quantificação de DNA-NET produzida com tratamento por cloroamidina	48
FIGURA 4.12 - Quantificação de DNA-NET produzida com tratamento por BAPTA/AM e N-acetilcisteína	49
FIGURA 4.13 - Quantificação de DNA-NET produzida com tratamento por PD98059	50
FIGURA 4.14 - Acúmulo de LC3II em neutrófilos humanos na presença de <i>T. gondii</i>	51
FIGURA 4.15 - Quantificação de neutrófilos positivos para puncta de LC3II na presença de <i>T. gondii</i>	52
FIGURA 4.16 - Quantificação de DNA-NET produzida com tratamento por 3-metiladenina, AS-605240 e IC-87114	53
FIGURA 4.17 - Viabilidade celular de neutrófilos tratados com inibidores	54
FIGURA 4.18 - Monitoramento da liberação de NET humana e viabilidade de <i>T. gondii</i>	55
FIGURA 4.19 - Viabilidade de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	56

<b>FIGURA 4.20 - Monitoramento da viabilidade de <i>T. gondii</i> em contato com NETs</b>	<b>57</b>
<b>FIGURA 4.21 - Quantificação de DNA-NET em meios condicionados produzidos para os ensaios de infectividade</b>	<b>58</b>
<b>FIGURA 4.22 - Infecção de células VERO com taquizoítos tratados com NET</b>	<b>59</b>
<b>FIGURA 5.1 - Composição da estrutura das NETs liberadas em resposta a protozoários da subclasse coccídea</b>	<b>61</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

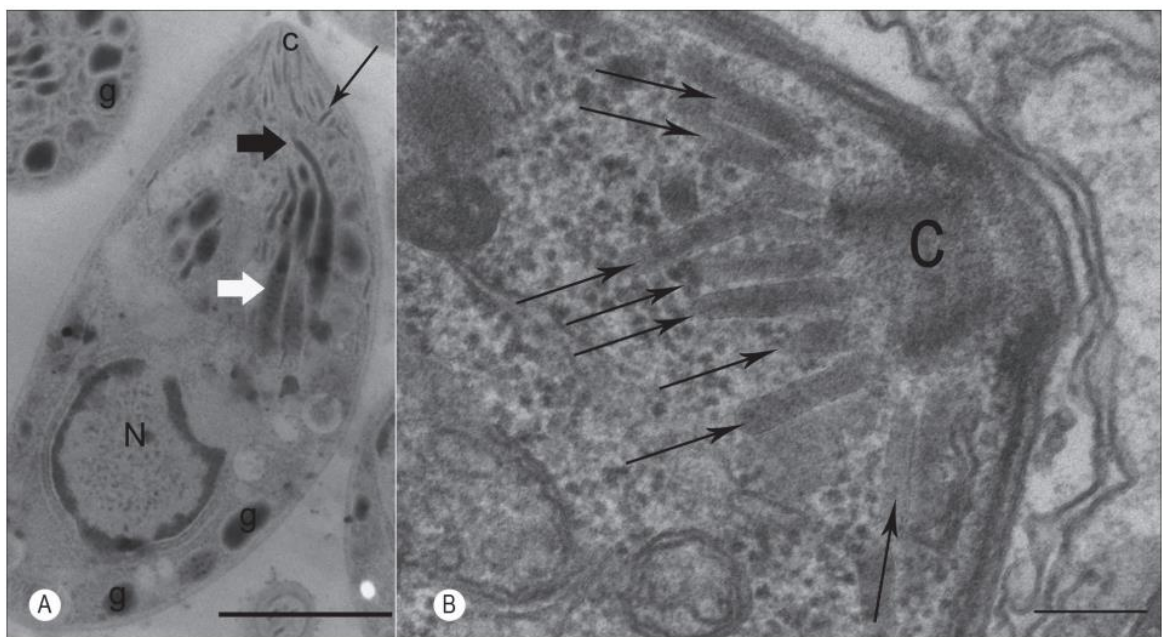
3-MA	3-metiladenina
Acs	Autoanticorpos
As60	AS605240 (inibidor de PI3K $\gamma$ )
BAPTA	BAPTA-AM (quelante de cálcio intracelular)
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cit-D	Citocalasina-D
Cl-A	Cloroamidina
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GA	Glutaraldeído
IC87	IC87114 (inibidor de PI3K $\delta$ )
MAPKs	Proteínas quinase ativadas por mitógeno
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MPO	Mieloperoxidase
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NE	Elastase neutrofílica
NETs	Armadilhas extracelulares neutrofílicas
PAD4	Peptidil arginina deiminase-4
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução tampão de fosfato
PD98	PD98059 (inibidor de MEK)
PE	Penicilina-estreptomicina
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinases
PKC	Proteína quinase c
PMA	Forbol 12-Miristato 13-Acetato
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
VERO	Célula epitelial renal de macaco verde africano



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

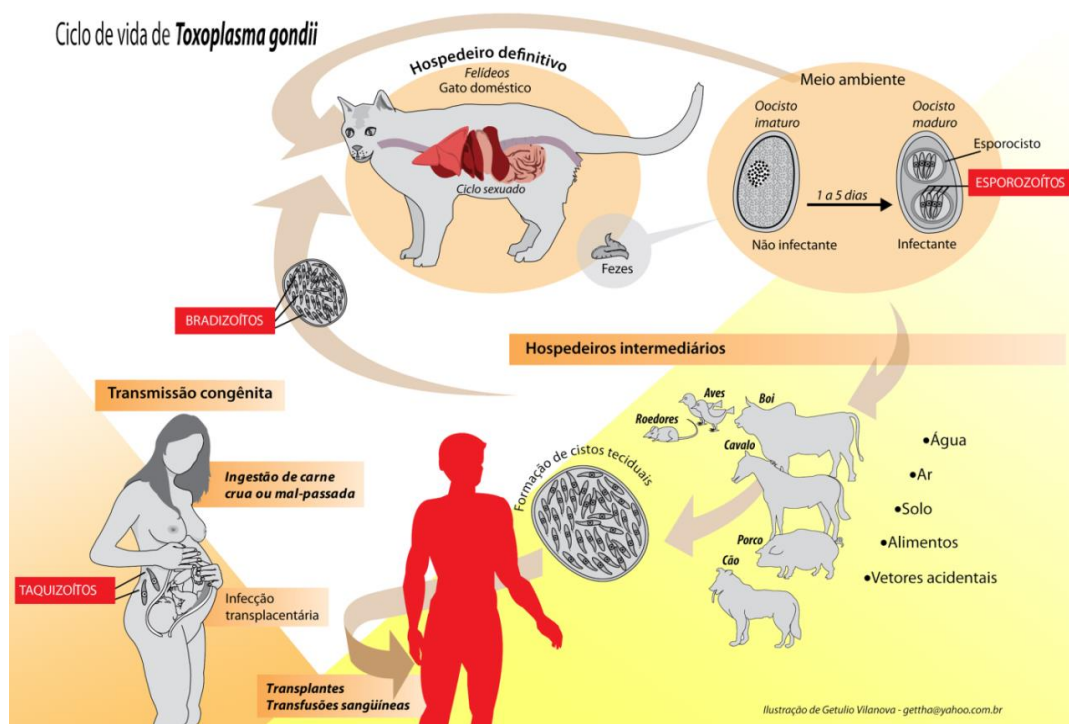
O *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, descoberto em 1908 paralelamente no Brasil, por Alfonso Splendore, e na Tunísia, por Charles Nicolle e Louis Manceaux, a partir do isolado de coelhos e roedores infectados (Nicolle & Manceaux 1908; Splendore 1908). Pertencente ao filo Apicomplexa, é o agente causador da toxoplasmose, sendo a única espécie do gênero *Toxoplasma*, capaz de infectar todos os animais de sangue quente, incluindo o homem, um de seus hospedeiros intermediários (Webster & Dubey 2022). O protozoário possui um corpo celular alongado com aproximadamente 8  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2  $\mu\text{m}$  de largura, e um complexo apical característico do filo ao qual pertence, incluindo o conóide e organelas secretórias, necessários para a invasão da célula hospedeira (Figura 1.1) (de Souza et al. 2014).



**Figura 1.1. Ultraestrutura do *Toxoplasma gondii*.** Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando as principais organelas secretórias do parasito. A - Regiões como núcleo (N), conóide (C), micronemas (seta fina), grânulos densos (g) e róptrias (setas largas) são evidenciadas. B - Região anterior de um taquizoíta de *T. gondii* evidenciando a extremidade apical, destacando o conóide (C) e vários micronemas, assinalados pelas setas. Barras: A – 1  $\mu\text{m}$ . B – 0,5  $\mu\text{m}$ . (de Souza et al. 2014).

O ciclo de vida do parasito é complexo e inclui três estágios evolutivos principais (Figura 1.2). A forma taquizoíto está presente na fase de rápida replicação e é capaz de infectar todos os tipos celulares nucleados, estabelecendo um vacúolo parasitóforo no interior dessas células. Através da endodiogenia, forma de replicação assexuada em que duas células filhas são geradas no interior de uma célula mãe, o protozoário se replica rapidamente, dando início à fase aguda da infecção. É um estágio evolutivo de extrema importância, também presente na transmissão vertical durante a gravidez, podendo comprometer a vida do feto, levando à má formação, problemas oculares, mentais e inclusive ao aborto (de Souza 1974; Dubey 1998).

No hospedeiro, após intensa replicação do parasito, a infecção avança para a fase crônica, com a conversão dos taquizoítos a bradizoítos, que possuem taxa de replicação mais lenta e se estabelecem em cistos teciduais. Mesmo que sejam capazes de se desenvolver em qualquer tecido, o parasito tem prevalência por tecido muscular e nervoso, incluindo músculo cardíaco, esquelético, e órgãos como o cérebro e olhos. Assim formados, os cistos teciduais podem permanecer com o hospedeiro por toda a vida, de forma latente, uma vez que a resistente parede cística pode promover uma barreira contra o sistema imune, favorecendo a sobrevivência do parasito (Dubey et al. 1998; Weiss & Kim 2000).



**Figura 1.2. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.** Vias de transmissão entre hospedeiros intermediários e definitivos (Moura et al. 2009).

Uma terceira forma evolutiva, igualmente importante no ciclo do parasito, é o esporozoíto. Apesar de possuir uma diversidade muito grande de hospedeiros intermediários, o *T. gondii* tem como único hospedeiro definitivo os felídeos, que possuem em seu epitélio intestinal um ambiente favorável para a reprodução sexuada do parasito (Martorelli Di Genova et al. 2019). Essa forma de reprodução se inicia com a esquizogonia a partir de bradizoítos, originando diversos estágios enteroepiteliais ainda não muito bem descritos, resultando em oocistos imaturos, não esporulados, cada um contendo dois esporocistos com quatro esporozoítos cada no seu interior. Esses oocistos são liberados no ambiente, junto às fezes dos felídeos, e sofrem processo de maturação (esporulação), se tornando uma fonte altamente infecciosa de contaminação (Hill & Dubey 2002). Logo, ao ingerir cistos teciduais presentes em carnes e vísceras de presas infectadas, além da possibilidade do parasito se estabelecer de forma crônica no hospedeiro definitivo, também se reproduz de forma sexuada levando a formação de oocistos (Tenter et al. 2000; Dubey 2009).

Uma das formas mais comuns de infecção é a ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos e o consumo de carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais (Dubey 2009). Uma vez ingeridos, cistos e oocistos sofrem ação de enzimas proteolíticas do estômago, que digerem a parede cística liberando o parasito, que ao infectar células enteroepiteliais realizam a estágio-conversão para a forma taquizoíta, iniciando a fase aguda da infecção e dando continuidade ao seu ciclo de vida. Outras formas de infecção incluem a transmissão placentária, da mãe para o feto, e também transfusão sanguínea e transplantes de órgãos (Khurana & Batra 2016; Alvarado-Esquivel et al. 2018).

A infecção em indivíduos saudáveis se manifesta com sintomas leves ou até de forma assintomática. Porém, os danos causados pela doença podem acometer a vida desde a gravidez até a fase adulta, levando a quadros encefalíticos, alterações oculares e neurológicas, podendo ser mais graves em pacientes imunossuprimidos, como portadores do vírus HIV e recém-transplantados, que geralmente possuem o sistema imune debilitado (Hill & Dubey 2002).

O *T. gondii* é um agente infeccioso bem-sucedido, encontrando-se amplamente distribuído no globo. Estima-se que um terço da população mundial esteja cronicamente infectada pelo parasito, com soroprevalência variando de 8 a 80%, a depender da região e levando-se em conta aspectos ambientais, culturais e outros

que podem favorecer o contato com o protozoário (Pappas et al. 2009). A facilidade na dispersão e a resistência dos oocistos podem ser vistos como importantes fatores na disseminação parasitária, justificando sua existência em todos os continentes e em diversos ambientes para além do terrestre, ampliando o número de espécies capazes de se tornarem hospedeiros intermediários (Aguirre et al. 2019; Shapiro et al. 2019).

Em 2012, a prevalência de toxoplasmose no Brasil foi alvo de estudo por Dubey e colaboradores, que revisaram o estado da toxoplasmose em humanos e animais no país. A distribuição da doença em todos os estados chama atenção, em especial para gestantes e crianças, e para a prevalência sorológica entre gatos selvagens. Além disso, estudos apontam que a falta de saneamento básico e tratamento de água e a presença de gatos nos centros urbanos brasileiros podem ser de extrema importância quando relacionados a casos de toxoplasmose em crianças e principalmente em pessoas de baixo nível socioeconômico (Bahia-Oliveira et al. 2003; Dattoli et al. 2011). Os surtos de toxoplasmose podem ser notados em algumas cidades brasileiras no decorrer dos anos, como observado recentemente em cidades de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul (Malta et al. 2019; Neves 2019). Acredita-se que cerca de 35% dos surtos de toxoplasmose registrados no mundo tem proveniência no Brasil, tendo como foco da contaminação, em sua maioria, reservatórios de água contaminados por oocistos e fontes de carne contaminadas com cistos teciduais, o que gera grande preocupação para a população em relação aos riscos causados pela infecção (Almeida 2020; Conceição et al. 2021).

## **1.2 Resposta imune e liberação de armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs)**

A resposta imune constitui um importante fator de defesa contra patógenos, envolvendo diversos tipos celulares e mecanismos específicos antimicrobianos, capazes de combater a infecção (Parkin & Cohen 2001). Em relação a infecção causada pelo *T. gondii*, após ultrapassar a barreira epitelial intestinal de seus hospedeiros, a presença do parasito leva a uma rápida ativação do sistema imune e

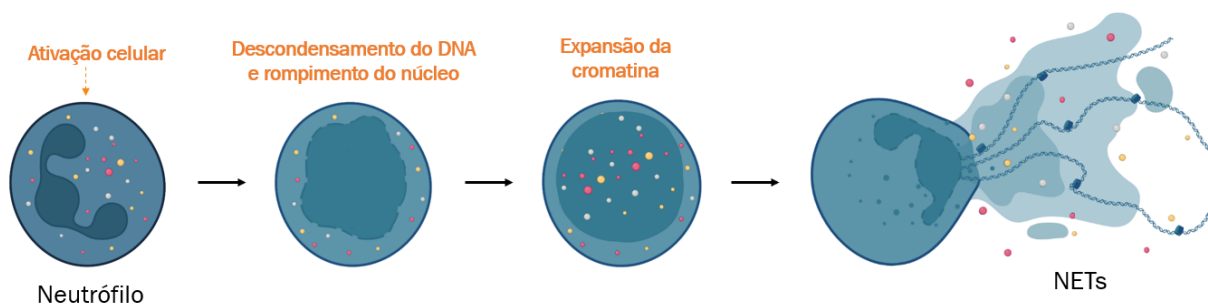
recrutamento de células como os neutrófilos para os locais de infecção, sendo encontrados de forma predominante (Snyder & Denkers 2020).

Os neutrófilos são as células sanguíneas leucocitárias mais abundantes na circulação, constituindo cerca de 70% da população celular geral, e são um dos primeiros tipos celulares recrutados para mediar a resposta imune inata na defesa do organismo (Liew & Kubes 2019). Possuem um formato arredondado com diâmetro entre 7 a 10  $\mu\text{m}$ , comportam um núcleo lobulado característico e grânulos citoplasmáticos específicos, contendo proteínas neutrofílicas (Borregaard 2010). São células muito importantes e de rápida resposta, possuindo um vasto número de receptores capazes de reconhecer mediadores inflamatórios solúveis e organismos estranhos no sangue e nos tecidos, resultando em ativação e migração celular (Hallett & Lloyds 1995; Kolaczowska & Kubes 2013). Uma vez produzidos e direcionados aos locais de infecção ou inflamação tecidual, estas células podem apresentar diferentes fenótipos com variadas funções, e sua relevância no sistema imune pode ser compreendida uma vez que a diminuição de neutrófilos no sangue pode levar a uma imunodeficiência alta e graves consequências (Bliss et al. 2001; Silvestre-Roig et al. 2016).

Dentre os mecanismos de defesa dos neutrófilos, estão a fagocitose, mecanismos oxidativos, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo complexo enzimático da NADPH oxidase, processos não oxidativos, como a liberação de peptídeos antimicrobianos e proteases (Segal 2005) e as armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs) (Brinkmann et al. 2004).

Em 2004, Brinkmann e colaboradores descreveram a liberação das NETs como um processo ativo, que consiste na extrusão de cromatina descondensada associada a histonas que, em conjunto com peptídeos antimicrobianos e proteases, podem levar ao aprisionamento e morte de microrganismos (Brinkmann et al. 2004). Sua formação se inicia a partir da ativação de neutrófilos, e pode ser desencadeada por diversos estímulos químicos ou biológicos. A partir do reconhecimento celular por receptores, se inicia uma cascata de ativação que envolve proteases que auxiliam no descondensamento da cromatina. Em seguida, a clivagem da proteína gasdermina D contribui para a formação de poros nas membranas nuclear e celular, auxiliando no extravasamento da cromatina para o citoplasma, e por fim, há liberação do conteúdo do citoplasma para o meio extracelular, onde as NETs são

formadas (Figura 1.3) (Remijsen et al. 2011; Sollberger et al 2018; Hamam & Palaniyar 2019; Thiam et al. 2020).

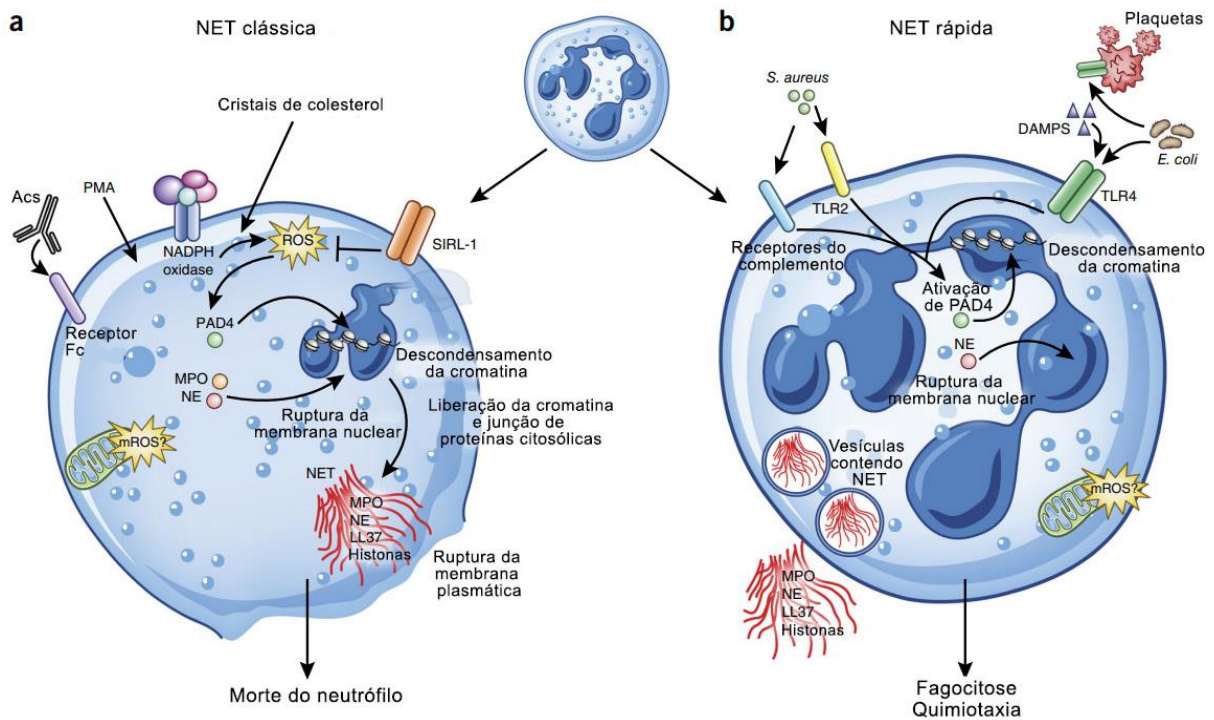


**Figura 1.3. Visão geral da liberação de NETs.** Esquema representativo de etapas necessárias para a liberação de NET, que se inicia com a ativação celular, seguido do descondensamento do DNA e rompimento do núcleo, levando à expansão da cromatina e associação com peptídeos antimicrobianos e proteases (estruturas arredondadas e coloridas), para então liberação do conteúdo para o meio extracelular (criado com BioRender.com).

Hoje se sabe que as NETs podem ser liberadas por duas formas distintas: rápida/vital ou clássica/suicida (Figura 1.4). Na liberação rápida, independente de ROS, pode haver envolvimento da via da peptidil arginina deiminase-4 (PAD4), onde há ativação neutrofílica a partir de 5 minutos e as NETs são transportadas em vesículas até serem liberadas no ambiente externo, sem comprometer a integridade celular; e mesmo após liberar todo o conteúdo nuclear o neutrófilo ainda consegue realizar atividades como migração e fagocitose (Pilszczek et al. 2010; Yipp et al. 2012; Saffarzadeh et al. 2014). A liberação clássica/tardia pode ser ativada pela proteína quinase c (PKC) ou por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), dependentes de ROS, levando o neutrófilo à morte por meio do rompimento da membrana plasmática para liberação do conteúdo (Brinkmann et al. 2004; Fuchs et al. 2007).

Alguns trabalhos vêm demonstrando que a origem do neutrófilo e a natureza do estímulo utilizado para ativação das células e indução da liberação de NETs levam a diferentes respostas e mecanismos (Parker et al. 2012; Kenny et al. 2017; Estúa-Acosta et al. 2019). Alguns dos mecanismos que estão envolvidos são a citrulinização de histonas e proteases, como elastase neutrofílica (NE) e mieloperoxidase (MPO), como auxiliares do descondensamento do DNA (Papayannopoulos et al. 2010; Pieterse et al. 2018). Além disso, a produção de

ROS, seja mitocondrial ou pelo complexo da NADPH oxidase, e o influxo de cálcio, podem ser cruciais para a formação de NETs (Ravindran et al. 2019; Zeng et al. 2019).



**Figura 1.4. Liberação de NET clássica e rápida.** (a) Diferentes estímulos, como forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA), autoanticorpos (Acs) e cristais de colesterol induzem NET clássica, após longo tempo de estímulo, com envolvimento de NADPH oxidase, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), peptidil arginina deiminase-4 (PAD4), mieloperoxidase (MPO) e elastase neutrofílica (NE). Nesse caso, a membrana celular é rompida, liberando NET para o meio extracelular e levando à morte o neutrófilo. (b) NET rápida pode ser induzida em poucos minutos por plaquetas ativadas, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, com participação de PAD4 e NE, resultando na liberação de NET através de vesículas, mantendo a viabilidade celular (Adaptado de Jorch & Kubes 2017).

Um dos mecanismos que também vêm sendo associado à produção de NETs é a autofagia, via conservada de reciclagem intracelular em eucariotos, disparada em situações de estresse nutricional e infecções por patógenos (Besteiro 2012; Lopes et al. 2013). Nos últimos anos, a associação entre autofagia e NET vem sendo proposta, sendo o envolvimento de ROS demonstrado em ambos os eventos. Estudos apontam que neutrófilos frente a diferentes estímulos necessitam em parte da autofagia para a liberação de NET, auxiliando na citrulinização de histonas e tendo um papel essencial na resposta imune contra protozoários (Itakura & Mccarty 2013;

Zhou et al. 2019). Por outro lado, Pieterse e colaboradores (2016) mostraram que a autofagia pode estar relacionada ou não à liberação de NET dependendo da condição a qual a célula se encontra, sugerindo assim, a existência de NET dependente e independente de autofagia.

As vias envolvidas na formação de NET, contudo, ainda não estão totalmente esclarecidas. Apesar de vias canônicas da NET rápida e clássica serem descritas com estímulos específicos, outras vias como fosfoinosítideo 3-quinases (PI3K), via relacionada tanto à NET quanto a autofagia, também podem ser importantes para a cascata de sinalização que leva à liberação de NET (Germic et al. 2017; Van der Linden et al. 2017). Sendo assim, novos estudos de investigação das vias e mecanismos relacionados à produção de NETs se fazem necessários.

### **1.3 NET em resposta a protozoários**

Embora as NETs tenham sido descritas inicialmente em resposta a bactérias, com o passar do tempo foi demonstrado que a ativação neutrofílica induzida por outros patógenos também leva à liberação de NET, incluindo diversas espécies de fungos, vírus, helmintos e protozoários (Delgado-Rizzo et al. 2017). As infecções causadas por protozoários, tendo como alguns de seus representantes espécies de *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Entamoeba*, podem levar a complicações à saúde humana e animal. Além disso, a resistência a drogas pode dificultar um tratamento eficiente contra estes parasitos. Logo, como um mecanismo natural da defesa imune, se fez necessário entender e desvendar o papel das NETs na resistência a esses patógenos (Andrews et al. 2014).

Muitos estudos *in vitro* mostram a liberação de NET induzida por protozoários sendo dependente do tempo e concentração do estímulo (Wei et al. 2021). Dentre os mecanismos envolvidos, a produção de ROS, envolvimento de NE, MPO e PAD4, além da via de ERK 1/2 e p38 MAPK se mostram importantes, uma vez que a inibição destas vias em tempos mais longos de indução com os patógenos reduz a liberação de NETs (Sousa-Rocha et al. 2015; Dias-Godinez et al. 2018; Li et al. 2018; Wei et al. 2021). Os mecanismos e a sinalização que levam à ativação celular podem vir a ser distintos entre neutrófilos originados de diferentes hospedeiros (Wei et al. 2016; Villagra-Blanco et al. 2017; Macedo et al. 2020).



O gênero *Leishmania* foi um dos primeiros protozoários a serem descritos induzindo a liberação de NET, mostrando que mesmo não sendo um mecanismo exclusivo e majoritário dos neutrófilos, as NETs têm grande relevância contra o parasito (Guimarães-Costa et al. 2009; Wardini et al. 2019). Apesar de diferentes espécies do gênero induzirem a liberação, os mecanismos envolvidos na ativação neutrofílica podem variar (Gabriel et al. 2010). Em 2015, Souza-Rocha e colaboradores enfatizaram a importância das NETs contra *Trypanosoma cruzi*, que acarretou no aprisionamento dos parasitos *in vitro*, sem comprometer sua viabilidade. Levando em conta a necessidade da motilidade desses parasitos para a infecção de células hospedeiras e sua sobrevivência, o tratamento *in vivo* com NET se mostrou eficiente na redução do número de parasitos na corrente sanguínea de camundongos infectados.

De forma geral, o tratamento com NET por longos períodos pode acarretar na perda de viabilidade celular (Sousa-Rocha et al. 2015). Porém, mesmo com sua capacidade de aprisionar e matar patógenos, alguns microrganismos, incluindo protozoários, produzem nucleases específicas que podem levar ao escape das NETs e contribuir para sua sobrevivência, como observado com *Leishmania* (Guimarães-Costa et al. 2014).

### **1.3.1 NET em resposta ao *Toxoplasma gondii***

Atualmente se sabe que há liberação de NET em resposta ao *T. gondii* por neutrófilos de diversos hospedeiros do parasito (Debierre-Grockiego et al. 2020). Em 2011, Abi Abdallah e colaboradores mostraram pela primeira vez neutrófilos humanos liberando NET frente à infecção por taquizoítos de cepas com variados graus de virulência. A liberação de NET foi mostrada a partir de 2 horas de interação com participação da via de MAPK-ERK. Além disso, NET de neutrófilos murinos se mostrou importante no aprisionamento e redução da viabilidade do parasito levando à diminuição da taxa de infecção de fibroblastos *in vitro*. Em ensaios *in vivo*, foi detectado MPO em tecido pulmonar bem como NET no fluido broncoalveolar de camundongos infectados por instilação intranasal, indicando que há liberação de NET em resposta ao parasito, o que pode influenciar no curso da infecção (Abdallah et al. 2011).

Desde então o estudo da liberação de NET em resposta ao *T. gondii* vem sendo abordado com neutrófilos de diferentes hospedeiros intermediários do

parasito como foca (Reichel et al. 2015), ovelha e boi (Yildiz et al. 2017), burro (Yildiz et al. 2019), golfinho (Imlau et al. 2020), cachorro (Karakurt & Yildiz. 2020; Wei et al. 2020). Em todos estes trabalhos a indução foi realizada com taquizoítos da cepa clonal RH, de alta virulência, levando a liberação de NET de forma tempo e dose dependente. Histonas, NE e MPO foram detectados em associação com DNA, constituindo uma estrutura clássica das NETs.

Ao avaliar os mecanismos envolvidos, foi visto que atividades de NE, MPO, NADPH oxidase e p38 MAPK são aumentados na presença do parasito (Reichel et al. 2015; Yildiz et al. 2019; Karakurt & Yildiz. 2020; Wei et al. 2020), e ensaio com inibidores comprovou que NE, MPO e NADPH oxidase são fundamentais para liberação de NET em resposta ao *T. gondii* (Reichel et al. 2015; Wei et al. 2020). Porém, parece haver divergência nos mecanismos participantes entre neutrófilos de diferentes espécies. A produção de ROS, que parece ter participação nas NETs liberadas por neutrófilos de alguns hospedeiros intermediários (Yildiz et al. 2019; Karakurt & Yildiz, 2020; Wei et al. 2020), não apresentou o mesmo perfil em ensaios com neutrófilos de golfinho, onde o estímulo com o parasito induz liberação de NET, porém não há geração de ROS (Imlau et al. 2019).

Em relação à relevância das NETs contra os taquizoítos, o aprisionamento do parasito é exibido em imagens de imunofluorescência e microscopia eletrônica de varredura. Porém, enquanto de um lado neutrófilos de boi produzem NET com efeito letal, por outro NET de ovelha e burro não levam à morte o parasito, mostrando, mais uma vez, as diferenças apresentadas na liberação de NET induzida pelo mesmo patógeno em neutrófilos de diferentes espécies hospedeiras (Yildiz et al. 2017; Yildiz et al. 2019). De certa forma, as NETs se mostraram eficientes contra o *T. gondii*, uma vez que o índice de infectividade foi diminuído após o tratamento do parasito com NET. Interessantemente, Wei e colaboradores (2020) revelaram que neutrófilos estimulados para liberação de NET com zimosan e tratados com taquizoítos de RH apresentam menos NETs do que o grupo não tratado, sugerindo que o parasito leve à degradação das NETs, o que poderia explicar um possível escape do *T. gondii*, como já foi visto com *Leishmania* e outros microrganismos (Seper et al. 2013; de Buhr et al. 2014; Guimarães-Costa et al. 2014).

Com o intuito de investigar a produção de NET no hospedeiro definitivo, nosso grupo demonstrou que neutrófilos de gato são capazes de liberar NET clássica e rápida em resposta a taquizoítos da cepa RH e também da cepa cistogênica ME49,

de moderada virulência. Em comparação, a cepa RH se mostrou maior indutora, com liberação de NET crescente ao longo do tempo, o que não foi visto com a cepa ME49, que manteve os níveis de dosagem de DNA constantes durante todo o período de análise. Seguindo o estudo com a cepa RH, identificamos componentes clássicos em sua estrutura e participação de NE, cálcio intracelular e a via da PI3K (Macedo et al. 2020). Além disso, assim como foi visto com neutrófilos de alguns de seus hospedeiros intermediários, neutrófilos de gato são capazes de aprisionar e reduzir a viabilidade de taquizoítos resultando em diminuição da sua infectividade. Lacerda e colaboradores (2019) realizaram um trabalho em paralelo ao nosso e também observaram que neutrófilos de gatos induzem liberação de NETs, sem entrar em maiores detalhes sobre os mecanismos envolvidos. Mais recentemente, nossos dados foram corroborados por Simsek e colaboradores (2021), que mostraram também a presença de NE dentre os componentes das NETs liberadas por gatos. Sendo assim, sugerimos que a produção de NET é um mecanismo conservado entre as diferentes espécies de hospedeiros, intermediários e definitivos.

Depois de uma década desde o primeiro estudo de produção de NET por neutrófilos humanos contra o protozoário, Miranda e colaboradores (2021) mostraram a diferença na resposta imune de neutrófilos entre indivíduos saudáveis e pacientes infectados pelo *T. gondii* e examinados nas fases aguda e crônica da doença. Apesar de todos possuírem número semelhante de neutrófilos circulantes, pacientes infectados em fase aguda, mas não em fase crônica, apresentaram neutrófilos com elevado grau de ativação. Além disso, metabolismo mitocondrial, gasdermina D, elastase neutrofílica e ROS se mostraram cruciais na liberação de NET *in vitro*. Por fim, o grupo mostrou *in vitro* a importância das NETs na ativação e migração de neutrófilos e na amplificação da resposta imune adaptativa, com recrutamento de linfócitos e produção de citocinas importantes na infecção pelo protozoário.

## 1.4 Justificativa

Tendo em vista a ampla distribuição do *T. gondii* em plano mundial, acarretando graves danos, principalmente em mulheres gestantes e pacientes imunocomprometidos, compreender o papel da imunidade inata na infecção pelo parasito é de fundamental importância para se buscar estratégias que visem à prevenção e o combate à infecção.

As armadilhas neutrofílicas extracelulares vêm ganhando muita atenção nos últimos tempos, como um importante fator de defesa imune dos neutrófilos contra diversos microrganismos. Hoje se sabe que neutrófilos de ambos os hospedeiros intermediários e definitivo do *T. gondii* respondem ao parasito liberando NETs; porém, diante da variedade encontrada na resposta entre neutrófilos de diferentes espécies, da carência do entendimento dos mecanismos envolvidos no processo, e do efeito das NETs humanas na infecção, se faz necessário o aprofundamento do estudo do papel das NETs produzidas por neutrófilos humanos em resposta ao parasito.

Desde 2011 foi evidenciado que neutrófilos humanos se mostraram competentes na liberação de NET em resposta ao *T. gondii*, participando não só no aprisionamento dos parasitos, mas também tendo um papel fundamental na resposta imune como um todo, influenciando o recrutamento de outras células do sistema imune. Contudo, é necessário entender se há uma resposta rápida de liberação de NETs contra o parasito, as vias e mecanismos moleculares envolvidos, e de que forma os diferentes tipos de NET podem ser vistos como um mecanismo efetivo contra o protozoário.

Logo, a execução deste projeto propõe avanços na compreensão da liberação de NETs por neutrófilos humanos *in vitro*, como um mecanismo de defesa do sistema imune, contra o *T. gondii*, de forma a esclarecer melhor o papel das NETs na infecção contra o protozoário.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar os mecanismos moleculares envolvidos na produção de NET por neutrófilos humanos em resposta a taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH, e seu impacto no controle da carga parasitária *in vitro*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Analisar a produção de NET rápida e clássica induzida por taquizoítos da cepa RH;
- b) Avaliar ultraestruturalmente a resposta de neutrófilos e a produção de NET frente à infecção;
- c) Determinar os mecanismos moleculares envolvidos na produção de NET em resposta ao parasito;
- d) Investigar o papel da autofagia no controle da liberação de NET em resposta ao parasito;
- e) Investigar o papel das NETs na viabilidade e capacidade infectiva do parasito.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Isolamento de neutrófilos sanguíneos humanos**

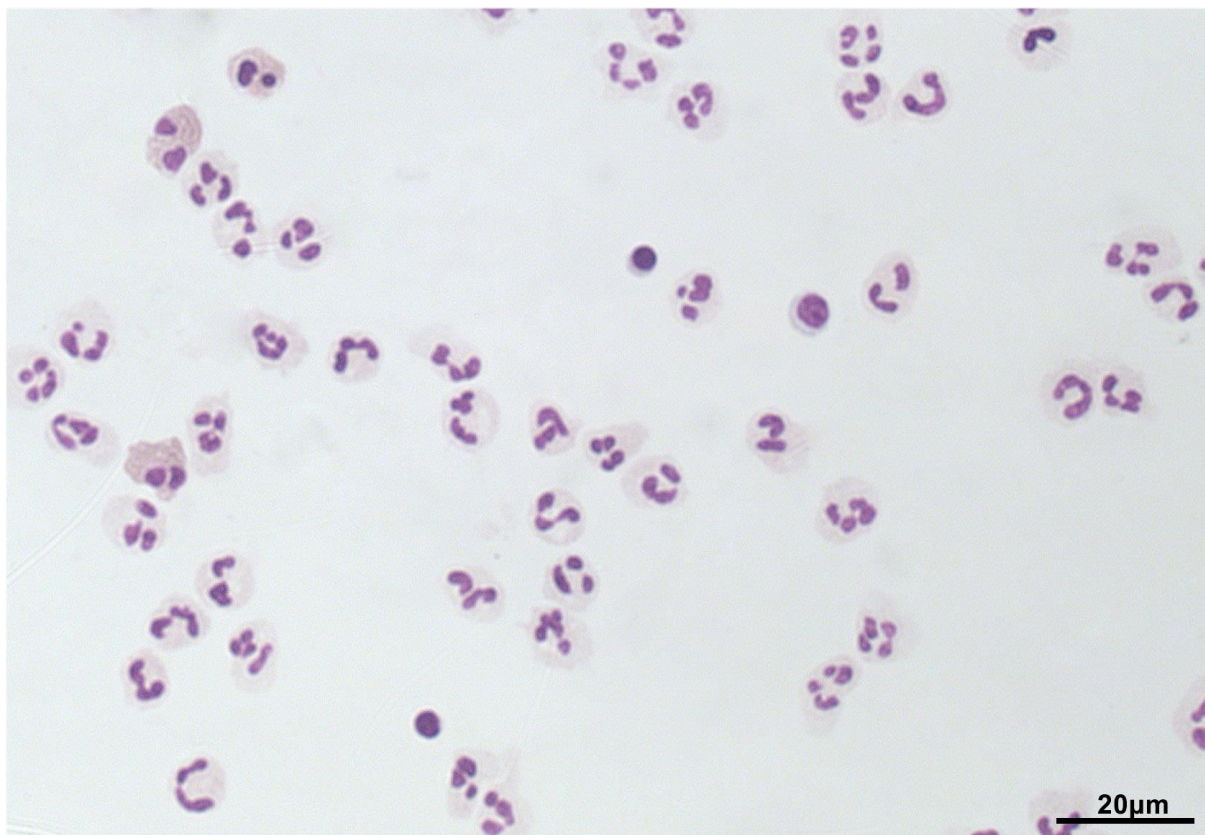
A obtenção de neutrófilos se deu por meio da purificação de sangue periférico por separação em Ficoll-Paque. Em tubo cônico de 15 ml contendo Ficoll-Paque (na metade do volume do sangue obtido), o sangue é colocado cuidadosamente para que não ocorra mistura com o Ficoll. O tubo foi centrifugado a  $400 \times g$  por 30 minutos, sem freio. Após centrifugação, a porção contendo células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) é descartada e a camada de neutrófilos contendo hemácias contaminantes é recolhida. Em novo tubo cônico de 50 ml é feita lise de hemácias com solução hipotônica de NaCl 0,2% por 1 minuto, seguido de neutralização da lise por NaCl 1,6%. No total, são feitas duas lises seguidas de uma lavagem com PBS 1x e mais uma última lise, etapas essas intercaladas por centrifugação a  $200 \times g$  por 7 minutos e descarte do sobrenadante. O pellet final é resuspendido em RPMI suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina (PE) e 1% de glutamina 200 mM, e as células são quantificadas em câmara de Neubauer para, em seguida, serem utilizadas nos experimentos.

Este projeto dispõe de um Certificado de Apresentação para Apreciação Ética aprovado, para coleta de sangue periférico humano (CAAE 4261505.4.0000.5257). A coleta foi realizada após o consentimento e autorização dos voluntários, sendo esses indivíduos saudáveis do sexo feminino e masculino na faixa etária entre 24 e 40 anos.

### **3.2 Determinação do grau de pureza dos neutrófilos isolados**

Para determinar o grau de pureza dos neutrófilos, após isolamento e contagem celular é feita uma citocentrifugação em centrífuga Tharmac Cellspin I com 50.000 células a  $200 \times g$  por 7 minutos em lâmina fosca lapidada para microscopia. Após coloração da lâmina pelo método de May-Grunwald-Giemsa, 10 a 15 campos são observados e as células são quantificadas e identificadas de acordo com

morfologia nuclear e coloração características. O isolamento de neutrófilos para experimentos realizados apresentou grau de pureza superior a 88,5% (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Purificação de neutrófilos humanos.** Imagem representativa dos neutrófilos obtidos após purificação em Ficoll-Paque e coloração por Giemsa.

### **3.3 Isolamento de taquizoítos de *T. gondii***

A cepa RH utilizada neste projeto é obtida a partir de culturas celulares e isolados peritoneais de camundongos. Infecção de células VERO (célula epitelial renal de macaco verde africano; ATCC CCL-81) é feita com a forma taquizoíta de *T. gondii* em garrafas de cultura. Após ciclo lítico e liberação de parasitos, o sobrenadante é recolhido e centrifugado a  $200 \times g$  por 5 minutos para a remoção de células VERO. O sobrenadante é, então, transferido para novo tubo cônico de 15 ml e centrifugado a  $1.500 \times g$  por 10 minutos, a fim de concentrar os parasitos. O pellet é ressuspenso em meio RPMI suplementado com 1% de SFB 1% de PE e 1% de glutamina 200 mM. Os taquizoítos são quantificados em câmara de Neubauer para, em seguida, serem utilizados somente nos experimentos de infectividade.

Taquizoítos de RH também são obtidos por meio de inóculos intraperitoneais em camundongos Swiss Webster. Após 72 horas de infecção, o lavado peritoneal é feito com meio RPMI completo. O meio contendo taquizoítos é então centrifugado a 1.500 × g por 10 minutos, e o pellet é ressuspensionado em meio RPMI para uso. Taquizoítos são quantificados em câmara de Neubauer para, em seguida, serem utilizados nos experimentos.

