

Avaliação da entrada e desenvolvimento de subpopulação fosfatidilserina
positiva de *Toxoplasma gondii* após tratamento com putrescina

Fernanda Silva de Souza

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, para obtenção
do título de mestre em Biociências e
Biotecnologia. Área de concentração:
Biologia Celular.

Campos dos Goytacazes, RJ

Fevereiro 2014

Avaliação da entrada e desenvolvimento de subpopulação fosfatidilserina positiva de *Toxoplasma gondii* após tratamento com putrescina

Fernanda Silva de Souza

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia. Área de concentração: Biologia Celular.

Examinada em 20 de fevereiro de 2014 por:

Prof. Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes - LTFCM - UEZO

Prof^a Dr^a. Alba Lucínia Peixoto Rangel - LBR - UENF

Prof. Dr. Clóvis de Paula Santos – LBCT – UENF

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta – LBCT – UENF

Orientador

Campos dos Goytacazes, RJ

Fevereiro 2014

Dedico este trabalho a...

Deus, meu sustento, fonte de força e coragem.

Minha família, por acreditar em meus sonhos.

Agradecimentos

A Deus, meu tudo. Obrigada por permitir todas as minhas vivências. Pelo amadurecimento e sabedoria que me foram dados. Por me capacitar e fornecer apoio acima do meu merecimento. Pelo amor e cuidado a mim conferido e por me fazer forte nos momentos mais difíceis. Obrigada porque sei que tens cuidado de minha família no tempo em que estou longe.

Ao meu orientador e amigo professor Renato Augusto DaMatta. Obrigada pela amizade, respeito e preocupação com o meu bem estar. Sou grata pela oportunidade que me destes ao longo desses anos e por todos os trabalhos que realizamos juntos. Você é um exemplo de profissional dedicado e envolvido com as coisas que faz. Obrigada pela paciência que tens comigo e por estar sempre preocupado com minha saúde. A cada dia tenho aprendido mais como profissional e pessoa. Agradeço também pela confiança e por me acolher em mais uma jornada na qual estaremos crescendo e aprendendo.

Ao meu amigo Dr. João Cláudio Damasceno de Sá. Obrigada acima de tudo por sua amizade. Agradeço também por todos os ensinamentos, pela paciência e alegria incontestável que me faz sorrir até em momentos de tristeza. Quem tem a oportunidade de trabalhar com você dificilmente se deixa abater por um experimento contaminado ou até mesmo algum problema de saúde! Obrigada pela ajuda nos experimentos, pela revisão deste trabalho, por acreditar na minha capacidade e me apoiar em todos os momentos. Não posso deixar de agradecer por ter aceitado ser meu aluno de IC, mesmo sendo um doutor já formado. Obrigada amigo!

A minha amiga Luciana Lemos Rangel da Silva. No nosso caso segue o ditado que os opostos se atraem, pois mesmo com personalidades totalmente diferentes conseguimos cultivar uma amizade sincera e divertida. Obrigada pelo carinho e conversas. Sabe o quanto acredito em seu potencial. Você é uma pessoa de personalidade forte e coração imenso.

Aos professores doutores Alba Rangel, Fabio Fortes e Clóvis de Paula Santos, por terem aceitado fazer parte da banca examinadora.

Ao Tiago Alves Teixeira dos Santos, por trazer o separador sempre que precisei e por sua disponibilidade em ajudar.

Ao Gabriel Rabello por me proporcionar momentos de muita alegria com suas manias e simplicidade. Agradeço por estar sempre disposto a ajudar.

A Juliana Azevedo, pela amizade, simpatia e carinho. Obrigada pelas conversas, apelidos carinhosos e abraços acolhedores.

Ao Thiago Torres, pelas conversas descontraídas e convívio agradável no laboratório.

Ao Farlen José Bebber Miranda pela boa vontade e disponibilidade em ajudar sempre.

A Letícia Oliveira, Júlia Resende, Josiana Gomes, Lara Pereira, Gildeide Costa, Bruna Xavier, Raul Ferraz, Cristiane Vergílio, Laís Pessanha, Laura Mota e Juliana Padrão pelo carinho imenso e as boas risadas que os tornaram especiais em minha vida.

Aos técnicos e funcionários Rosemary Cardoso Maciel, Darli Grativol Keller, Adriana Alves Martins, Beatriz Ferreira Ribeiro, Giovana Alves de Moraes, Márcia Adriana da Silva Carvalho Dutra, Luciana Silva Timóteo e Fábio Conceição de Oliveira pelos ensinamentos e carinho ao longo desses anos.