Taquizoítos fixados também foram usados nesse projeto. Para isso, após isolamento os parasitos foram fixados com paraformaldeído 4% (PFA) por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, três lavagens com PBS 1x foram feitas e intercaladas por centrifugações a 1.500 × g por 10 min. Ao fim, o pellet foi ressuspensionado em PBS 1x com 1% de PE e armazenados a 4°C para posterior uso.

Este projeto dispõe de uma licença da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz para utilização de camundongos para manutenção dos parasitos (CEUA/IOC L042-2018-A2).

### **3.4 Indução e inibição da produção de NET**

Para avaliação da produção de NET, usamos como indutores o controle positivo, forbol 12-miristato 13- acetato (PMA) por 180 minutos de indução ou taquizoítos da cepa RH por 15 e 180 minutos de indução (simulando NET rápida e clássica), com carga parasitária de 5:1 (parasito:célula). Para isso,  $1,5 \times 10^5$  neutrófilos foram plaqueados por poço em placas de 96 poços, fundo “U”, seguido do estímulo. Para o uso de inibidores farmacológicos, neutrófilos foram tratados com os mesmos por 20 minutos antes da infecção. Ao final dos tempos de interação, os sobrenadantes dos poços foram recolhidos, centrifugados em tubos de 1,5 ml a 1.500 × g por 10 minutos, e armazenados em novos eppendorfs a - 80°C para posterior dosagem por PicoGreen (item 3.6). Os indutores e inibidores farmacológicos utilizados foram: PMA (100 nM; Sigma-Aldrich), Cit-D (citocalasina D; inibidor de fagocitose; 10 µg/mL; Sigma-Aldrich), iNE (inibidor de elastase neutrofílica; 10 µg/ml; Cayman Chemical), iMPO (4-ABAH; inibidor de mieloperoxidase; 600 nM; Cayman Chemical), As60 (AS605240; inibidor de PI3Kγ; 10 µM; Tocris), IC87 (IC87114; inibidor de PI3Kδ; 1 µM; Cayman Chemical), Cl-A (cloroamidina; inibidor de PAD; 12 µM; Cayman Chemical); PD98 (PD98059; inibidor de MEK; 60 µM; Sigma-Aldrich), BAPTA (BAPTA-AM; quelante de cálcio intracelular;



10  $\mu$ M; Calbiochem), 3-MA (3-metiladenina; inibidor de PI3K; 5 mM; Sigma-Aldrich) e NAC (N-acetilcisteína; molécula antioxidante; 10 mM; Sigma-Aldrich).

### **3.5 Avaliação da viabilidade de neutrófilos**

A fim de avaliar o efeito de agentes farmacológicos na viabilidade celular dos neutrófilos, realizamos um ensaio com o reagente PrestoBlue (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. Para isso, neutrófilos foram plaqueados em placa de 96 poços opaca com fundo transparente, na ausência ou presença de inibidores, simulando ensaio de indução e inibição de NET. As células foram mantidas em estufa por 180 minutos, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, e o reagente PrestoBlue foi adicionado 15 minutos antes do tempo final. Em seguida, a leitura da placa foi feita por espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices), no comprimento de onda 560/590 excitação/emissão. Após a primeira leitura, a placa foi incubada por mais 1 hora na estufa e uma nova leitura foi realizada. Os valores da segunda leitura foram plotados.

Alternativamente, a perda da viabilidade celular foi analisada pela incorporação do corante azul de tripano 0,4% (Sigma-Aldrich), de acordo com protocolo previamente estabelecido (Strober 2001).

### **3.6 Quantificação de DNA-NET**

Para quantificação de DNA associado às NETs presente nos sobrenadantes e armazenados a - 80°C, utilizamos o kit Quant-iT PicoGreen (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Resumidamente, sobrenadantes são pipetados em placa de 96 poços opaca (50  $\mu$ l para cada condição), e o reagente PicoGreen é adicionado no mesmo volume dos sobrenadantes. Após adição do reagente, placa é agitada manualmente e reservada por 5 minutos no escuro, para em seguida ser feita a leitura. A análise foi realizada por espectrofotômetro SpectraMax M3, no comprimento de onda 480/520 nm excitação/emissão.

## **3.7 Caracterização estrutural e molecular das NETs**

### **3.7.1 Microscopia de fluorescência**

Para analisar os componentes moleculares presentes nas NETs, usamos a técnica de microscopia de imunofluorescência. Previamente,  $2,5 \times 10^5$  neutrófilos foram plaqueados por poço em placa de 24 poços sobre lamínulas de vidro 13mm e infectados ou não com taquizoítos na proporção 5:1 (parasito-célula) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 15 e 180 min de interação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram processadas segundo protocolo estabelecido (Brinkmann, 2010), com pequenas alterações, como incubação com anticorpo primário overnight a 4°C e marcação para DNA com DAPI (1 µg/mL). Componentes moleculares e autofagia foram detectados por anticorpos primários monoclonal contra histona H1 feito em camundongo (sc-8030; 1:100; Santa Cruz Biotechnology), policlonais contra mieloperoxidase (PA5-16672; 1:200; Invitrogen) e LC3B (L7543; 1:100; Sigma) feitos em coelho. Parasitos também foram detectados por anticorpo monoclonal contra toxoplasma (P30) feito em camundongo (MA1-83499; 1:100; Invitrogen). Os anticorpos secundários utilizados foram: contra camundongo, Alexa Fluor 488 (A11032; 1:2000; Invitrogen) e Alexa Fluor 546 (A11003; 1:400; Invitrogen), e contra coelho Alexa Fluor 594 (A11037; 1:800; Invitrogen), todos feitos em cabra. Por fim, as lamínulas foram coradas com DAPI e montadas em lâmina com meio de montagem DABCO (D2522; Sigma-Aldrich). A análise foi feita em microscópio Zeiss Axio Imager M1.

### **3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura**

A fim de analisar a estrutura fina das NETs e a sua associação com os parasitos em maiores detalhes, procedemos ao processamento do material para microscopia eletrônica de varredura. Inicialmente,  $2,5 \times 10^5$  neutrófilos foram plaqueados por poço em placas de 24 poços, sobre lamínulas de vidro 13mm, e infectados ou não com taquizoítos na proporção 5:1 (parasito-célula) por 15 ou 180 minutos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após o término da interação as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (GA) diluído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7.2)

contendo 3,5% de sacarose e 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub> por 1 hora. A pós-fixação foi feita com 1% de tetróxido de ósmio diluído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio por 30 minutos, seguido de 2 lavagens com este mesmo tampão. Em seguida, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol (30% > 50% > 70% > 90% > 100% >100% >100%) por 10 minutos em cada concentração. O material foi mantido em etanol 100% até ser levado ao ponto crítico, realizado na plataforma Rudolph Barth do Instituto Oswaldo Cruz. Após esta etapa, o material foi montado em *stubs*, metalizado com ouro e analisado no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM-6390LV.

### **3.8 Produção de meio condicionado rico em NET**

Para análise da viabilidade e infectividade dos parasitos, foi produzido previamente meio condicionado contendo NET. Neutrófilos foram plaqueados na quantidade de  $2 \times 10^6$  por poço em placa de 6 poços, estimulados ou não com taquizoítos de *T. gondii* na proporção 5:1 (parasito:célula), por 180 minutos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Ao fim do tempo, os sobrenadantes foram recolhidos e centrifugados a  $1.500 \times g$  por 10 minutos. Os meios condicionados controle de neutrófilos não estimulados (MC CTR), contendo NET (MC NET), ou contendo NET e filtrado por membrana de poro 0,22 µm (MC NET Filt) foram aliquotados em eppendorfs e armazenados a -20°C para serem usados no dia seguinte.

### **3.9 Ensaio de infectividade dos taquizoítos**

Para analisar o efeito da NET na infectividade do parasito,  $10^5$  células VERO foram previamente plaqueadas por poço em placa de 24 poços, sobre lamínulas de vidro 13 mm em meio DMEM F12 suplementado com 10% de SFB, 1% de PE e 1% de glutamina 200 mM. No dia seguinte, taquizoítos foram tratados em tubos de 1,5 ml por 180 minutos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, com meio RPMI 1% (CTR), MC CTR, MC NET ou MC NET Filt. Em seguida, os parasitos foram utilizados para infectar as monocamadas de células VERO previamente plaqueadas, na proporção 1:1 (célula:parasito) por 3 horas. Após infecção, as lamínulas foram lavadas com meio DMEM F12 e mantidas em estufa por mais 21 horas. Após 24 horas de interação, as

lamínulas foram lavadas, fixadas, coradas por método de Giemsa e quantificadas quanto a taxa de infecção.

### **3.10 Processamento das lamínulas de infectividade**

Para avaliar a infectividade em células VERO, procedemos à coloração das amostras pelo método May-Grunwald-Giemsa. Para tanto, a fixação das células foi feita com solução Bouin por 15 minutos, seguida de duas lavagens com álcool 70% e uma lavagem com água destilada e, por fim, o corante May-Grunwald-Giemsa (filtrado e diluído 1:1 em água destilada) foi adicionado. Após coloração com Giemsa, amostras foram lavadas duas vezes com água destilada e as lamínulas, uma a uma, passam por bateria de desidratação (acetona 100% > acetona 70% + xilol 30% > acetona 50% + xilol 50% > acetona 30% + xilol 70% > xilol 100% > xilol 100%; 3 segundos para cada concentração) e são montadas em Permount. Ao final, as lâminas são analisadas em microscópio de luz.

### **3.11 Análise do índice de infecção de células VERO**

Para determinar a taxa de infecção de células VERO, após coloração com Giemsa e montagem das lâminas procedemos à contagem às cegas do número de células infectadas e do número de parasitos por célula. São analisadas 200 células por lamínula, e por fim o índice de infecção é calculado usando a seguinte fórmula, como já descrito (Moreira-Souza et al., 2015):

$$\text{Índice de Infecção} = \frac{\% \text{ células infectadas} * n^{\circ} \text{ total de parasitos intracelulares}}{n^{\circ} \text{ total de células}}$$

### **3.12 Ensaio de viabilidade dos taquizoítos**

Com o intuito de avaliar o papel da NET na viabilidade dos taquizoítos,  $5 \times 10^5$  neutrófilos foram plaqueados em placa *CELL view* 35 mm e mantidos a 37°C por 30 min. Após o tempo, a placa foi lavada para remover células não aderentes e

parasitos da cepa RH na proporção 5:1 (parasito:célula) foram adicionados. Em seguida, iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) na concentração 3 µg/mL foi adicionado a fim de detectar morte de neutrófilos e de parasitos com o passar do tempo. Após a adição dos parasitos e de iodeto de propídeo a interação foi monitorada e registrada por 270 minutos seguidos em time-lapse no microscópio Zeiss Axio Observer.Z1. Imagens foram adquiridas por câmera HMR Axiocam monochrome operado por software Zeiss Zen 3.1. A temperatura e foco durante análise em *time-lapse* foram mantidas usando Módulo de Controle de Temperatura e Dispositivo Foco Definitivo Zeiss ao longo da interação.

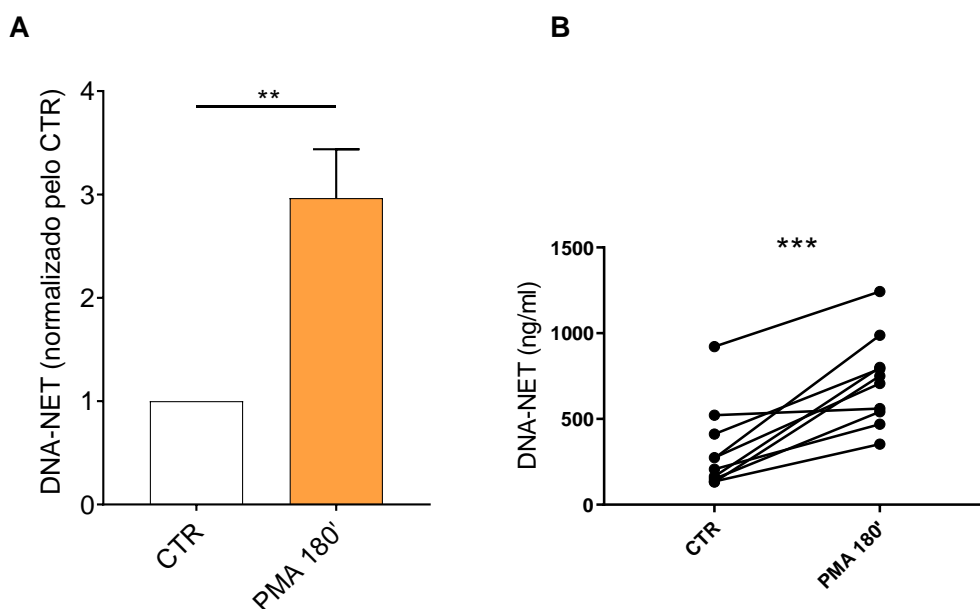
### **3.13 Análise estatística**

Os dados dos gráficos estão apresentados como média e erro padrão da média. As comparações entre os grupos foram feitas por teste-*t* de Student pareado ou One-Way ANOVA com medidas repetidas com correção Geisser-Greenhouse e teste de comparações múltiplas de Tukey, quando apropriado. Diferença de  $p < 0.05$  foram consideradas significantes. O software GraphPad Prism 7.0 foi utilizado para todas as análises.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Neutrófilos humanos liberam NET rápida e clássica em resposta a taquizoítos de *T. gondii*

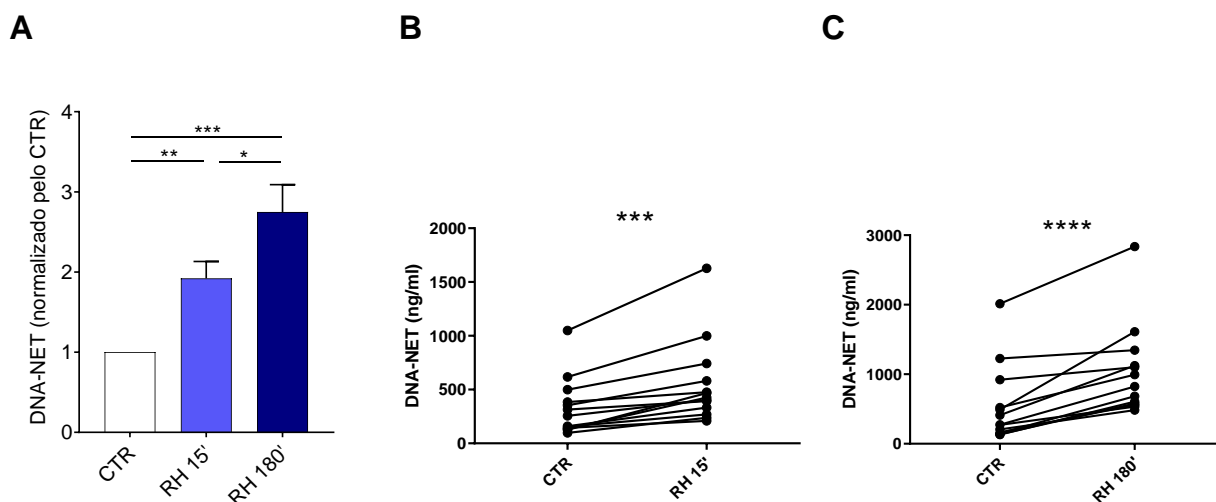
A fim de evidenciar a liberação de NET por neutrófilos humanos, iniciamos o estudo avaliando a capacidade dessas células para a liberação de NET com estímulo já conhecido, o PMA, utilizado aqui como controle positivo de indução da liberação de NET (Figura 4.1). Como esperado, após 180 minutos foi possível observar que a dosagem de DNA, componente central da estrutura das NETs, sinaliza a aptidão dos neutrófilos de nossos experimentos para este mecanismo.



**Figura 4.1. Quantificação de DNA-NET em resposta a PMA.** Neutrófilos humanos foram estimulados com PMA (100 nm) por 180 min. (A) O DNA nos sobrenadantes foi dosado pelo método de PicoGreen, e os gráficos são apresentados pela média ( $\pm$  SEM) das dosagens normalizada pelo controle não estimulado (CTR). (B) Variação intradoador com valores absolutos da dosagem. Teste-*t* pareado; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ ;  $n=10$ .

Em seguida, estimulamos neutrófilos humanos com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH na proporção 5:1 (parasito:célula) por 15 e 180 minutos, representando os diferentes tipos de NET (Figura 4.2). Nossos resultados mostram pela primeira vez que após curto período de estímulo com a presença do parasito, há um aumento

da dosagem de DNA de forma significativa em comparação ao controle não estimulado, indicando a liberação de NET rápida. Junto a isso, também demonstramos a liberação de NET clássica, corroborando dados já publicados (Abdallah et al. 2011; Miranda et al. 2021), indicando, dessa forma, que neutrófilos humanos liberam NET rápida e clássica em resposta a taquizoítos de *T. gondii*.

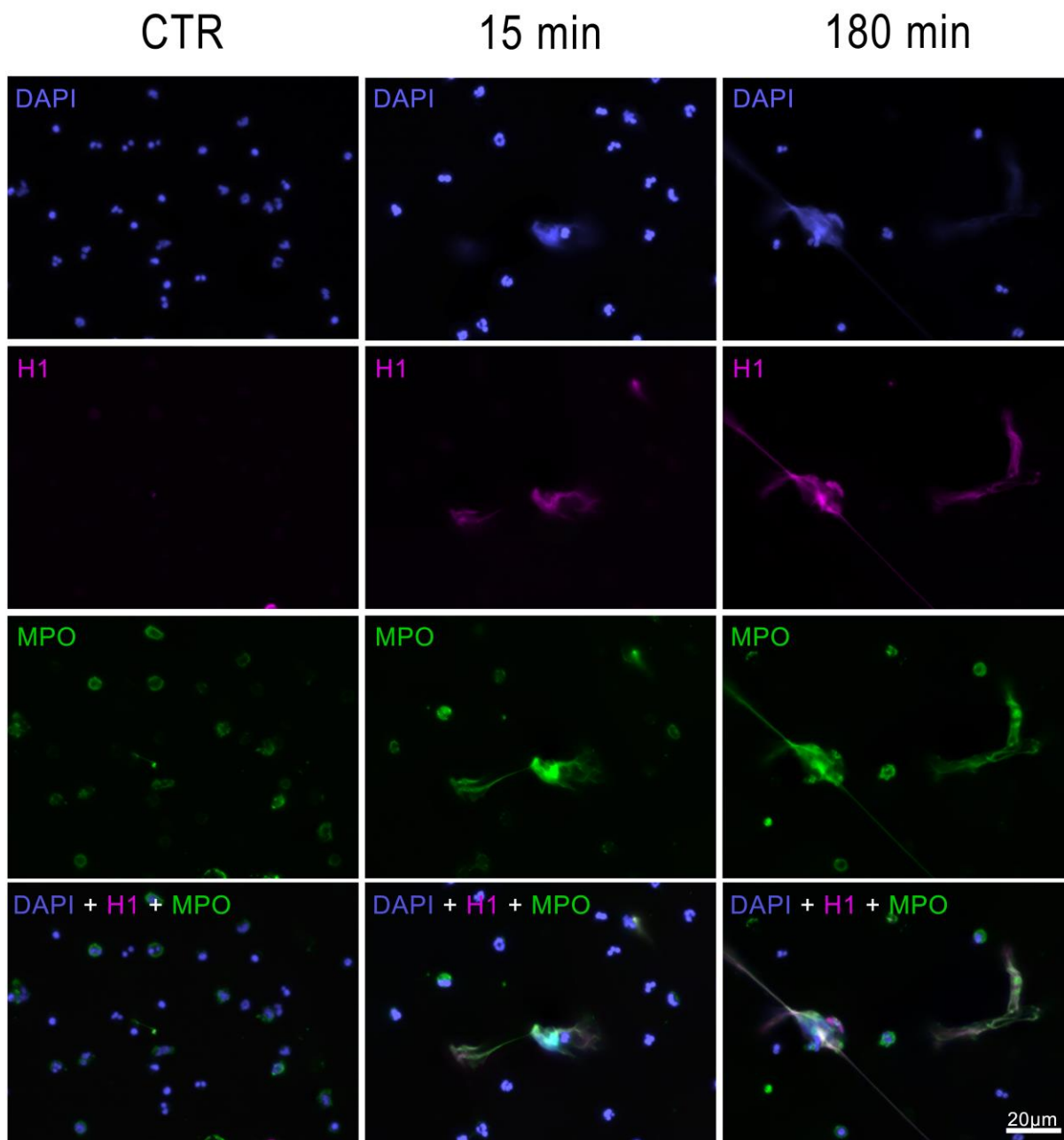


**Figura 4.2. Quantificação de DNA-NET em resposta a *T. gondii*.** Neutrófilos humanos de diferentes doadores foram incubados na ausência ou na presença de taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 e 180 min. (A) O DNA dos sobrenadantes foi dosado pelo método de PicoGreen e os gráficos são apresentados pela média ( $\pm$  SEM) das dosagens normalizada pelo grupo controle (CTR). (B e C) Variação intradoador com valores absolutos da dosagem em 15 minutos (B) e 180 minutos (C). One-Way ANOVA seguido de Tukey como teste post (A) e teste-*t* pareado (B, C); \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ;  $n=13$ .

## 4.2 DNA, histona e mieloperoxidase compõem a estrutura das NETs induzidas por *T. gondii*

Com o intuito de validar os resultados das dosagens de DNA por Picogreen e visualizar as NETs através da marcação de componentes clássicos como histona e MPO, estimulamos neutrófilos humanos por 15 e 180 minutos e processamos as amostras para microscopia de imunofluorescência. Observamos que diferentemente do controle não infectado, onde identificamos neutrófilos não ativados com sua

morfologia nuclear característica, na presença do parasito há estruturas das NETs composta por histona H1, mieloperoxidase e DNA (Figura 4.3).

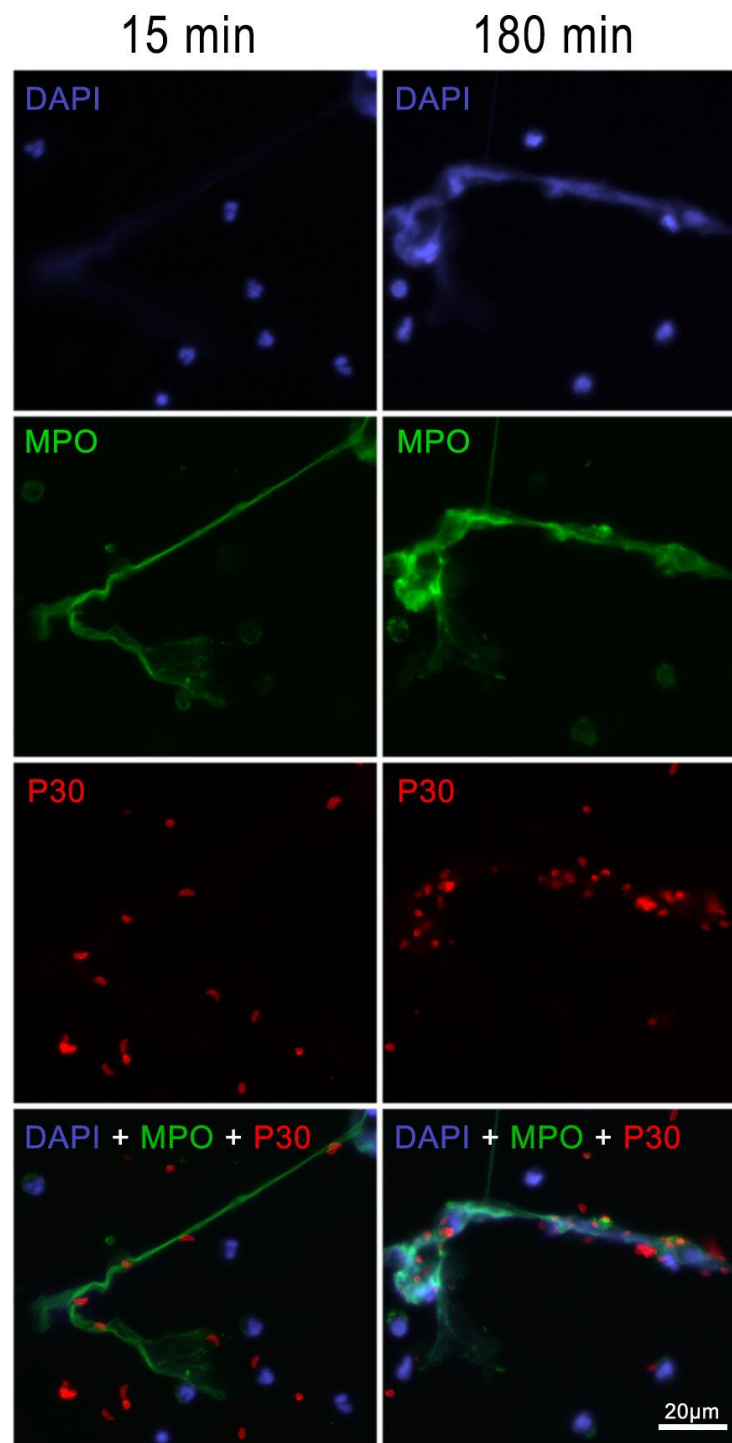


**Figura 4.3. Presença das NETs em resposta a *T. gondii*.** Neutrófilos humanos foram estimulados ou não com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 e 180 minutos e processados para microscopia de imunofluorescência com anticorpo contra histona H1 e mieloperoxidase. Imagens representativas de três experimentos independentes.

Para sinalizar a presença do parasito e observar sua interação com os neutrófilos, usamos anticorpo P30 contra o antígeno de superfície (SAG) dos



taquizoítos. Assim, conseguimos observar os parasitos associados às NETs, com a marcação para SAG sobreposta à marcação para DNA e MPO (Figura 4.4).



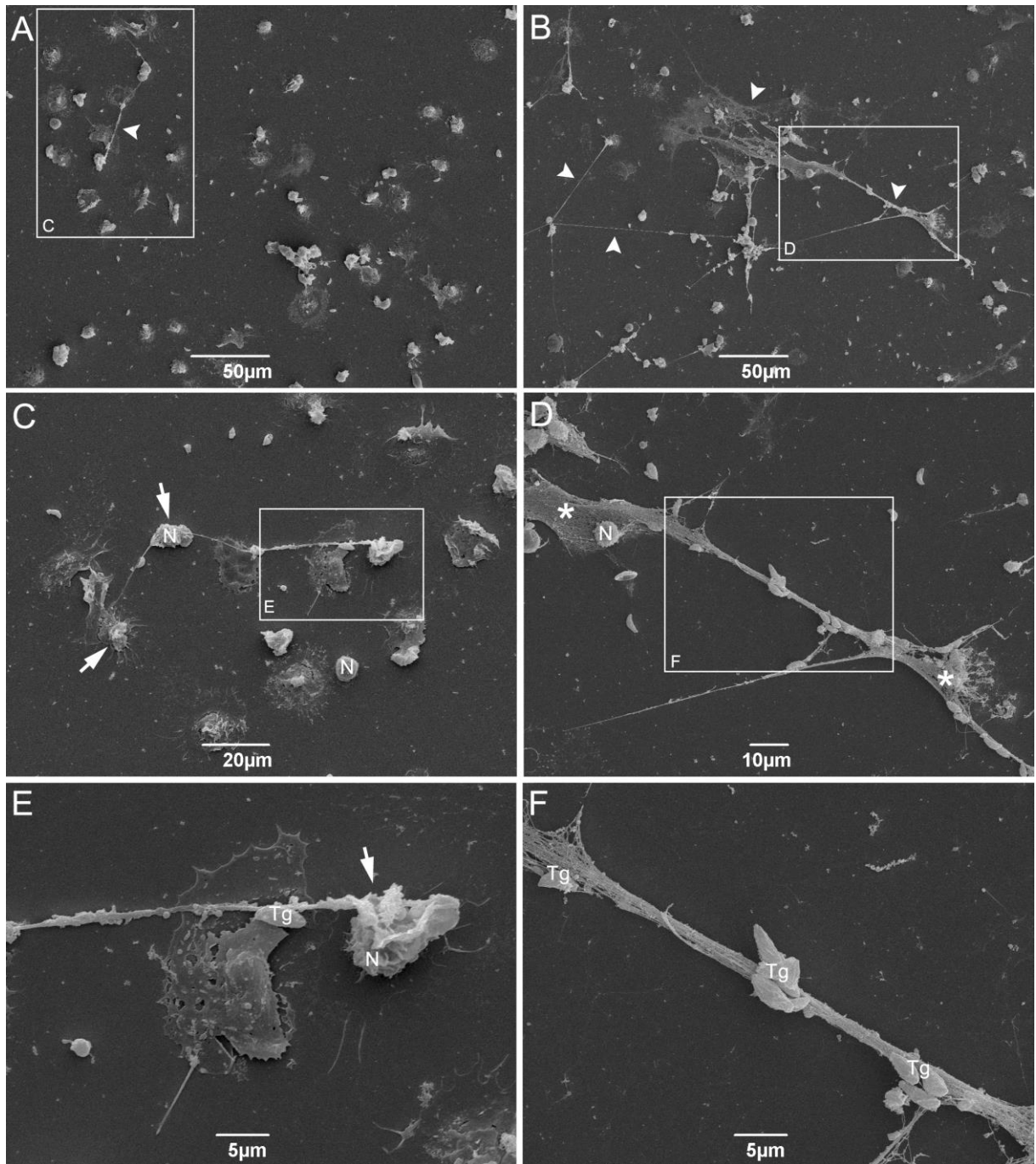
**Figura 4.4. Associação do *T. gondii* à estrutura das NETs.** Neutrófilos humanos foram estimulados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 e 180 minutos e processados para microscopia de imunofluorescência com anticorpos contra mieloperoxidase (MPO) e antígeno de superfície do parasito (P30). Imagens representativas de três experimentos independentes.

### 4.3 Aspecto ultraestrutural das NETs liberadas em resposta a *T. gondii*

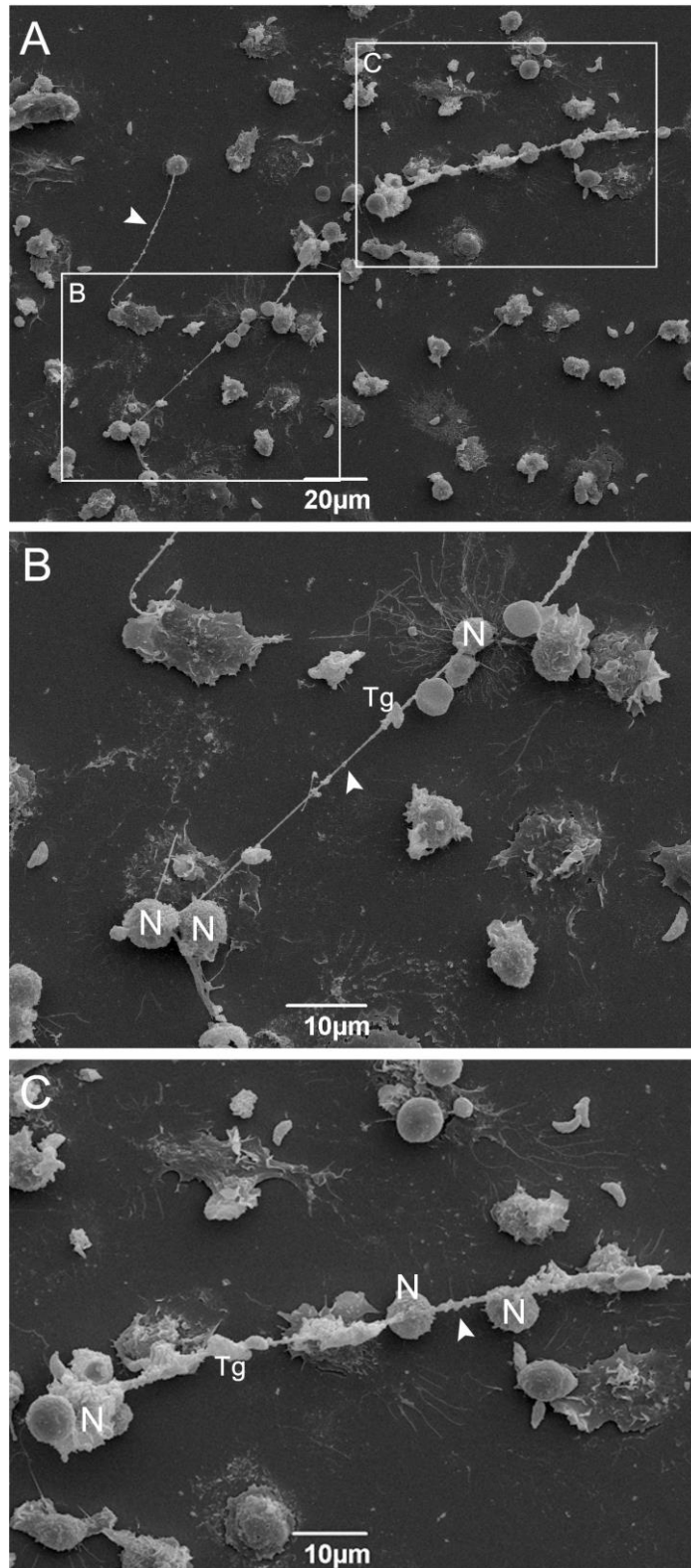
A fim de analisar o aspecto ultraestrutural das NETs e sua relação com o parasito em maiores detalhes, nós optamos pela microscopia eletrônica de varredura. Após estimular neutrófilos humanos e processar as amostras, foi possível observar diferença na quantidade de NET rápida e tardia liberadas (Figura 4.5 A e B, respectivamente). Com 15 minutos de indução, as NETs são vistas em menor quantidade e tamanho, comparado às estruturas vistas com 180 minutos. Em maior aumento é notório que a maior parte dos neutrófilos liberando NET rápida mantêm a integridade celular, possibilitando o reconhecimento da origem da NET (Figura 4.5 C e E). Por outro lado, em 180 minutos as NET observadas, em sua maioria, não puderam ter sua origem localizada, possivelmente devido a morte do neutrófilo para a liberação de NET, impossibilitando seu reconhecimento (Figura 4.5 D).

Além disso, através dessa técnica a associação entre NET e parasito foi melhor evidenciada. Como mostra a Figura 4.5 (E e F), os parasitos parecem estar em contato próximo com as estruturas que caracterizam as NETs, indicando um possível aprisionamento.

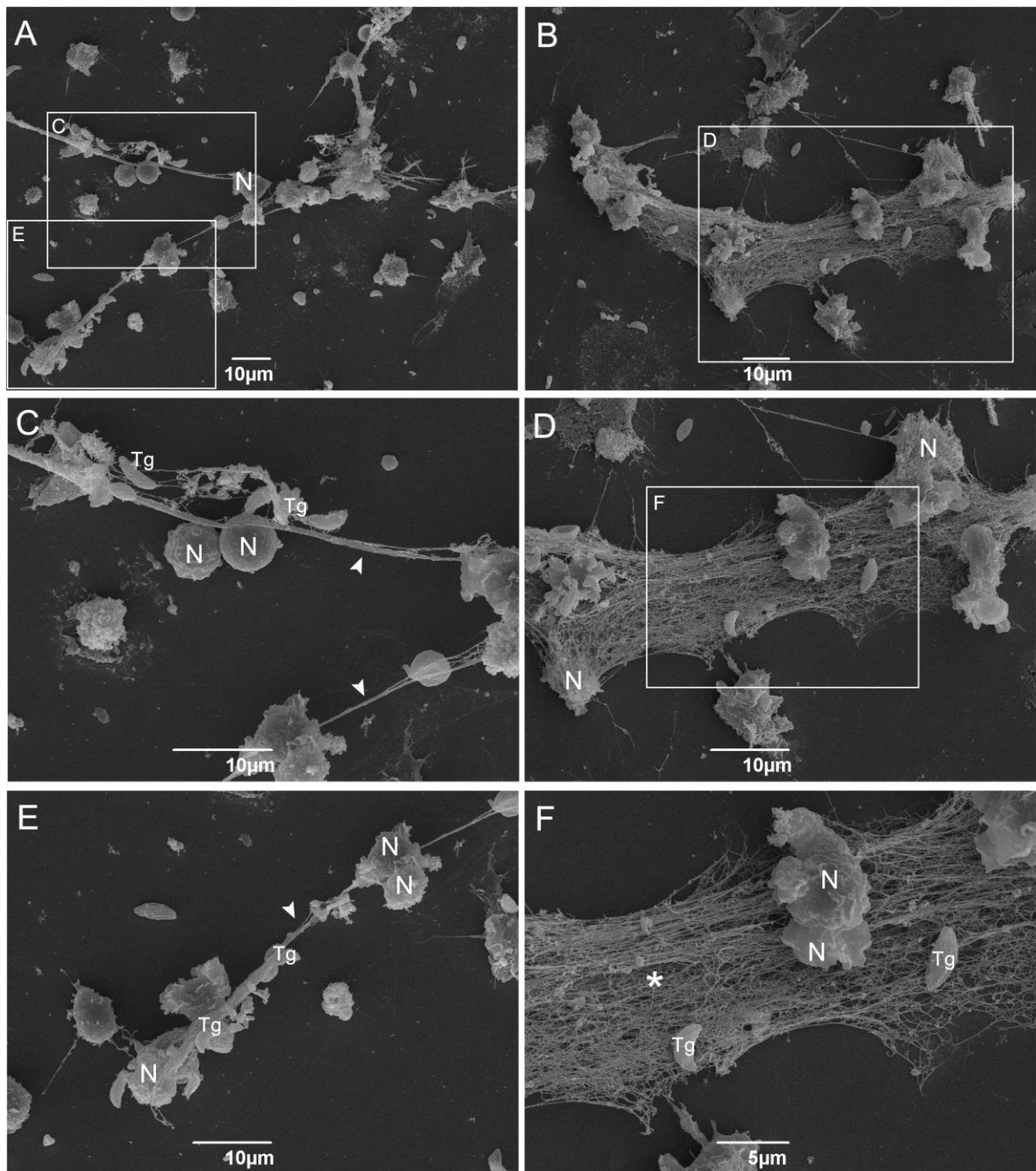
Ao analisar a estrutura das NETs, observamos também diferentes fenótipos apresentados, baseados em descrições prévias (Hakkim et al. 2011; Schauer et al. 2014; Imlau et al. 2019) (Figura 4.6 e Figura 4.7). Como é mostrado através de imagens representativas de campos fotografados, com 15 minutos de indução a liberação de NET se caracteriza em fibras finas e alongadas (*sprNETs*, da abreviação do termo em inglês *spread*, espalhado), partindo de neutrófilos íntegros, como foi citado anteriormente (Figura 4.6). Em contrapartida, NET formada após 180 minutos de indução apresenta dois fenótipos distintos: *sprNET* (Figura 4.7 A, C e E), e estruturas mais densas, se assemelhando ao formato de rede (*aggNET*, abreviação do termo em inglês *aggregated*, agregado), aparentando se originar de diversos neutrófilos e englobando células íntegras e parasitos (Figura 4.7 D, B e F). Apesar da distinção na estrutura das NETs rápida e clássica em resposta a *T. gondii*, ambas aparentam aprisionar os parasitos.



**Figura 4.5. Aspecto ultraestrutural da interação entre NET e *T. gondii*.** Neutrófilos humanos foram estimulados com taquizoítos de *T. gondii*, na proporção 5:1 (parasito:célula) por 15 (A, C e E) ou 180 (B, D e F) minutos e processados para microscopia eletrônica de varredura. As estruturas das NETs são indicadas em A e B (cabeça de seta branca), neutrófilos íntegros liberando NET são indicados em C e E (seta branca) e o que se assemelha ser o ponto de origem da NET, indicado possível morte neutrofílica, é indicado em D (asterisco). Imagens representativas de três experimentos independentes. Tg = *T. gondii*; N = neutrófilo.



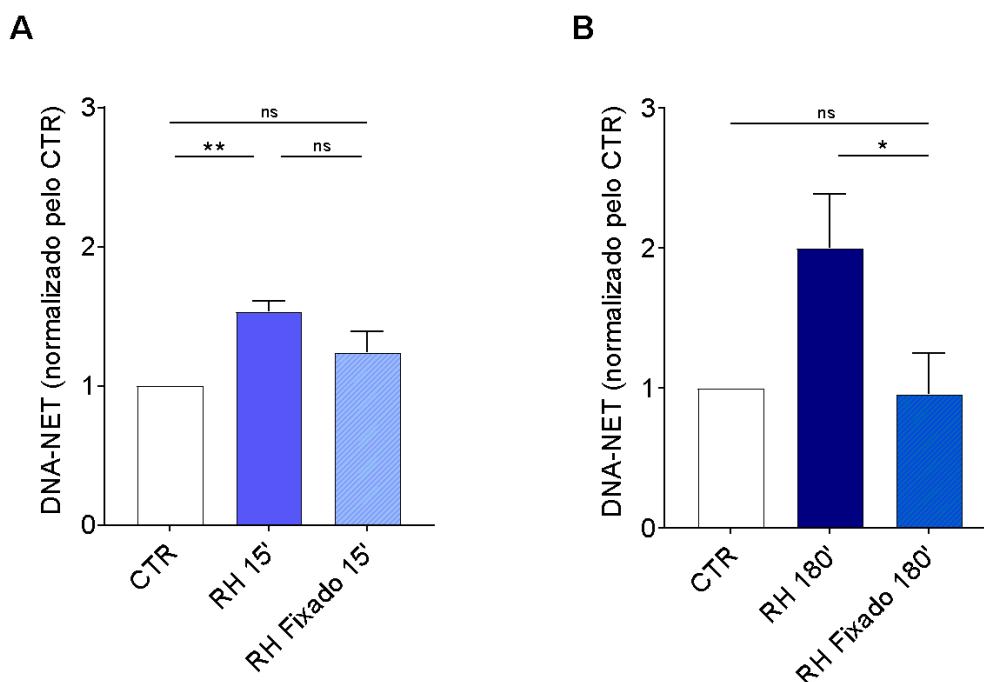
**Figura 4.6. Aspecto ultraestrutural da estrutura da NET rápida.** Neutrófilos humanos foram estimulados com taquizoítos de *T. gondii*, na proporção 5:1 (parasito:célula) por 15 minutos e processados para microscopia eletrônica de varredura. NETs espalhadas (*sprNETs*) são indicadas por cabeça de seta branca. Imagens representativas de três experimentos independentes; Tg = *T. gondii*; N = neutrófilo.



**Figura 4.7. Aspecto ultraestrutural da estrutura da NET clássica.** Neutrófilos humanos foram estimulados com taquizoítos de *T. gondii*, na proporção 5:1 (parasito:célula) por 180 minutos e processados para microscopia eletrônica de varredura. NETs espalhadas (*sprNETs*) são indicadas por cabeça de seta branca (A, C e E) e NETs agregadas (*aggNETs*) são indicadas por asterisco (F). Imagens representativas de três experimentos independentes; Tg = *T. gondii*; N = neutrófilo.

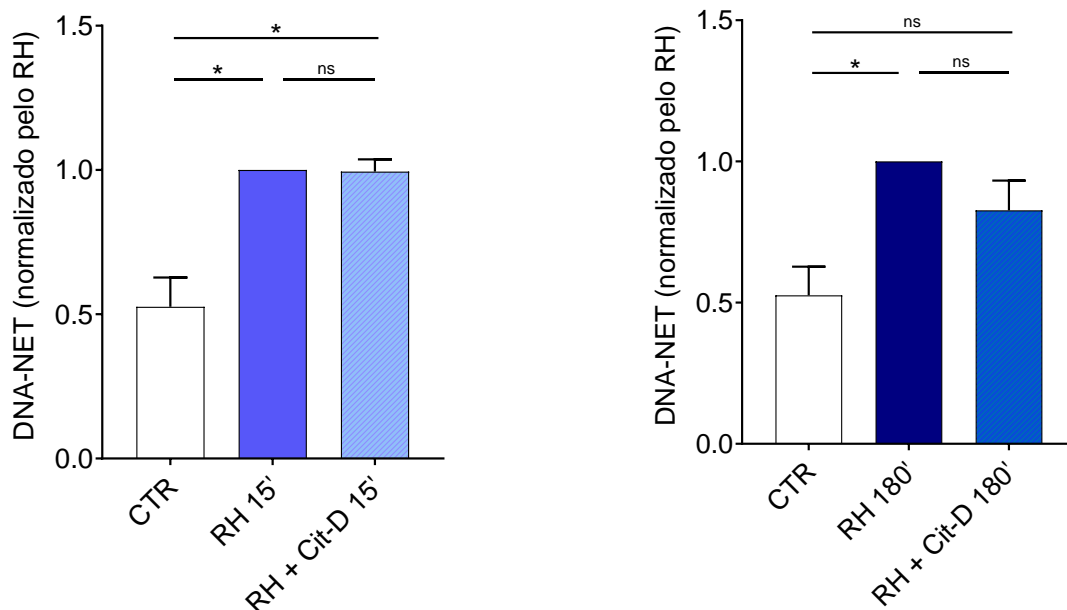
#### 4.4 Liberação de NET depende de viabilidade de taquizoítos

Com o intuito de compreender melhor o que leva à ativação celular e consequente produção de NET, estimulamos neutrófilos com parasitos fixados (Figura 4.8). Foi possível observar que o parasito morto não induz NET rápida ou clássica de forma significativa em comparação com o controle não estimulado, mesmo após longo tempo de indução, indicando a necessidade de viabilidade do protozoário para a indução da liberação de NETs.



**Figura 4.8. Quantificação de DNA-NET em resposta a *T. gondii* fixado.** Neutrófilos humanos foram incubados na ausência (CTR) ou na presença de taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH vivos ou fixados (MOI 5:1) por 15 (A) e 180 min (B). O DNA nos sobrenadantes foi dosado por PicoGreen e os gráficos são apresentados pela média ( $\pm$  SEM) das dosagens normalizada pelo controle não estimulado. One-Way ANOVA seguido de Tukey como teste post; \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$ ;  $n = 5$ . ns = não significativo.

Além disso, o tratamento prévio de neutrófilos com citocalasina D, um inibidor da polimerização de actina e, consequentemente, da fagocitose, não afetou de forma significativa a liberação de NET (Figura 4.9).

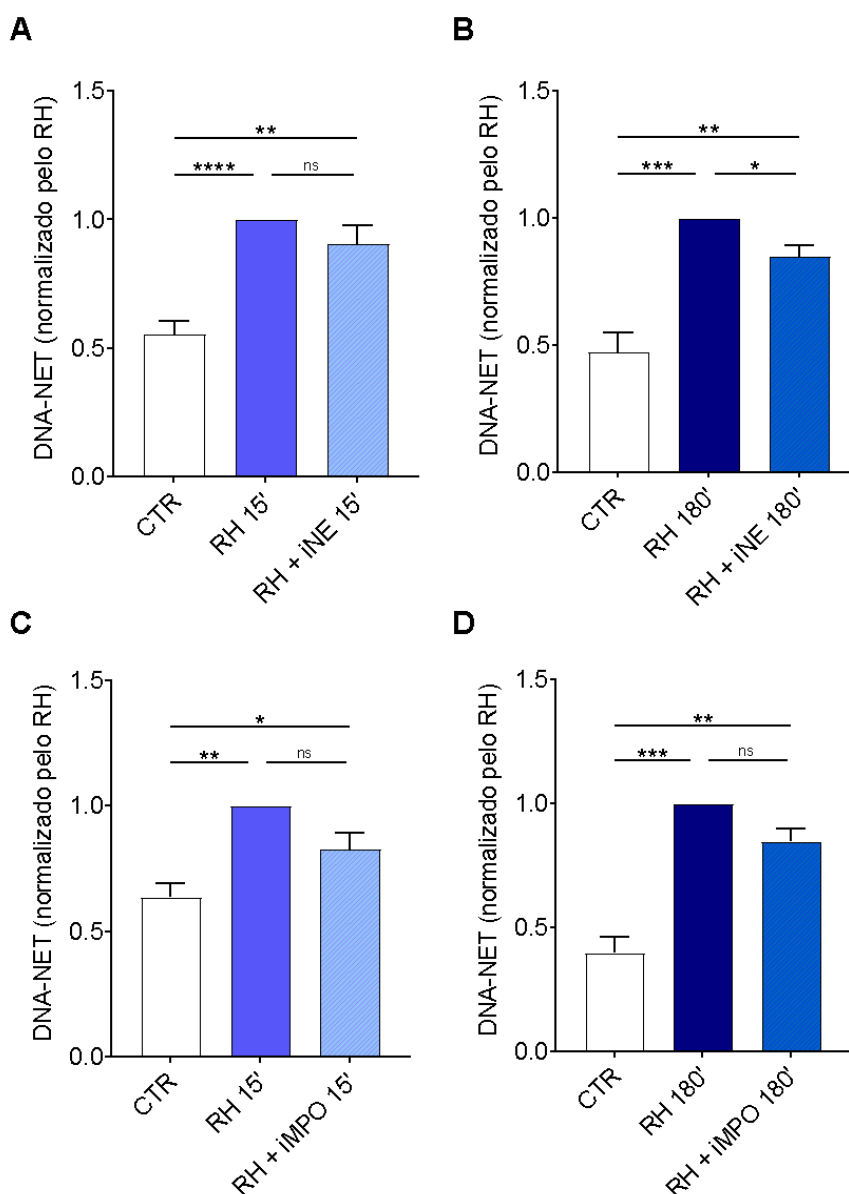


**Figura 4.9. Quantificação de DNA-NET com tratamento por citocalasina D.** Neutrófilos humanos foram tratados com citocalasina D (Cit-D), e em seguida, estimulados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 (A) e 180 min (B). O DNA nos sobrenadantes foi dosado por PicoGreen e os gráficos são apresentados pela média ( $\pm$  SEM) das dosagens normalizada pelo grupo RH. One-Way ANOVA seguido de Tukey como teste post; \*  $p < 0.05$ ;  $n = 5$ . ns = não significativo.

#### 4.5 Liberação de NET clássica humana em resposta ao *T. gondii* é parcialmente dependente de elastase neutrofílica e PAD4

Após detectarmos mieloperoxidase como um dos componentes presentes na estrutura das NETs, e sabendo do seu papel como possível auxiliador do descondensamento da cromatina, juntamente com a elastase neutrofílica, realizamos ensaios para melhor avaliar suas participações na produção de NET humana em resposta a *T. gondii*. Para isso, o tratamento de neutrófilos com inibidores de NE e MPO foi realizado antes do estímulo por taquizoítos. Nossos resultados mostram que a inibição de elastase neutrofílica diminui de forma significativa a produção de NET clássica em relação a condição sem inibidor, mas não afeta a produção de NET rápida (Figura 4.10 A e B). Em contrapartida, a inibição de MPO não altera a produção de NET rápida e clássica, indicando que

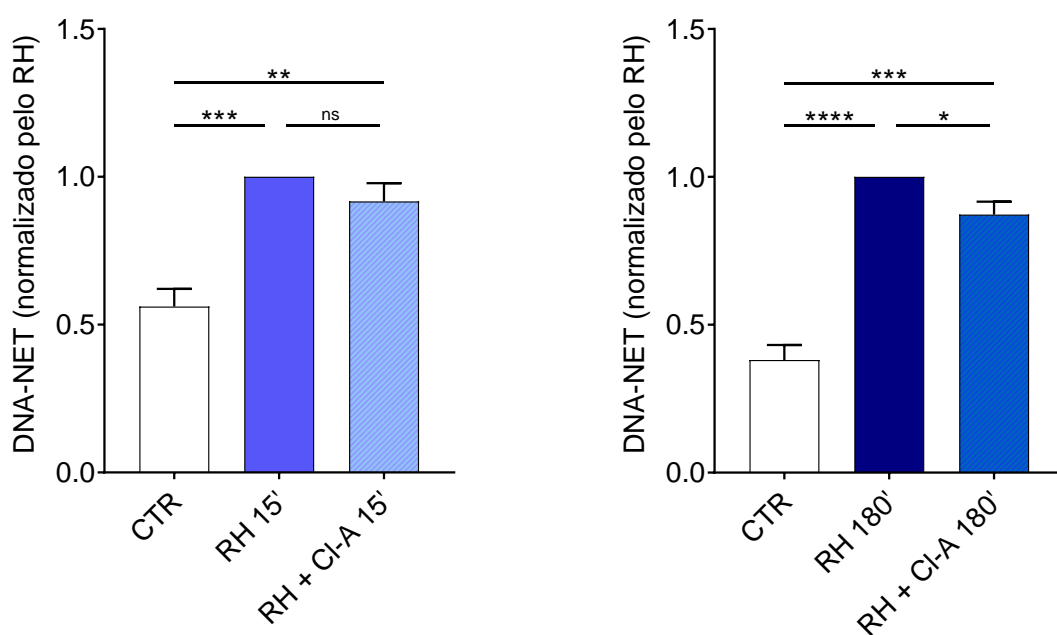
apesar de estar presente na estrutura das NETs, a MPO parece não participar diretamente do processo de liberação das NETs (Figura 4.10 C e D).



**Figura 4.10. Quantificação de DNA-NET produzida com tratamento com inibidores de elastase neutrofílica e mieloperoxidase.** Neutrófilos humanos foram tratados com inibidores de elastase neutrofílica (iNE) ou mieloperoxidase (iMPO) por 20 minutos e, em seguida, estimulados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 (A; C) e 180 min (B; D). O DNA nos sobrenadantes foi dosado por PicoGreen e os gráficos são apresentados pela média ( $\pm$  SEM) das dosagens normalizada pelo grupo RH. One-Way ANOVA seguido de Tukey como teste post; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ;  $n = 8-11$ . ns = não significativo.



Outro componente importante que pode auxiliar no descondensamento da cromatina é a enzima PAD4, levando à citrulinização de histonas (Rohrbach et al. 2012). Para avaliar sua participação em resposta ao parasito, analisamos a produção de NET por neutrófilos tratados com cloroamidina (inibidor de PAD4), e após estímulo com taquizoítos observamos que a presença do inibidor diminuiu a produção de NET de forma significativa em tempo longo de indução, mas não em tempo curto, indicando a participação de PAD4 na liberação de NET clássica (Figura 4.11).

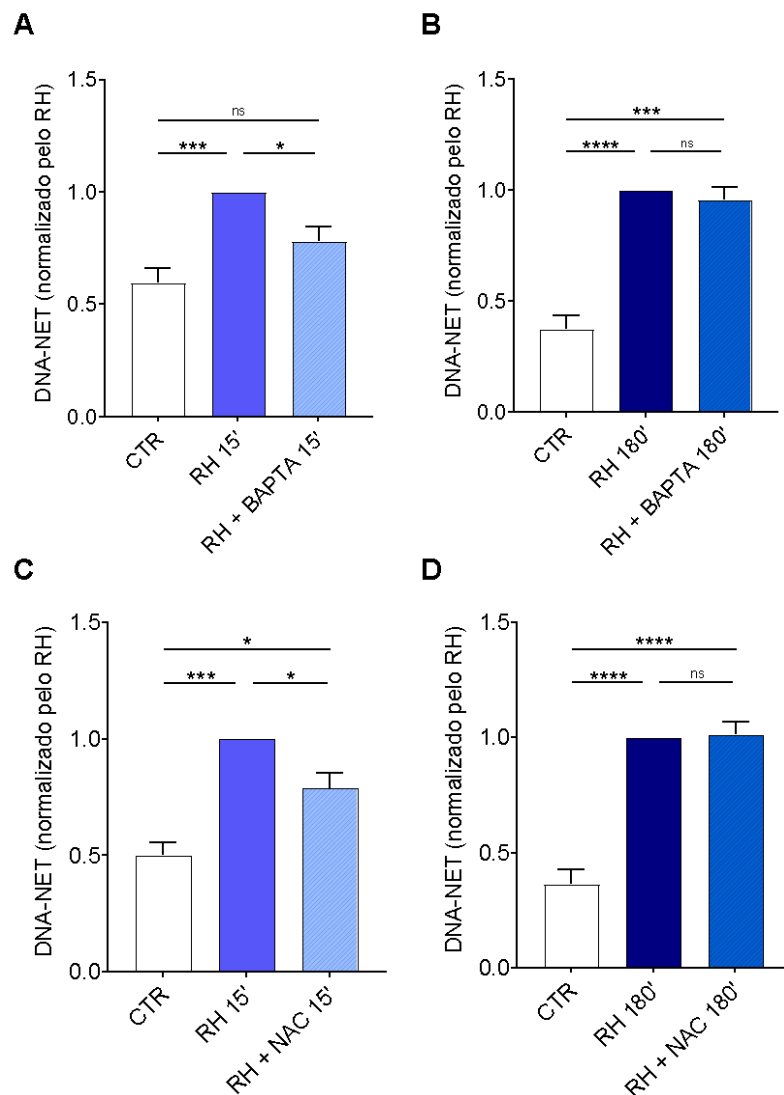


**Figura 4.11. Quantificação de DNA-NET produzida com tratamento por cloroamidina.** Neutrófilos humanos foram tratados com cloroamidina (Cl-A) por 20 minutos e em seguida, estimulados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 (A) e 180 min (B). O DNA nos sobrenadantes foi dosado por PicoGreen e os gráficos são apresentados pela média ( $\pm$  SEM) das dosagens normalizada pelo grupo RH. One-Way ANOVA seguido de Tukey como teste post; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ;  $n = 10$ . ns = não significativo.

#### 4.6 Cálcio intracelular e ROS participam da liberação de NET rápida humana em resposta a *T. gondii*

Com o intuito de elucidar outros mecanismos que estão envolvidos na produção de NET, avaliamos a participação de cálcio intracelular e ROS, que já

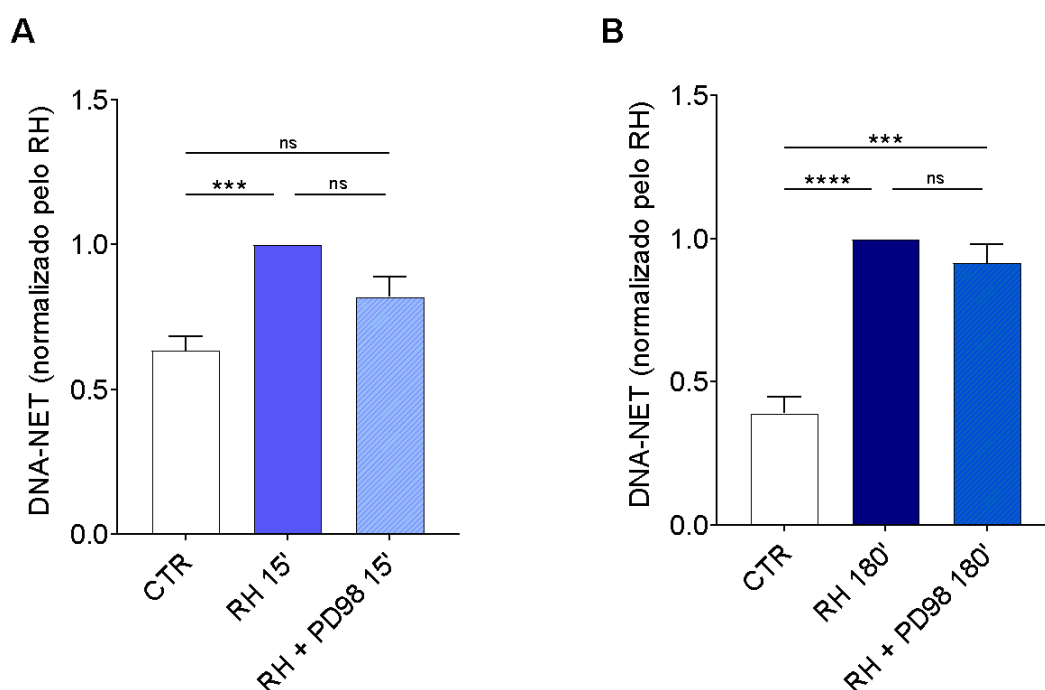
foram descritos como mediadores importantes para a cascata de sinalização das NETs (Fuchs et al. 2007; DeSouza-Vieira et al. 2016; Zeng et al. 2019). Sendo assim, tratamos neutrófilos humanos com inibidores BAPTA-AM e N-acetilcisteína (quelante de cálcio intracelular e molécula antioxidante, respectivamente) anteriormente ao estímulo com *T. gondii*. A dosagem de DNA revelou que BAPTA-AM e NAC diminuíram a produção de NET rápida de forma significativa em comparação com o grupo que recebeu somente *T. gondii* (Figura 4.12).



**Figura 4.12. Quantificação de DNA-NET produzida com tratamento por BAPTA-AM e N-acetilcisteína.** Neutrófilos humanos foram tratados com inibidores BAPTA-AM (BAPTA) ou **N-acetilcisteína (NAC)** por 20 minutos e, em seguida, estimulados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 (A; C) e 180 min (B; D). O DNA nos sobrenadantes foi dosado por PicoGreen e os gráficos são apresentados pela média ( $\pm$  SEM) das dosagens normalizada pelo grupo RH. One-Way ANOVA seguido de Tukey como teste post; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ;  $n = 8$ . ns = não significativo.

## 4.7 Inibidor da via de MEK não altera produção de NET rápida e clássica induzida por *T. gondii*

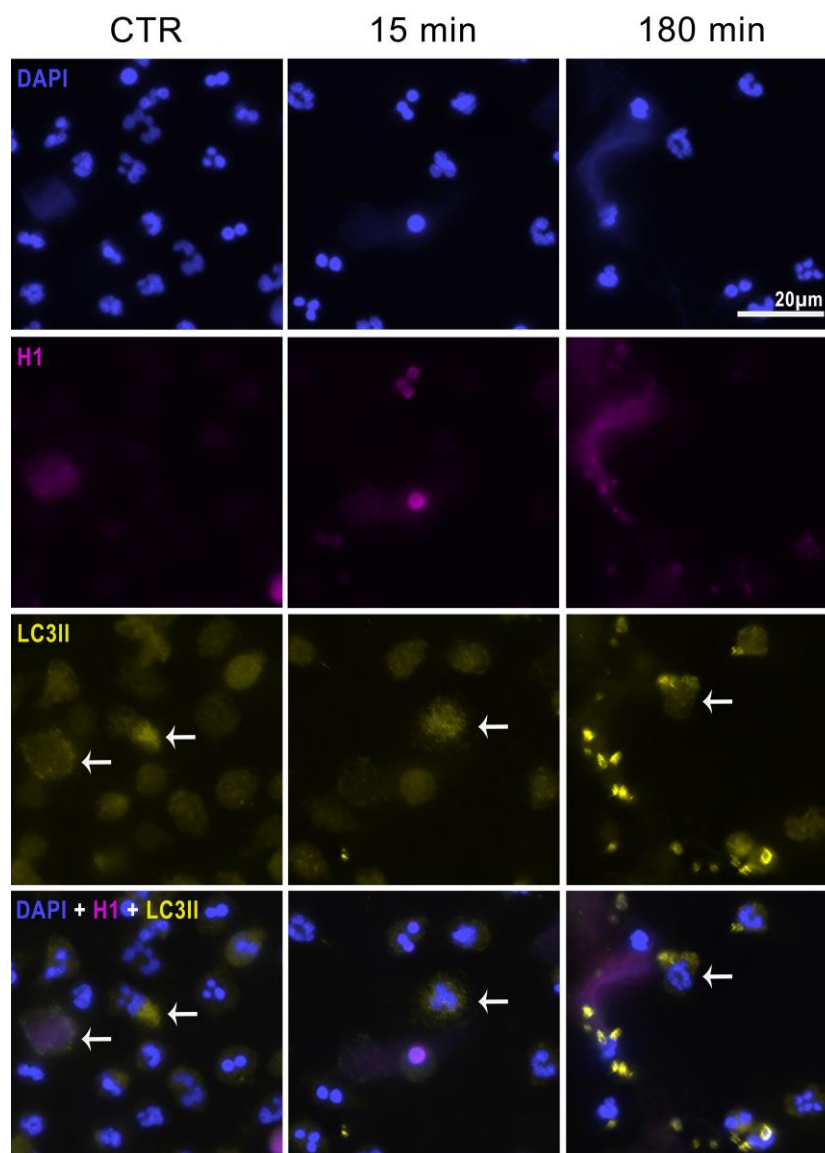
Dentre as vias de sinalização que podem levar à liberação de NET, a via mediada por MAPK se mostrou presente na liberação de NET por neutrófilos humano e de cachorro (Abdallah et al. 2011; Wei et al. 2020). Para avaliar a participação desta via em nosso modelo, tratamos neutrófilos humanos com o inibidor PD98059 e estimulamos os mesmos com taquizoítos. Nosso resultado indica que o uso do inibidor PD98 não afetou a liberação de NET rápida e clássica de forma significativa. (Figura 4.13).



**Figura 4.13. Quantificação de DNA-NET produzida com tratamento por PD98059.** Neutrófilos humanos foram tratados com o inibidor PD98059 (PD98) por 20 minutos e, em seguida, estimulados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 (A) e 180 min (B). O DNA nos sobrenadantes foi dosado por PicoGreen e os gráficos são apresentados pela média ( $\pm$  SEM) das dosagens normalizada pelo grupo RH. One-Way ANOVA seguido de Tukey como teste post; \*\*\*  $p < 0.001$  e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ;  $n = 8$ . ns = não significativo.

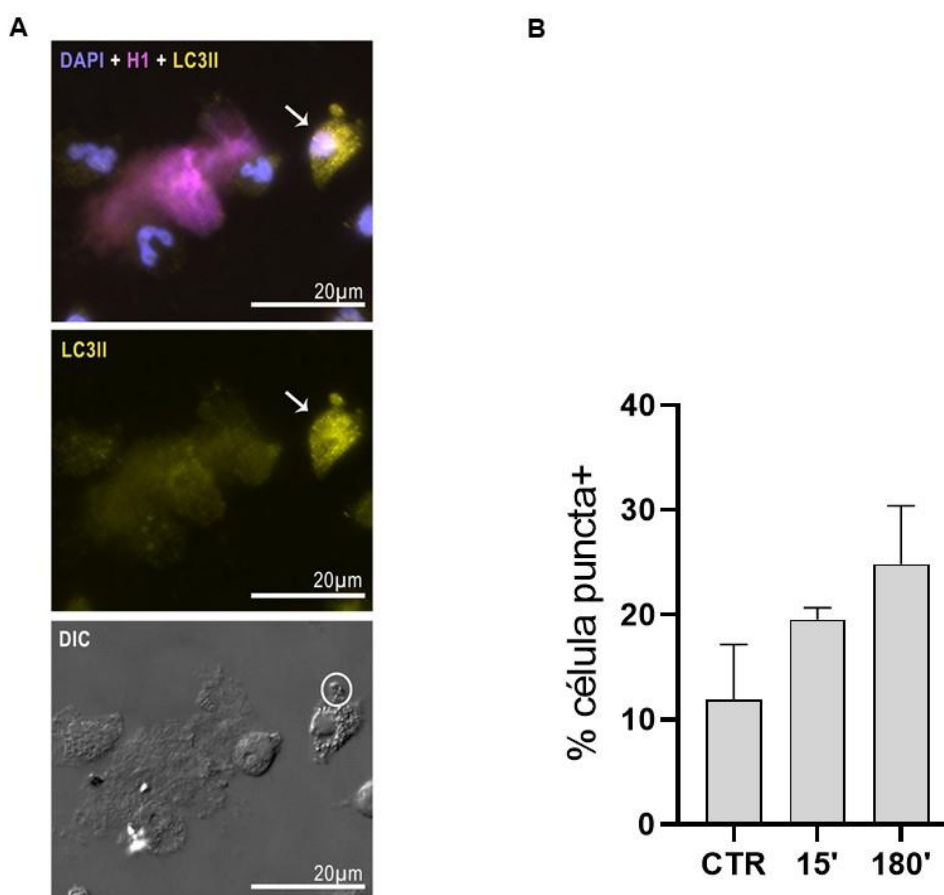
#### 4.8 Liberação de NET rápida em resposta a *T. gondii* é parcialmente dependente de autofagia

Por fim, ainda investigando mecanismos que podem participar da produção de NET, como a autofagia, investigamos a presença de autofagossomos durante o processo de formação de NET induzido pelo parasito. Observamos, em ambos os tempos de análise, marcação em *puncta* para LC3II em ensaio de imunofluorescência, concomitante com a liberação de NETs (Figura 4.14).



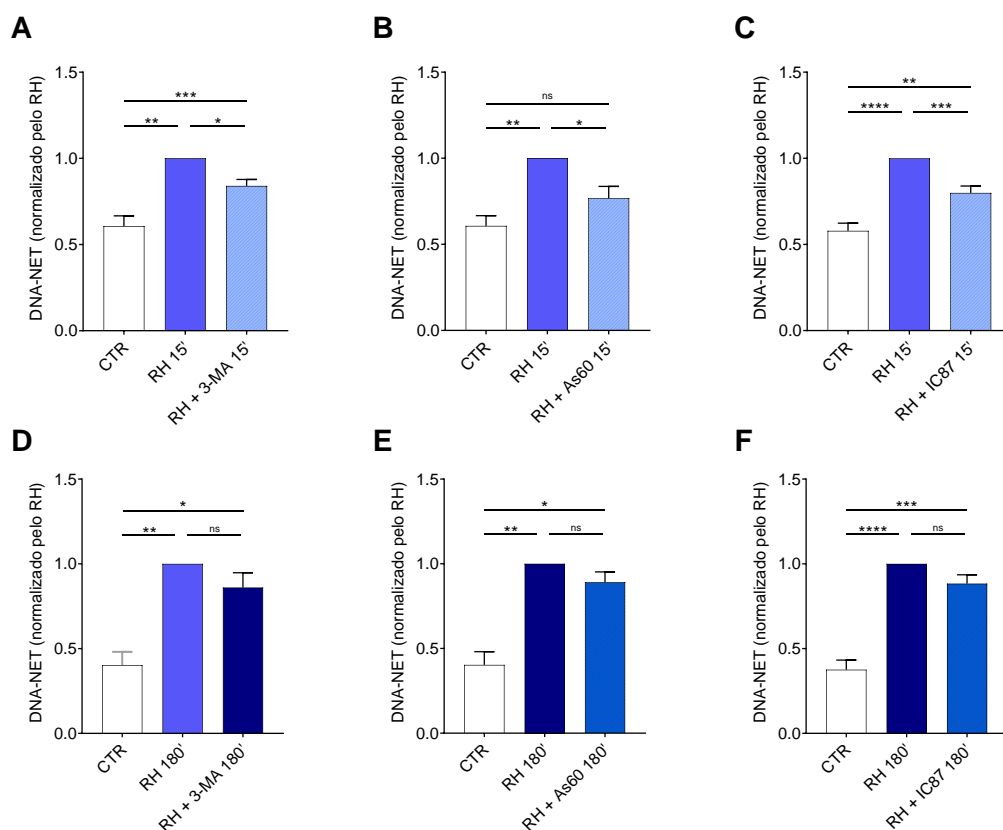
**Figura 4.14. Acúmulo de LC3II em neutrófilos humanos na presença de *T. gondii*.** Neutrófilos humanos foram infectados ou não com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 e 180 minutos e processados para microscopia de imunofluorescência com anticorpo contra LC3II e histona H1. Notar as setas brancas indicando células com puncta de LC3II. Imagens representativas de dois experimentos independentes.

Uma vez que o anticorpo contra LC3II também marca taquizoítos de *T. gondii* (Souto et al. 2016), para contabilizar as células positivas para puncta de LC3II (indicando acúmulo da proteína e, conseqüentemente presença de autofagossomos), as células foram analisadas quanto a marcação contra LC3II juntamente com o contraste interferencial diferencial (DIC), permitindo assim diferenciar os puncta presentes nas células da marcação em taquizoítos (Figura 4.15 A). Dessa forma, observamos que o estímulo com o parasito leva a um aumento no acúmulo de LC3II nos neutrófilos ao longo do tempo, comparado ao controle não estimulado (Figura 4.15 B).



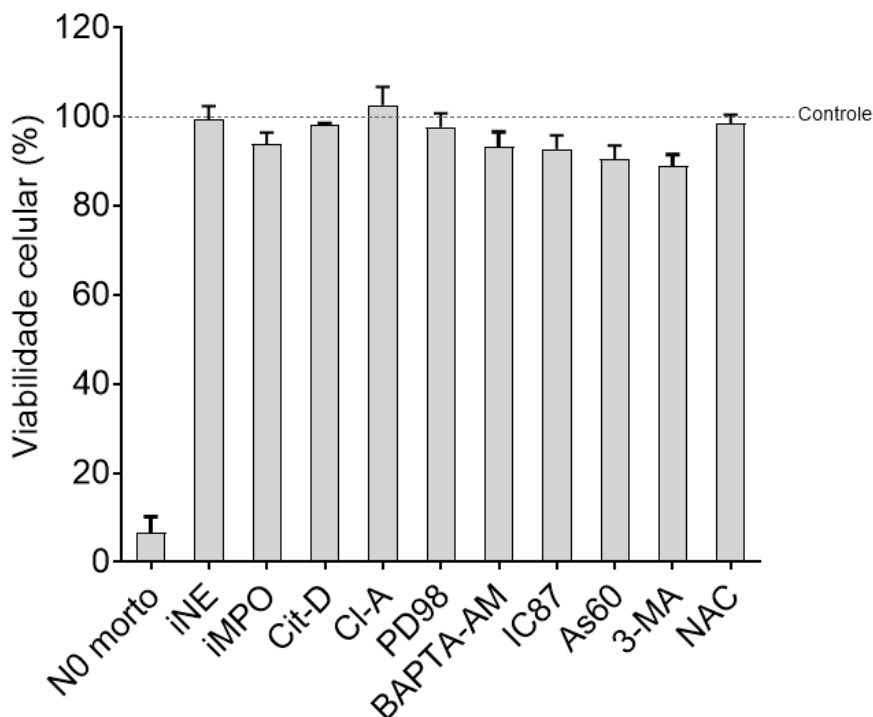
**Figura 4.15. Quantificação de neutrófilos positivos para puncta de LC3II na presença de *T. gondii*.** Neutrófilos humanos foram estimulados ou não com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 e 180 minutos e processados para microscopia de imunofluorescência com anticorpo contra LC3II e histona H1 (A). (B) Quantificação de células positivas para puncta de LC3II em imagens fotografadas de campos aleatórios. Notar na letra A as setas brancas indicando célula positiva para puncta de LC3II, e círculo branco no DIC indicando parasito também positivo para puncta de LC3II. (A) Imagens representativas de dois experimentos independentes. (B) n=2.

Seguindo o resultado anterior, indicando aumento do fluxo autofágico na presença do *T. gondii*, decidimos investigar se a autofagia era um mecanismo necessário para a produção de NET por neutrófilos humanos. Sendo assim, utilizamos o inibidor 3-metiladenina (3-MA) da via de PI3K, via relacionada tanto à produção de NET, quanto a autofagia (Figura 4.16 A e D). Nossos resultados indicam que a via de PI3K participa da liberação de NET rápida, uma vez que a inibição desta via levou a uma diminuição significativa da produção de NETs em resposta ao parasito em comparação ao grupo não tratado. Junto a isso, na presença de inibidores seletivos de duas isoformas de PI3K (IC-87114 inibindo PI3K $\delta$  e As-605240 inibindo PI3K $\gamma$ ) também observamos inibição na liberação de NET rápida, corroborando a participação da via da PI3K no processo (Figura 4.16 B, C, E e F).



**Figura 4.16. Quantificação de DNA-NET produzida com tratamento por 3-MA, AS-605240 e IC-87114.** Neutrófilos humanos foram tratados com inibidores por 20 minutos e em seguida, estimulados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) por 15 (A, B e C) e 180 min (D, E e F). O DNA nos sobrenadantes foi dosado por PicoGreen e os gráficos são apresentados pela média ( $\pm$  SEM) das dosagens normalizada pelo grupo RH. One-Way ANOVA seguido de Tukey como teste post; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ;  $n = 6-9$ . ns = não significativo.

É importante destacar que a viabilidade dos neutrófilos permaneceu acima de 90% após o tratamento com os inibidores, indicando que os mesmos não apresentaram toxicidade celular significativa após 180 minutos de incubação com os inibidores (Figura 4.17).

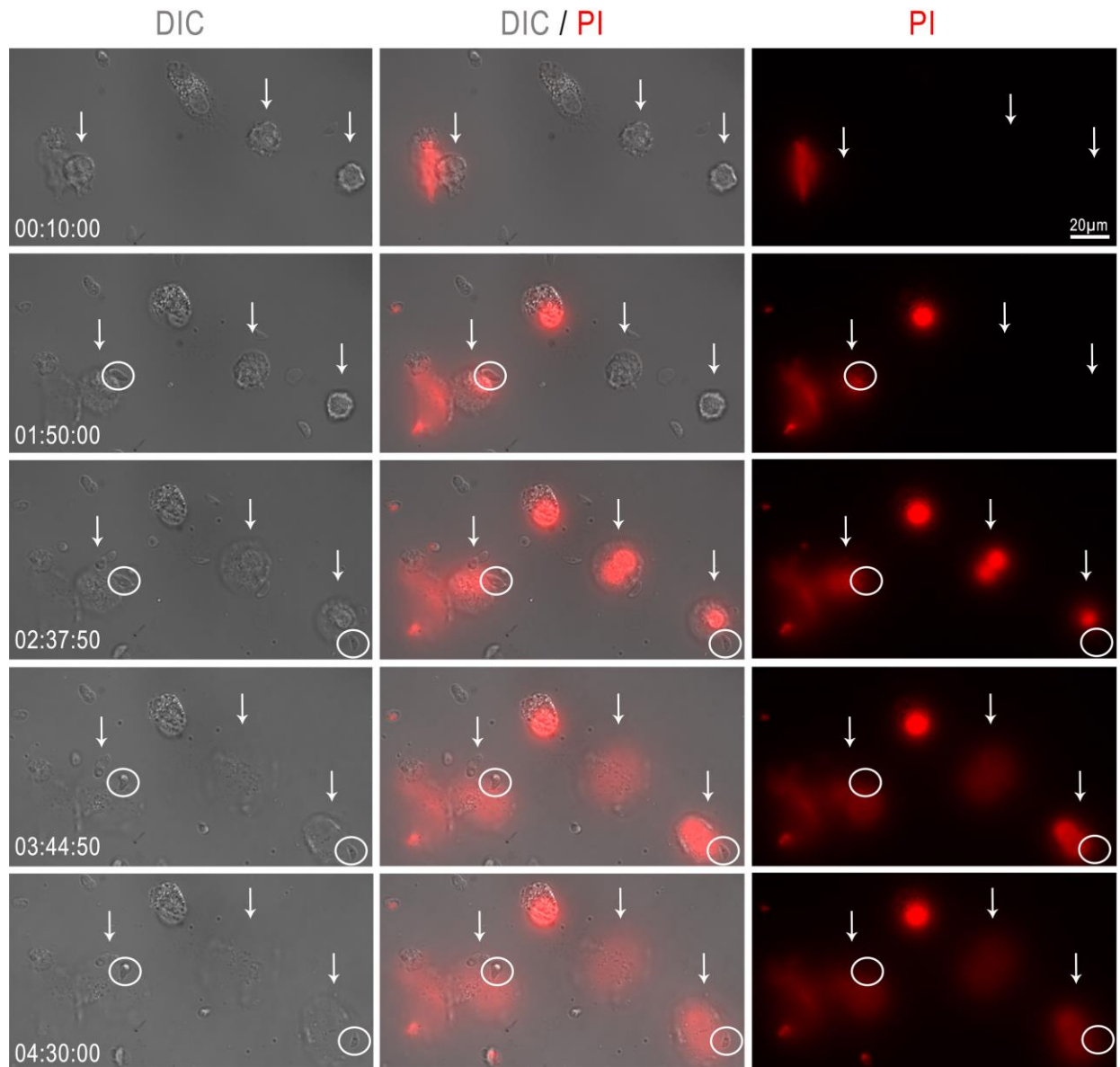


**Figura 4.17. Viabilidade celular de neutrófilos tratados com inibidores.** Após tratamento com inibidores por 180 minutos, a viabilidade celular foi investigada através do reagente Prestoblu e ou Azul de tripano. n= 2- 5.

#### 4.9 NET de neutrófilo humano não afeta viabilidade de *T. gondii*

Uma vez que as NETs possuem características antimicrobianas, resolvemos monitorar a liberação de NET e a interação com taquizoítos por 180 minutos, a fim de avaliar o efeito das NETs na viabilidade do *T. gondii* ao longo do tempo. Em nosso registro de videomicroscopia é possível ver que na presença do parasito diferentes neutrófilos (indicados por setas brancas) possuem sua morfologia alterada ao longo do tempo, incorporando PI, indicando o comprometimento da integridade da membrana celular, e extrusão das NETs, que é marcada pela expansão da cromatina ao redor dos neutrófilos. (Figura 4.18). É possível observar nos diferentes canais apresentados, que taquizoítos se encontram em contato com NET liberada,

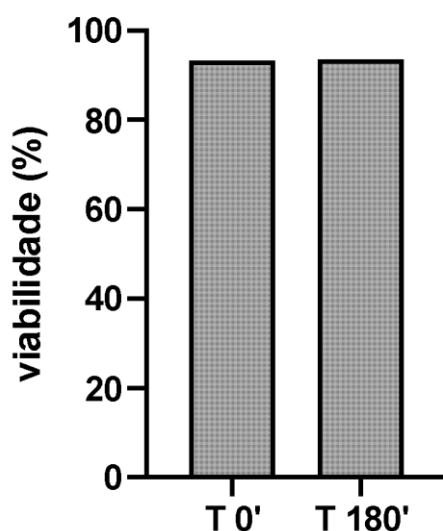
porém não incorporam PI durante todo o tempo de observação. Após 180 minutos de monitoramento, parasitos em contato com NET continuavam viáveis. Assim, continuamos registrando, para avaliar se o efeito letal da NET poderia ser de forma tardia. Mesmo após cerca de 5 horas de monitoramento não constatamos morte dos parasitos em contato com as NETs (indicados por círculos brancos).



**Figura 4.18. Monitoramento da liberação de NET humana e viabilidade de *T. gondii*.** Neutrófilos humanos foram estimulados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) e incubados com PI (3 µg/ml). Os tempos no canto inferior esquerdo indicam, a partir de 10 minutos de interação até o fim do registro, o momento da liberação de NET por neutrófilos (setas brancas). Os círculos brancos indicam taquizoítos em contato com NET. n=1.

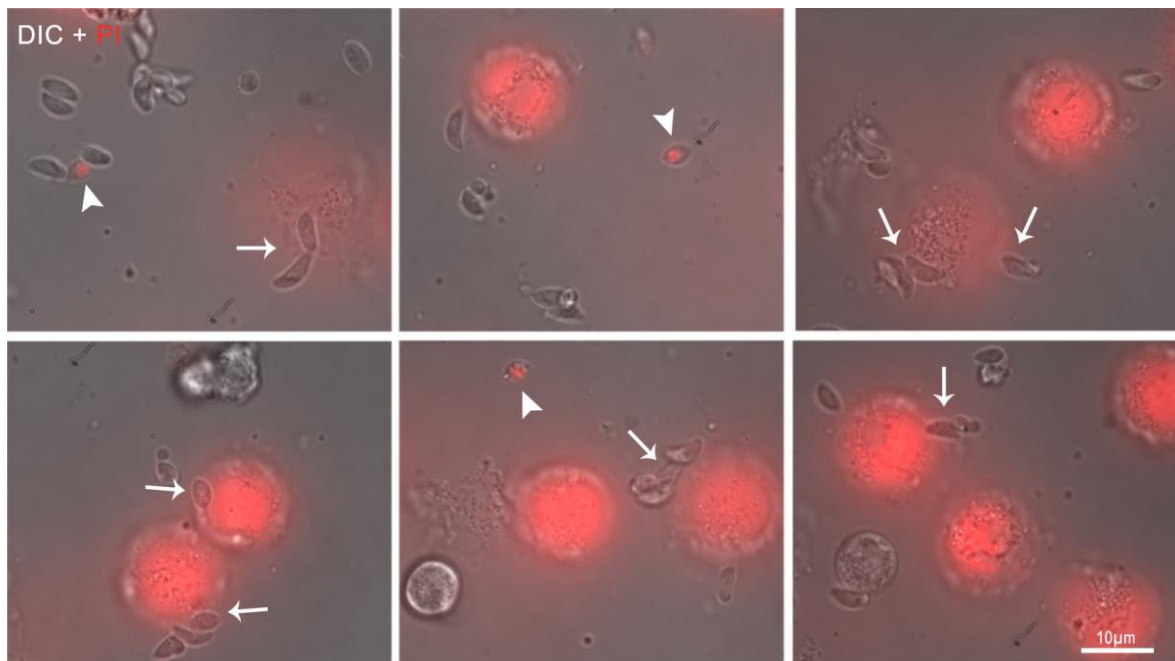


Durante o registro, alguns taquizoítos incorporados com PI foram observados, mas nenhum deles em contato direto com neutrófilos ou NET. Com o intuito de avaliar a morte desses parasitos, simulamos a condição inicial do experimento e comparamos sua viabilidade no tempo final (180 minutos) com parasitos inicialmente usados para infectar neutrófilos e mantido em banho no gelo. Através de análise por corante azul de tripano, mostramos que não houve morte espontânea dos taquizoítos durante todo o período de observação (Figura 4.19).



**Figura 4.19. Viabilidade de taquizoítos de *T. gondii*.** Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH foram mantidos em condições similares ao ensaio por videomicroscopia por 180 minutos e sua viabilidade inicial (T 0') e final (T 180') foram avaliadas pelo corante azul de tripano. n=1.