As minhas amigas e irmãs que constituíram a minha família em Campos: Aline e Camila Ventura e Jaíne Polonini. As meninas de uma “República sem nome”! Parece que nossa trajetória juntas de fato chegou ao fim, mas nunca esquecerei o que vivemos. Formamos uma família, com todos os problemas e divergências que uma família pode ter. Mas, descobrimos um mundo juntas e aprendemos a respeitar e conviver com nossos defeitos. Nossa ligação é eterna. Desejo a vocês todas as bênçãos de Deus. Amo vocês!

Ao Marlon Heggdorne, meu grande amigo e irmão! Parece que as grandes amizades surgem em um piscar de olhos. Estou feliz por não deixarmos a distância afetar nossa amizade, às vezes sinto como se você nunca tivesse deixado Campos. Obrigada por tudo. Amo você!

As minhas amigas Marcela Possoly e Susane Borges. Obrigada pelo carinho imensurável e principalmente a amizade. Agradeço também pelos jantares e conversas acolhedoras. Amo vocês!

As minhas amigas do Pará, Dr^a Barbarella Macchi e Karla Oliveira. Obrigada pelo carinho e convivência agradável no tempo em que estivemos juntas. Mantenho minha promessa de ir visitá-las quando puder!

Aos amigos maravilhosos e engraçados que fiz ao longo desses anos. Muitos que agora seguindo seu caminho já foram para longe, mas jamais deixarão meu coração: Patrícia Guedes, Laila Ribeiro, Aline Brandão, Viviane Lovatel, Jorge Luís, Isabela Borges, Maíra Marini, Adélia Mandu, Géssika Silva, Larine Paiva, Gilmara Gonzaga, Mariana Cipriano e Carolina Torres.

Aos meus pais, Gerivalda Silva de Souza e Gilberto Francisco de Souza. Obrigada pela confiança que lhes permitiu deixar uma filha de 16 anos sair de casa e por acreditar que ela estava pronta para fazer suas próprias escolhas. Obrigada por adiarem alguns de seus sonhos para que eu e minha irmã vivêssemos os nossos. Agradeço por respeitarem minhas decisões e nunca duvidarem de que eu seria capaz de chegar onde estou. Gostaria de estar mais presente, mas sei que desejam o melhor para mim e isso requer alguns sacrifícios, como a distância. Amo vocês pelo que representam em minha vida.

A minha irmã, confidente e melhor amiga, Danielle Silva. Obrigada por chorar comigo nos momentos de angústia e alegria. Pelas boas risadas que soltamos quando conversamos por telefone, pelas muitas orações e pelo amor inexplicável. Obrigada também ao meu cunhado, Bruno Santos, pelo carinho e as orações. Agradeço a Deus por tê-los ao meu lado. Amo vocês!

A todos os meus parentes, tios e tias, e amigos, quase irmãos, de Duque de Caxias. Obrigada pelo carinho e pela recepção amável todas as vezes que tenho a oportunidade de visitá-los.

| Sumário | Pág. |
|--|-------------|
| Lista de abreviaturas..... | I |
| Lista de figuras e tabelas..... | II |
| Resumo..... | III |
| Abstract..... | IV |
| 1.0 – Introdução | 1 |
| 1.1 Toxoplasmose | 1 |
| 1.2. Estabelecimento da doença e mecanismo de evasão | 3 |
| 1.3. Macrófagos | 5 |
| 1.4. Fosfatidilserina | 7 |
| 1.5. Mimetismo apoptótico em protozoários | 9 |
| 1.6. Poliaminas | 12 |
| 2.0 – Objetivo geral | 15 |
| 2.1. Objetivos específicos | 15 |
| 3.0 – Materiais e métodos | 16 |
| 3.1. Obtenção das células hospedeiras | 16 |
| 3.2. Separação das subpopulações de taquizoítos PS ⁺ e PS ⁻ de <i>T. gondii</i> | 16 |
| 3.3. Tratamento das subpopulação PS ⁺ com putrescina | 17 |
| 3.4. Coloração das lamínulas com Giemsa | 17 |
| 3.5. Imunomarcacão | 18 |
| 3.6. Dosagem de óxido nítrico. | 18 |
| 3.7. Viabilidade dos taquizoítos com azul de tripan | 19 |
| 3.8. Análise de dados | 19 |
| 4.0 – Resultados | 20 |
| 4.1. Avaliação da entrada e persistência de subpopulações de <i>Toxoplasma gondii</i> em macrófagos ativados | 20 |
| 4.2. Produção de nitrito em macrófagos ativados e infectados com subpopulações de <i>Toxoplasma gondii</i> . | 22 |
| 4.3. Localização de SMAD 2 fosforilada em macrófagos ativados e infectados com subpopulações de taquizoítos. | 22 |
| 4.4. Viabilidade celular dos taquizoítos PS ⁺ após tratamento com putrescina | 25 |
| 5.0 – Discussão | 26 |
| 6.0 – Conclusões | 30 |
| 7.0 – Referências bibliográficas | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | | |
|--------------------------------|-------|---|
| DCs | | Células dendríticas |
| DMEM | | Meio Eagle modificado por Dulbecco |
| IFN-γ | | Interferon gamma |
| IκB | | Inibidor de κ B |
| IKK | | I κ B Kinase |
| IL | | Interleucina |
| iNOS | | Óxido nítrico sintase induzida |
| LPS | | Lipopolissacarídeo |
| M1 | | Macrófago de ativação clássica |
| M2 | | Macrófago de ativação alternativa |
| NF-κB | | Fator nuclear kappa B |
| NK | | Natural killer |
| NO | | Óxido nítrico |
| PBS | | Tampão fosfato salino |
| PS | | Fosfatidilserina |
| PS⁻ | | Parasitas que não expõem fosfatidilserina |
| PS⁺ | | Parasitas que expõem fosfatidilserina |
| PUT | | PS ⁺ tratados com putrescina |
| SFB | | Soro fetal bovino |
| TGF-β | | Fator de crescimento transformante beta 1 |
| TIM | | Imunoglobulina de célula T |
| TNFα | | Fator de necrose tumoral alfa |
| VP | | Vacúolo parasitóforo |