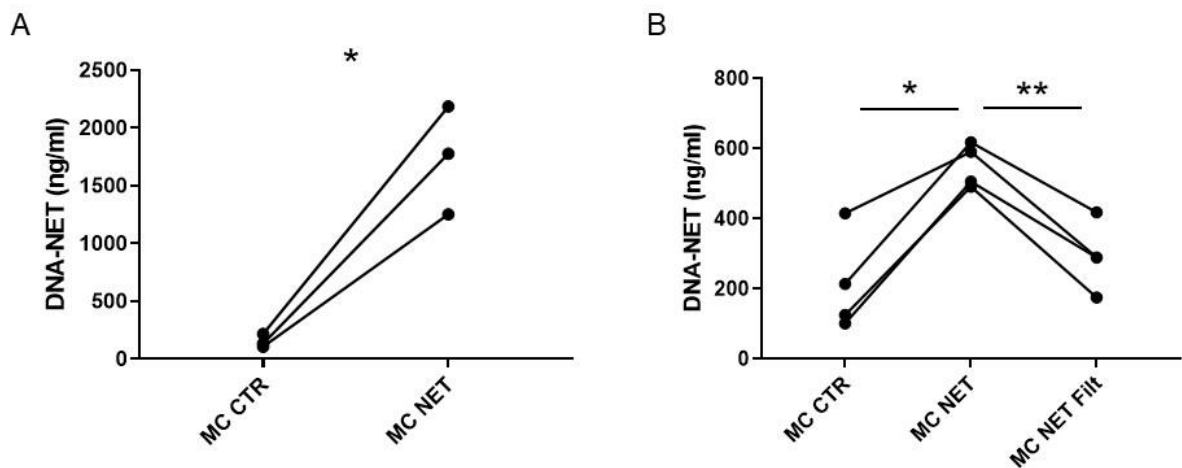
Por fim, ainda avaliando o efeito da NET na viabilidade de *T. gondii*, após o monitoramento da videomicroscopia fotografamos outros campos da placa com interação entre NET e taquizoítos, onde é possível ver que não há perda de viabilidade dos parasitos em contato com NET (Figura 4.20).



**Figura 4.20. Monitoramento da viabilidade de *T. gondii* em contato com NETs.** Neutrófilos humanos foram estimulados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI 5:1) e incubados com PI (3  $\mu\text{g/ml}$ ). Ao final do experimento (270 minutos) campos aleatórios foram fotografados indicando parasitos incorporados com PI sem contato com NET (cabeça de seta branca) e parasitos vivos em contato com NET (seta branca).  $n=1$ .

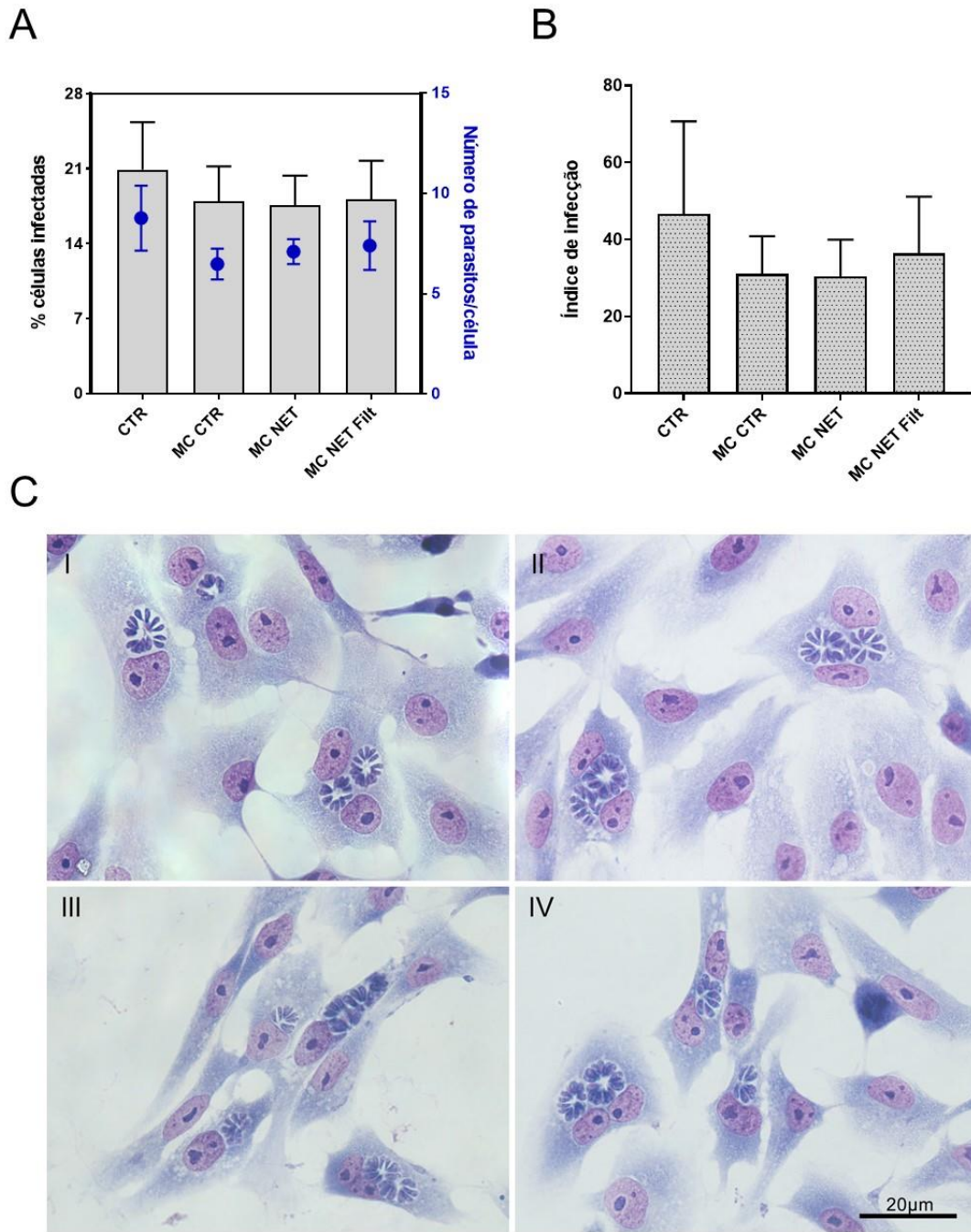
#### 4.10 NET humana não afeta infectividade de *T. gondii*

Diante do estudo mais detalhado da liberação de NET em resposta a *T. gondii* e tendo em vista que o contato com as NETs não parece afetar a viabilidade do parasito, nos perguntamos se as NETs levariam ao aprisionamento e, conseqüente diminuição da taxa de infecção de células hospedeiras. Dessa forma, tratamos os taquizoítos com o meio controle RPMI 1% (CTR), meio condicionado com NET (MC NET), meio condicionado com NET filtrada, a fim de reter as armadilhas (MC NET Filt) e meio condicionado sem estímulo (MC CTR) para posterior infecção de monocamada de células VERO. A dosagem dos meios condicionados mostra a diferença na produção de NETs entre neutrófilos cultivados na ausência ou presença do parasito (MC CTR e MC NET, respectivamente) (Figura 4.21 A), e também a retenção das NET após a filtragem, com valores de dosagem semelhantes ao MC CTR (Figura 4.21 B).



**Figura 4.21. Quantificação de DNA-NET em meios condicionados produzidos para os ensaios de infectividade.** Neutrófilos humanos foram estimulados ou não com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI5:1) por 180 minutos. O DNA nos sobrenadantes (MC CTR, MC NET e MC Filt) foi dosado pelo método de PicoGreen, e os gráficos são apresentados como a variação intradoador com valores absolutos da dosagem. Teste-*t* pareado (A) e One-Way ANOVA (B); \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$ .  $n=4-7$ .

Após o ensaio de infectividade quantificamos as células infectadas e a quantidade de parasitos por célula e calculamos o índice de infecção. Nossos resultados indicam que não houve diferença significativa entre os grupos, tanto na porcentagem de células infectadas e número de parasitos por célula, quanto para no índice de infecção (Figura 1.22 A e B). Em imagens representativas, podemos observar células VERO infectadas com parasitos após os tratamentos. (Figura 1.22 C).



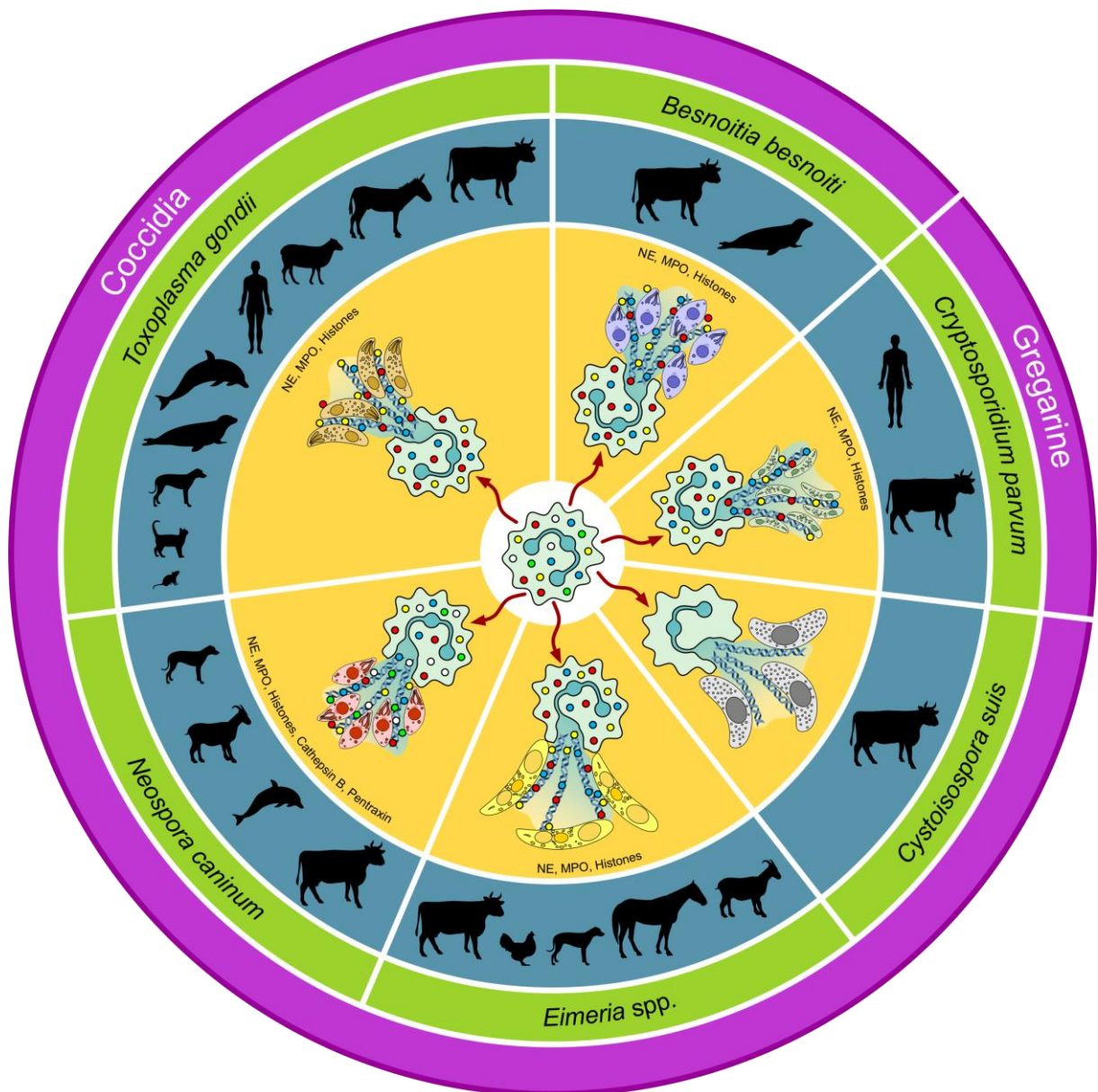
**Figura 4.22. Infecção de células VERO com taquizoítos tratados com NET.** Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH foram tratados com meio CTR (RPMI 1%) (I), MC CTR (II), MC NET (III) ou MC NET filtrado (IV), e usados para infectar monocamada de células VERO na proporção 1:1 (parasito:célula). Após 24 horas de interação, amostras foram processadas, coradas pelo método de May Grunwald Giemsa e analisadas. Imagens representativas de 3 a 7 experimentos independentes.

## 5 DISCUSSÃO

A importância das armadilhas extracelulares neutrofílicas na infecção contra o *T. gondii* vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa, e apesar de já ter sido demonstrada diante de neutrófilos de diferentes hospedeiros, ainda é necessário elucidar o papel da liberação de NET humana como um mecanismo de defesa contra o parasito. Logo, neste trabalho procuramos investigar como os neutrófilos humanos respondem à infecção por taquizoítos da cepa RH (altamente virulenta), avaliando as vias e mecanismos envolvidos na liberação de NET e qual sua relevância diante da infecção.

Inicialmente, estimulamos neutrófilos humanos com taquizoítos para quantificar o DNA relacionado às NETs presente nos sobrenadantes por meio da dosagem por PicoGreen. Mostramos pela primeira vez que neutrófilos humanos liberam NET rápida em resposta a taquizoítos, com detecção a partir de 15 minutos de estímulo, corroborando estudos anteriores realizados com neutrófilos de outros hospedeiros, intermediários e definitivo (Reichel et al. 2015; Yildiz et al. 2017; Yildiz et al. 2019; Macedo et al. 2020; Simsek et al. 2021). A liberação de NET se apresentou de forma tempo dependente, ocorrendo também após longo tempo de indução, de forma crescente, corroborando dados já publicados (Abdallah et al. 2011; Miranda et al. 2021).

Para demonstrar a liberação de NET por neutrófilos humanos e validar a dosagem por PicoGreen, ensaios de imunofluorescência foram realizados e as NETs foram detectadas utilizando-se marcadores para componentes clássicos de sua estrutura, como DNA, mieloperoxidase e histona H1. Os componentes presentes são os mesmos encontrados em NETs liberadas em resposta ao parasito por neutrófilos de outros hospedeiros, e também em NETs produzidas em resposta a outras espécies da subclasse dos coccídeos, grupo ao qual o *T. gondii* pertence (Figura 5.1). Com esta metodologia conseguimos também identificar a sobreposição da marcação de componentes das NETs com a marcação do parasito, o que poderia ser um indicativo de associação e aprisionamento dos taquizoítos.



**Figura 5.1. Composição da estrutura das NETs liberadas em resposta a protozoários da subclasse coccídea.** Esquema representativo que demonstra a composição das NETs liberadas por neutrófilos de diversos hospedeiros em resposta a protozoários da subclasse coccídea, incluindo o *T. gondii*, parasito de interesse desta dissertação. NE = elastase neutrofílica; MPO = mieloperoxidase (Macedo et al., artigo em preparação).

Sendo assim, com o intuito de analisar a relação das NETs com os parasitos de forma mais detalhada, a microscopia eletrônica de varredura foi a metodologia escolhida para este passo. Estudos anteriores já haviam relatado a presença de diferentes fenótipos das NETs, baseados na morfologia da sua estrutura (Hakkim et al. 2011; Schauer et al. 2014; Imlau et al. 2019). Dentre os fenótipos descritos estão *spNET*, que se assemelha a uma alongada estrutura de fio próxima a células

íntegras, *diffNET*, com estrutura mais difusa que pode se encontrar em formato circular e *AggNET*, caracterizada por estruturas mais densas e aglomeradas de rede de NETs originadas de diversos neutrófilos. Nossa análise nos permitiu observar dois dos fenótipos descritos até então. Com 15 minutos de indução, a NET rápida liberada em resposta ao *T. gondii* se mostrou majoritariamente como *sprNET*, liberadas de neutrófilos íntegros. Já, em 180 minutos de indução, observamos tanto *sprNET*, quanto *AggNET*, sendo esta última vista com maior frequência. A liberação de NET rápida é descrita como um tipo de liberação que mantém a viabilidade celular do neutrófilo (Saffarzadeh et al. 2014), o que pode explicar a presença de *sprNET* com 15 minutos de indução, onde conseguimos identificar o neutrófilo que origina essa estrutura das NETs. A presença desse fenótipo também é vista em tempo mais longo de indução, porém em menor quantidade, ao contrário da *aggNET*, que está presente de forma predominante nos tempos tardios, o que pode se relacionar com o tipo de liberação que leva à morte celular.

Dando continuidade ao estudo, após a caracterização da liberação das NETs e sua estrutura, procuramos avaliar de que forma o parasito leva à ativação dos neutrófilos humanos para a produção de NET. Em estudo publicado em 2012, Abi Abdallah mostrou que neutrófilos humanos tratados com citocalasina D, um inibidor da polimerização de actina que impede a fagocitose dos taquizoítos, não tiveram a produção de NET clássica alterada. Em nossos experimentos realizamos tratamento dos neutrófilos também com citocalasina D, e mostramos que o tratamento dos neutrófilos não interferiu na liberação de NET rápida e clássica induzida por *T. gondii*, similar aos resultados vistos também com neutrófilos do hospedeiro definitivo (Macedo et al. 2020). Junto a isso, em trabalho recente Miranda e colaboradores (2021) induziram neutrófilos humanos saudáveis com taquizoítos da cepa RH *in vitro*, no intuito de simular a infecção aguda. Após 3 horas de estímulo, a presença do parasito induziu a liberação de NET, que foi inibida com o tratamento dos taquizoítos por micalolide B, um despolimerizador de actina, impedindo a entrada ativa do parasito em neutrófilos. Os resultados apontaram que esse tratamento preveniu a liberação de NET quase completamente. Além disso, mostramos que a indução com parasitos mortos, fixados com PFA, levou a uma liberação de NET similar à do grupo controle não infectado, confirmando a necessidade da viabilidade dos parasitos para ativação celular e posterior liberação de NET. Nossos resultados, em conjunto com os dados publicados anteriormente,

confirmam que a entrada ativa de taquizóitos, mas não a fagocitose, é necessária para a ativação neutrofílica e liberação de NET induzida pelo *T. gondii*.

Desde a ativação celular até o momento da liberação de NET, diversos mecanismos moleculares participam de forma integral ou parcial do processo. Dentre os mecanismos envolvidos, alguns já foram descritos sendo essenciais para ativação dos neutrófilos, como a citrulinização de histonas (Li et al. 2010; Lewis et al. 2015) e o influxo de cálcio juntamente com a produção de ROS por NADPH oxidase (Fuchs et al. 2007; DeSouza-Vieira et al. 2016; Zeng et al. 2019). Para evidenciar as vias de sinalização envolvidas na formação de NET e avaliar as diferenças entre a liberação de NET rápida e clássica em nosso modelo, optamos por realizar ensaios com inibidores farmacológicos, seguido da quantificação de NET pela dosagem de DNA.

Demos início avaliando uma etapa fundamental para o processo da liberação de NET, que é o descondensamento da cromatina. Essa etapa pode ter a transmigração de elastase neutrofílica e mieloperoxidase para o núcleo como auxiliares no processo (Papayannopoulos et al. 2010; Pieterse et al. 2018), e também a participação de PAD4 como um catalisador da citrulinização de histonas (Zeng et al. 2019). Diferentemente de Reichel e colaboradores (2015), que mostraram a participação de MPO e NE na liberação de NET por neutrófilos de foca, em nosso modelo, apesar da mieloperoxidase estar presente na estrutura das NETs, sua inibição não alterou a produção de NET rápida ou clássica. Por outro lado, a inibição de elastase neutrofílica diminuiu a produção de NET clássica, corroborando dados de Miranda e colaboradores (2021), indicando NE como componente participante na produção de NET humana. Resultados semelhantes foram vistos por nosso grupo com neutrófilos de gato (Macedo et al. 2020). Juntamente a isso, mostramos que a cloroamidina, inibidor de PAD4, também teve efeito na redução de NET clássica, mas não rápida, reduzindo sua produção, o que sugere a participação dessa enzima somente no processo de formação de NET clássica. Dessa forma, nossos resultados apontam que a liberação de NET rápida induzida por *T. gondii* talvez envolva outro mecanismo no auxílio do descondensamento do DNA, que não seja a citrulinização de histonas por PAD4.

A avaliação das vias envolvidas na produção de NET frente ao *T. gondii* por neutrófilos de outros hospedeiros já foi investigada por outros grupos. Reichel e colaboradores (2015) mostraram que a inibição de NADPH oxidase pelo difenileno-



iodônio (DPI) diminuiu a produção de NET por neutrófilos de foca. Juntamente a eles, neutrófilos de cachorro também mostraram ter a participação de NADPH oxidase envolvida para a liberação de NET clássica (Wei et al 2020). A investigação da participação de NADPH oxidase como produtora de ROS no nosso modelo não foi possível, uma vez que o DPI apresentou toxicidade aos neutrófilos (dados não mostrados). Porém, conseguimos avaliar de forma indireta a participação de ROS tratando os neutrófilos com NAC, como um agente redutor de ROS intracelular. Miranda e colaboradores (2021) já haviam mostrado que a presença de *T. gondii* induz a produção de ROS neutrofílica, sem destacar se era um processo necessário para produção de NET. Em nosso estudo, o uso do NAC diminuiu de forma significativa a liberação de NET rápida, indicando a possível contribuição da produção de ROS para a liberação de NET humana. Além disso, uma vez que a produção de ROS é dependente de  $Ca^{2+}$  (Burgos et al 2011; Conejeros et al. 2011), investigamos também sua participação na contribuição para a formação de NET. Mostramos pela primeira vez que o tratamento dos neutrófilos com BAPTA-AM, que age como um quelante de cálcio intracelular, diminuiu de forma significativa a liberação de NET rápida, como esperado, sugerindo seu papel durante o processo contra o *T. gondii*. Reichel e colaboradores (2015) também mostraram o papel do cálcio na formação de NET por neutrófilos de foca, porém a análise só foi feita com indução por 60 minutos, onde bloqueadores dos canais de cálcio influenciaram negativamente na liberação de NET clássica.

Em 2012, Abi Abdallah e colaboradores demonstraram que a produção de NET leva a ativação de ERK 1/2 e requer a via de sinalização de MEK 1/2, que uma vez bloqueada pelo inibidor U0126, diminui a produção de NET. Em nosso estudo, utilizamos o inibidor PD98, também inibidor da via de MEK, porém surpreendentemente não houve alteração da liberação de NET rápida ou clássica. Apesar de ambos serem inibidores de MEK, especificamente de MEK1 e 2, interferindo na cascata de sinalização da via de Raf-MEK-ERK, o inibidor PD98 não inibe de forma tão potente MEK2, e quando comparados, o inibidor U0126 pode vir a ser mais potente (Favata et al. 1998). Logo, não podemos excluir a via de MEK como participante da liberação de NET humana em resposta a *T. gondii* somente pelo resultado encontrado com o uso do PD98. Para isso, é necessário realizar mais ensaios utilizando outros inibidores, para que possamos estudar melhor essa via de

sinalização e corroborar ou refutar dados publicados anteriormente (Abi Abdallah et al. 2012).

Por fim, investigamos o papel da autofagia como um mecanismo participante da produção de NET. A autofagia é um processo regulatório conservado, visando a homeostase celular, que regula o estresse nutricional, oxidativo, a presença de organelas danificadas e também participa em infecções por diversos patógenos, podendo facilitar ou dificultar sua sobrevivência (Levine et al. 2011). Alguns estudos já mostraram o envolvimento da autofagia com a liberação de NET (Skendros et al. 2018), porém o papel da autofagia nesse processo pode variar dependendo do tipo de estímulo usado para a ativação neutrofílica, nunca relacionado anteriormente com a liberação de NET estimulada pelo *T. gondii*. Inicialmente, nosso projeto possuía diferentes metodologias para essa análise, como a expressão de proteínas autofágicas, indutores e inibidores de diferentes vias participantes para o processo da autofagia e microscopia eletrônica de transmissão. Porém, devido aos obstáculos encontrados durante a pandemia e redução do tempo para realização dos experimentos, tivemos que reduzir o número de metodologias abordadas, e optamos por manter a microscopia de imunofluorescência e ensaio com inibidores. Após estímulo dos neutrófilos com os taquizoítos e aumento dessas células positivas para *puncta* de LC3II, indicando o aumento do fluxo autofágico na presença do parasito, decidimos averiguar com mais cautela a participação da autofagia nesse processo.

A via de PI3K é expressa em neutrófilos humanos e regula diversas funções celulares do sistema imune, como a produção de ROS (Condliffe et al. 2015). A produção de NET clássica induzida por *Leishmania amazonensis* é parcialmente dependente de PI3K, seja pela isoforma PI3K $\gamma$ , quanto por PI3K $\delta$  (De Souza-Vieira et al. 2016). Em recente trabalho, nosso grupo mostrou que neutrófilos de gato também tem participação da via de PI3K na liberação de NET clássica (Macedo et al. 2020). Em nosso modelo, realizamos ensaios com o 3-MA, inibidor farmacológico da via de PI3K, envolvido tanto na liberação de NET quanto na via de PI3K/Akt/mTOR relacionada a autofagia, e nossos ensaios indicaram que a liberação de NET rápida se mostrou parcialmente dependente de PI3K, pelas duas isoformas analisadas (PI3K $\gamma$  e PI3K $\delta$ ), relacionando, pela primeira vez, o envolvimento desta via na liberação de NET por neutrófilos humanos em resposta ao *T. gondii*. Se há envolvimento de outras vias de sinalização para a formação de NET

rápida e quais vias estão envolvidas na formação de NET clássica, é algo que precisamos investigar de forma mais ampla.

Avaliamos a viabilidade dos neutrófilos na presença dos inibidores farmacológicos com o reagente PrestoBlue. A técnica foi usada em neutrófilos de três doadores independentes; porém, observamos que o tratamento com NAC de alguma forma interferiu na reação com o PrestoBlue. Sendo assim, avaliamos a viabilidade celular também pelo método do azul de tripano. Dessa forma, nos certificamos que as drogas usadas não geraram toxicidade celular. Por outro lado, o DPI, inibidor da produção de ROS pela via da NADPH oxidase, que é amplamente utilizado nos estudos de NET, levou à morte mais de 30% das células (avaliado por ambos os métodos), e seu uso foi interrompido.

A estrutura das NETs e seus componentes antimicrobianos como elastase neutrofílica, mieloperoxidase, catepsina G e outros, permitem o aprisionamento e morte de diversos patógenos. Em nosso estudo investigamos o potencial das NETs liberadas por neutrófilos humanos em afetar a viabilidade dos taquizoítos. Em estudo feito por van der Liden e colaboradores (2017) através do acompanhamento da liberação de NET por videomicroscopia, os autores mostram que após rompimento do neutrófilo e liberação do conteúdo para o meio extracelular, as NETs se localizam ao redor dos neutrófilos de forma difusa, diferentemente do que é visto em imagens de microscopia processadas após fixação das células e manuseamento das amostras. Dessa forma, utilizamos o PI com a intenção de acompanhar o processo de marcação das células indicando o comprometimento de membrana, o que poderia ser um indicativo da liberação e presença das NETs, assim como também a marcação de parasitos que poderiam ter a perda da sua viabilidade. Após incubarmos neutrófilos humanos com taquizoítos e PI, nosso registro de videomicroscopia capturou a possível ativação celular e liberação de NET de neutrófilos diferentes com o passar do tempo pela incorporação de PI, sinalizando a extrusão do DNA para o meio extracelular e o possível rompimento de membrana, similar ao que foi visto por van der Linden (2017).

Apesar de naturalmente as NETs se encontrarem de forma semelhante ao que é mostrado por imagens de imunofluorescência e MEV, com estruturas maiores cobrindo uma superfície maior devido ao fluxo sanguíneo, o registro por videomicroscopia nos permitiu analisar as mudanças morfológicas celulares que ocorrem desde a ativação até a liberação de NET. Além disso, conseguimos

acompanhar também a interação dessa estrutura com os parasitos. Nosso registro mostrou que apesar de taquizoítos aparentarem estar em contato com estruturas indicativas de estruturas das NETs marcadas com PI, não há incorporação do intercalante pelos parasitos ao longo do tempo, indicando que não há perda de viabilidade por comprometimento de membrana do *T. gondii*. De fato, após o registro, observamos alguns taquizoítos marcados com PI em diferentes campos, porém esses não estavam nas proximidades das estruturas intercaladas com PI, que acreditamos serem NETs, ou neutrófilos marcados. Logo, muito provavelmente não estavam viáveis antes mesmo da interação com neutrófilos, ou morreram devido a outros mecanismos de defesa, como a degranulação, não resultando de uma morte pela ação das NETs. Apesar de diversos neutrófilos originarem NETs com componentes clássicos em sua estrutura, o conteúdo proteico dos grânulos e o arsenal molecular presente nos neutrófilos varia com a espécie animal (Yildiz et al. 2017; Fingerhut et al. 2020). Logo, as proteínas que são essenciais para atividade antimicrobiana podem diferir na composição total das NETs entre neutrófilos de diferentes hospedeiros, interferindo na toxicidade desse mecanismo, o que pode explicar diferentes respostas quanto ao efeito letal das NETs contra o mesmo parasito (Yildiz et al. 2017).

Além disso, como já foi documentando, a capacidade de inibir, degradar e resistir à estrutura das NETs permite o escape e sobrevivência de diversos patógenos (Storisteanu et al. 2016; Ríos-López et al. 2021). Estudos da interação entre NET e *Staphylococcus aureus* mostraram que a bactéria produz diversos fatores de virulência que influenciam na habilidade de escapar de mecanismos do sistema imune, como a degradação da estrutura central das NETs pela produção de nucleases, contribuindo para a patogênese observada *in vivo* (Berends et al. 2010). Mais tarde, outro grupo mostrou que a degradação de NET ocorre de forma a converter sua estrutura em desoxiadenosina, promovendo a morte de células do sistema imune mediada por caspase 3 (Thammavongsa et al. 2013). Assim como observado para bactéria, espécies do gênero *Leishmania* também são capazes de escapar das NETs, por meio da expressão da enzima 3'-nucleotidase/nuclease (3'NT/NU), que é uma enzima envolvida na nutrição e infecção do parasito, também capaz de clivar a estrutura das NETs, como mostrado para *L. infantum* (Guimarães-Costa et al. 2014). Além disso, foi mostrado para *L. amazonensis* e *L. donovani* que a superfície de membrana composta por lipofosfoglicano (LPG)

encontrada comumente em espécies do gênero confere resistência a morte induzida pela ação das NETs (Guimarães-Costa et al. 2009; Christelle et al. 2010).

Em nosso estudo anterior com neutrófilos de gato, constatamos que a NET é capaz de matar os taquizoítos (Macedo et al. 2020), diferentemente do que foi visto aqui, com a produção de NET por neutrófilos humanos. É possível que os taquizoítos consigam escapar do efeito antimicrobiano das NETs por neutrófilos humanos por meio da produção de inibidores de componentes presentes na estrutura das NETs ou até da produção de nucleases específicas, favorecendo sua sobrevivência. Sabe-se, por exemplo, que taquizoítos de *T. gondii* expressam uma endonuclease tipo IV (TgAPN) de forma abundante, que atua na proteção contra danos causados ao DNA pelo estresse oxidativo e é fundamental para proteção contra a ação de células do sistema imune (Onyango et al. 2011). Em trabalho anterior feito por Wei e colaboradores (2020), também com a cepa RH, a relação entre o parasito e meio condicionado contendo NET foi observada e notou-se a degradação das NETs presente nesse meio, reforçando a possível habilidade do *T. gondii* em produzir fatores que facilitem seu escape dessa estrutura, o que pode vir a ser algo relacionado a virulência da cepa analisada. Se esta nuclease mencionada anteriormente ou outra podem estar envolvidas no escape do parasito, ou se ele utiliza alguma outra estratégia para escapar das NETs, é algo que precisa ser melhor investigado. Estudos que abordem análise do genoma do *T. gondii* da cepa RH, ou até o uso de inibidores de componentes presentes na estrutura das NETs como a elastase neutrofílica, podem ser metodologias que auxiliem nessa análise específica do escape às NETs. Um ponto que precisa ser destacado também é a possível divergência na interação de diferentes cepas do *T. gondii* às NETs originadas de neutrófilos humanos.

Por último, para avaliar a capacidade das NETs no aprisionamento e redução da infecção é preciso utilizar meios para reter ou degradar sua estrutura, uma vez que neutrófilos possuem um arsenal de mecanismos de defesa que podem influenciar no resultado. No primeiro estudo da liberação de NET em resposta ao *T. gondii*, Abdallah e colaboradores (2011) utilizaram a marcação pelo intercalante Sytox Green na interação entre neutrófilo e parasito, e observaram a incorporação do corante pelo parasito após contato com as NETs, indicando perda de viabilidade. Seguindo de experimento de infectividade onde foi analisado a formação de placas em cultura de fibroblastos infectados, a morte dos parasitos pelas NETs, levou à

redução da infecção das células, que foi restaurada mediante uso da DNase. Estudos que vieram em seguida, com neutrófilos de diferentes hospedeiros intermediários e definitivo, também abordaram o efeito das NETs na redução da infecção pelo parasito (Reichel et al. 2015; Yildiz et al. 2017; Yildiz et al. 2018; Wei et al. 2020; Macedo et al. 2020; Simsek et al. 2021). Dentre as metodologias descritas, foram utilizadas diferentes linhagens celulares e condições para a análise do efeito das NETs na infecção, o que dificulta a comparação do papel das NETs originadas por diferentes neutrófilos contra a infecção. Porém, apesar das divergências nas metodologias utilizadas, foi demonstrado um efeito positivo das NETs na redução da infecção pelo *T. gondii*.

A NET originada de neutrófilos de ovelha, apesar de não ocasionar letalidade aos taquizoítos, foi eficiente no aprisionamento e conseqüente diminuição da taxa de infecção de células VERO (Yildiz et al. 2017). Em nosso estudo, nós optamos por produzir meios condicionados contendo ou não NET com o estímulo do próprio parasito para avaliar essa questão. Após dosagem dos meios filtrados indicando a retenção das NETs e conseqüente redução da dosagem de DNA, usamos esses meios para tratar parasitos e infectar monocamadas de células VERO. Em nosso ensaio de viabilidade, constatamos que assim como NET de neutrófilo de ovelha, as NETs originadas de neutrófilos humanos não ocasionaram morte dos parasitos, porém por outro lado, também não foi eficaz em reduzir o índice de infecção do parasito de forma significativa. Apesar de aparentar aprisionar, o *T. gondii*, como observado por microscopia, parece que de alguma forma o parasito consegue escapar das NETs e infectar a célula hospedeira, garantindo sua sobrevivência, o que precisa ser melhor investigado.

Muito progresso foi feito nos últimos anos em relação ao entendimento do papel das NETs nas infecções por patógenos, seja por bactérias, vírus ou protozoários. Diante do entendimento de que a origem do neutrófilo, o protocolo de isolamento, o meio de cultura, e o estímulo utilizado são fatores importantes que influenciam nos mecanismos envolvidos na liberação de NET, se fez necessário estudar a infecção em diferentes hospedeiros de forma individual, mesmo que este seja um mecanismo bem conservado em comum entre as espécies. Com o *T. gondii* não foi diferente, e hoje temos cada vez mais um conjunto de dados que nos permite entender a relação das NETs com o parasito e as diferenças encontradas na resposta de neutrófilos de cada hospedeiro.

Apesar de estudarmos de forma mais detalhada a liberação de NET humana em resposta ao *T. gondii* neste trabalho, é necessária uma maior investigação quanto às vias de sinalização da liberação de NET, a participação de mecanismos como a NADPH oxidase e a autofagia. Além disso, também se faz necessário avaliar o papel das NETs na infecção pela perspectiva do parasito, quanto as enzimas que podem vir a ser produzidas e inibidores que permitam seu escape das NETs e sucesso na infecção. Recentemente, Miranda e colaboradores (2021) mostraram que o estímulo de neutrófilos saudáveis *in vitro* com taquizoítos da cepa RH, leva a uma ativação e consequente produção de NET similar ao observado com neutrófilos isolados de pacientes com toxoplasmose aguda. Dessa forma, a produção de NET analisada *in vitro* pode vir a simular o que ocorre no organismo após a infecção, e assim podemos avaliar com maior clareza de que forma a liberação de NET pode vir a ser um mecanismo eficaz contra a toxoplasmose humana aguda.

## 6 CONCLUSÕES

Mostramos neste estudo pela primeira vez a liberação de NET rápida, além de NET clássica, produzida por neutrófilos humanos em resposta a taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH. A estrutura das NETs apresentou diferentes fenótipos nos tempos analisados, mantendo uma associação com os parasitos. Dentre os mecanismos analisados, constatamos que a produção de NET rápida é parcialmente dependente de cálcio intracelular, ROS e da via de sinalização da PI3K. Por outro lado, a formação de NET clássica requer elastase neutrofílica e PAD4. Junto a isso, demonstramos que as NETs não parecem afetar a viabilidade dos taquizoítos, e consequentemente o índice de infecção em células VERO.

O desenvolvimento do estudo da liberação de NET humana em resposta a este parasito nos permitiu compreender a participação de alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na interação protozoário e sistema imune, e como um possível escape do *T. gondii* contra um mecanismo de defesa conservado entre os hospedeiros intermediários e definitivo do parasito pode levar ao sucesso da infecção. Estudos futuros permitirão avaliar de que forma o protozoário consegue escapar das NETs e como este mecanismo pode vir a ter uma relevância frente à infecção pelo protozoário.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah DSA, et al. *Toxoplasma gondii* Triggers Release of Human and Mouse Neutrophil Extracellular Traps. *Infect Immun*. 2012; 80(2):768-77.

Aguirre AA, et al. The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *EcoHealth*. 2019; 16(2):378-390.

Alvarado-Esquivel C, et al. Association between *Toxoplasma gondii* infection and history of blood transfusion: a case-control seroprevalence study. *J Int Med Res*. 2018; 46(4):1626-1633.

Andrews KT, et al. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014; 4(2):95-111.

Attademo FLN, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) in Brazil. *J Zoo Wildl Med*. 2016; 47(2):423-6.

Bahia-Oliveira LMG, et al. Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9(1):55-62.

Berends ETM et al. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J. Innate Immun*. 2010; 576-586.

Besteiro S. Which roles for autophagy in *Toxoplasma gondii* and related apicomplexan parasites?. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2012; 184(1):1-8.

Biswas A, et al. Behavior of neutrophil granulocytes during *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 21;7:259.

Bliss SK, et al. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun*. 2001; 69(8):4898-905.

Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010; 33(5):657-70.

Brinkmann V, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303(5663):1532-5.

Brinkmann et al. Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them. *JOVE*. 2010; vol. 36.

Burgess TL, et al. Defining the risk landscape in the context of pathogen pollution: *Toxoplasma gondii* in sea otters along the Pacific Rim. R. Soc. Open Sci. 2018; 5(7):171178.

Burgos RA, et al. Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. Vet. Immunol. Immunopathol. 2011; 143, 1–10.

Christelli G, et al. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. J Immunol. 2010; 185(7):4319-27.

Coombes JL, et al. Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. Proc Natl Acad. 2013; 110(21):E1913-22.

Conceição AR, et al. Ocular Findings in Infants with Congenital Toxoplasmosis after a Toxoplasmosis Outbreak. Ophthalmology. 2021; 128(9):1346-1355.

Condliffe AM, et al. Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. Blood. 2005; 106, 1432–1440.

Conejeros I, et al. Induction of reactive oxygen species in bovine neutrophils is CD11b, but not dectin-1-dependent. Vet. Immunol. Immunopathol. 2011; 139, 308-312.

Conrad PA, et al. Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. Int. J. Parasitol. 2005; 35(11-12):1155-68.

Dattoli VC, et al. Oocyst ingestion as an important transmission route of *Toxoplasma gondii* in Brazilian urban children. J Parasitol. 2011; 97(6):1080-4.

Debierre-Grockiego F, et al. Recent Advances in the Roles of Neutrophils in Toxoplasmosis. Trends Parasitol. 2020 36(12):956-958.

de Buhr N, et al. Streptococcus suis DNase SsnA contributes to degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) and evasion of NET-mediated antimicrobial activity. Microbiology (Reading). 2014;160(Pt 2):385-395.

Delgado-Rizo V, et al. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. Front Immunol. 2017; 8:81.

De Souza-Vieira T, et al. Neutrophil extracellular traps release induced by *Leishmania*: Role of PI3K $\gamma$ , ERK, PI3K $\sigma$ , PKC, and [Ca<sup>2+</sup>]. J. Leukoc. Biol. 2016; 100, 801–810.

De Souza W. Aspectos ultraestruturais do processo de divisão do *Toxoplasma gondii*. Rev Soc Bras Med Trop. 1974; 8 (1).

Díaz-Godínez C, et al. *Entamoeba histolytica* Trophozoites Induce a Rapid Non-classical NETosis Mechanism Independent of NOX2-Derived Reactive Oxygen Species and PAD4 Activity. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8:184.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii* Int. J. Parasitol. 1998; 28(7):1019-24.

Dubey JP, et al. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. Clin Microbiol. 1998; 11(2):267-99.

Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 2009; 39(8):877-82.

Dubey JP, et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. Parasitology. 2012; 139(11):1375-424.

Estúa-Acosta GA, et al. Neutrophil Extracellular Traps: Current Perspectives in the Eye. MDPI Cells. 2019; 8(9):979.

Favata MF, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. J Biol Chem. 1998; 273(29):18623-32.

Fingerhut L, et al. What is the evolutionary fingerprint in neutrophil granulocytes?. Int. J. Mol. Sci. 2020; 21(12):4523.

Franco PS, et al. Brazilian strains of *Toxoplasma gondii* are controlled by azithromycin and modulate cytokine production in human placental explants. J Biomed Sci. 2019; 26(1):10.

Fuchs TA, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps J Cell Biol. 2007; 176(2):231-41.

Gabriel C, et al. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. J Immunol. 2010; 185(7):4319-27.

Genova BMD, et al. Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. PLoS Biol. 2019; 17(8):e3000364.

Germic N, et al. Neither eosinophils nor neutrophils require ATG5-dependent autophagy for extracellular DNA trap formation. Immunology. 2017; 152(3):517-525.

Ghozzi K, et al. First report of Tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators. *Mar. Pollut. Bull.* 2017; 15;117(12):197-202.

Guimarães-Costa AB, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(16):6748-53.

Guimarães-Costa AB, et al. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. *Infect Immun.* 2014; 82(4):1732-40.

Hakkim A, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* 2011; 75-77, 2011.

Hallett MB, Lloyds D. Neutrophil priming: the cellular signals that say “amber” but not “green.”. *Immunol Today.* 1995; 16(6):264-8.

Hamam HJ, Palaniyar N. Post-Translational Modifications in NETosis and NETs-Mediated Diseases. *Biomolecules.* 2019; 9(8):369.

Hamilton CM, Comparative virulence of Caribbean, Brazilian and European isolates of *Toxoplasma gondii*. *Parasit Vectors.* 2019; 12(1):104.

Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8(10):634-40.

Honnold SP, et al. Toxoplasmosis in a Hawaiian Monk Seal (*Monachus schauinslandi*). *J Parasitol.* 2005; 91(3):695-7.

Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. *J Infect Dis.* 1995; 172(6):1561-6.

Imlau M, et al. Dolphin-derived NETosis results in rapid *Toxoplasma gondii* tachyzoite ensnarement and different phenotypes of NETs. *Dev Comp Immunol.* 2020 103:103527.

Itakura A, McCarty OJT. Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2013; 305(3):C348-54.

Karakurt, Yildiz. In vitro investigation of NETosis reaction developing from dog polymorphonuclear neutrophils to *Toxoplasma gondii*. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2020; 44: 886-893.

Kenny EF, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife*. 2017; 6:e24437.

Khan A, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(37):148727.

Khan A, et al. A monomorphic haplotype of chromosome Ia is associated with widespread success in clonal and nonclonal populations of *Toxoplasma gondii*. *MBio*. 2011; 2(6):e00228-11.

Khurana S, Batra N. Toxoplasmosis in organ transplant recipients: Evaluation, implication and prevention. *Trop. Parasitol*. 2016; 6(2):123-128.

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*. 2013; 13(3):159-75.

Lacerda LC, et al. *Toxoplasma gondii* induces extracellular traps release in cat neutrophils. *Exp Parasitol*. 2019; 207:107770.

Levine B, et al. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011; 469, 323–335.

Li P, et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med*. 2010; 207, 1853–1862.

Li L, et al. Mouse macrophages capture and kill *Giardia lamblia* by means of releasing extracellular trap. *Dev Comp Immunol*. 2018; 88:206-212.

Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev*. 2019; 99(2):1223-1248.

Lewis HD, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat. Chem. Biol*. 2015; 11, 189–191.

Macedo IS, et al. Extracellular Traps Released by Neutrophils from Cats are Detrimental to *Toxoplasma gondii* Infectivity. *Microorganisms*. 2020; 8(11):1628.

Martorelli Di Genova B, et al. Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. *PLoS Biol*. 2019; 17(8):e3000364.

Miranda FJB, et al. *Toxoplasma gondii*-Induced Neutrophil Extracellular Traps Amplify the Innate and Adaptive Response. *mBio*. 2021; 12(5):e0130721.

Moreira-Souza ACA, et al. Pyrimidinergic receptor activation controls *Toxoplasma gondii* infection in macrophages. *PloS one*. 2015; v.10, n.7, p.e0133502.

Nicolle C, Manceaux LH. On a leishman body infection (or related organisms) of the gondi. *Int J Parasitol*. 1908; 39(8):863-4.

Onyango DO, et al. Base excision repair apurinic/aprimidinic endonucleases in apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. DNA Repair (Amst). 2011; 10(5):466-75.

Pappas G, et al. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. Int J Parasitol. 2009; 39(12):1385-94.

Papayannopoulos V, et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 2010; 191(3):677-91.

Parker H, et al. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. J Leukoc Biol. 2012; 92(4):841-9.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet. 2001; 357(9270):1777-89.

Pieterse E, et al. Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. Front. Immunol. 2016; 7:484.

Pieterse E, et al. Cleaved N-terminal histone tails distinguish between NADPH oxidase (NOX)-dependent and NOX-independent pathways of neutrophil extracellular trap formation. Ann Rheum Dis. 2018; 77(12):1790-1798.

Pilsczek FH, et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. J. Immunol. Res. 2010; 185(12):741325.

Ravindran M. Neutrophil Extracellular Trap Formation: J. Physiol. Pharmacol. 2019; 9(8):365.

Reichel M, et al. Harbour seal (*Phoca vitulina*) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. Dev. Comp. Immunol. 2015; 50(2):106-15.

Remijsen Q, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. Cell Death Differ. 2011; 21(2):290-304.

Ríos-López AL, et al. Avoiding the trap: Mechanisms developed by pathogens to escape neutrophil extracellular traps. Microbiol. Res. 2021; 243:126644.

Rohrbach AS, et al. Activation of PAD4 in NET formation. Front. Immunol. 2012; 3:360.

Saffarzadeh M, et al. Characterization of rapid neutrophil extracellular trap formation and its cooperation with phagocytosis in human neutrophils. *Discoveries Journals*. 2014; 2(2):e19.

Schauer C, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* 2014; 20, 511–517.

Segal AW. How Neutrophils Kill Microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:197223.

Seper A, et al. *Vibrio cholerae* evades neutrophil extracellular traps by the activity of two extracellular nucleases. *PLoS Pathog.* 2013; 9(9):e1003614.

Shapiro K, et al. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food and Waterborne Parasitology.* 2019; 15:e00049.

Sibley LD, Ajioka JW. Population Structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal Expansion Driven by Infrequent Recombination and Selective Sweeps. *Annu Rev Microbiol.* 2008; 62:329-51.

Silvestre-Roig C, et al. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood.* 2016; 127(18):2173-81.

Simsek NS et al. In vitro investigation on extracellular traps formation of cat polymorphonuclear leucocytes against *Toxoplasma gondii*. *Turk. J. Vet. Anim.* 2021; 45: 873-880.

Skendros P, et al. Autophagy in Neutrophils: From Granulopoiesis to Neutrophil Extracellular Traps. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2018; 4;6:109.

Snyder LM, Denkers EY. From initiators to effectors: roadmap through the intestine during encounter of *Toxoplasma gondii* with the mucosal immune system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 10:614701.

Sollberger G, et al. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol.* 2018; 3(26):eaar6689.

Souto XM, et al. The morphological analysis of autophagy in primary skeletal muscle cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 2016; 115(7):2853-61.

Souza W, Belfort JR, R. (org.). *Toxoplasmosis & Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.

Sousa-Rocha D, et al. *Trypanosoma cruzi* and its soluble antigens induce NET release by stimulating toll-like receptors. *PLoS One.* 2015; 10(10):e0139569.

Splendore A. A new protozoan parasite of rabbit found in histological lesions similar to human Kala-Azar. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1908; 3:109–112.

Storisteanu DML, et al. Evasion of neutrophil extracellular traps by respiratory pathogens. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2016; 56(4):423-431.

Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* 2001; Apêndice 3:Apêndice 3B.

Tenter AM, et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000; 30(12-13):1217-58.

Thammavongsa V, et al. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science.* 2013; 342(6160):863-6.

Thiam HR, et al. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2020; 36:191-218.

Van der Linden M, et al. Differential Signalling and Kinetics of Neutrophil Extracellular Trap Release Revealed by Quantitative Live Imaging. *Sci Rep.* 2017; 7(1):6529.

Villagra-Blanco R, et al. Bovine Polymorphonuclear Neutrophils Cast Neutrophil Extracellular Traps against the Abortive Parasite *Neospora caninum*. *Front Immunol.* 2017; 8:606.

Wardini AB, et al. Neutrophil properties in healthy and *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. *Sci Rep.* 2019; 9(1):6247.

Wei Z, et al. Neutrophil Extracellular Traps Release Induced by the Apicomplexan Parasite *Neospora caninum In Vitro*. *Front Immunol.* 2016; 7:436.

Wei Z, et al. *Toxoplasma gondii* Triggers Neutrophil Extracellular Traps Release in Dogs. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:429.

Wei R, et al. *Trypanosoma evansi* triggered neutrophil extracellular traps formation dependent on myeloperoxidase, neutrophil elastase, and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways. *Vet Parasitol.* 2021; 296:109502.

Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* 2000; 5:D391-405.

Yildiz K, et al. Role of NETs in the difference in host susceptibility to *Toxoplasma gondii* between sheep and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2017; 189:1-10.

Yipp BG, et al. Dynamic NETosis is carried out by live neutrophils in human and mouse bacterial abscesses and during severe gram positive infection. *Nat. Med.* 2012; 18(9): 1386–1393.



Zeng MY, et al. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol Oral Microbiol.* 2019; 34(2):27-38.



Zhou E, et al. Simultaneous and Positively Correlated NET Formation and Autophagy in *Besnoitia besnoiti* Tachyzoite-Exposed Bovine Polymorphonuclear Neutrophils. *Front. immunol.* 2019; 10:1131.

## 8 PUBLICAÇÕES



Article

# Extracellular Traps Released by Neutrophils from Cats are Detrimental to *Toxoplasma gondii* Infectivity

Isabela S. Macedo <sup>1,†</sup>, Marcos V. A. Lima <sup>1,†</sup>, Jéssica S. Souza <sup>1</sup>, Natalia C. Rochael <sup>2</sup>, Pedro N. Caldas <sup>3</sup>, Helene S. Barbosa <sup>1</sup>, Flávio A. Lara <sup>4</sup>, Elvira M. Saraiva <sup>2</sup>  and Rafael M. Mariante <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-360, RJ, Brazil; macedos.isa@gmail.com (I.S.M.); marquinhos9796@gmail.com (M.V.A.L.); jsouza.biomed@gmail.com (J.S.S.); helene@ioc.fiocruz.br (H.S.B.)

<sup>2</sup> Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil; natyrochael@yahoo.com.br (N.C.R.); esaraiva@micro.ufrj.br (E.M.S.)

<sup>3</sup> HVN Hospital Veterinário Niterói, Niterói 24360-440, RJ, Brazil; pedrovvet@pedrovvet.com.br

<sup>4</sup> Laboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-360, RJ, Brazil; flavioalveslara2000@gmail.com

\* Correspondence: rafael.mariante@ioc.fiocruz.br or rafaelmariante@gmail.com; Tel.: +55-21-2562-1018

† These authors contributed equally to this work.

Received: 14 September 2020; Accepted: 11 October 2020; Published: 22 October 2020



**Abstract:** *Toxoplasma gondii* is the causative agent of toxoplasmosis, an infectious disease that affects over 30% of the human world population, causing fatal infections in immunocompromised individuals and neonates. The life cycle of *T. gondii* is complex, and involves intermediate hosts (birds and mammals) and definitive hosts (felines, including domestic cats). The innate immune repertoire against the parasite involves the production of neutrophil extracellular traps (NET), and neutrophils from several intermediate hosts produce NET induced by *T. gondii*. However, the mechanisms underlying NET release in response to the parasite have been poorly explored. Therefore, the aims of this study were to investigate whether neutrophils from cats produce NET triggered by *T. gondii* and to understand the mechanisms thereby involved. Neutrophils from cats were stimulated with *T. gondii* tachyzoites and NET-derived DNA in the supernatant was quantified during the time. The presence of histone H1 and myeloperoxidase was detected by immunofluorescence. We observed that cat neutrophils produce both classical and rapid/early NET stimulated by *T. gondii*. Inhibition of elastase, intracellular calcium, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)- $\delta$  partially blocked classical NET release in response to the parasite. Electron microscopy revealed strands and networks of DNA in close contact or completely entrapping parasites. Live imaging showed that tachyzoites are killed by NET. We conclude that the production of NET is a conserved strategy to control infection by *T. gondii* amongst intermediate and definitive hosts.

**Keywords:** calcium; definitive host; elastase; felid; infectivity; killing; live imaging; neutrophil extracellular trap; PI3K; *Toxoplasma gondii*

### 1. Introduction

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite of the phylum Apicomplexa, and one of the most successful eukaryotic pathogens of medical and veterinary importance, since it can naturally infect all warm-blooded animals, including humans [1,2]. The parasite is distributed worldwide, and it is estimated that one third of the world's human population is chronically infected with *T. gondii*, with a seroprevalence varying from 9% to more than 80% in different countries [3].

Humans acquire infection by ingesting contaminated food or water, consuming raw or undercooked meat containing the parasite, or by vertical transmission from mother to fetus [1,2]. In general, the clinical signs produced by *T. gondii* are mild and self-limiting in healthy individuals, but in some cases, it can lead to ocular toxoplasmosis [4]. On the other hand, in immunocompromised individuals and congenitally infected individuals the parasite can lead to severe illness [5,6].

The life cycle of *T. gondii* is complex, and the parasite can virtually infect all mammals and birds, that are intermediate hosts of the protozoan. Felids are the only known definitive host, in the gut of which the sexual cycle of the parasite occurs giving rise to the environmentally resistant oocysts [1,2]. The oocysts are released in cat feces and will mature in the environment, becoming a source of infection for other hosts [7]. Other forms of the parasite include the tachyzoites, which are the fast replicating forms that are vertically transmitted to fetus in congenital toxoplasmosis, and bradyzoites, which are present in tissue cysts and preferentially persist in brain and muscle tissues of infected hosts [8].

Neutrophils are the most abundant white blood cells in cats [9]. They constitute the first line of defense against invading pathogens and modulate adaptive immune responses by interacting with other immune cells through direct cell-to-cell contact [10] and the secretion of immunomodulators [11–13]. During *T. gondii* infection, neutrophils are rapidly recruited to the site of parasites entry [14–16], where they can get infected, therefore acting as motile reservoirs of *T. gondii* and contributing to the spread of the parasite through a Trojan-horse mechanism [16].

Neutrophils use an arsenal of weapons against invading microorganisms, including phagocytosis, degranulation, and production of extracellular traps [17–20]. Neutrophil extracellular traps (NET) are composed of a scaffold of DNA associated with granular and cytoplasmic proteins that can entrap and kill pathogens through two major mechanisms: a classical one, which is reactive oxygen species (ROS)-dependent and occurs after 1–4 h of stimulation, leading to neutrophil death; an early/rapid one, which does not depend on ROS and occurs within 5 to 15 min of stimulation, not affecting neutrophil viability and function [21–23].

Release of NET can be triggered by an uncountable number of biological stimuli, including bacteria, fungus, viruses, helminths, and protozoans such as the pathogenic parasite *T. gondii* [24–28]. Neutrophils from different organisms release NET upon interaction with *T. gondii*, including those of mice, humans, dogs, cattle, sheep, donkey, harbor seals, and dolphins [29–35], all of which are intermediate hosts for the parasite. Recently, extracellular traps were also shown to be produced by cat neutrophils [36]. However, the mechanisms behind NET formation in response to *T. gondii* are not completely understood.

Here, we show that neutrophils from cat, the main definitive host for the parasite, release NET in response to two of the major clonal lineages of *T. gondii* and that the parasites are entrapped and killed by NET. The release of NET begins as early as 15 min of interaction with parasites, and proceeds for several hours, suggesting the existence of both a rapid/early and a classical mechanism of NET production. Classical release of NET does not require infection of neutrophils, and does partially depend on elastase, intracellular calcium, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)- $\delta$ , but not on myeloperoxidase, peptidyl arginine deiminase (PAD)-4, and PI3K $\gamma$ .

Taken together, the data presented here allow us to speculate that the release of extracellular traps in response to *T. gondii* is a mechanism of the innate immunity to control infection conserved from intermediate to definitive hosts of the parasite.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents

RPMI 1640 culture medium and fetal calf serum were obtained from Cultilab (Campinas, SP, Brazil). Ficoll Paque Plus was obtained from GE Healthcare (Chicago, IL, USA). DMEM/F12 culture medium was acquired from Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Propidium iodide and penicillin-streptomycin antibiotics were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Quant-iT

PicoGreen dsDNA Assay Kit, ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI, and PrestoBlue Cell Viability Reagent were acquired from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

We used the following pharmacological inhibitors/inducers in the study: phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 100 nM; Sigma-Aldrich), DNase (20 U/mL; Invitrogen), cytochalasin D (CytD; 10 µg/mL; Sigma-Aldrich), elastase inhibitor III (ELi; MeOSuc-AAPV-CMK; 10 µg/mL; Calbiochem, San Diego, CA, USA), myeloperoxidase inhibitor I (MPOi; 600 nM; Calbiochem), AS605240 (selective inhibitor of PI3Kγ; 10 µM; Tocris Bioscience, Bristol, UK), IC87114 (selective inhibitor of PI3Kδ; 1 µM; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), chloroamidine (Cl-A; PAD inhibitor; 12 µM; Cayman Chemical); PD98059 (MEK inhibitor; 60 µM; Sigma-Aldrich) and BAPTA/AM ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> chelator; 10 µM; Calbiochem).

The following antibodies were used in this study: rabbit anti-myeloperoxidase polyclonal (PA5-16672; 1:200; Invitrogen), mouse anti-histone H1 monoclonal (sc-8030; 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-toxoplasma (TP3) monoclonal (sc-52255; 1:100; Santa Cruz Biotechnology), Goat anti-Mouse Alexa Fluor 594 (A11032; 1:1600; Invitrogen), and Donkey anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (A21206; 1:600; Invitrogen).

## 2.2. Animals

The cats used in this study were all mixed breed, from both sexes, aging from 1 to 6 years old, negative for feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV). The study was carried out in strict accordance with the guidelines of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil), and the Normative Resolution 30/2016 of the same entity. The blood samples herein used were leftovers from samples taken for the diagnose of animals in need.

## 2.3. Isolation of Neutrophils from Cats

Peripheral blood samples (≈2–4 mL) were provided by the Veterinary Hospital Niterói, RJ. Neutrophils were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll Paque Plus (1.077 g/mL). After centrifugation (400× *g* for 30 min), the neutrophil layer containing red blood cells (RBC) was collected and transferred to a 15 mL conical tube and suspended in 0.2% NaCl for 30 s for RBC lysis. Afterwards, an equal amount of NaCl 1.6% was added to stop RBC lysis. Finally, cells were washed, suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 1% fetal calf serum and 1% penicillin-streptomycin antibiotics solution, and kept on ice until use.

## 2.4. Parasites Culture

Tachyzoites of *T. gondii* from RH strain are routinely maintained in Swiss mice by intraperitoneal inoculation of parasites, as previously described [37]. After 72 h of inoculation parasites were harvested from peritoneum in PBS and centrifuged (200× *g* for 5 min) to remove any contaminating cells. The supernatant containing the parasites was transferred to another tube and centrifuged again (1500× *g* for 10 min). Parasites were recovered from pellet, counted in a hemocytometer, and used to infect subconfluent monolayers of Vero cells (Vero ATCC CCL-81™, Manassas, VA, USA) or to stimulate NET production, as described later. Vero cells cultures re maintained at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in DMEM/F12 culture medium supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin-streptomycin antibiotic solution. Tachyzoites released from the supernatant of infected Vero cells a few days later were also used to stimulate NET production. They were harvested and isolated by differential centrifugation exactly as explained above for the peritoneum. To maintain their virulence, parasites are periodically passed in vivo.

Parasites of *T. gondii* ME49 strain are routinely maintained in C57BL/6 mice. Tissue cysts are obtained from the brains of mice inoculated intraperitoneally with 50 cysts/animal, as described elsewhere [38]. Briefly, cysts were ruptured with acid pepsin solution and free parasites were added to Vero cells cultures. Two weeks later, released tachyzoites from infected cells were collected from the

supernatant as described above for the RH strain, washed, counted in a hemocytometer, and used to infect other Vero cultures or to stimulate NET production. To maintain their virulence, parasites are periodically passed in vivo.

*Leishmania amazonensis* promastigotes from MHOM/BR/77/LTB0016 strain were maintained at 26 °C in Schneider's insect medium supplemented with 10% fetal calf serum. Stationary-phase promastigotes were obtained from 5-day-old cultures. Parasites were washed and counted in a hemocytometer.

#### 2.5. NET Induction/Inhibition Assay

In order to induce NET production, neutrophils ( $10^5$  cells per well) were plated in 96-well plates and incubated with PMA, *L. amazonensis* promastigotes or *T. gondii* tachyzoites from either RH or ME49 strains (5:1 parasites/neutrophil ratio) for up to 180 min at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Paraformaldehyde-fixed tachyzoites were used at the same parasite/neutrophil ratio as well. In some cases, neutrophils were treated for 30 min with one of the several pharmacological inhibitors listed above before adding *T. gondii* tachyzoites. Afterwards supernatants were collected, spun down for 5 min, and stored at −80 °C until use.

#### 2.6. Quantification of NET-Derived DNA

Supernatants were distributed into 96-well opaque plates, and NET-derived DNA was quantified using the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit according to manufacturer's instructions. Analysis was performed in a SpectraMax Paradigm microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) using 485/538 nm excitation/emission wavelengths. Herring sperm DNA was used to make the standard concentration curve.

#### 2.7. Detection of Myeloperoxidase, Histone H1, and *T. gondii*

Neutrophils ( $2.5 \times 10^5$  cells per well) were plated in 24-well plates with coverslips and incubated or not with *T. gondii* tachyzoites from RH strain for 180 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Cultures were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature and carefully washed with PBS. Coverslips were stained with anti-MPO and either anti-Histone H1 or anti-*Toxoplasma gondii* antibodies, followed by the secondary antibodies anti-mouse Alexa Fluor 594 and anti-rabbit Alexa Fluor 488. Slides were mounted with ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI and examined and photographed in a Zeiss Axio Imager.M1 microscope (Zeiss, Germany).

#### 2.8. Ultrastructural Visualization of *T. gondii* Entrapment in NET

Neutrophils ( $2.5 \times 10^5$  cells per well) were cultivated in 24-well plates with coverslips and stimulated with *T. gondii* tachyzoites from RH strain for 180 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were fixed for 1 h at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 3.5% sucrose and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>. After washing, cells were post-fixed with 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferricyanide for 1 h at room temperature and dehydrated in crescent concentrations of ethanol. Following dehydration, the specimens were critical-point dried, coated with gold, and observed in a JEOL-JSM-6390LV scanning electron microscope (JEOL, Japan) from the Rudolf Barth Electron Microscopy Platform (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

#### 2.9. Production of NET-Enriched Supernatants

Neutrophils ( $6 \times 10^5$  cells per well) were plated in 24-well plates and incubated with *T. gondii* tachyzoites from RH strain (5:1 parasites/neutrophil ratio) for 180 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Afterwards supernatant was collected, spun down for 5 min, and stored at −80 °C until use. NET-DNA was quantified with the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit as described before. NET-enriched supernatants were treated or not with DNase (20 U/mL) for 30 min and used in the parasite infectivity assay.

### 2.10. Parasite Infectivity Assay

*T. gondii* tachyzoites from RH strain were incubated in NET-enriched supernatants ( $\approx 1 \mu\text{g/mL}$  NET-DNA) for 180 min at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Supernatants were pretreated or not with 20 U/mL DNase for 30 min before adding parasites. Afterwards parasites were used to infect monolayers of Vero cells (1:1 parasite/Vero ratio) in coverslips for 180 min. Cells were then washed to remove non-internalized parasites and kept at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , for 21 h. Coverslips were stained with Giemsa and observed in a Zeiss Axio Imager.A2 microscope. At least 200 cells were counted randomly in the central area of each slide. The infection index was calculated using the following formula:

$$\text{Infection Index} = \frac{\% \text{ Infected Cells} \times \text{Total Number of Intracellular Parasites}}{\text{Total Number of Cells}}$$

### 2.11. Neutrophil Viability Assay

The cytotoxicity of the inhibitors to neutrophils was examined with PrestoBlue Cell Viability Reagent according to manufacturer's instructions. Briefly, neutrophils were incubated with inhibitors in the same conditions used for the NET induction assay, except that cells were not further stimulated. Cells were kept at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , for 180 min, and PrestoBlue was added 20 min before the end of the incubation time. Analysis was performed in a SpectraMax M2 microplate reader (Molecular Devices) using 560/590 nm excitation/emission wavelengths. Data is represented as percentage of control.

### 2.12. Live Cell Imaging

Neutrophils ( $5 \times 10^5$ ) were seeded in 35 mm CELLview plates (Greiner Bio-One, Americana, SP, Brazil) and allowed to adhere for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ . Afterwards, non-adherent cells were washed out and *T. gondii* tachyzoites from RH strain were added at a parasites:neutrophil ratio of 5:1 in 800  $\mu\text{L}$  of RPMI. Propidium iodide was added to the dish at a final concentration of 3  $\mu\text{g/mL}$ , in order to stain NET as well as dead neutrophils and parasites over time. Parasites were allowed to settle for 15 min before recording began. Spontaneous death of parasites in culture medium in the absence of neutrophils was also evaluated as a control condition. Time-lapse analysis was performed by sequential acquisition along several hours with a time interval of 30 s, using a Zeiss Axio Observer Z1 microscope. Images were acquired by an HMR Axiocam monochrome camera operated by Axiovision software version 3.2 (Zeiss, Germany). The red signal from propidium iodide was acquired by Colibri illumination system using a 590 nm LED with Zeiss fluorescence filter 50. Temperature and focus were maintained along time-lapse analysis using a Temperature Control module and a Zeiss Definitive Focus device, respectively. Images were processed in ImageJ 1.52 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### 2.13. Statistical Data Analysis

The experiments were generally performed in duplicate and repeated two to six times, according to the number of blood samples (number of cats) available at the moment and the number of neutrophils that we were able to obtain from each blood sample. The number of cats for each day of experimentation ranged from one to six. Data are presented as the total number of cats tested for each experiment as mean  $\pm$  SD values. Comparisons between groups were done by paired t-test, after D'Agostino–Pearson omnibus normality test, or repeated measures one-way ANOVA with Greenhouse–Geisser correction and Dunnett's multiple comparisons test, when appropriate. Differences of  $p < 0.05$  were considered to be significant. GraphPad Prism 7 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used for all analyses.

## 3. Results

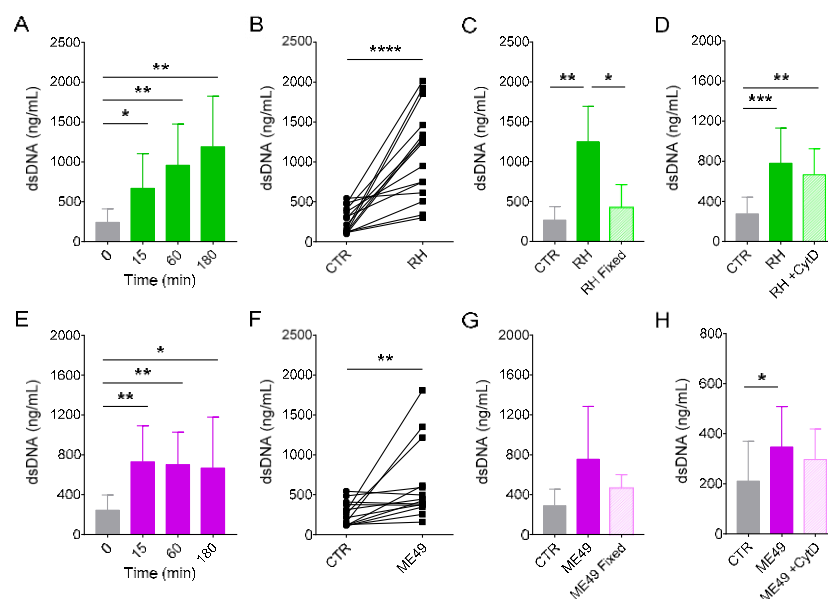
### 3.1. Neutrophils from Cats Produce Extracellular Traps in Response to Classical Inducers

We first investigated the ability of feline neutrophils to produce NET in response to either PMA, a well-known PKC activator and potent inducer of NET [39], or *L. amazonensis*, a protozoan parasite

with a well-described capacity to induce NET both in vitro and in vivo [40–42], as our positive control conditions. As expected, treatment with PMA led to a two-fold increase in dsDNA release when compared to untreated cells (Supplementary Figure S1A). Stimulation of cells with *L. amazonensis* promastigotes induced a seven-fold increase in dsDNA production as compared to control cells (Supplementary Figure S1B), corroborating our previous findings [43,44]. These results confirm that neutrophils from cats are competent in producing NET triggered by various stimuli as part of its repertoire of immune responses.

### 3.2. Cat Neutrophils Produce Extracellular Traps in Response to *Toxoplasma gondii*

We next examined whether neutrophils from cats produce NET as a strategy to combat infection by *T. gondii*. NET production was accompanied for up to 180 min after incubating neutrophils with tachyzoites from two clonal strains of the parasite, RH (type I, virulent strain) or ME49 (type II, cystogenic strain). *T. gondii* induced dsDNA release by neutrophils in a strain- and time-dependent manner, beginning as early as 15 min after incubation with parasites (Figure 1). Interestingly, production of NET in response to RH strain was more pronounced than to ME49 strain at later time points (Figure 1A,E; 4.0- and 4.9-fold change for RH and 2.9- and 2.7-fold change for ME49 at 60 and 180 min, respectively, when compared to control). This assay was performed with neutrophils from at least 10 different cats, and although the extent of the response varies from one donor to the other, the response pattern is the same for all donors (Figure 1B,F). Paraformaldehyde fixed parasites induced far less NET than live parasites (Figure 1C,G), suggesting that NET production may have the contribution of factors released by *T. gondii*. We cannot rule out the possibility that the fixation process itself could alter the conformation of the parasite's surface molecules [45], thereby affecting their recognition by the receptors involved in NET release.

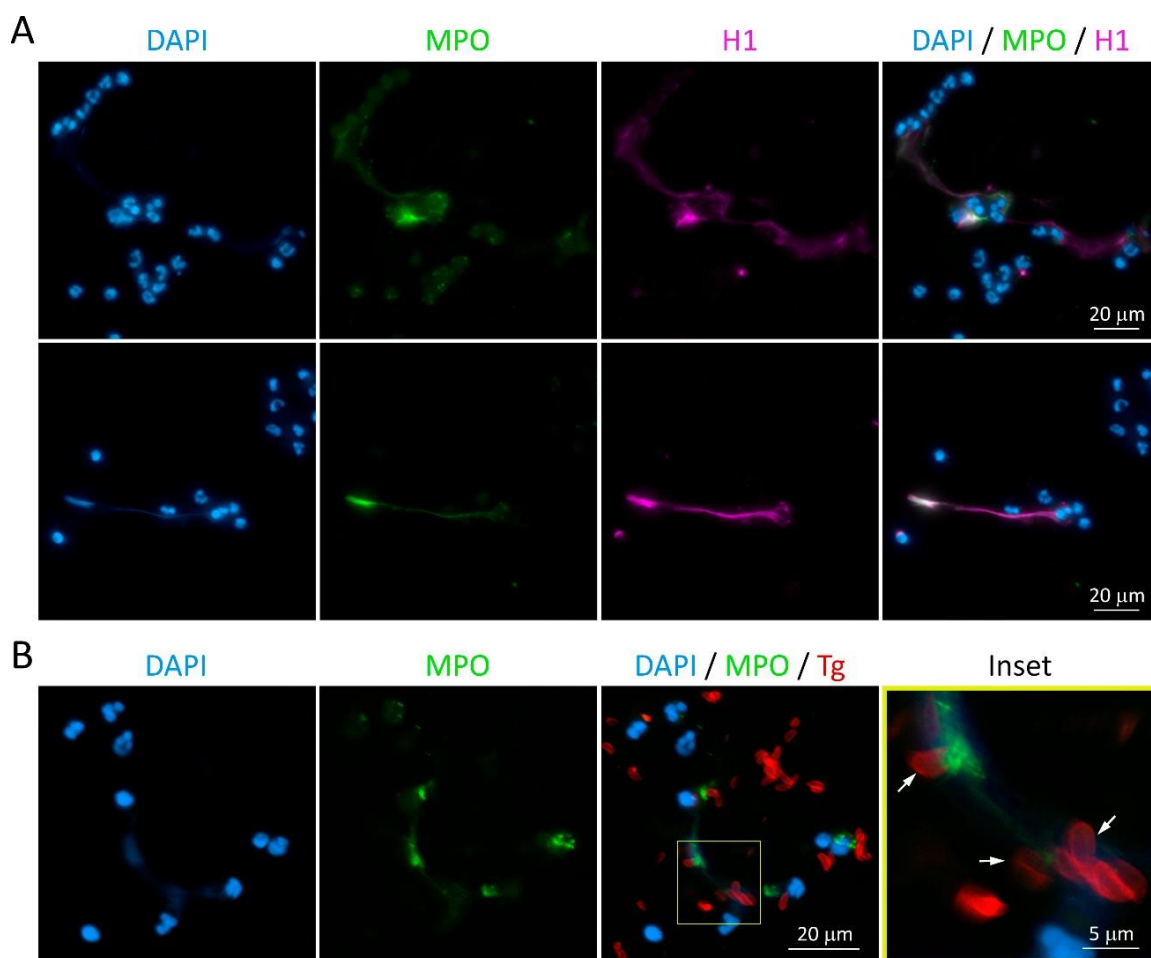


**Figure 1.** *Toxoplasma gondii* induce neutrophil extracellular trap (NET) release from cat neutrophils. Neutrophils from several donors were incubated for the indicated time intervals in the absence (CTR) or presence of tachyzoites from (A–D) RH or (E–H) ME49 strains (5:1 parasites:neutrophil ratio). Supernatants were collected and released dsDNA was quantified with PicoGreen Kit. (A,E) Release of NET from feline neutrophils is strain- and time-dependent ( $n = 10–12$ ). (B,F) Interdonor variations in dsDNA release after 180 min incubation with parasites ( $n = 14–15$ ). (C,G) NET induction by paraformaldehyde-fixed or live parasites after 180 min incubation ( $n = 8–9$ ). (D,H) Formation of NET does not require invasion of neutrophils by the parasites. Cat neutrophils were pretreated or not with cytochalasin D (CytD; 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 30 min and then stimulated with *T. gondii* tachyzoites ( $n = 5–12$ ). All results are shown as mean (SD). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

In order to determine if NET production in response to live parasites would be triggered during invasion of neutrophils by *T. gondii*, we treated neutrophils for 30 min with the actin polymerization inhibitor cytochalasin D before adding the parasites. Pretreatment of cells with CytD did not affect dsDNA release by cat neutrophils (Figure 1D,H), indicating that the invasion of cells is dispensable for NET production in response to *T. gondii*.

### 3.3. NET from Cats Entrap *Toxoplasma gondii* Tachyzoites

In order to investigate the components associated with feline NET and the capacity of those NET to entrap parasites, we performed a microscopic analysis of the parasite–NET interaction. After 180 min interaction of *T. gondii* with neutrophils, cells were fixed, stained for myeloperoxidase, histone H1 or the parasite and DNA, and examined in a fluorescence microscope. We found that NET released in response to *T. gondii* tachyzoites contains all the classical NET signatures (Figure 2A), and that many parasites are entangled in DNA-MPO structures (Figure 2B).

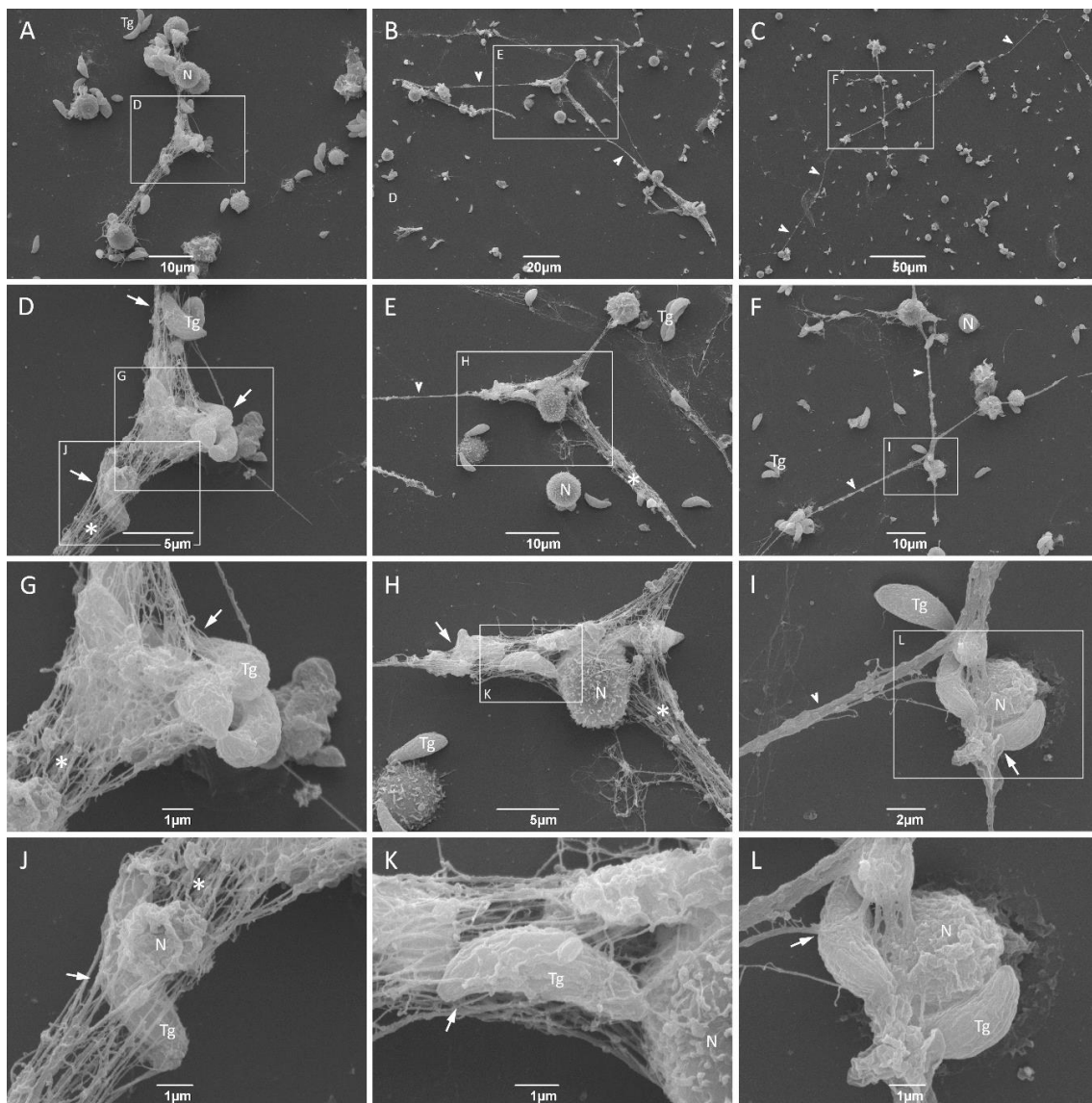


**Figure 2.** NET formation induced by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Neutrophils were incubated for 180 min with RH strain tachyzoites (5:1 parasites:neutrophil ratio), fixed and stained for myeloperoxidase (MPO) and histone H1 (A) or *T. gondii* (B). Neutrophils DNA was counterstained with DAPI. Inset shows a region containing several parasites entrapped in DNA-MPO rich structures (arrows). Tg = *T. gondii*.

We further analyzed the ultrastructural aspects of parasite–NET interactions. Neutrophils were incubated with *T. gondii* tachyzoites for 180 min, fixed, processed as described in methods, and observed in a scanning electron microscope. Three representative fields were photographed at different magnifications, showing either strands or networks of extracellular DNA in close association with



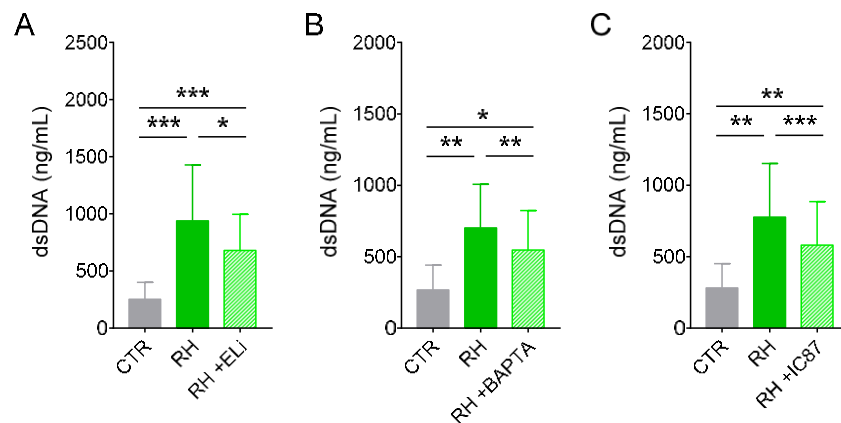
*T. gondii* tachyzoites (Figure 3). In some cases, parasites can be seen completely entrapped in the network of NET produced by cat neutrophils (Figure 3G,J,K).



**Figure 3.** Ultrastructural aspects of *T. gondii* and cat NET interactions. Neutrophils were incubated for 180 min with tachyzoites from RH strain (5:1 parasites:neutrophil ratio), fixed and processed for scanning electron microscopy (A–L). Strands (arrowheads) or networks (asterisks) of NET can be seen entrapping tachyzoites of *T. gondii* (arrows). Selected areas indicated by rectangles are zoomed in the picture below. Tg = *T. gondii*; N = neutrophil.

#### 3.4. Release of dsDNA from Cat Neutrophils in Response to *T. gondii* Depends on Elastase, Calcium, and PI3K $\delta$

To further elucidate the mechanisms involved in NET release by cat neutrophils in response to *T. gondii* tachyzoites, we pretreated neutrophils with one of several inhibitors before adding parasites. We first assessed the role of elastase, myeloperoxidase, and PAD4 on dsDNA release after 180 min. Administration of elastase inhibitor decreased NET-derived DNA production by cat neutrophil by 27% (Figure 4A). MPO or PAD inhibition did not affect dsDNA release by neutrophils stimulated with *T. gondii* (Supplementary Figure S2A,B). Importantly, the inhibitors herein used were not toxic to neutrophils (Supplementary Figure S3).

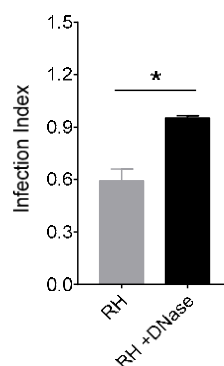


**Figure 4.** Classical NET-derived DNA release in response to *T. gondii* involves elastase, intracellular calcium, and PI3K $\delta$ . Neutrophils were pretreated or not with (A) the elastase inhibitor MeOSuc-AAPV-CMK (Eli; 10  $\mu$ g/mL), (B) the intracellular calcium chelator BAPTA/AM (BAPTA; 10  $\mu$ M), or (C) the PI3K $\delta$  selective inhibitor IC87114 (IC87; 1  $\mu$ M) for 30 min and then stimulated for 180 min with RH tachyzoites (5:1 parasites:neutrophil ratio). Supernatants were collected and released dsDNA was quantified with PicoGreen Kit ( $n = 9$ –13). All results are shown as mean (SD). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Next, we investigated the role of calcium, PI3K, and MEK signaling pathways in feline NET induced by *T. gondii*. Pretreatment of neutrophils with a calcium chelator led to a 22% inhibition in dsDNA release by cat neutrophils (Figure 4B). Administration of a PI3K $\delta$  selective inhibitor decreased by 26% the release of NET-derived DNA triggered by *T. gondii* (Figure 4C). Interestingly, treatment of feline neutrophils with a PI3K $\gamma$  selective inhibitor had no effect on dsDNA release in response to tachyzoites (Supplementary Figure S2C). Inhibition of MEK had no effect on dsDNA release by cat neutrophils in the presence of *T. gondii* (Supplementary Figure S2D). Of note, the calcium chelator and the inhibitors for PI3K $\delta$ , PI3K $\gamma$ , and MEK presented no toxicity to neutrophils after 180 min (Supplementary Figure S3).

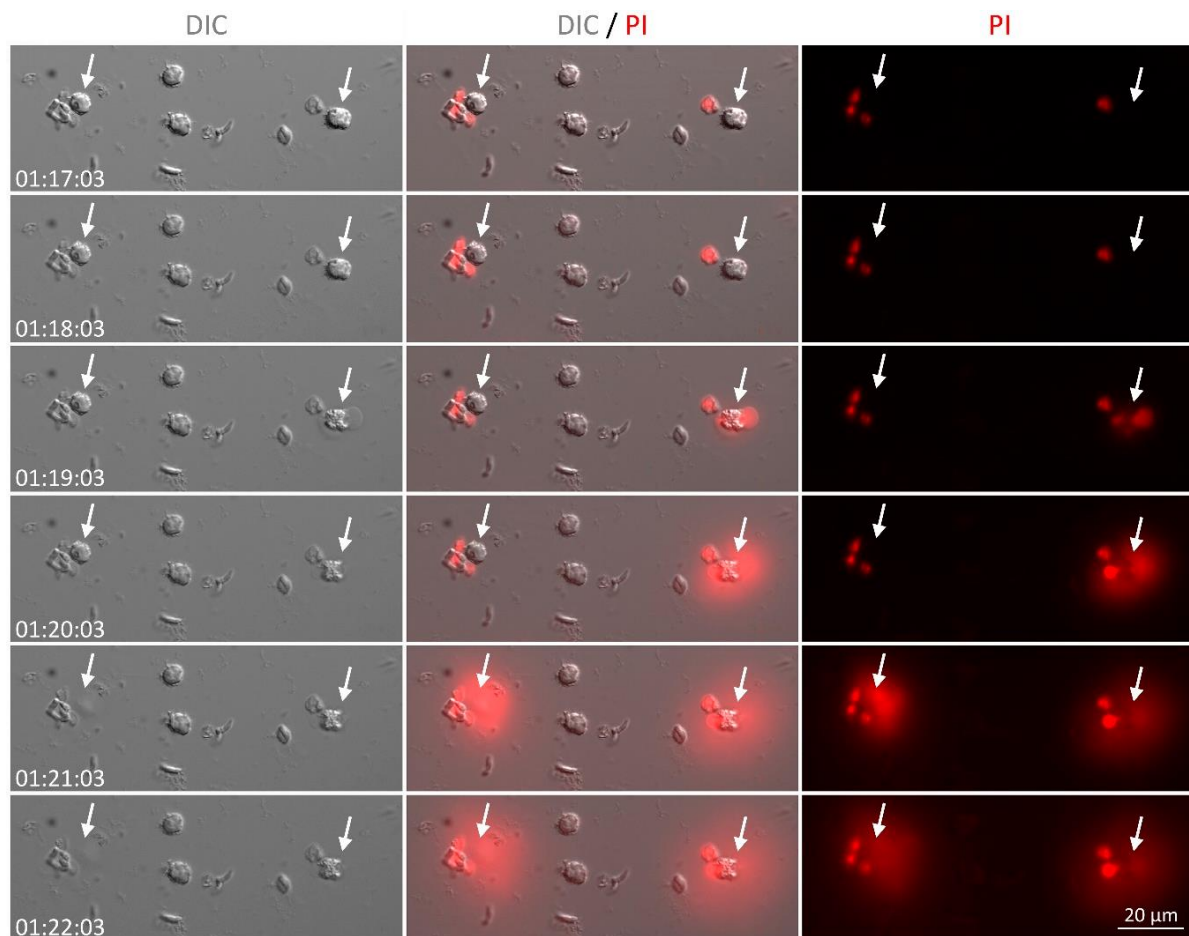
### 3.5. NET from Cats Kill *Toxoplasma gondii* Tachyzoites

To verify the capacity of feline NET to affect infectivity of *T. gondii*, we incubated parasites for 180 min in NET-enriched supernatants pretreated or not with DNase and examined the ability of the tachyzoites to infect Vero cells. We found an infection index 47% higher when Vero cells were incubated with parasites treated with NET-enriched supernatants in the presence of DNase than with parasites treated in the absence of DNase (Figure 5), suggesting that NET directly inhibit *T. gondii* infectivity.

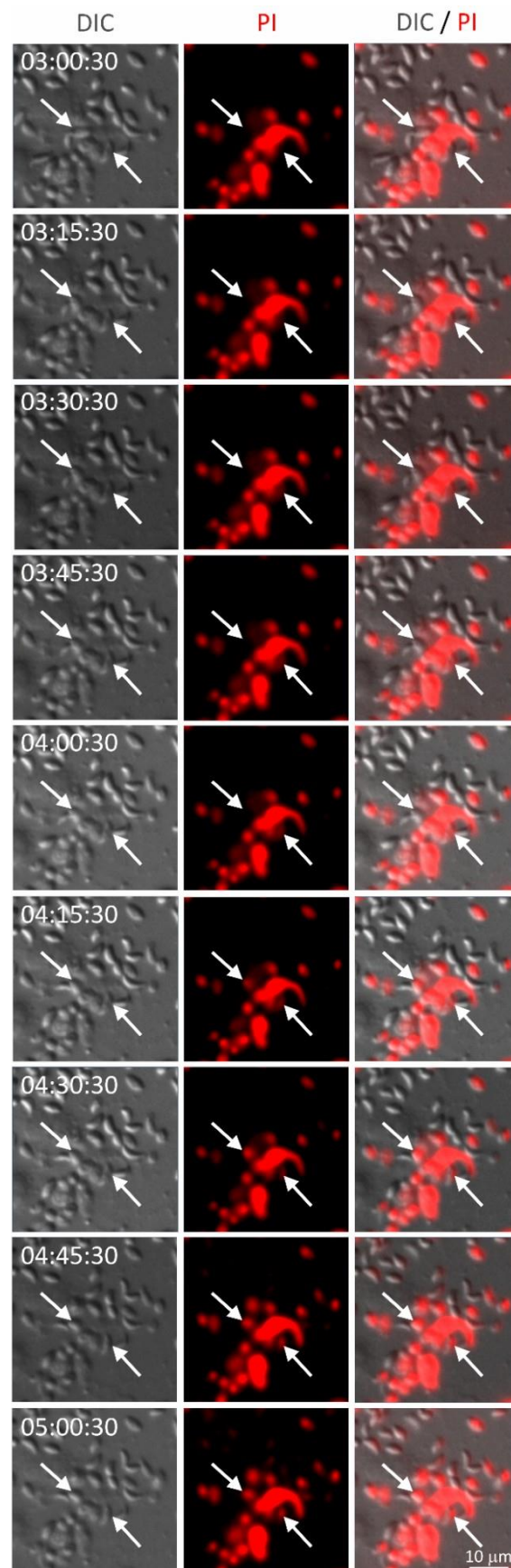


**Figure 5.** NET decreases *T. gondii* infectivity to host cells. Tachyzoites of RH strain were incubated in NET-enriched supernatants pretreated or not with DNase for 30 min. Parasites were further used to infect Vero cells (1:1 parasite:Vero ratio) for 180 min, and the infection index was determined after 21 h culture. Data from two independent experiments are shown as mean (SD). \*  $p < 0.05$ .

Finally, we asked whether inhibition of *T. gondii* infectivity could be due to parasite killing by NET. We performed a time-lapse analysis of neutrophils incubated with *T. gondii*, and found that neutrophils can release NET from as early as 15 min to up to 180 min of interaction with parasites (Figure 6 and Supplementary Video S1 depict the release of NET after 80 min interaction with the parasite). As expected, parasites entrapped in NET died over time, as seen by propidium iodide incorporation (Figure 7), suggesting that loss of host cells infectivity is caused by a loss of *T. gondii* tachyzoites viability. Noteworthy, parasites incubated in culture medium in the absence of neutrophils remained alive for up to 5 h (Supplementary Figure S4), confirming that the death of tachyzoites was caused by NET.



**Figure 6.** Time lapse recording of NET release by cat neutrophils in response to *T. gondii*. Neutrophils were stimulated with RH tachyzoites (5:1 parasites:neutrophil ratio) in the presence of propidium iodide (PI). Arrows point to neutrophils releasing NET after about 80 min of interaction with parasites. DIC = differential interference contrast.



**Figure 7.** Tachyzoites of *T. gondii* die in contact with feline NET. Neutrophils were stimulated with RH tachyzoites (5:1 parasites:neutrophil ratio) in the presence of propidium iodide (PI) and images were recorded during the time. Arrows point to two parasites dying after contact with NET. DIC = differential interference contrast.

#### 4. Discussion

Although several studies have called attention to the importance of neutrophils in the infection and spread by *Toxoplasma gondii* in mice [16,29,46–48], the role of neutrophils in feline toxoplasmosis remains poorly explored. In general, gaining knowledge in the field of parasite–neutrophil interaction will help to elucidate the mechanisms involved in the evasion of the parasite from the immune system and in the establishment of the disease. Here, we elucidated part of the molecular mechanisms involved in NET production induced by *T. gondii* in cat neutrophils, evidencing the participation of neutrophil elastase, intracellular calcium, and PI3K $\delta$  in the process.

Neutrophil extracellular trap production in response to *T. gondii* was first described by Abi Abdallah and colleagues, showing that neutrophils from humans and mice release NET induced by tachyzoites through a MAPK-partially dependent pathway, and that NET reduce parasite viability [29]. A few years later, production of NET in response to *T. gondii* infection was shown for other intermediate hosts. Neutrophils from dog [35], sheep and cattle [31], donkey [34], harbour seal [30], and dolphin [33] all release NET induced by this parasite. Moreover, Lacerda and colleagues recently showed that neutrophils from cats also produce NET in response to *T. gondii* [36], although without exploring its mechanism or NET toxicity to the parasite. Here we show that cat neutrophils produce classical NET in response to tachyzoites of the virulent strain RH, corroborating previous findings [36]. Furthermore, we show that the cystogenic strain ME49 also induces NET release, and that production of NET by cat neutrophils in response to both virulent or cystogenic strains occurs either in a classical way, after a few hours, or in a rapid way, within the first 15 min of interaction with parasites. Early NET release has been previously shown for neutrophils from intermediate hosts in response to RH strain [30,31,34,35] and from bovine neutrophils stimulated with a related apicomplexan parasite, *Besnoitia besnoiti* [49]. Zhou and colleagues present evidence that bovine neutrophils produce NET within  $\approx 30$  min of interaction with *B. besnoiti* bradyzoites, and that the overall phenotype and crawling activities of neutrophils seem not to be affected by this event, suggesting that the rapid NET release is vital [49]. Those results corroborate previous findings with unrelated protozoan [23] and other microorganisms [22]. Whether neutrophils from cats remain alive after rapid NET release in response to *T. gondii* deserves further investigations.

We found that production of cat NET in response to the virulent RH strain was more pronounced than that triggered by the cystogenic ME49 strain over time. These differences might somehow reflect the differences in host immune response induced by those strains [50]. Moreover, it seems that the parasites affect NET production by releasing soluble factors, and not only by direct contact, since paraformaldehyde fixed tachyzoites induced much less NET than live ones. In this line of reasoning, Abi Abdallah and colleagues showed that internalization of tachyzoites by human neutrophils is not necessary for NET production [29]. Here we corroborate those findings and show that pretreatment of cat neutrophils with cytochalasin—a drug that inhibits actin polymerization, thereby preventing phagocytosis—does not significantly impact NET production. However, we cannot rule out the possibility that the phagocytosis-independent active internalization of parasites, especially in the virulent RH strain [51,52], can play a role in the process of NET production. In addition, the fixation of tachyzoites with paraformaldehyde could alter the conformation of molecules [45] on the parasite's cell surface, which could somehow be involved in neutrophil receptor recognition during NET release. Additional studies are necessary to elucidate these questions.

Further, we examined the components and ultrastructural aspects of cat NET and its capacity to ensnare tachyzoites of the virulent RH strain of *T. gondii*. We identified histone H1 as well as myeloperoxidase associated with the released DNA. Moreover, several tachyzoites were seen associated with cat NET. By scanning electron microscopy, we observed strands as well as networks of chromatin fibers entangling parasites. Previous studies have categorized NET according to different morphological structures: diffuse NET (*diff* NET), consisting of extracellular decondensed chromatin presented in a circular form and close to the cell body; spread NET (*spr* NET), corresponding to elongated web-like structures composed of thin chromatin fibers; aggregated NET (*agg* NET), characterized by large clusters

of NET aggregating many neutrophils with a massive appearance [53–55]. We show here that the NET produced by cat neutrophils after 180 min of interaction with RH tachyzoites are very similar to *spr*NET. Imlau and colleagues show that neutrophils isolated from dolphins produce all three types of NET, with a predominance of *spr*NET and *agg*NET [32]. Here, we did not find large clusters of NET aggregating neutrophils, but eventually small clusters could be seen (Supplementary Figure S5), corroborating previous findings and suggesting a conserved mechanism of NET release in response to *T. gondii*.

NET's antimicrobial activity can lead to death of various groups of pathogens, including bacteria, fungi, and protozoa. This is accomplished by the presence in NET of a plethora of proteases, antimicrobial enzymes, histones, and DNA, all of which contribute toward direct antimicrobial effects [56]. Here we investigated the ability of cat NET to inhibit infectivity and kill ensnared *T. gondii*. We show that treatment of NET-enriched supernatants with DNase increases the infectivity of tachyzoites to epithelial cells, and that entangled parasites are killed by NET, corroborating previous findings with mice neutrophils [29]. Interestingly, our live cell imaging analysis reveals that not all the parasites associated with NET died over a long time frame of recording. There is growing evidence that some microorganisms developed the ability to escape NET by degrading NET structure, inhibiting NET release, or resisting NET killing [57]. Degradation of NET are usually achieved by nucleases produced by pathogens, and we have previously shown that the expression of the enzyme 3'-nucleotidase/nuclease (3'NT/NU) by *Leishmania* parasites contributes to their escape from NET killing [58]. On the other hand, nuclease production can be associated with the degree of virulence of some parasites [57,59]. Therefore, it is tempting to speculate that the virulent RH tachyzoites we used in our assays are producing nucleases or other factors which could degrade NET and enable the survival and/or escape of at least part of the parasite population. Corroborating this hypothesis, Wei and colleagues recently showed that *T. gondii* tachyzoites from the same strain can degrade NET induced by zimosan [35]. Additional investigations are needed to elucidate the molecular factors involved there.

The mechanisms involved in the release of NET have been focus of intensive investigation in recent years. Although not fully understood, the molecular mechanisms of classical NET release involves different molecules and signaling pathways, including the activation of the Raf-MEK-ERK pathway and the generation of ROS by NADPH oxidase [53,60], the translocation of neutrophil elastase to the nucleus, and the association of MPO to the DNA, leading to chromatin decondensation [61] and the citrullination of histones by the nuclear enzyme peptidyl arginine deiminase-4 (PAD4), mediated by intracellular  $Ca^{2+}$  influx and ROS, also leading to decondensation of chromatin [62,63]. Reichel and colleagues showed that inhibition of neutrophil elastase or MPO completely abrogated dsDNA release by neutrophils from harbour seal stimulated with *T. gondii* [30]. However, it is not clear whether NET production by cat neutrophils depends on MPO or elastase. We therefore examined the role of these molecules and found that inhibition of elastase but not of MPO significantly affected dsDNA release, indicating that elastase is more important than MPO in our model.

In a recent report, Wei and colleagues showed that treatment of dog neutrophils with the NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodonium (DPI) prevented DNA release in response to *T. gondii* [35]. Similar results were obtained with donkey neutrophils [34]. In another study, Reichel and others disclosed that inhibition of NADPH oxidase with the same inhibitor prevented NET release by neutrophils from harbour seal stimulated with *T. gondii*. Since the mechanism of ROS production is dependent on  $Ca^{2+}$  and the store-operated  $Ca^{2+}$  entry (SOCE) plays a fundamental role in this process [64,65], the authors investigated the involvement of  $Ca^{2+}$  and showed that the inhibition of the SOCE pathway significantly reduced dsDNA release, suggesting the participation of  $Ca^{2+}$ /SOCE in the process of NET release in harbour seal [30]. Recently, cat neutrophils have been shown to produce ROS after stimulation with *T. gondii* [36]. However, if the release of NET by cat neutrophils depends on the production of ROS is something that deserves further investigation. Unfortunately, we could not provide additional information about the direct role of NADPH oxidase and ROS production in

the process of NET release by cat neutrophils, since treatment of our cells with DPI led to massive neutrophils death (data not shown). On the other hand, we show the involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  in cat NET production after treating cells with the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA/AM, corroborating previous findings [30]. Interestingly, treatment with the PAD inhibitor chloroamidine did not prevent NET release by cat neutrophils, suggesting the existence of a PAD-independent mechanism of NET release that might be influenced by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.

We have shown previously that production of NET induced by *Leishmania amazonensis* is partially dependent on PI3K signaling pathway, either through PI3K $\delta$  and PI3K $\gamma$  isoforms [44]. These isoforms are commonly expressed in leukocytes, and together they regulate several functions of the immune system [66]. Whereas PI3K $\gamma$  regulate ROS generation, PI3K $\delta$  is dispensable for this process, although it is important for the amplification of a second wave of ROS production dependent on the first wave initiated by PI3K $\gamma$  [67]. Here, we showed that the blockage of PI3K $\delta$  with a selective inhibitor decreased NET release in response to *T. gondii* by cat neutrophils. Surprisingly, administration of a PI3K $\gamma$  selective inhibitor had no effect on NET production in our model, indicating that generation of ROS might be secondary in NET release by cat neutrophils. Accordingly, MEK1/2 inhibition also had no effect on NET release by cat neutrophils in the presence of *T. gondii*, unlike what was found for human neutrophils, where NET production involves activation of ERK1/2 signaling pathway and where blockage of MEK1/2 partially prevents the release of NET [29]. These discrepancies may reflect the existence of different signaling pathways for NET release between different species in response to the *T. gondii*.

Much progress has been made in recent years with regard to the need of different molecular pathways to induce NET depending on the stimulus, and despite being important for the classical NET release for some stimuli, NADPH oxidase, ROS, MPO, and neutrophil elastase are not necessary to induce NET by other stimuli [39,68]. Therefore, we speculate here that although production of NET is a conserved mechanism between different species, neutrophils from different organisms may use different signaling pathways to induce NET to the same stimulus. Further comparative studies are needed to test this hypothesis.

## 5. Conclusions

We show for the first time that neutrophils from cats release both classical and rapid/early NET in response to either virulent or cystogenic strains of *T. gondii*, and that the parasites are entrapped and killed by NET. The mechanisms of classical release of cat NET to *T. gondii* tachyzoites involve the participation of neutrophil elastase, intracellular calcium, and PI3K $\delta$  signaling pathways.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/11/1628/s1>, Figure S1: Neutrophils from cats produce NET in response to PMA and *Leishmania amazonensis*, Figure S2: Release of classical NET-derived DNA in response to *T. gondii* is independent of MPO, PAD, PI3K $\gamma$ , and MEK, Figure S3: Neutrophil viability after treatment with inhibitors, Figure S4: Spontaneous death of *Toxoplasma gondii* in culture medium, Figure S5: NET formation induced by *Toxoplasma gondii* tachyzoites, Video S1: Time lapse video showing the release of NET by cat neutrophils in response to *T. gondii*, Video S2: Tachyzoites of *T. gondii* dying in contact with cat NET.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.M.M.; Formal analysis, R.M.M.; Funding acquisition, R.M.M.; Investigation, I.S.M., M.V.A.L., J.S.S., N.C.R., F.A.L. and R.M.M.; Methodology, I.S.M., M.V.A.L. and R.M.M.; Project administration, R.M.M.; Resources, P.N.C., H.S.B., F.A.L., E.M.S. and R.M.M.; Supervision, R.M.M.; Visualization, J.S.S. and R.M.M.; Writing—original draft, I.S.M., M.V.A.L. and R.M.M.; Writing—review and editing, I.S.M., M.V.A.L., J.S.S., N.C.R., P.N.C., H.S.B., F.A.L., E.M.S. and R.M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Chamada Universal 432255/2016-8), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Bolsas E-26/260.A58/2018 and E-26/260.048/2018, Redes de Pesquisa em Saúde E-26/211.570/2019), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001), and Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

**Acknowledgments:** The authors thank Sandra Maria de Oliveira Souza (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz) for her technical assistance and Veronica Schmitz Pereira (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz) and Rodrigo da Cunha Bisaggio (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, IFRJ) for the critical discussions about the data of this manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R.; Weiss, L.M. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 1217–1258. [[CrossRef](#)]
2. Dubey, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 877–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Pappas, G.; Roussos, N.; Falagas, M.E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 1385–1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Holland, G.N. Ocular toxoplasmosis: A global reassessment. Part I: Epidemiology and course of disease. *Am. J. Ophthalmol.* **2003**, *136*, 973–988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Dupont, C.D.; Christian, D.A.; Hunter, C.A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin. Immunopathol.* **2012**, *34*, 793–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ferguson, D.J.P.; Bowker, C.; Jeffery, K.J.M.; Chamberlain, P.; Squier, W. Congenital toxoplasmosis: Continued parasite proliferation in the fetal brain despite maternal immunological control in other tissues. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *56*, 204–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Dubey, J.P.; Swan, G.V.; Frenkel, J.K. A simplified method for isolation of *Toxoplasma gondii* from the feces of cats. *J. Parasitol.* **1972**, *58*, 1005–1006. [[CrossRef](#)]
8. Dubey, J.P. Toxoplasmosis—A waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* **2004**, *126*, 57–72. [[CrossRef](#)]
9. Osbaldiston, G.W. Haematological values in healthy cats. *Br. Vet. J.* **1978**, *134*, 524–536. [[CrossRef](#)]
10. Van Gisbergen, K.P.J.M.; Geijtenbeek, T.B.H.; Van Kooyk, Y. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol.* **2005**, *26*, 626–631. [[CrossRef](#)]
11. Jaillon, S.; Galdiero, M.R.; Del Prete, D.; Cassatella, M.A.; Garlanda, C.; Mantovani, A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin. Immunopathol.* **2013**, *35*, 377–394. [[CrossRef](#)]
12. Nauseef, W.M.; Borregaard, N. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 602–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Liew, P.X.; Kubes, P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 1223–1248. [[CrossRef](#)]
14. Bliss, S.K.; Butcher, B.A.; Denkers, E.Y. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 4515–4521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Norose, K.; Naoi, K.; Fang, H.; Yano, A. In vivo study of toxoplasmic parasitemia using interferon-gamma-deficient mice: Absolute cell number of leukocytes, parasite load and cell susceptibility. *Parasitol. Int.* **2008**, *57*, 447–453. [[CrossRef](#)]
16. Coombes, J.L.; Charsar, B.A.; Han, S.J.; Halkias, J.; Chan, S.W.; Koshy, A.A.; Striepen, B.; Robey, E.A. Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E1913–E1922. [[CrossRef](#)]
17. Faurschou, M.; Sørensen, O.E.; Johnsen, A.H.; Askaa, J.; Borregaard, N. Defensin-rich granules of human neutrophils: Characterization of secretory properties. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1591*, 29–35. [[CrossRef](#)]
18. Faurschou, M.; Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **2003**, *5*, 1317–1327. [[CrossRef](#)]
19. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1532–1535. [[CrossRef](#)]
20. Kolaczowska, E.; Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 159–175. [[CrossRef](#)]
21. Pilszczek, F.H.; Salina, D.; Poon, K.K.H.; Fahey, C.; Yipp, B.G.; Sibley, C.D.; Robbins, S.M.; Green, F.H.Y.; Surette, M.G.; Sugai, M.; et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 7413–7425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



22. Yipp, B.G.; Kubes, P. NETosis: How vital is it? *Blood* **2013**, *122*, 2784–2794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rochaël, N.C.; Guimarães-Costa, A.B.; Nascimento, M.T.C.; DeSouza-Vieira, T.S.; Oliveira, M.P.; Garcia e Souza, L.F.; Oliveira, M.F.; Saraiva, E.M. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Schönrich, G.; Raftery, M.J. Neutrophil Extracellular Traps Go Viral. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 366. [[CrossRef](#)]
25. Silva, L.M.R.; Muñoz-Caro, T.; Burgos, R.A.; Hidalgo, M.A.; Taubert, A.; Hermosilla, C. Far beyond Phagocytosis: Phagocyte-Derived Extracellular Traps Act Efficiently against Protozoan Parasites In Vitro and In Vivo. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 5898074. [[CrossRef](#)]
26. Hoppenbrouwers, T.; Autar, A.S.A.; Sultan, A.R.; Abraham, T.E.; Van Cappellen, W.A.; Houtsmuller, A.B.; Van Wamel, W.J.B.; Van Beusekom, H.M.M.; Van Neck, J.W.; De Maat, M.P.M. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0176472. [[CrossRef](#)]
27. Díaz-Godínez, C.; Carrero, J.C. The state of art of neutrophil extracellular traps in protozoan and helminthic infections. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, BSR20180916. [[CrossRef](#)]
28. Urban, C.F.; Nett, J.E. Neutrophil extracellular traps in fungal infection. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2019**, *89*, 47–57. [[CrossRef](#)]
29. Abi Abdallah, D.S.A.; Lin, C.; Ball, C.J.; King, M.R.; Duhamel, G.E.; Denkers, E.Y. *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 768–777. [[CrossRef](#)]
30. Reichel, M.; Muñoz-Caro, T.; Sanchez Contreras, G.; Rubio García, A.; Magdowski, G.; Gärtner, U.; Taubert, A.; Hermosilla, C. Harbour seal (*Phoca vitulina*) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Dev. Comp. Immunol.* **2015**, *50*, 106–115. [[CrossRef](#)]
31. Yildiz, K.; Gokpinar, S.; Gazyagci, A.N.; Babur, C.; Sursal, N.; Azkur, A.K. Role of NETs in the difference in host susceptibility to *Toxoplasma gondii* between sheep and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2017**, *189*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Imlau, M.; Conejeros, I.; Muñoz-Caro, T.; Zhou, E.; Gärtner, U.; Ternes, K.; Taubert, A.; Hermosilla, C. Dolphin-derived NETosis results in rapid *Toxoplasma gondii* tachyzoite ensnarement and different phenotypes of NETs. *Dev. Comp. Immunol.* **2020**, *103*, 103527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Villagra-Blanco, R.; Silva, L.M.R.; Conejeros, I.; Taubert, A.; Hermosilla, C. Pinniped- and Cetacean-Derived ETosis Contributes to Combating Emerging Apicomplexan Parasites (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*) Circulating in Marine Environments. *Biology (Basel)* **2019**, *8*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yildiz, K.; Gokpinar, S.; Sursal, N.; Babur, C.; Ozen, D.; Azkur, A.K. Extracellular Trap Formation by Donkey Polymorphonuclear Neutrophils Against *Toxoplasma gondii*. *J. Equine Vet. Sci.* **2019**, *73*, 1–9. [[CrossRef](#)]
35. Wei, Z.; Wang, Z.; Liu, X.; Wang, C.; Han, Z.; Wu, D.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Yang, Z.; Liu, Q. *Toxoplasma gondii* Triggers Neutrophil Extracellular Traps Release in Dogs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 429. [[CrossRef](#)]
36. Lacerda, L.C.; dos Santos, J.L.; Wardini, A.B.; da Silva, A.N.; Santos, A.G.; Silva Freire, H.P.; dos Anjos, D.O.; Romano, C.C.; Mendes, É.A.; Munhoz, A.D. *Toxoplasma gondii* induces extracellular traps release in cat neutrophils. *Exp. Parasitol.* **2019**, *207*, 107770. [[CrossRef](#)]
37. Gomes, A.F.; Guimares, E.V.; Carvalho, L.; Correa, J.R.; Mendonça-Lima, L.; Barbosa, H.S. *Toxoplasma gondii* down modulates cadherin expression in skeletal muscle cells inhibiting myogenesis. *BMC Microbiol.* **2011**, *11*, 110. [[CrossRef](#)]
38. Guimarães, E.V.; de Carvalho, L.; Barbosa, H.S. Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells in vitro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 170–174. [[CrossRef](#)]
39. Kenny, E.F.; Herzig, A.; Krüger, R.; Muth, A.; Mondal, S.; Thompson, P.R.; Brinkmann, V.; von Bernuth, H.; Zychlinsky, A. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife* **2017**, *6*, e24437. [[CrossRef](#)]
40. Guimarães-Costa, A.B.; Nascimento, M.T.C.; Froment, G.S.; Soares, R.P.P.; Morgado, F.N.; Conceição-Silva, F.; Saraiva, E.M. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6748–6753. [[CrossRef](#)]
41. Morgado, F.N.; Nascimento, M.T.; Saraiva, E.M.; de Oliveira-Ribeiro, C.; Madeira, M.; da Costa-Santos, M.; Vasconcellos, E.C.; Pimentel, M.I.; Rosandiski Lyra, M.; Schubach, A.; et al. Are neutrophil extracellular traps playing a role in the parasite control in active American tegumentary leishmaniasis lesions? *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. De Menezes, J.P.; Saraiva, E.M.; Da Rocha-Azevedo, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wardini, A.B.; Guimarães-Costa, A.B.; Nascimento, M.T.C.; Nadaes, N.R.; Danelli, M.G.M.; Mazur, C.; Benjamin, C.F.; Saraiva, E.M.; Pinto-da-Silva, L.H. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 259–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. De Souza-Vieira, T.; Guimarães-Costa, A.; Rochael, N.C.; Lira, M.N.; Nascimento, M.T.; Lima-Gomez, P.d.S.; Mariante, R.M.; Persechini, P.M.; Saraiva, E.M. Neutrophil extracellular traps release induced by *Leishmania*: Role of PI3K $\gamma$ , ERK, PI3K $\alpha$ , PKC, and [Ca<sup>2+</sup>]. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *100*, 801–810. [[CrossRef](#)]
45. Metz, B.; Kersten, G.F.A.; Baart, G.J.E.; De Jong, A.; Meiring, H.; Ten Hove, J.; Van Steenberg, M.J.; Hennink, W.E.; Crommelin, D.J.A.; Jiskoot, W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: Reactions with insulin. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 815–822. [[CrossRef](#)]
46. Bliss, S.K.; Gavrilescu, L.C.; Alcaraz, A.; Denkers, E.Y. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 4898–4905. [[CrossRef](#)]
47. Del Rio, L.; Bennouna, S.; Salinas, J.; Denkers, E.Y. CXCR2 deficiency confers impaired neutrophil recruitment and increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 6503–6509. [[CrossRef](#)]
48. Biswas, A.; French, T.; Düsedau, H.P.; Mueller, N.; Riek-Burchardt, M.; Dudeck, A.; Bank, U.; Schüler, T.; Dunay, I.R. Behavior of neutrophil granulocytes during *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 259. [[CrossRef](#)]
49. Zhou, E.; Silva, L.M.R.; Conejeros, I.; Velásquez, Z.D.; Hirz, M.; Gärtner, U.; Jacquiet, P.; Taubert, A.; Hermosilla, C. *Besnoitia besnoiti* bradyzoite stages induce suicidal- and rapid vital-NETosis. *Parasitology* **2020**, *147*, 401–409. [[CrossRef](#)]
50. Gavrilescu, L.C.; Denkers, E.Y. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 902–909. [[CrossRef](#)]
51. Morisaki, J.H.; Heuser, J.E.; Sibley, L.D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 2457–2464.
52. Zhao, Y.; Marple, A.H.; Ferguson, D.J.P.; Bzik, D.J.; Yap, G.S. Avirulent strains of *Toxoplasma gondii* infect macrophages by active invasion from the phagosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 6437–6442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hakkim, A.; Fuchs, T.A.; Martinez, N.E.; Hess, S.; Prinz, H.; Zychlinsky, A.; Waldmann, H. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 75–77. [[CrossRef](#)]
54. Schauer, C.; Janko, C.; Munoz, L.E.; Zhao, Y.; Kienhöfer, D.; Frey, B.; Lell, M.; Manger, B.; Rech, J.; Naschberger, E.; et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 511–517. [[CrossRef](#)]
55. Muñoz-Caro, T.; Rubio, M.C.R.; Silva, L.M.R.; Magdowski, G.; Gärtner, U.; McNeilly, T.N.; Taubert, A.; Hermosilla, C. Leucocyte-derived extracellular trap formation significantly contributes to *Haemonchus contortus* larval entrapment. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Hussain, Q.A. Neutrophil Extracellular Traps: As Antimicrobial Peptides. *Oral Rehabil. Dent.* **2019**, 1–9. [[CrossRef](#)]
57. Storisteanu, D.M.L.; Pocock, J.M.; Cowburn, A.S.; Juss, J.K.; Nadesalingam, A.; Nizet, V.; Chilvers, E.R. Evasion of neutrophil extracellular traps by respiratory pathogens. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2017**, *56*, 423–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Guimarães-Costa, A.B.; De Souza-Vieira, T.S.; Paletta-Silva, R.; Freitas-Mesquita, A.L.; Meyer-Fernandes, J.R.; Saraiva, E.M. 3<sup>1</sup>-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 1732–1740. [[CrossRef](#)]
59. Tran, T.M.; MacIntyre, A.; Hawes, M.; Allen, C. Escaping Underground Nets: Extracellular DNases Degrade Plant Extracellular Traps and Contribute to Virulence of the Plant Pathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005686. [[CrossRef](#)]
60. Fuchs, T.A.; Abed, U.; Goosmann, C.; Hurwitz, R.; Schulze, I.; Wahn, V.; Weinrauch, Y.; Brinkmann, V.; Zychlinsky, A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **2007**, *176*, 231–241. [[CrossRef](#)]
61. Papayannopoulos, V.; Metzler, K.D.; Hakkim, A.; Zychlinsky, A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **2010**, *191*, 677–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

62. Li, P.; Li, M.; Lindberg, M.R.; Kennett, M.J.; Xiong, N.; Wang, Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 1853–1862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Lewis, H.D.; Liddle, J.; Coote, J.E.; Atkinson, S.J.; Barker, M.D.; Bax, B.D.; Bicker, K.L.; Bingham, R.P.; Campbell, M.; Chen, Y.H.; et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 189–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Burgos, R.A.; Conejeros, I.; Hidalgo, M.A.; Werling, D.; Hermosilla, C. Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2011**, *143*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Conejeros, I.; Patterson, R.; Burgos, R.A.; Hermosilla, C.; Werling, D. Induction of reactive oxygen species in bovine neutrophils is CD11b, but not dectin-1-dependent. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2011**, *139*, 308–312. [[CrossRef](#)]
66. Vanhaesebroeck, B.; Guillermet-Guibert, J.; Graupera, M.; Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 329–341. [[CrossRef](#)]
67. Condliffe, A.M.; Davidson, K.; Anderson, K.E.; Ellson, C.D.; Crabbe, T.; Okkenhaug, K.; Vanhaesebroeck, B.; Turner, M.; Webb, L.; Wymann, M.P.; et al. Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood* **2005**, *106*, 1432–1440. [[CrossRef](#)]
68. Parker, H.; Dragunow, M.; Hampton, M.B.; Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *92*, 841–849. [[CrossRef](#)]

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# Different Drugs, Same End: Ultrastructural Hallmarks of Autophagy in Pathogenic Protozoa

Yasmin Pedra-Rezende<sup>1</sup>, Isabela S. Macedo<sup>2</sup>, Victor Midlej<sup>3</sup>, Rafael M. Mariante<sup>2\*</sup> and Rubem F. S. Menna-Barreto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Estrutural, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup>Laboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Santi M. Mandal,  
Indian Institute of Technology  
Kharagpur, India

### Reviewed by:

Juan Diego Maya,  
University of Chile, Chile  
William Harold Witola,  
University of Illinois at  
Urbana–Champaign, United States

### \*Correspondence:

Rafael M. Mariante  
rafaelmariante@gmail.com  
Rubem F. S. Menna-Barreto  
rubemsadok@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
Antimicrobials, Resistance and  
Chemotherapy,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 17 January 2022

**Accepted:** 02 March 2022

**Published:** 29 March 2022

### Citation:

Pedra-Rezende Y, Macedo IS,  
Midlej V, Mariante RM and  
Menna-Barreto RFS (2022) Different  
Drugs, Same End: Ultrastructural  
Hallmarks of Autophagy in  
Pathogenic Protozoa.  
Front. Microbiol. 13:856686.  
doi: 10.3389/fmicb.2022.856686

Protozoan parasites interact with a wide variety of organisms ranging from bacteria to humans, representing one of the most common causes of parasitic diseases and an important public health problem affecting hundreds of millions of people worldwide. The current treatment for these parasitic diseases remains unsatisfactory and, in some cases, very limited. Treatment limitations together with the increased resistance of the pathogens represent a challenge for the improvement of the patient's quality of life. The continuous search for alternative preclinical drugs is mandatory, but the mechanisms of action of several of these compounds have not been described. Electron microscopy is a powerful tool for the identification of drug targets in almost all cellular models. Interestingly, ultrastructural analysis showed that several classes of antiparasitic compounds induced similar autophagic phenotypes in trypanosomatids, trichomonadids, and apicomplexan parasites as well as in *Giardia intestinalis* and *Entamoeba* spp. with the presence of an increased number of autophagosomes as well as remarkable endoplasmic reticulum profiles surrounding different organelles. Autophagy is a physiological process of eukaryotes that maintains homeostasis by the self-digestion of nonfunctional organelles and/or macromolecules, limiting redundant and damaged cellular components. Here, we focus on protozoan autophagy to subvert drug effects, discussing its importance for successful chemotherapy.

**Keywords:** protozoa, drugs, chemotherapy, autophagy, electron microscopy, endoplasmic reticulum profile, autophagosome, myelin-like structure

## AUTOPHAGY AND ITS MOLECULAR MACHINERY

Autophagy is a physiological process of self-digestion of nonfunctional organelles and/or macromolecules, limiting redundant and damaged cellular components. This biochemical pathway can be selective or nonselective and guarantees eukaryotic homeostasis through the turnover and recycling of target cellular structures, which are pivotal events during cell growth and differentiation (Menna-Barreto, 2019; Abdrakhmanov et al., 2020; Klionsky et al., 2021). Despite nonselective characteristics during different conditions, such as starvation, numerous selective autophagic examples, including mitophagy, reticulophagy, and xenophagy (degradation by

autophagy of mitochondria, endoplasmic reticulum, and pathogens, respectively), have been reported (Abdrakhmanov et al., 2020).

In pathological situations, including in protozoan infections, autophagy is increased to recover the cellular balance (Kirkegaard et al., 2004; Swanson, 2006). However, continuous induction of this pathway can culminate in autophagic cell death (Levine and Yuan, 2005). In protozoa, the autophagic phenotype is often induced *in vitro* by a great variety of drugs with different well-known mechanisms of action (Menna-Barreto et al., 2009c; Menna-Barreto, 2019).

Molecularly, autophagy is a highly conserved process regulated by autophagy-related genes (ATGs) previously identified in *Saccharomyces cerevisiae* (Klionsky et al., 2003), and their orthologs were subsequently described in all eukaryotes (Klionsky et al., 2021). Currently, three autophagic types are presented in the literature: macroautophagy (also called autophagy), microautophagy, and chaperone-mediated autophagy (CMA; Menna-Barreto, 2019; Abdrakhmanov et al., 2020).

Macroautophagy is characterized by the presence of double membrane organelles named autophagosomes that will address cellular material to be degraded in lysosomes. In a well-controlled process dependent on Atg proteins, a membrane structure (phagophore) surrounds damaged organelles or macromolecules, giving rise to autophagosomes (Shintani and Klionsky, 2004; Alvarez et al., 2008). The triggering of the process depends on the serine/threonine protein kinase TOR (target of rapamycin), a nutritional availability sensor, and Atg6 (beclin 1 in mammals), which is a phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K; Duszenko et al., 2011).

Unlike macroautophagy, autophagosomes are absent in microautophagy. The cellular material that will be degraded is engulfed by invagination of the lysosomal membrane. As demonstrated by electron microscopy, lysosomes full of small vesicles in their lumen are called multivesicular bodies. Unfortunately, this autophagic type is poorly studied due to the absence of specific markers (Menna-Barreto, 2019; Klionsky et al., 2021).

The most selective autophagic type is CMA, where signal pentapeptides (KFERQ, VDKFQ or QREFK) present in target proteins bind to cytosolic chaperones. The chaperone substrate binds to the lysosomal receptor LAMP-2A, promoting channel formation derived from receptor dimerization. Target molecules are degraded in the lysosomal lumen after entering through this channel (Duszenko et al., 2011).

Since the first description more than half a century ago, ultrastructural characterization remains a valuable tool for autophagic phenotype detection, allowing autophagosome identification without the use of specific markers (Menna-Barreto et al., 2009c; Menna-Barreto, 2019). More recently, knockdown or knockout of autophagic components strategies have also been commonly used. The gold-standard method for monitoring autophagic flux is the detection of Atg8 (LC3 in mammals) by morphological investigation after immunostaining microscopy (presence of LC3 puncta) and/or by immunoblotting (detection of LC3-I and LC3-II; Klionsky et al., 2021). In the present work, we reviewed different aspects of the protozoan autophagy

exacerbation, discussing the possible role for drug resistance/susceptibility of these pathogens.

## PROTOZOAN DISEASES AND CHEMOTHERAPY

### Chagas Disease

Chagas disease, which is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a neglected illness that affects approximately 6–7 million people worldwide, mostly in Latin America, and causes approximately 10,000 deaths per year (World Health Organization, 2020a). The occurrence of Chagas disease has also been reported in nonendemic countries, such as Canada, the United States, Australia, and Japan, due to the constant migration of individuals from endemic areas (Rassi et al., 2010). The transmission is mainly vectorial, depending on the infected triatomine bug, but *T. cruzi* can also be transmitted through blood transfusion, organ transplantation, ingestion of contaminated food or *via* transplacental (Delgado and Gascón, 2020).

Clinically, Chagas disease presents two phases: acute and chronic. In the acute stage, despite patent bloodstream parasitemia, no specific symptoms are detected. In the chronic phase, individuals are asymptomatic in the indeterminate stage; approximately 30%–40% of cases progress to the symptomatic stage, which is characterized by cardiac and/or digestive alterations (Rassi et al., 2010). The clinical treatment of this disease is still based on the nitrocompounds benznidazole, and nifurtimox, which were discovered half a century ago and are highly effective in acute cases but exhibit limited efficacy in chronic patients (Table 1; Dias et al., 2016). Given limitations in currently available treatments, there is an urgent need for alternative and specific treatments. Several efforts have been directed to the development of new drugs or combinations for Chagas disease chemotherapy (Vannier-Santos et al., 2019).

### Sleeping Sickness

Caused by *Trypanosoma brucei*, sleeping sickness is a neglected disease transmitted by tsetse flies (*Glossina* genus) that occurs exclusively in sub-Saharan Africa with rural populations being more exposed to the vector (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). At present, approximately 70 million people are at risk of infection, and 30,000 new cases are emerging regardless of disease control initiatives (World Health Organization, 2022). There are two subspecies that are pathogenic to humans: *T. brucei gambiense* and *T. brucei rhodesiense*. The most prevalent is *T. brucei gambiense*, which is present in western Africa and causes approximately 98% of reported cases, whereas *T. brucei rhodesiense* is found in eastern Africa and is much less prevalent (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Alternative routes of transmission have also been reported, such as transplacental or mechanical transmission through other blood-sucking insects, but both are less frequent than the classical tsetse route (Drugs for Neglected Diseases Initiative, 2020).

Sleeping sickness presents in two distinct clinical phases depending on the localization of the parasite. In the first stage,

**TABLE 1** | The main protozoal infections and their current chemotherapies.

Disease	Treatment	Mechanism of action	References
Chagas disease	Benznidazole Nifurtimox	Nitroreductases activation	Wilkinson et al., 2008
Sleeping sickness	Suramin Pentamidine Eflornithine Melarsoprol	Glycosomal enzymes inhibition Mitochondrial dysfunction Ornithine decarboxylase inhibition Trypanothione inhibition	Babokhov et al., 2013 Vercesi and Docampo, 1992 LoGiudice et al., 2018 Kennedy, 2013
Leishmaniasis	Pentavalent antimonials Amphotericin B Paromomycin Pentamidine Miltefosine Azolic compounds	Sb (V) to Sb (III) reduction and type I DNA topoisomerases inhibition Plasma membrane permeabilization and mitochondrial dysfunction Protein synthesis inhibition Mitochondrial dysfunction Cytochrome c oxidase inhibition CYP51 inhibition	Frézard et al., 2009 Lee et al., 2002 Kip et al., 2018 Vercesi and Docampo, 1992 Luque-Ortega and Rivas, 2007 Emami et al., 2017
Toxoplasmosis	Pyrimethamine and sulfadiazine	Block the parasite DNA synthesis (by inhibition of the folate metabolic pathway)	Dunay et al., 2018
Malaria	Spiramycin Chloroquine Hydroxychloroquine Artemether-lumefantrine Atovaquone-proguanil Doxycycline Tetracycline Clindamycin Mefloquine Artesunate	Inhibits translocation (by interference in bacterial 50S ribosomal subunits) Intravacuolar pH increasing (hemoglobin digestion interfered) Intravacuolar pH increasing (hemoglobin digestion interfered) Free radical damage to parasite organelles and proteins. Mitochondrial electron transport inhibition Inhibits apicoplast protein translation (organelle dysfunction) Protein synthesis inhibition (results in nonfunctional apicoplasts) Protein synthesis inhibition (results in nonfunctional apicoplasts) Intravacuolar pH increasing (hemoglobin digestion blockage) Parasite DNA damage	Brisson-Noël et al., 1988; Brook, 1998 Gabay et al., 1994 Fox, 1993 White et al., 1999 Painter et al., 2010; Vaidya, 2011 Briolant et al., 2010 Dahl et al., 2006 Dahl et al., 2006 Mungthin et al., 1998 Gopalakrishnan and Kumar, 2015
Giardiasis	Nitroimidazoles	Damage DNA and proteins	Lindmark and Müller, 1976; Leitsch et al., 2012; Muller et al., 2015;
Trichomoniasis and Amebiasis	Benzimidazoles Nitazoxanide Paromomycin	Blocking glucose uptake and inhibit microtubules polymerization Inhibition of enzymes that participates in energy conversion and possibly production of nitro radicals Inhibition of protein synthesis	Sears and O'Hare, 1988 Hoffman et al., 2007 Edlind, 1989

*T. brucei* is mainly localized in the host bloodstream. However, in the second phase, the parasite is concentrated in the central nervous system, causing progressive neurological injury (Kennedy, 2013). The current treatment of the disease varies depending on the infectious species (*T. brucei gambiense* or *T. brucei rhodesiense*) as well as the disease phase (early or late stage). Pentamidine is the first choice for early stage *T. brucei gambiense* infection, while suramin is recommended for the early stage of *T. brucei rhodesiense* infection (Table 1; Kennedy and Rodgers, 2019). For the late stage, melarsoprol and eflornithine represent the primary treatment options, and the latter is generally used in association with nifurtimox. Fexinidazole is an oral treatment indicated as the first line for the first stage and nonsevere second stage in *T. brucei gambiense* (World Health Organization, 2022). The high toxicity of clinical drugs, especially melarsoprol, encourages the search for alternatives for anti-*T. brucei* chemotherapy.

## Leishmaniasis

Leishmaniasis is another neglected disease caused by 20 different *Leishmania* species that are spread by phlebotomine sandflies (Centers for Disease Control and Prevention, 2021a). Globally, more than 12 million people worldwide are infected, and 350 million people are at risk of infection with approximately 1.6 million new cases and 20,000–30,000 deaths each year (Pan American Health Organization, 2019). Distinct species of

*Leishmania* spp. cause different clinical manifestations, and there are three different forms of the disease: mucosal, cutaneous, and visceral (kala-azar; Centers for Disease Control and Prevention, 2021a).

Due to the complexity of clinical manifestations and the diversity of etiological agent species, there are still many difficulties in finding a unique and effective treatment (Kaye and Scott, 2011). Pentavalent antimonial compounds constitute the first-line treatment, and meglumine antimoniate and sodium stibogluconate are the two main formulations. Other drugs, such as amphotericin B, paromomycin, pentamidine, miltefosine, and azolic compounds, are also commonly used alone or in combination (Table 1; Aronson et al., 2016). Undesirable side effects together with reports of resistance to conventional drugs justify the continuous search for new leishmanicidal agents (De Menezes et al., 2015). Among the novel approaches for cutaneous leishmaniasis, CO<sub>2</sub> laser administration and thermotherapy, cryotherapy, electrotherapy, intralesional administration, combination therapy, immunomodulation, nanotechnology, and drug repurposing have been employed (Roatt et al., 2020).

## Toxoplasmosis

Toxoplasmosis is a disease caused by the obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*. This is the most prevalent infectious

disease in humans, chronically infecting approximately one-third of the world's population (Dubey, 2010). The successful worldwide distribution of *T. gondii* is attributed to the high diversity of host species it can infect, including almost all warm-blooded animals, and its multiple mechanisms of transmission, which include ingestion by the host of undercooked meat containing parasite cysts or oocyst-contaminated food or water (Dunay et al., 2018; Centers for Disease Control and Prevention, 2021b). Due to the infrequent or mild clinical manifestations, toxoplasmosis is considered an opportunistic infection in immunosuppressed patients and pregnant women, leading to severe symptoms, such as retinochoroiditis and mental disability (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b).

Treatment of toxoplasmosis typically involves a combination of antimicrobials, such as pyrimethamine and sulfadiazine, plus folinic acid depending on the disease presentation, and particularities are noted in pregnant women (Table 1; Dunay et al., 2018; Centers for Disease Control and Prevention, 2021b). Unfortunately, the drugs used in clinical practice are only active against tachyzoites, the replicative form of the parasite, and do not demonstrate activity against tissue cysts containing bradyzoites, a latent stage of *T. gondii* that is present in the chronic phase of the disease (Dunay et al., 2018).

## Malaria

*Plasmodium* is the causative agent of malaria, a disease transmitted by the *Anopheles* mosquito, affecting tropical and subtropical countries, especially in Africa (Cowman et al., 2016; Centers for Disease Control and Prevention, 2021c). In 2019, malaria led to more than 400,000 deaths worldwide, mainly affecting children due to underdeveloped immunity. Thus, the disease is noted as one of the most serious and deadly illnesses in the world (Mbacham et al., 2019; World Health Organization, 2020b). Due to efficient public health strategies, an important reduction in cases can be observed in developed countries, and new cases are typically associated with immigrants and tourists from endemic areas (Cotter et al., 2013; Gachelin et al., 2018). Regarding clinical manifestations, malaria presents milder to more specific symptoms according to disease progression, including organ failure, blood abnormalities, cerebral malaria, and even death if not treated (Centers for Disease Control and Prevention, 2021c).

Treatment varies with the severity of the disease and the *Plasmodium* species, among other factors (White, 1996). Antimalarial drugs, such as chloroquine and hydroxychloroquine, have been the most widely administered to patients with uncomplicated malaria since their development. However, due to drug resistance over time, the disease can now be effectively treated with other drugs, such as artemether-lumefantrine (Table 1). For severe malaria, the patient should be treated with intravenous artesunate (Van Vugt et al., 2011; Centers for Disease Control and Prevention, 2021c).

## Giardiasis

*Giardia intestinalis* (syn. *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*) is the most common parasite related to gastrointestinal infections in the world, affecting approximately 200 million people annually

(Certad et al., 2017). Most cases are characterized by asymptomatic infections. However, these infections will release infectious cysts, perpetuating parasite dissemination (Capewell et al., 2021). The main symptoms of giardiasis are diarrhea and weight loss, which are linked to trophozoite adhesion to host intestinal epithelia, inefficient nutrient and water uptake, and triggering of an immune response (Leung et al., 2019). In some cases, giardiasis leads to a loss of barrier function and dysbiosis of the gut flora, presenting features similar to irritable bowel syndrome (Allain and Buret, 2020). The clinical effects of giardiasis are more significant in children, in which psychomotor and cognitive development can also be adversely affected during the infection, beyond the classical symptoms (Rogawski et al., 2017).

The current treatment of giardiasis is based on several drug classes. 5-Nitroimidazole derivatives are the most prescribed compounds, and metronidazole (MTZ) is often the drug of choice (Table 1). Among the other alternatives used, albendazole and mebendazole also stand out (Escobedo et al., 2016). MTZ presents undesirable side effects, usually resulting in treatment interruption. Drug resistance has been reported both *in vitro* and *in vivo*, and a complete parasitological cure has not been achieved (Argüello-García et al., 2020).

## Trichomoniasis

Despite the advances achieved from public campaigns carried out in recent decades, sexually transmitted infections (STIs) and their consequences are among the top five reasons that cause people in developing countries to seek medical treatment (Cudmore and Garber, 2010). Human trichomoniasis caused by the protozoan *Trichomonas vaginalis* is an STI with a wide geographic distribution that affects approximately 156 million people worldwide (Rowley et al., 2019). This disease is characterized by an infection of the urogenital tract and is more frequently noted in females. Severe and irritating inflammation resulting from exacerbated vaginal leukorrhea is the main pathological consequence (Cudmore and Garber, 2010; Secor, 2012). In men, trichomoniasis is typically asymptomatic, and the host acts only as a carrier. However, trichomoniasis can sporadically cause urethritis, prostatitis, and infertility (Secor, 2012). The greater predisposition of infected individuals to viral, bacterial, and fungal infections as well as the association between the presence of the parasite and a higher incidence of cervical cancer and an aggressive type of prostate cancer underscore the importance of trichomoniasis in human medicine (Hirt, 2013).

Trichomoniasis is only treated in women, and treatment is mainly based on MTZ administration (Table 1; Van Gerwen and Muzny, 2019). In addition to MTZ, tinidazole (TIN) is also prescribed due to better absorption and fewer gastrointestinal side effects than MTZ (Viitanen et al., 1985). Other drugs, such as disulfiram and nithiamide, can be used when patients have hypersensitivity to 5-nitroimidazoles (Sears and O'Hare, 1988).

## Amebiasis

Amebiasis is an enteric infection quite similar to giardiasis with one important difference: its disease state can range from

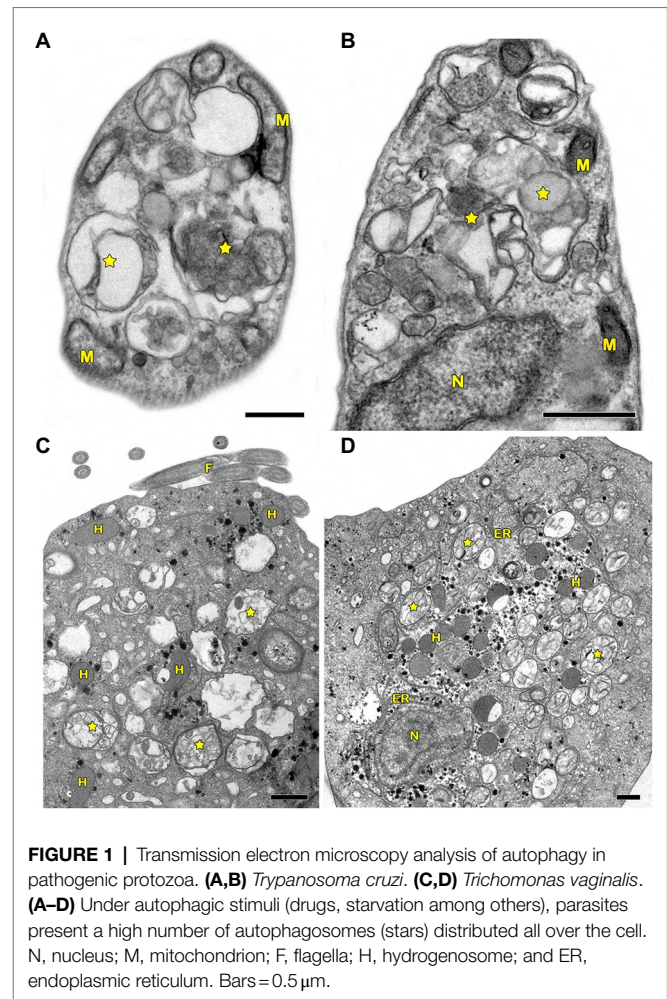
intestinal inflammation to a severe liver abscess (Shirley et al., 2018). In humans, the disease is mainly caused by the nonflagellated protozoa *Entamoeba histolytica* (Shimokawa et al., 2012). Amebic infection is one of the main causes of diarrhea worldwide, mainly in young children. In developing countries, childhood diarrhea is a very common cause of death, accounting for approximately 9% of deaths in children under 5 years old (United Nations International Children's Emergency Fund, 2018).

The most effective treatment for amebiasis is based on the administration of MTZ, mainly for the invasive disease form (Farthing, 2006). Paramomycin and diloxanide furoate are luminal agents commonly used to eliminate cysts from the colon (Zulfiqar et al., 2021). Other nitroimidazole derivatives, including tinidazole and ornidazole, are also used (Table 1; Chacín-Bonilla, 2013). The severe complication of amebiasis, namely, liver abscess, can be managed through aspiration using computed tomography as a guide combined with MTZ. In some cases, surgery is also required to treat gastrointestinal bleeding, megacolon, liver abscesses, and other severe damages when drainage is not possible (González-Alcaide et al., 2017).

## AUTOPHAGY IN PROTOZOA

In protozoa, autophagy was first reported in *T. brucei* in 1977 by Vickerman and Tetley (1977) based on ultrastructural evidence. To date, parasites under starvation and/or subjected to other stress conditions commonly present autophagic features, including an increase in autophagosome number, multivesicular bodies, and myelin-like structures (Figures 1A–D, 2A–F, 3A,B; Benchimol, 1999; Maia et al., 2007; Corrêa et al., 2009; Menna-Barreto et al., 2009c; Besteiro et al., 2011; Ghosh et al., 2012; Koh et al., 2015; Picazarri et al., 2015; Souto et al., 2016; Nguyen et al., 2017b; Hernández-García et al., 2019; Araujo-Silva et al., 2021; Wu et al., 2021; Zhang et al., 2021). Interestingly, concentric membrane and myelin-like structures share morphological similarities to the phagophore described in yeast and mammals. The endoplasmic reticulum (ER), the main source of the phagophoric membrane, is frequently found surrounding degraded subcellular structures, especially in stressed parasites (Figures 3A,B; Maia et al., 2007; Corrêa et al., 2009; Martins-Duarte et al., 2009; Menna-Barreto et al., 2009a; Duszenko et al., 2011; Busatti et al., 2013; Hernández-García et al., 2019).

Regarding the molecular machinery, the autophagic pathway is well conserved among eukaryotes. Many ATG homologs have been identified in pathogenic protozoa, but some components are lacking or differ from those found in yeast. In trypanosomatids, genes involved in phagophore elongation and degradation of autophagosome cargo were detected by *in silico* approaches, including the complete Atg8 conjugation system (Atg3, Atg4, Atg7, and Atg8; Figure 4; Herman et al., 2006). Similar data were obtained in *Entamoeba* and *T. vaginalis*, where the Atg8 conjugation system was described, and the Atg12 complex is lacking (Picazarri et al., 2015; Hernández-García et al., 2019; Huang et al., 2019). In *Giardia*, bioinformatic analysis revealed the TOR, S6K1, PI3K, Atg1, Atg16, Atg7,

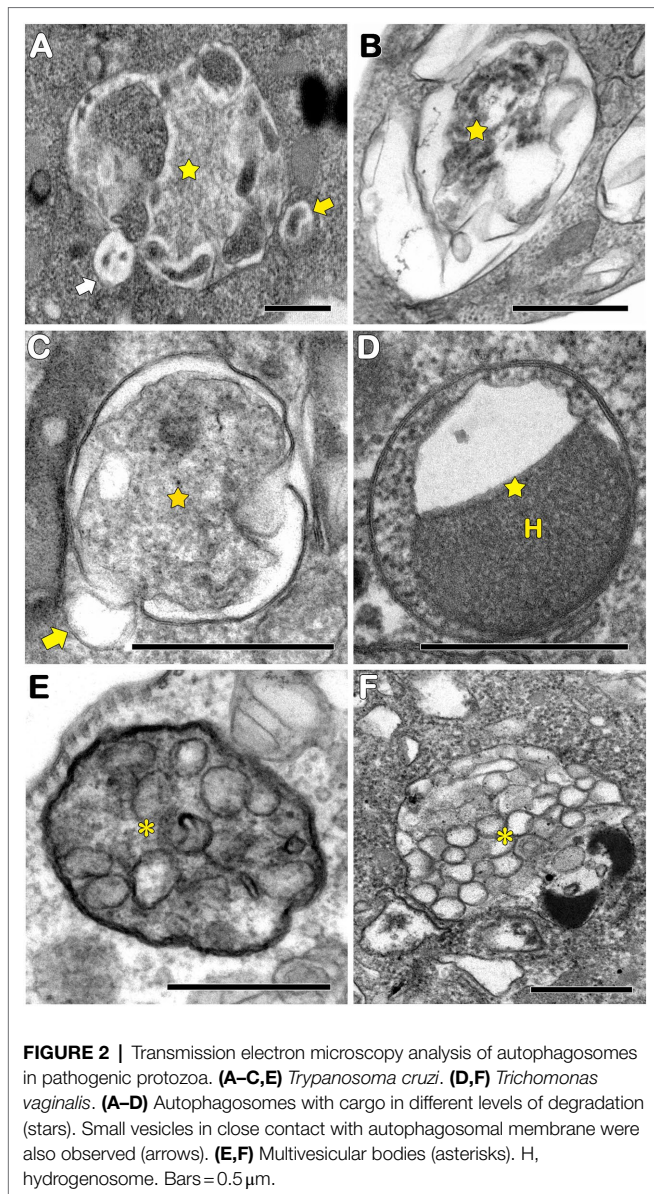


**FIGURE 1 |** Transmission electron microscopy analysis of autophagy in pathogenic protozoa. (A,B) *Trypanosoma cruzi*. (C,D) *Trichomonas vaginalis*. (A–D) Under autophagic stimuli (drugs, starvation among others), parasites present a high number of autophagosomes (stars) distributed all over the cell. N, nucleus; M, mitochondrion; F, flagella; H, hydrogenosome; and ER, endoplasmic reticulum. Bars = 0.5  $\mu$ m.

Atg8, and Atg18 genes (Cernikova et al., 2020; Wu et al., 2021). *Toxoplasma gondii* seems to have well-conserved autophagic machinery, presenting several putative orthologs of yeast Atgs, including proteins of the Atg1, TOR, and PI3K complexes and Atg9 and Atg8/Atg12 systems (Lévêque and Besteiro, 2016; Besteiro, 2017). On the other hand, the Atg repertoire in *Plasmodium* did not reveal the presence of Atg24, TOR kinase, Atg9, Atg6, and Atg16, but the other Atgs found in *T. gondii* are also present (Lévêque and Besteiro, 2016; Besteiro, 2017).

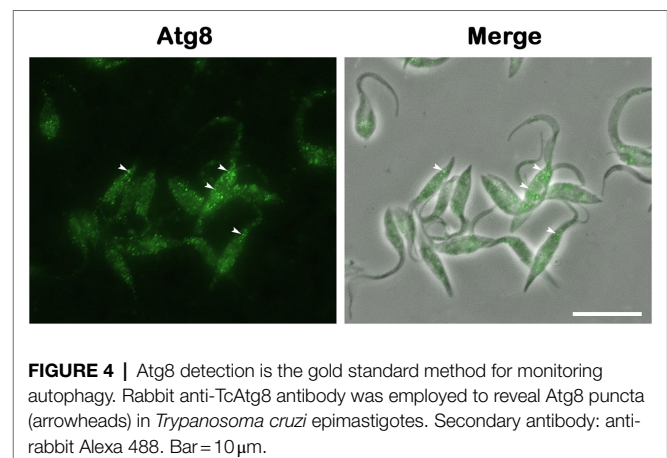
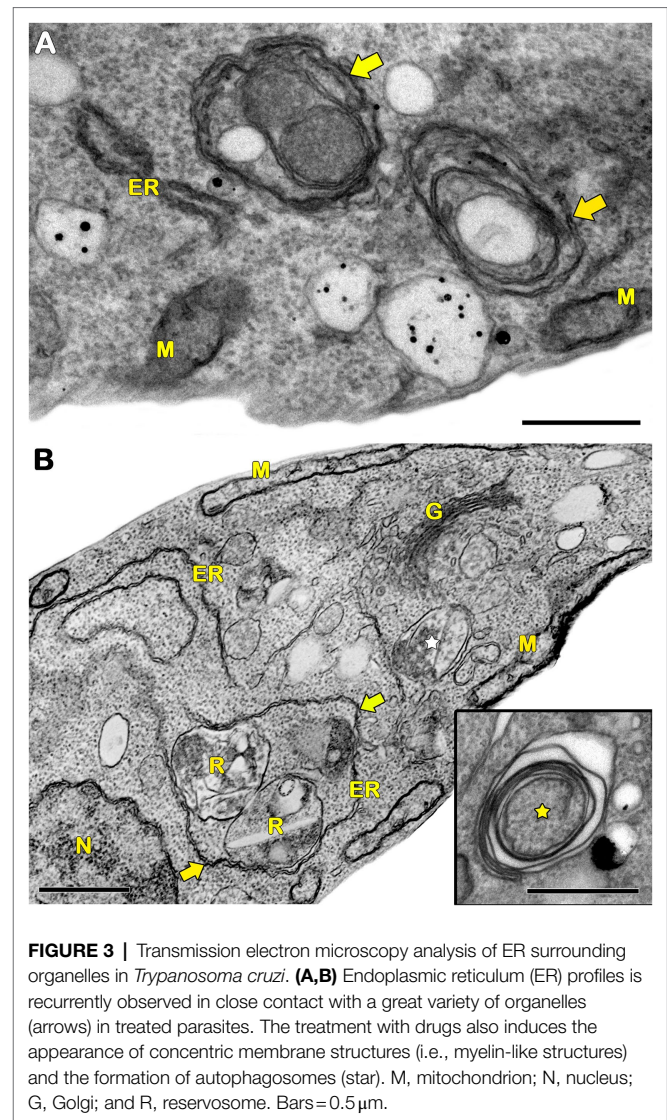
The first functional analysis of Atgs in protozoa was performed in *L. major* in 2006 (Besteiro et al., 2006). The role of Atg8 and Atg4 was assessed in *T. cruzi* in 2008, and its activity was found to be directly related to the differentiation process of the parasite. The isoforms of Atg8 (TcAtg8.1 and TcAtg8.2) and Atg4 (Atg4.1 and Atg4.2) were investigated, showing the localization of Atg8.1 in autophagosomes of parasites under nutritional deprivation (Alvarez et al., 2008). Other Atg8 isoforms were identified in *Leishmania* spp. and *T. brucei* (Atg8, Atg8A, Atg8B, and Atg8C) and are regulated by the same two Atg4 isoforms (Rigden et al., 2005; Koopmann et al., 2009; Williams et al., 2009). On the other hand, in trypanosomatids, the Atg12





conjugation system is incomplete, and ATG5, ATG10, and ATG12 are lacking (Herman et al., 2006; Kiel, 2010). In *E. histolytica*, no Atg regulation was described during starvation, but EhAtg8 has a function in driving phagosome acidification (Picazarri et al., 2015). Atg8 is upregulated during the *G. intestinalis* differentiation process, and its expression induces parasite encystation (Wu et al., 2021). Moreover, *T. vaginalis* expresses two Atg8 genes, TvAtg8a and TvAtg8b, both of which retain a functional domain of Atg8. Moreover, TvAtg8a is more highly expressed (Huang et al., 2019).

The presence of genes encoding TOR kinases (TOR1 and TOR2) and their respective complexes (TORC1 and TORC2) was also detected in pathogenic trypanosomatids; however, their functions were not fully investigated. Following treatment with rapamycin, a classical autophagic inducer, an increased number of autophagosomes derived from TORC2 inhibition



in *T. brucei* were observed, blocking parasite replication (Barquilla et al., 2008; Denninger et al., 2008). In *Giardia* and *Trichomonas*, rapamycin increased the number of Atg8 puncta, which may

regulate parasite growth and differentiation into cysts (Hernández-García et al., 2019; Wu et al., 2021). A putative ortholog of mammalian TOR kinase is present in the *T. gondii* genome (TgTOR, TGME49\_116440). To assess whether TgTOR is a component of the amino acid sensing mechanism, the parasites were treated with rapamycin, mimicking amino acid deprivation. Increasing drug concentrations induced a dose-dependent accumulation of Atg8 puncta, suggesting an increase in autophagic activity in the parasites (Besteiro et al., 2011) and a dose-dependent fragmentation of the parasite's mitochondria (Ghosh et al., 2012).

As previously mentioned, autophagy seems to be particularly important for the success of the protozoan life cycle, especially during the differentiation steps (Alvarez et al., 2008; Besteiro et al., 2011; Lévêque et al., 2015; Picazarri et al., 2015; Smith et al., 2021; Wu et al., 2021). *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are submitted to limited nutrients after their migration to the triatominae rectum, a crucial step for the occurrence of metacyclogenesis (Alvarez et al., 2008; Duszenko et al., 2011). Recently, Losinno et al. (2021) described the involvement of acidocalcisomes during this differentiation process. Autophagic vesicles released from this organelle fuse to reservosomes, contributing to reservosomal acidification and consequently increasing the hydrolytic activity of the cysteine protease cruzipain, resulting in parasite self-proteolysis (Losinno et al., 2021). Further experiments on the role of this self-processing and cruzipain activation in parasite differentiation and infection in both invertebrate and vertebrate hosts must be performed. In *Leishmania* spp., metacyclogenesis is also regulated by autophagy (Besteiro et al., 2006; Williams et al., 2006). Atg4.2 deletion blocked autophagic flux, leading to the accumulation of lipidated Atg8 and a decrease in the percentage of promastigotes under differentiation (Schoijet et al., 2017) as well as during *L. mexicana* amastigogenesis (Williams et al., 2006). In this parasite, megasomes are lysosome-like organelles that play a crucial role during the differentiation process. The deletion of two megasomal cysteine peptidases (CPA and CPB) also led to the impairment of amastigogenesis, and a high number of autophagosomes were found in mutant parasites (Williams et al., 2006; Kiel, 2010). At least for trypanosomatids, the involvement of autophagy in the regulation of virulence and infectivity in vertebrate hosts is clear (Besteiro et al., 2006), but the related molecular processes still need to be elucidated.

Due to the remarkable differences among vertebrate and invertebrate hosts, it is common sense that nutrient availability, temperature, and pH, among other environmental conditions influence protozoan metabolism, including ATP production (Kiel, 2010). Interestingly, the regulation of some of these metabolic adaptations occurs by autophagy. Li and He (2014, 2017) showed that autophagic flux participates in acidocalcisome acidification and that the blockage of organelle biogenesis also impairs the autophagic pathway in *T. brucei*. In *G. intestinalis*, Atg8 interacts with other proteins, such as myeloid leukemia factor (MLF) and FYVE domains, participating in the protein metabolism pathway and processing mitosomal and encystation proteins (Wu et al., 2021). In *Entamoeba*, EhAtg8 is involved

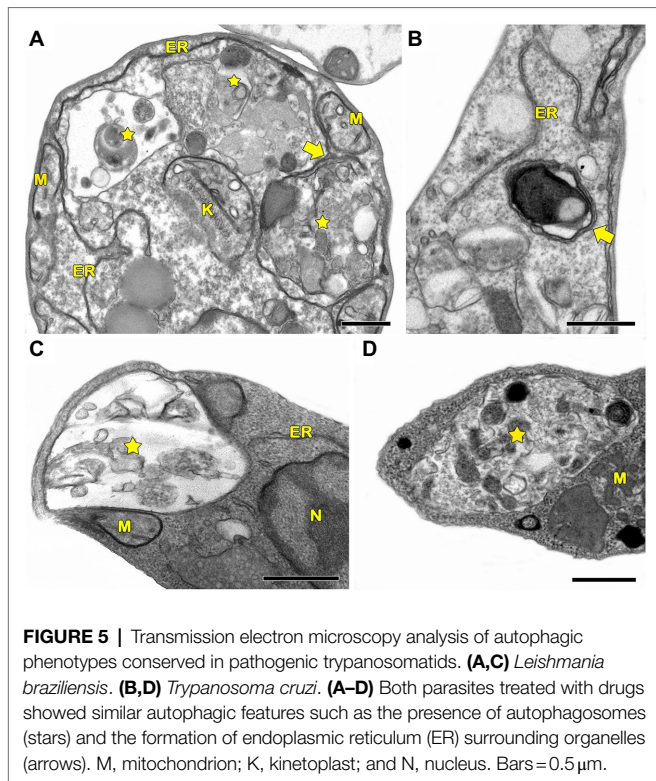
in the incorporation, scavenging and intracellular trafficking of nutrients (Picazarri et al., 2015). On the other hand, glucose restriction in *T. vaginalis* induces autophagy associated with TvAtg8 expression and autophagosome-like formation (Huang et al., 2019).

In apicomplexan parasites, Atg8 exerts unique functions. In addition to its cytosolic or, in the case of stressful conditions, vesicular location, it also localizes to the apicoplasts of *Toxoplasma* and *Plasmodium* (Kitamura et al., 2012; Kong-Hap et al., 2013; Tomlins et al., 2013; Lévêque et al., 2015). In *T. gondii*, Atg8 is responsible for the proper segregation of the organelle by tethering it to the centrosomes during the replication of the parasite (Lévêque et al., 2015). In *Plasmodium*, the protein contributes to apicoplast formation and maintenance (Tomlins et al., 2013). Given that the apicoplast is important for the synthesis of isoprenoid precursors and fatty acids, which are essential for parasite survival (Sheiner et al., 2013), Atg8 has an indirect but important role in apicomplexan metabolism.

Autophagy is also involved in the control of mitochondrial functionality and phospholipid homeostasis in protozoa (Besteiro et al., 2006; Williams et al., 2012; Vanrell et al., 2017). *Trypanosoma cruzi* epimastigotes submitted to an acidic environment or nutritional deprivation showed intense autophagic activity, ROS generation, and mitochondrial remodeling. These conditions reproduce the triatomine rectum environment, which is crucial for differentiation to the metacyclic form, suggesting a direct correlation between autophagy and mitochondrial remodeling during the process. On the other hand, insect blood digestion promotes transitory alkaline conditions. Our group also demonstrated that alkaline medium led to early exacerbation of autophagy and mitochondrial impairment. These features recovered over time, indicating a survival mechanism to increase the autophagic flux for the removal of damaged structures (Pedra-Rezende et al., 2021). *Leishmania major* promastigotes deficient in Atg5, which are not capable of forming autophagosomes, also presented a remarkable decrease in their virulence *in vitro* and *in vivo*. Strong mitochondrial dysfunction was also observed in these mutants together with the increased phosphatidylethanolamine (PE) content and ROS production, suggesting a conjugation of mitochondrial PE to Atg8 for autophagosome biogenesis (Williams et al., 2012). In *T. gondii*, starvation leads to mitochondrial dysfunction with consequent impairment of host cell invasion capacity and accumulation of Atg8 puncta (Besteiro et al., 2011; Ghosh et al., 2012). The use of mutated and conditional knockout parasites revealed that Atg8 and Atg3 are essential for Atg8 lipidation and autophagosome formation (Besteiro et al., 2011).

Regarding the selectivity of the autophagic pathway, selective degradation of *T. brucei* glycosomes (peroxisome-like) was proposed during the differentiation from bloodstream trypomastigotes into procyclic forms. This target organelle is crucial for parasite survival and is involved in bioenergetic metabolism and antioxidant defenses, corroborating the pivotal role of pexophagy in this trypanosomatid (Herman et al., 2008; Brennand et al., 2015).

In general, autophagic phenotypes are very conserved, at least in pathogenic protozoans. Ultrastructural evidence



**FIGURE 5 |** Transmission electron microscopy analysis of autophagic phenotypes conserved in pathogenic trypanosomatids. **(A,C)** *Leishmania braziliensis*. **(B,D)** *Trypanosoma cruzi*. **(A–D)** Both parasites treated with drugs showed similar autophagic features such as the presence of autophagosomes (stars) and the formation of endoplasmic reticulum (ER) surrounding organelles (arrows). M, mitochondrion; K, kinetoplast; and N, nucleus. Bars = 0.5  $\mu\text{m}$ .

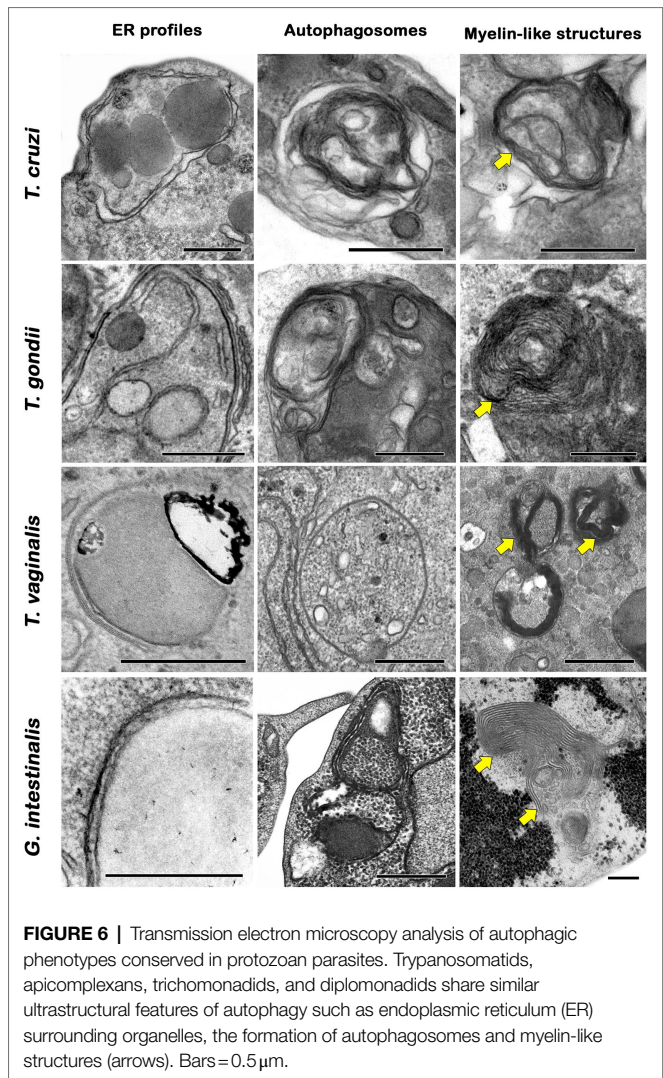
(autophagosome formation, myelin-like structures and ER surrounding organelles) and Atg expression are frequently assessed in parasites under autophagic stimuli (Figures 5A–D, 6).

## AUTOPHAGIC PHENOTYPES IN DRUG-TREATED PARASITES

Following the recent guidelines for monitoring autophagy, autophagic phenotypes in protozoa after treatment with drugs were assessed by different techniques, including Western blotting and electron and fluorescence microscopy (Klionsky et al., 2021). Innumerable compounds from distinct classes induced different autophagic phenotypes (to different degrees) in protozoan parasites.

One of the most frequent morphological features of autophagy identified in these parasites is the presence of concentric membrane structures or myelin-like structures. Ultrastructural studies noted this structure in protozoa treated with all classes of compounds (Vannier-Santos et al., 1995; Benchimol, 1999; Braga et al., 2005; Granthon et al., 2006; Uzcátegui et al., 2007; Menna-Barreto et al., 2009a,b; Carvalho et al., 2010; Bombaça et al., 2018, 2021; Martínez-García et al., 2018; Araujo-Silva et al., 2021).

The increased number of autophagosomes, a determinant of macroautophagy occurrence, is another very recurrent phenotype detected in treated protozoa (Braga et al., 2005; Granthon et al., 2006; Uzcátegui et al., 2007; Dos Santos et al., 2010; Schurigt et al., 2010; Besteiro et al., 2011; Sengupta et al., 2011; Fernandes et al., 2012; Ghosh et al., 2012;



**FIGURE 6 |** Transmission electron microscopy analysis of autophagic phenotypes conserved in protozoan parasites. Trypanosomatids, apicomplexans, trichomonads, and diplomonads share similar ultrastructural features of autophagy such as endoplasmic reticulum (ER) surrounding organelles, the formation of autophagosomes and myelin-like structures (arrows). Bars = 0.5  $\mu\text{m}$ .

Veiga-Santos et al., 2013; Souto et al., 2016; Nguyen et al., 2017b; Scariot et al., 2017; Lim et al., 2018; Martínez-García et al., 2018; Hernández-García et al., 2019; Huang et al., 2019; de Paula et al., 2020; Silva et al., 2020; Nishi et al., 2021; Zhang et al., 2021).

As previously mentioned, Atg8 is considered the gold standard method for autophagic evaluation. Treatment of *L. donovani* with cryptolepine induced an increase in the number of Atg8 puncta (Sengupta et al., 2011). Similar findings were observed in *T. brucei* treated with L-leucine methyl ester and bacteriocin AS-48 (Koh et al., 2015; Martínez-García et al., 2018). In *T. gondii*, starvation or treatment with the drug monensin or some antimalarial compounds induces a time-dependent accumulation of Atg8 puncta (Besteiro et al., 2011; Lavine and Arrizabalaga, 2012; Varberg et al., 2018). Similar results were obtained when parasites were treated with the ER stress-inducing agents dithiothreitol, brefeldin A, or tunicamycin (Nguyen et al., 2017a). Alternatively, the autofluorescent compound monodansyl cadaverine (MDC) is typically employed to assess autophagy, despite the nonspecificity of this marker. Several groups observed

an increase in MDC labeling after the treatment of parasites with different compounds (Sengupta et al., 2011; Fernandes et al., 2012; Lazarin-Bidóia et al., 2013; Veiga-Santos et al., 2013; Desoti et al., 2014; Scariot et al., 2017, 2019; de Paula et al., 2020; Bortoleti et al., 2021; Nishi et al., 2021; Zhang et al., 2021).

ER profiles surrounding cytoplasmic structures and organelles are also commonly detected in treated protozoa. Fernandes et al. (2012) demonstrated that treatment with triazolic naphthoquinone led to the appearance of ER in close contact with reservosomes of *T. cruzi* epimastigotes. Especially in this case, the authors described the Golgi as an alternative source of the phagophoric membrane (Fernandes et al., 2012). In *L. amazonensis*, elatol and amiodarona induced a similar phenotype and pronounced swelling of the mitochondrion and destabilization of the plasma membrane (Dos Santos et al., 2010; Macedo-Silva et al., 2011). In *T. gondii*, treatment with thiolactomycin analogs induced dramatic morphological changes in parasite shape and intracellular organization, including abnormal amounts of concentric membranes expanded throughout the parasite cytoplasm, possibly representing ER profiles (Martins-Duarte et al., 2009).

To evaluate the specific role of autophagy in a drug mechanism of action, one of the most common experimental protocols is the treatment of parasites with autophagic inhibitors, such as wortmannin and 3-MA (Pasquier, 2016; Klionsky et al., 2021). In *T. cruzi*, the use of these inhibitors completely abolished the trypanocidal effect of naphthoimidazoles, reinforcing autophagy as part of the mechanism of cell death induced by these compounds (Menna-Barreto et al., 2009a). Similar results were obtained with *T. gondii*, where preincubation with 3-MA efficiently abrogated the effects of monensin on mitochondrial fragmentation (Lavine and Arrizabalaga, 2012). Interestingly, 3-MA was not able to prevent antimalarial compounds from the medicines for malaria venture malaria box MMV2- or MMV3-induced mitochondrial disruption, indicating that autophagy may occur downstream of mitochondrial fragmentation via PI3K-independent mechanisms (Varberg et al., 2018).

## CONCLUDING REMARKS

Protozoan diseases still represent a significant challenge, demanding specific public health strategies, especially in low-income countries. Many of them are considered neglected diseases that impair physical and cognitive development, limiting individual productivity and resulting in economic issues (World Health Organization, 2015; Centers for Disease Control and Prevention, 2021d). Different parasite forms from a great variety of subpopulations also contribute to the increase in the drug resistance of pathogens, reinforcing the necessity of a continuous search for alternative compounds with anti-protozoan activity. During preclinical tests, cellular, molecular, and biochemical information about the targets of the novel compounds is critical for the characterization of drug safety and specificity.

Indeed, a detailed description of the mechanisms of action is still lacking, even for clinical drugs. As an example, the trypanocidal actions of benzimidazole and nifurtimox, which are

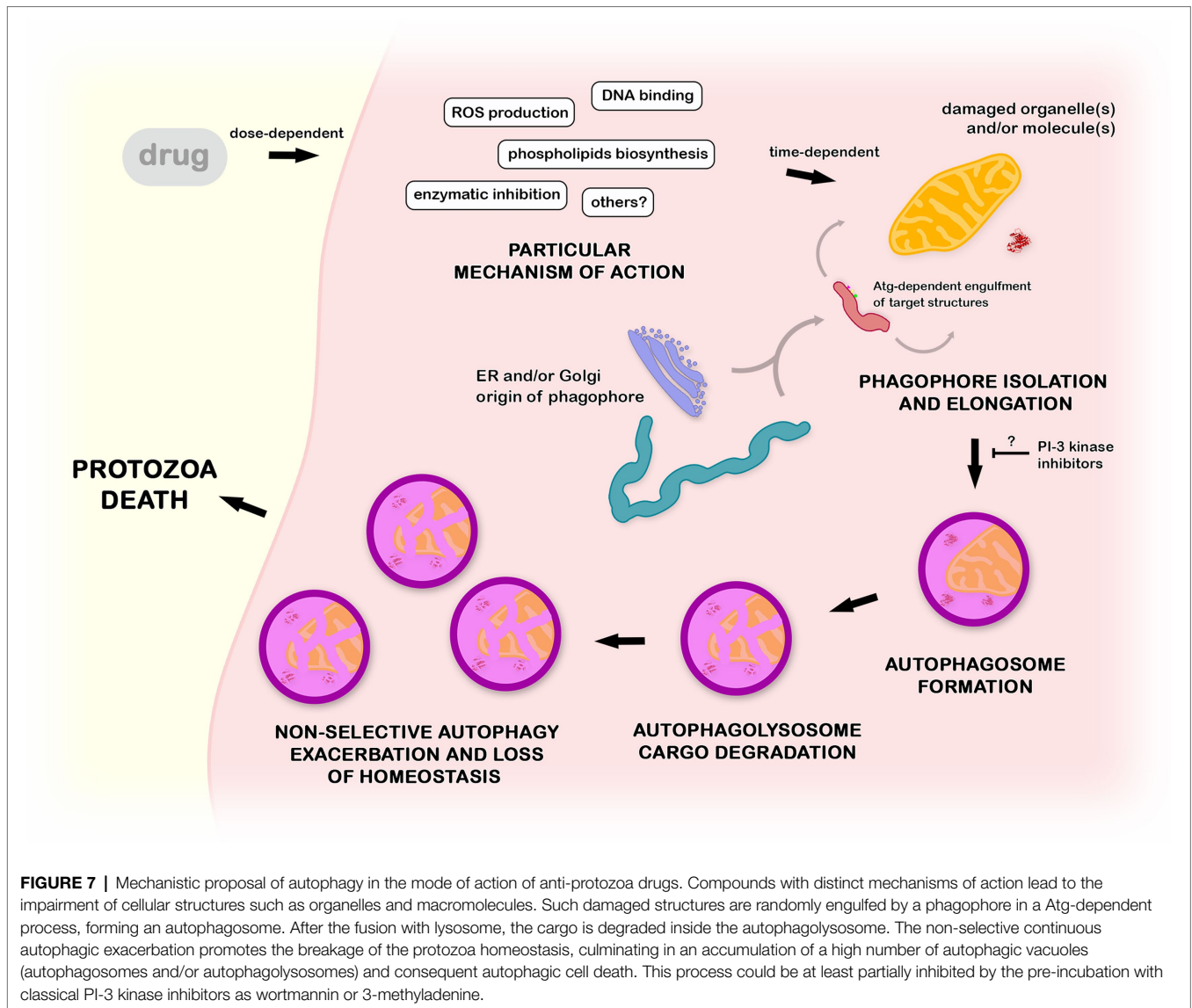
employed for Chagas disease treatment, are still not completely understood more than 50 years after their discovery (Menna-Barreto and De Castro, 2016). Furthermore, many new compounds with potent anti-protozoan activity do not exhibit predicted biological effects (Chatelain and Ioset, 2011; Gaspar et al., 2015), emphasizing the importance of the identification of effective molecular targets. Despite multidisciplinary efforts involving high-throughput screenings to discover novel candidates for the treatment of protozoan diseases (Annang et al., 2015; Peña et al., 2015), few studies have elucidated their mechanisms of action. One of the main reasons is the lack of efficient and practical tools to assess molecular drug targets *in vitro* and *in vivo*.

Electron microscopy was extensively employed in the first identification of primary drug targets in treated parasites, such as organelles and cellular structures (Corrêa et al., 2009; Menna-Barreto and De Castro, 2016). Ultrastructural analysis may allow inferences about the action of the compounds. Many studies also suggest the triggering of cell death processes as part of the drug mechanism (Maia et al., 2007; Corrêa et al., 2009; Menna-Barreto et al., 2009a,b; Menna-Barreto, 2019). Despite all ultrastructural evidence, the occurrence of programmed cell death in protozoan parasites is very controversial due to the absence of precise information about biochemical and molecular events, especially those involved in regulatory processes (Menna-Barreto, 2019). Until the convincing identification of the executioners, these phenotypes should be classified as unregulated processes or incidental necrosis (Proto et al., 2013; Menna-Barreto, 2019).

The treatment of different protozoa with distinct classes of drugs led to a convergent autophagic phenotype. Ultrastructural lesions in organelles, such as mitochondria, reservosomes, or hydrogenosomes, are usually closely associated with the appearance of endoplasmic reticulum profiles and an increase in the number of autophagosomes (Menna-Barreto et al., 2009a,b; Hernández-García et al., 2019). Together with the formation of myelin-like structures, these are the most recurrent autophagy-related phenotypes described (Figure 7). Based on morphological findings, the autophagic role in cell death has been postulated, but a description of the regulatory events involved is lacking (Bera et al., 2003; Baehrecke, 2005; Menna-Barreto et al., 2009a). It is well known that autophagy plays a pivotal role in homeostasis maintenance in eukaryotes, including protozoan parasites. Drugs impair different molecular pathways, causing the loss of the balance in the turnover of crucial cellular structures. Such an imbalance promotes an exacerbation of nonselective autophagy, culminating in nonspecific damage (Baehrecke, 2005). This is a reasonable explanation for the appearance of the autophagic phenotype in treated parasites regardless of the drug and/or mechanism of action involved (Menna-Barreto et al., 2009b; Menna-Barreto, 2019). In summary, autophagy represents survival machinery responsible for the removal of cellular structures damaged by compounds.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RM-B conceived the work and drafted the manuscript. YP-R and RM-B wrote trypanosomatids subjects. RM and IM wrote



the apicomplexan part. VM wrote about anaerobic parasites. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported by CNPq, CAPES, FAPERJ, and FIOCRUZ.

## REFERENCES

- Abdrakhmanov, A., Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B. (2020). To eat or to die: deciphering selective forms of autophagy. *Trends Biochem. Sci.* 45, 347–364. doi: 10.1016/j.tibs.2019.11.006
- Allain, T., and Buret, A. G. (2020). Pathogenesis and post-infectious complications in giardiasis. *Adv. Parasitol.* 107, 173–199. doi: 10.1016/bs.apar.2019.12.001

## ACKNOWLEDGMENTS

We are very thankful to Antonio Pereira-Neves from CPqAM/Fiocruz, Brazil, for kindly providing all ultrastructural images of *Trichomonas* and for his helpful discussions about autophagic process in these parasites as well. We also thank Helene Santos Barbosa from IOC/Fiocruz, Brazil, for kindly providing the ER profiles and myelin-like structures ultrastructural images of *Toxoplasma*.

- Alvarez, V. E., Kosec, G., Sant'Anna, C., Turk, V., Cazzulo, J. J., and Turk, B. (2008). Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: a possible new strategy for fighting parasitic infections? *Autophagy* 4, 361–363. doi: 10.4161/auto.5592
- Annang, E., Pérez-Moreno, G., García-Hernández, R., Cordon-Obras, C., Martín, J., Tormo, J. R., et al. (2015). High-throughput screening platform for natural product-based drug discovery against 3 neglected tropical diseases: human

- African trypanosomiasis, leishmaniasis, and chagas disease. *J. Biomol. Screen.* 20, 82–91. doi: 10.1177/1087057114555846
- Araujo-Silva, C. A., De Souza, W., Martins-Duarte, E. S., and Vommaro, R. C. (2021). HDAC inhibitors Tubastatin A and SAHA affect parasite cell division and are potential anti-*Toxoplasma gondii* chemotherapeutics. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 15, 25–35. doi: 10.1016/j.ijpddr.2020.12.003
- Argüello-García, R., Leitsch, D., Skinner-Adams, T., and Ortega-Pierres, M. G. (2020). Drug resistance in giardia: mechanisms and alternative treatments for giardiasis. *Adv. Parasitol.* 107, 201–282. doi: 10.1016/bs.apar.2019.11.003
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., et al. (2016). Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin. Infect. Dis.* 63, e202–e264. doi: 10.1093/cid/ciw670
- Babokhov, P., Sanyaolu, A. O., Oyibo, W. A., Fagbenro-Beyioku, A. F., and Iriemenam, N. C. (2013). A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathog. Glob. Health* 107, 242–252. doi: 10.1179/204773213Y0000000105
- Baehrecke, E. H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 505–510. doi: 10.1038/nrm1666
- Barquilla, A., Crespo, J. L., and Navarro, M. (2008). Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14579–14584. doi: 10.1073/pnas.0802668105
- Benchimol, M. (1999). Hydrogenosome autophagy: an ultrastructural and cytochemical study. *Biol. Cell.* 91, 165–174. doi: 10.1016/s0248-4900(99)80039-2
- Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R., and Vaidya, T. (2003). Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol. Biochem. Parasitol.* 127, 23–35. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00300-6
- Besteiro, S. (2017). Autophagy in apicomplexan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* 40, 14–20. doi: 10.1016/j.mib.2017.10.008
- Besteiro, S., Brooks, C. F., Striepen, B., and Dubremetz, J. F. (2011). Autophagy protein Atg3 is essential for maintaining mitochondrial integrity and for normal intracellular development of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *PLoS Pathog.* 7:e1002416. doi: 10.1371/journal.ppat.1002416
- Besteiro, S., Williams, R. A. M., Morrison, L. S., Coombs, G. H., and Mottram, J. C. (2006). Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 281, 11384–11396. doi: 10.1074/jbc.M512307200
- Bombaça, A. C. S., Silva, L. A., Chaves, O. A., da Silva, L. S., Barbosa, J. M. C., da Silva, A. M., et al. (2021). Novel N,N-di-alkyl-naphthoimidazolium derivative of  $\beta$ -lapachone impaired *Trypanosoma cruzi* mitochondrial electron transport system. *Biomed. Pharmacother.* 135:111186. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111186
- Bombaça, A. C. S., Von Dossow, D., Barbosa, J. M. C., Paz, C., Burgos, V., and Menna-Barreto, R. F. S. (2018). Trypanocidal activity of natural sesquiterpenoids involves mitochondrial dysfunction, ROS production and autophagic phenotype in trypanosomacruzi. *Molecules* 23:2800. doi: 10.3390/molecules23112800
- Bortoleti, B., Gonçalves, M. D., Tomiotto-Pellissier, F., Contato, V. M., Silva, T. F., de Matos, R., et al. (2021). Solidagenone acts on promastigotes of *L. amazonensis* by inducing apoptosis-like processes on intracellular amastigotes by IL-12p70/ROS/NO pathway activation. *Phytomedicine* 85:153536. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153536
- Braga, M. V., Magaraci, F., Lorente, S. O., Gilbert, I., and de Souza, W. (2005). Effects of inhibitors of  $\Delta 24(25)$ -sterol methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc. Microanal.* 11, 506–515. doi: 10.1017/S143192760505035X
- Brennand, A., Rico, E., Rigidin, D. J., Van Der Smissen, P., Courtoy, P. J., and Michels, P. A. (2015). ATG24 represses autophagy and differentiation and is essential for homeostasis of the flagellar pocket in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* 10:e0130365. doi: 10.1371/journal.pone.0130365
- Briolant, S., Almeras, L., Belghazi, M., Boucomont-Chapeaublanc, E., Wurtz, N., Fontaine, A., et al. (2010). Plasmodium falciparum proteome changes in response to doxycycline treatment. *Malar. J.* 9:141. doi: 10.1186/1475-2875-9-141
- Brisson-Noël, A., Trieu-Cuot, P., and Courvalin, P. (1988). Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* 22(Suppl B), 13–23.
- Brook, I. (1998). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of Spiramycin and their clinical significance. *Clin. Pharmacokinet.* 34, 303–310. doi: 10.2165/00003088-199834040-00003
- Busatti, H. G., Alves, R. J., Santana-Anjos, K. G., Gil, F. F., Cury, M. C., Vannier-Santos, M. A., et al. (2013). Effects of metronidazole analogues on *Giardia lamblia*: experimental infection and cell organization. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75, 160–164. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.001
- Capewell, P., Krumrie, S., Katzer, F., Alexander, C. L., and Weir, W. (2021). Molecular epidemiology of giardia infections in the genomic era. *Trends Parasitol.* 37, 142–153. doi: 10.1016/j.pt.2020.09.013
- Carvalho, C. S., Melo, E. J., Tenório, R. P., and Góes, A. J. (2010). Anti-parasitic action and elimination of intracellular *Toxoplasma gondii* in the presence of novel thiosemicarbazone and its 4-thiazolidinone derivatives. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 139–149. doi: 10.1590/s0100-879x2009005000038
- Centers for Disease Control and Prevention (2019). African Trypanosomiasis. Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/index.html> (Accessed March 18, 2019).
- Centers for Disease Control and Prevention (2021a). Leishmaniasis. Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html> (Accessed March 16, 2021).
- Centers for Disease Control and Prevention (2021b). Toxoplasmosis. Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/index.html> (Accessed August 19, 2021).
- Centers for Disease Control and Prevention (2021c). Malaria. Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/malaria/index.html> (Accessed September 18, 2021).
- Centers for Disease Control and Prevention (2021d). Diseases. Available at: <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html> (Accessed September 20, 2021).
- Cernikova, L., Faso, C., and Hehl, A. B. (2020). Phosphoinositide-binding proteins mark, shape and functionally modulate highly-diverged endocytic compartments in the parasitic protist *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* 16:e1008317. doi: 10.1371/journal.ppat.1008317
- Certad, G., Viscogliosi, E., Chabé, M., and Cacciò, S. M. (2017). Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 33, 561–576. doi: 10.1016/j.pt.2017.02.006
- Chacin-Bonilla, L. (2013). An update on amebiasis. *Rev. Med. Chil.* 141, 609–615. doi: 10.4067/S0034-98872013000500009
- Chatelain, E., and Ioset, J. R. (2011). Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. *Drug Des. Devel. Ther.* 5, 175–181. doi: 10.2147/DDDT.S16381
- Corrêa, G., Vilela, R., Menna-Barreto, R. F., Midlej, V., and Benchimol, M. (2009). Cell death induction in *Giardia lamblia*: effect of beta-lapachone and starvation. *Parasitol. Int.* 58, 424–437. doi: 10.1016/j.parint.2009.08.006
- Cotter, C., Sturrock, H. J., Hsiang, M. S., Liu, J., Phillips, A. A., Hwang, J., et al. (2013). The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet* 382, 900–911. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60310-4
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., and Marsh, K. (2016). Malaria: biology and disease. *Cell* 167, 610–624. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055
- Cudmore, S. L., and Garber, G. E. (2010). Prevention or treatment: the benefits of *Trichomonas vaginalis* vaccine. *J. Infect. Public Health* 3, 47–53. doi: 10.1016/j.jiph.2010.01.003
- Dahl, E. L., Shock, J. L., Shenai, B. R., Gut, J., DeRisi, J. L., and Rosenthal, P. J. (2006). Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3124–3131. doi: 10.1128/AAC.00394-06
- De Menezes, J. P. B., Guedes, C. E. S., Petersen, A. L. O. A., Fraga, D. B. M., and Veras, P. S. T. (2015). Advances in development of new treatment for leishmaniasis. *Biomed. Res. Int.* 2015:815023. doi: 10.1155/2015/815023
- De Paula, J. C., Bakoshic, A. B. K., Lazarin-Bidóia, D., Ud Din, Z., Rodrigues-Filho, E., Ueda-Nakamura, T., et al. (2020). Antiproliferative activity of the dibenzylideneacetone derivative (E)-3-ethyl-4-(4-nitrophenyl) but-3-en-2-one in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 211:105653. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105653
- Delgado, M. J. P., and Gascón, J. (2020). *Chagas Disease: A Neglected Tropical Disease*. Switzerland: Springer.
- Denninger, V., Koopmann, R., Muhammad, K., Barth, T., Bassarak, B., Schönfeld, C., et al. (2008). Kinetoplastida: model organisms for simple autophagic pathways? *Methods Enzymol.* 451, 373–408. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03225-4
- Desoti, V. C., Lazarin-Bidóia, D., Sudatti, D. B., Pereira, R. C., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., et al. (2014). Additional evidence of the trypanocidal

- action of (–)-elatal on amastigote forms through the involvement of reactive oxygen species. *Mar. Drugs* 12, 4973–4983. doi: 10.3390/md12094973
- Dias, J. C. P., Ramos, A. N., Gontijo, E. D., Luquetti, A., Shikanai-Yasuda, M. A., Coura, J. R., et al. (2016). 2 nd Brazilian Consensus on Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49(Suppl 1), 3–60. doi: 10.1590/0037-8682-0505-2016
- Dos Santos, A. O., Veiga-Santos, P., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P., Sudatti, D. B., Bianco, E. M., et al. (2010). Effect of elatal, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Mar. Drugs* 8, 2733–2743. doi: 10.3390/md8112733
- Drugs for Neglected Diseases initiative (2020). Sleeping Sickness. Available at: <https://dndi.org/diseases/sleeping-sickness/> (Accessed March 5, 2020).
- Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Dunay, L. R., Gajurel, K., Dhakal, R., Liesenfeld, O., and Montoya, J. G. (2018). Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, e00057–e00117. doi: 10.1128/CMR.00057-17
- Duszenko, M., Ginger, M. L., Brennam, A., Gualdrón-López, M., Colombo, M. I., Coombs, G. H., et al. (2011). Autophagy in protists. *Autophagy* 7, 127–158. doi: 10.4161/auto.7.2.13310
- Edlind, T. D. (1989). Susceptibility of *Giardia lamblia* to aminoglycoside protein synthesis inhibitors: correlation with rRNA structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 484–488. doi: 10.1128/AAC.33.4.484
- Emami, S., Tavangar, P., and Keighobadi, M. (2017). An overview of azoles targeting sterol 14 $\alpha$ -demethylase for antileishmanial therapy. *Eur. J. Med. Chem.* 135, 241–259. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.04.044
- Escobedo, A. A., Lalle, M., Hrastnik, N. I., Rodríguez-Morales, A. J., Castro-Sánchez, E., Cimerman, S., et al. (2016). Combination therapy in the management of giardiasis: what laboratory and clinical studies tell us, so far. *Acta Trop.* 162, 196–205. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.06.026
- Farthing, M. J. (2006). Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 436–445. doi: 10.1038/ncpgasthep0557
- Fernandes, M. C., Da Silva, E. N., Pinto, A. V., De Castro, S. L., and Menna-Barreto, R. F. (2012). A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 139, 26–36. doi: 10.1017/S0031182011001612
- Fox, R. I. (1993). Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin. Arthritis Rheum.* 23, 82–91. doi: 10.1016/S0049-0172(10)80012-5
- Frézard, F., Demicheli, C., and Ribeiro, R. R. (2009). Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules* 14, 2317–2336. doi: 10.3390/molecules14072317
- Gabay, T., Krugliak, M., Shalmiev, G., and Ginsburg, H. (1994). Inhibition by anti-malarial drugs of haemoglobin denaturation and iron release in acidified red blood cell lysates: a possible mechanism of their anti-malarial effect? *Parasitology* 108, 371–381. doi: 10.1017/S0031182000075910
- Gachelin, G., Garner, P., Ferroni, E., Verhave, J. P., and Opinel, A. (2018). Evidence and strategies for malaria prevention and control: a historical analysis. *Malar. J.* 17:96. doi: 10.1186/s12936-018-2244-2
- Gaspar, L., Moraes, C., Freitas-Junior, L., Ferrari, S., Costantino, L., Costi, M. P., et al. (2015). Current and future chemotherapy for Chagas disease. *Curr. Med. Chem.* 22, 4293–4312. doi: 10.2174/0929867322666151015120804
- Ghosh, D., Walton, J. L., Roepe, P. D., and Sinai, A. P. (2012). Autophagy is a cell death mechanism in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* 14, 589–607. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01745.x
- González-Alcaide, G., Peris, J., and Ramos, J. M. (2017). Areas of research and clinical approaches to the study of liver abscess. *World J. Gastroenterol.* 23, 357–365. doi: 10.3748/wjg.v23.i2.357
- Gopalakrishnan, A. M., and Kumar, N. (2015). Antimalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 317–325. doi: 10.1128/AAC.03663-14
- Grantham, A. C., Braga, M. V., Rodrigues, J. C. F., Cammerer, S., Lorente, S. O., Gilbert, I. H., et al. (2006). Alterations on the growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* induced by squalene synthase inhibitors. *Vet. Parasitol.* 146, 25–34. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.12.022
- Herman, M., Gillies, S., Michels, P. A., and Rigden, D. J. (2006). Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy* 2, 107–118. doi: 10.4161/auto.2.2.2369
- Herman, M., Pérez-Morga, D., Schtickzelle, N., and Michels, P. A. (2008). Turnover of glycosomes during life-cycle differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Autophagy* 4, 294–308. doi: 10.4161/auto.5443
- Hernández-García, M. S., Miranda-Ozuna, J. F. T., Salazar-Villatoro, L., Vázquez-Calzada, C., Ávila-González, L., González-Robles, A., et al. (2019). Biogenesis of autophagosome in *Trichomonas vaginalis* during macroautophagy induced by rapamycin-treatment and iron or glucose starvation conditions. *J. Eukaryot. Microbiol.* 66, 654–669. doi: 10.1111/jeu.12712
- Hirt, R. P. (2013). *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex. Transm. Infect.* 89, 439–443. doi: 10.1136/sextrans-2013-051105
- Hoffman, P. S., Sisson, G., Croxen, M. A., Welch, K., Harman, W. D., Cremades, N., et al. (2007). Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 868–876. doi: 10.1128/AAC.01159-06
- Huang, K. Y., Chen, R. M., Lin, H. C., Cheng, W. H., Lin, H. A., Lin, W. N., et al. (2019). Potential role of autophagy in proteolysis in *Trichomonas vaginalis*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 52, 336–344. doi: 10.1016/j.jmii.2018.11.002
- Kaye, P., and Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 604–615. doi: 10.1038/nrmicro2608
- Kennedy, P. G. E. (2013). Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurol.* 12, 186–194. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70296-X
- Kennedy, P. G. E., and Rodgers, J. (2019). Clinical and neuropathogenic aspects of human African trypanosomiasis. *Front. Immunol.* 10:39. doi: 10.3389/fimmu.2019.00039
- Kiel, J. A. K. W. (2010). Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 365, 819–830. doi: 10.1098/rstb.2009.0237
- Kip, A. E., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., and Dorlo, T. P. C. (2018). Clinical pharmacokinetics of systemically administered antileishmanial drugs. *Clin. Pharmacokinet.* 57, 151–176. doi: 10.1007/s40262-017-0570-0
- Kirkegaard, K., Taylor, M. P., and Jackson, W. T. (2004). Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 301–314. doi: 10.1038/nrmicro865
- Kitamura, K., Kishi-Itakura, C., Tsuboi, T., Sato, S., Kita, K., Ohta, N., et al. (2012). Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 7:e42977. doi: 10.1371/journal.pone.0042977
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., et al. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 17, 1–382. doi: 10.1080/15548627.2020.1797280
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., et al. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* 5, 539–545. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00296-X
- Koh, H. X., Aye, H. M., Tan, K. S. W., and He, C. Y. (2015). The lysosomotropic drug LeuLeu-OME induces lysosome disruption and autophagy-independent cell death in *Trypanosoma brucei*. *Microb. Cell* 2, 288–298. doi: 10.15698/mic2015.08.217
- Kong-Hap, M. A., Mouammine, A., Daher, W., Berry, L., Lebrun, M., Dubremetz, J. F., et al. (2013). Regulation of ATG8 membrane association by ATG4 in the parasitic protist *Toxoplasma gondii*. *Autophagy* 9, 1334–1348. doi: 10.4161/auto.25189
- Koopmann, R., Muhammad, K., Perbandt, M., Betzel, C., and Duszenko, M. (2009). *Trypanosoma brucei* ATG8: structural insights into autophagic-like mechanisms in protozoa. *Autophagy* 5, 1085–1091. doi: 10.4161/auto.5.8.9611
- Lavine, M. D., and Arrizabalaga, G. (2012). Analysis of monensin sensitivity in *Toxoplasma gondii* reveals autophagy as a mechanism for drug induced death. *PLoS One* 7:e42107. doi: 10.1371/journal.pone.0042107
- Lazarin-Bidóia, D., Desoti, V. C., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., and Silva, S. O. (2013). Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. *Free Radic. Biol. Med.* 60, 17–28. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.008
- Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R., and Nakhasi, H. L. (2002). Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ.* 9, 53–64. doi: 10.1038/sj.cdd.4400952

- Leitsch, D., Schlosser, S., Burgess, A., and Duchene, M. (2012). Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2, 166–170. doi: 10.1016/j.ijpddr.2012.04.002
- Leung, A. K. C., Leung, A. A. M., Wong, A. H. C., Sergi, C. M., and Kam, J. K. M. (2019). Giardiasis: an overview. *Recent Patents Inflamm. Allergy Drug Discov.* 13, 134–143. doi: 10.2174/1872213X13666190618124901
- Lévêque, M. F., Berry, L., Cipriano, M. J., Nguyen, H. M., Striepen, B., and Besteiro, S. (2015). Autophagy-related protein ATG8 has a noncanonical function for apicoplast inheritance in *Toxoplasma gondii*. *MBio* 6, e01446–e01415. doi: 10.1128/mBio.01446-15
- Lévêque, M., and Besteiro, S. (2016). “Unusual functions for the autophagy machinery in apicomplexan parasites,” in *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, ed. M. A. Hayat (Massachusetts, EUA: Academic Press), 281–292.
- Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* 115, 2679–2688. doi: 10.1172/JCI26390
- Li, F. J., and He, C. Y. (2014). Acidocalcisome is required for autophagy in *Trypanosoma brucei*. *Autophagy* 10, 1978–1988. doi: 10.4161/auto.36183
- Li, F. J., and He, C. Y. (2017). Autophagy in protozoan parasites: *Trypanosoma brucei* as a model. *Future Microbiol.* 12, 1337–1340. doi: 10.2217/fmb-2017-0158
- Lim, K. T., Amanah, A., Chear, N. J. Y., Zahari, Z., Zainuddin, Z., and Adenan, M. I. (2018). Inhibitory effects of (+)-spectaline and iso-6-spectaline from *Senna spectabilis* on the growth and ultrastructure of human-infective species *Trypanosoma brucei* rhodesiense bloodstream form. *Exp. Parasitol.* 184, 57–66. doi: 10.1016/j.exppara.2017.11.007
- Lindmark, D. G., and Müller, M. (1976). Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10, 476–482. doi: 10.1128/AAC.10.3.476
- LoGiudice, N., Le, L., Abuan, I., Leizorek, Y., and Roberts, S. (2018). Alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of polyamine biosynthesis, as a therapeutic strategy against hyperproliferative and infectious diseases. *Med. Sci.* 6:12. doi: 10.3390/medsci6010012
- Losinno, A. D., Martínez, S. J., Labriola, C. A., Carrillo, C., and Romano, P. S. (2021). Induction of autophagy increases the proteolytic activity of reservosomes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Autophagy* 17, 439–456. doi: 10.1080/15548627.2020.1720428
- Luque-Ortega, J. R., and Rivas, L. (2007). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1327–1332. doi: 10.1128/AAC.01415-06
- Macedo-Silva, S. T., Oliveira Silva, T. L. A., Urbina, J. A., de Souza, W., and Rodrigues, J. C. (2011). Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Mol. Biol. Int.* 2011:876021. doi: 10.4061/2011/876021
- Maia, C., Attias, M., Urbina, J., Gilbert, I., Magaraci, F., and de Souza, W. (2007). Azasterols impair *Giardia lamblia* proliferation and induces encystation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 310–316. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.174
- Martínez-García, M., Bart, J. M., Campos-Salinas, J., et al. (2018). Autophagic-related cell death of *Trypanosoma brucei* induced by bacteriocin AS-48. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 8, 203–212. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.03.002
- Martins-Duarte, E. S., Jones, S. M., Gilbert, I. H., Atella, G. C., de Souza, W., and Vommaro, R. C. (2009). Thiolactomycin analogues as potential anti-*Toxoplasma gondii* agents. *Parasitol. Int.* 58, 411–415. doi: 10.1016/j.parint.2009.08.004
- Mbacham, W. F., Ayong, L., Guewo-Fokeng, M., and Makoge, V. (2019). Current situation of malaria in Africa. Malaria control and elimination. *Methods Mol. Biol.* 2013, 29–44. doi: 10.1007/978-1-4939-9550-9\_2
- Menna-Barreto, R. F. S. (2019). Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death Dis.* 30:93. doi: 10.1038/s41419-019-1370-2
- Menna-Barreto, R. F. S., Corrêa, J. R., Cascabulho, C. M., Fernandes, M. C., Pinto, A. V., Soares, M. J., et al. (2009a). Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 136, 499–510. doi: 10.1017/S0031182009005745
- Menna-Barreto, R. F. S. R., and De Castro, S. (2016). Clear shot at primary aim: susceptibility of *Trypanosoma cruzi* organelles, structures and molecular targets to drug treatment. *Curr. Top. Med. Chem.* 17, 1212–1234. doi: 10.2174/1568026616666161025161858
- Menna-Barreto, R. F. S., Goncalves, R. L. S., Costa, E. M., Silva, R. S., Pinto, A. V., Oliveira, M. F., et al. (2009b). The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 644–653. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.004
- Menna-Barreto, R. F. S., Salomão, K., Dantas, A. P., Santa-Rita, R. M., Soares, M. J., Barbosa, H. S., et al. (2009c). Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* 40, 157–168. doi: 10.1016/j.micron.2008.08.003
- Muller, J., Rout, S., Leitsch, D., Vaithilingam, J., Hehl, A., and Muller, N. (2015). Comparative characterisation of two nitroreductases from *Giardia lamblia* as potential activators of nitro compounds. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 5, 37–43. doi: 10.1016/j.ijpddr.2015.03.001
- Munghthin, M., Bray, P. G., Ridley, R. G., and Ward, S. A. (1998). Central role of hemoglobin degradation in mechanisms of action of 4-amino-quinolines, quinoline methanols, and phenanthrene methanols. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2973–2977. doi: 10.1128/AAC.42.11.2973
- Nguyen, H. M., Berry, L., Sullivan, W. J. Jr., and Besteiro, S. (2017a). Autophagy participates in the unfolded protein response in *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 364:fnx153. doi: 10.1093/femsle/fnx153
- Nguyen, H. M., El Hajj, H., El Hajj, R., Tawil, N., Berry, L., Lebrun, M., et al. (2017b). *Toxoplasma gondii* autophagy-related protein ATG9 is crucial for the survival of parasites in their host. *Cell. Microbiol.* 19:e12712. doi: 10.1111/cmi.12712
- Nishi, L., Sanfelice, R., Bortoleti, B., Tomiotto-Pellissier, F., Silva, T. F., Evangelista, F. F., et al. (2021). *Moringa oleifera* extract promotes apoptosis-like death in *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. *Parasitology* 148, 1447–1457. doi: 10.1017/S0031182021001086
- Painter, H. J., Morrisey, J. M., and Vaidya, A. B. (2010). Mitochondrial electron transport inhibition and viability of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5281–5287. doi: 10.1128/AAC.00937-10
- Pan American Health Organization (2019). Manual of Procedures for Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas. Available at: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838> (Accessed August 15, 2021).
- Pasquier, B. (2016). Autophagy inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 985–1001. doi: 10.1007/s00018-015-2104-y
- Pedra-Rezende, Y., Fernandes, M. C., Mesquita-Rodrigues, C., Stiebler, R., Bombaça, A. C. S., Pinho, N., et al. (2021). Starvation and pH stress conditions induced mitochondrial dysfunction, ROS production and autophagy in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1867:166028. doi: 10.1016/j.bbdis.2020.166028
- Peña, I., Pilar Manzano, M., Cantizani, J., Kessler, A., Alonso-Padilla, J., Bardera, A. I., et al. (2015). New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource. *Sci. Rep.* 5:8771. doi: 10.1038/srep08771
- Picazari, K., Nakada-Tsukui, K., Tsuboi, K., Miyamoto, E., Watanabe, N., Kawakami, E., et al. (2015). Atg8 is involved in endosomal and phagosomal acidification in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 17, 1510–1522. doi: 10.1111/cmi.12453
- Proto, W. R., Coombs, G. H., and Mottram, J. C. (2013). Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 58–66. doi: 10.1038/nrmicro2929
- Rassi, A., Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375, 1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- Rigden, D. J., Herman, M., Gillies, S., and Michels, P. A. (2005). Implications of a genomic search for autophagy-related genes in trypanosomatids. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 972–974. doi: 10.1042/BST0330972
- Roatt, B. M., de Oliveira, C. J. M., De Brito, R. C. F., Coura-Vital, W., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., and Reis, A. B. (2020). Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 8965–8977. doi: 10.1007/s00253-020-10856-w
- Rogawski, E. T., Bartelt, L. A., Platts-Mills, J. A., Seidman, J. C., Samie, A., Havt, A., et al. (2017). Determinants and impact of giardia infection in the first 2 years of life in the MAL-ED birth cohort. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 6, 153–160. doi: 10.1093/jpids/piw082
- Rowley, J., Hoorn, S. V., Korenromp, E., Low, N., Unemo, M., Abu-Raddad, L. J., et al. (2019). Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull. World Health Organ.* 97, 548–562. doi: 10.2471/BLT.18.228486
- Scariot, D. B., Britta, E. A., Moreira, A. L., Falzirolli, H., Silva, C. C., and Ueda-Nakamura, T. (2017). Induction of early autophagic process on *Leishmania amazonensis* by synergistic effect of miltefosine and innovative



- semi-synthetic thiosemicarbazone. *Front. Microbiol.* 8:255. doi: 10.3389/fmicb.2017.00255
- Scariot, D. B., Volpato, H., Fernandes, N. S., Soares, E. F. P., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B. P., et al. (2019). Activity and cell-death pathway in *Leishmania infantum* induced by sugiol: vectorization using yeast cell wall particles obtained from *saccharomyces cerevisiae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9:208. doi: 10.3389/fcimb.2019.00208
- Schoijet, A. C., Sternlieb, T., and Alonso, G. D. (2017). The phosphatidylinositol 3-kinase class III complex containing TcVps15 and TcVps34 participates in autophagy in *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 64, 308–321. doi: 10.1111/jeu.12367
- Schurigt, U., Schaad, C., Glowa, C., Baum, U., Thomale, K., Schnitzer, J. K., et al. (2010). Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in Leishmania major associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5028–5041. doi: 10.1128/AAC.00327-10
- Sears, S. D., and O'Hare, J. (1988). In vitro susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to 50 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 144–146. doi: 10.1128/AAC.32.1.144
- Secor, W. E. (2012). *Trichomonas vaginalis*: treatment questions and challenges. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 10, 107–109. doi: 10.1586/eri.11.159
- Sengupta, S., Chowdhury, S., BoseDasgupta, S., Wright, C. W., and Majumder, H. K. (2011). Cryptolepine-induced cell death of *Leishmania donovani* promastigotes is augmented by inhibition of autophagy. *Mol. Biol. Int.* 2011:187850. doi: 10.4061/2011/187850
- Sheiner, L., Vaidya, A. B., and McFadden, G. I. (2013). The metabolic roles of the endosymbiotic organelles of *Toxoplasma* and *Plasmodium* spp. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 452–458. doi: 10.1016/j.mib.2013.07.003
- Shimokawa, C., Kabir, M., Taniuchi, M., Mondal, D., Kobayashi, S., Ali, I. K., et al. (2012). Entamoeba moshkovskii is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. *J. Infect. Dis.* 206, 744–751. doi: 10.1093/infdis/jis414
- Shintani, T., and Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306, 990–995. doi: 10.1126/science.1099993
- Shirley, D. T., Farr, L., Watanabe, K., and Moonah, S. (2018). A review of the global burden, new diagnostics, and current therapeutics for Amebiasis. *Open Forum Infect. Dis.* 5:ofy161. doi: 10.1093/ofid/ofy161
- Silva, R. C. M. C., Fox, E. G. P., Gomes, F. M., Feijó, D. F., Ramos, I., Koeller, C. M., et al. (2020). Venom alkaloids against Chagas disease parasite: search for effective therapies. *Sci. Rep.* 10:10642. doi: 10.1038/s41598-020-67324-8
- Smith, D., Kannan, G., Coppens, I., Wang, F., Nguyen, H. M., Cerutti, A., et al. (2021). Toxoplasma TgATG9 is critical for autophagy and long-term persistence in tissue cysts. *elife* 10:e59384. doi: 10.7554/eLife.59384
- Souto, X. M., Barbosa, H. S., and Menna-Barreto, R. F. (2016). The morphological analysis of autophagy in primary skeletal muscle cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 115, 2853–2861. doi: 10.1007/s00436-016-5040-3
- Swanson, M. S. (2006). Autophagy: eating for good health. *J. Immunol.* 177, 4945–4951. doi: 10.4049/jimmunol.177.8.4945
- Tomlins, A. M., Ben-Rached, F., Williams, R. A., Proto, W. R., Coppens, I., Ruch, U., et al. (2013). Plasmodium falciparum ATG8 implicated in both autophagy and apicoplast formation. *Autophagy* 9, 1540–1552. doi: 10.4161/auto.25832
- United Nations International Children's Emergency Fund (2018). Current Status and Progress: Diarrhoea Remains a Leading Killer of Young Children, Despite the Availability of a Simple Treatment Solution. Available at: <https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/#> (Accessed September 18, 2021).
- Uzcátegui, N. L., Carmona-Gutiérrez, D., Denninger, V., Schoenfeld, C., Lang, F., Figarella, K., et al. (2007). Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* bloodstream forms: cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3960–3968. doi: 10.1128/AAC.00423-07
- Vaidya, A. B. (2011). "Naphthoquinones: atovaquone, and other antimalarials targeting mitochondrial functions," in *Treatment and Prevention of Malaria*. eds. H. Staines and S. Krishna (Basel: Springer), 127–139.
- Van Gerwen, O. T., and Muzny, C. A. (2019). Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of *Trichomonas vaginalis* infection. *F1000Res.* 8:1666. doi: 10.12688/f1000research.19972.1
- Van Vugt, M., van Beest, A., Sicuri, E., van Tulder, M., and Grobusch, M. P. (2011). Malaria treatment and prophylaxis in endemic and nonendemic countries: evidence on strategies and their cost-effectiveness. *Future Microbiol.* 6, 1485–1500. doi: 10.2217/fmb.11.138
- Vannier-Santos, M. A., Brunoro, G. F., Soeiro, M. N. C., DeCastro, S. L., and Menna-Barreto, R. (2019). "Parasite, compartments and molecules: trick vs. treatment on Chagas disease," in *Biology of Trypanosoma cruzi*. ed. W. de Souza (London: IntechOpen).
- Vannier-Santos, M. A., Urbina, J. A., Martiny, A., Neves, A., and de Souza, W. (1995). Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in Leishmania. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 337–346. doi: 10.1111/j.1550-7408.1995.tb01591.x
- Vanrell, M. C., Losinno, A. D., Cueto, J. A., Balcazar, D., Fraccaroli, L. V., and Carrillo, C. (2017). The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:e0006049. doi: 10.1371/journal.pntd.0006049
- Varberg, J. M., LaFavers, K. A., Arrizabalaga, G., and Sullivan, W. J. J. (2018). Characterization of plasmodium Atg3-Atg8 interaction inhibitors identifies novel alternative mechanisms of action in *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e01489–e01417. doi: 10.1128/AAC.01489-17
- Veiga-Santos, P., Desoti, V. C., Miranda, N., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B. P., and Silva, S. O. (2013). The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 125, 349–356. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.11.014
- Vercesi, A. E., and Docampo, R. (1992). Ca<sup>2+</sup> transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca<sup>2+</sup>, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem. J.* 284, 463–467. doi: 10.1042/bj2840463
- Vickerman, K., and Tetley, L. (1977). Recent ultrastructural studies on trypanosomes. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 57, 441–457
- Viitanen, J., Haataja, H., and Männistö, P. T. (1985). Concentrations of metronidazole and tinidazole in male genital tissues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28, 812–814. doi: 10.1128/AAC.28.6.812
- White, N. J. (1996). The treatment of malaria. *N. Engl. J. Med.* 335, 800–806. doi: 10.1056/nejm199609123351107
- White, N. J., van Vugt, M., and Ezzet, F. (1999). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. *Clin. Pharmacokinet.* 37, 105–125. doi: 10.2165/00003088-199937020-00002
- Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., and Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5022–5027. doi: 10.1073/pnas.0711014105
- Williams, A., Jahreis, L., Sarkar, S., Saiki, S., Menzies, F. M., and Ravikumar, B. (2006). Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr. Top. Dev. Biol.* 76, 89–101. doi: 10.1016/S0070-2153(06)76003-3
- Williams, R. A. M., Smith, T. K., Cull, B., Mottram, J. C., and Coombs, G. H. (2012). ATG5 is essential for ATG8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in *Leishmania major*. *PLoS Pathog.* 8:e1002695. doi: 10.1371/journal.ppat.1002695
- Williams, R. A. M., Woods, K. L., Juliano, L., Mottram, J. C., and Coombs, G. H. (2009). Characterization of unusual families of ATG8-like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Autophagy* 5, 159–172. doi: 10.4161/auto.5.2.7328
- World Health Organization (2015). Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: Third WHO Report on Neglected Diseases 2015. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/152781> (Accessed March 20, 2021).
- World Health Organization (2020a). Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Fact Sheet. Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (Accessed March 12, 2020).
- World Health Organization (2020b). World Malaria Report. Fact Sheet. Available at: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme> (Accessed September 19, 2020).
- World Health Organization (2022). Trypanosomiasis, Human African (Sleeping Sickness). Fact Sheet. Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)) (Accessed Jan 22, 2022).

- Wu, J. H., Tung, S. Y., Ho, C. C., Su, L. H., Gan, S. W., Liao, J. Y., et al. (2021). A myeloid leukemia factor homolog involved in encystation-induced protein metabolism in *Giardia lamblia*. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1865:129859. doi: 10.1016/j.bbagen.2021.129859
- Zhang, J., Si, H., Lv, K., Qiu, Y., Sun, J., Bai, Y., et al. (2021). Licarin-B exhibits activity against the *Toxoplasma gondii* RH strain by damaging mitochondria and activating autophagy. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:684393. doi: 10.3389/fcell.2021.684393
- Zulfiqar, H., Mathew, G., and Horrall, S. (2021). *Amebiasis*. Treasure Island (FL): StatPearls.

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

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Pedra-Rezende, Macedo, Midlej, Mariante and Menna-Barreto. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.