| Lista de figuras e tabelas | Pág. |
|--|-------------|
| Figura 1: Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> . | 2 |
| Figura 2: Esquema de bicamada lipídica. | 7 |
| Figura 3: Esquema de translocadores de PS na membrana plasmática. | 8 |
| Figura 4: Esquema de macrófagos infectados com subpopulações de <i>T. gondii</i> . | 12 |
| Figura 5: Estrutura química da poliamina putrescina. | 13 |
| Figura 6: Número médio de taquizoítos aderidos e interiorizados em macrófagos ativados infectados por 1 h. | 20 |
| Figura 7: Imagens representativas de campo claro de macrófagos infectados com <i>T. gondii</i> e número médio de vacúolos. | 21 |
| Figura 8: Imagem representativa da imunomarcagem de SMAD 2P (verde) em macrófagos (núcleo azul) infectados com <i>T. gondii</i> (vermelho). | 23 |
| Figura 9: Ativação de SMAD 2P em macrófagos murinos ativados infectados com subpopulações PS ⁺ , PUT e PS ⁻ de <i>Toxoplasma gondii</i> após 1 (A) e 24 h de interação (B). | 24 |
| Figura 10: Imagem representativa da imunomarcagem de macrófagos murinos (núcleo azul) infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> (vermelho) em 24 h de interação. | 25 |
| Figura 11: Viabilidade celular da população total de taquizoítos de <i>T. gondii</i> após incubação de 1 h com putrescina. Resultado obtido da média das porcentagens de 3 experimentos. | 25 |
| Tabela 1: Persistência da infecção em macrófagos murinos ativados e infectados com subpopulações PS ⁺ , PUT e PS ⁻ de <i>Toxoplasma gondii</i> por 24 h. | 21 |
| Tabela 2: Produção de nitrito de macrófagos murinos peritoneais ativados e infectados com subpopulações PS ⁺ , PUT e PS ⁻ de <i>Toxoplasma gondii</i> no tempo de 24 h. | 22 |

Resumo

A toxoplasmose é uma doença de grande relevância para a saúde humana e veterinária, é causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. O estabelecimento da doença pelo parasito se deve aos “mecanismos de evasão” que envolvem a invasão de células e comprometimento da resposta imune hospedeira. Uma parcela da população de taquizoítos de *T. gondii* expõem fosfatidilserina (PS) na face externa da membrana mimetizando uma célula apoptótica. A PS é um fosfolípido de carga negativa encontrada na membrana plasmática. Em condições não apoptóticas a PS está localizada na face citosólica da bicamada lipídica. A exposição de PS por células em apoptose quando em contato com macrófagos induz a liberação do fator de crescimento transformante beta1 levando a fosforilação e migração nuclear do fator de transcrição SMAD 2P. Isto resulta em redução da produção de óxido nítrico (NO), um importante agente microbicida da resposta imune. A poliamina putrescina é uma molécula relatada principalmente por sua importância no crescimento celular. No entanto, também é descrita por sua característica catiônica que induz afinidade a moléculas carregadas negativamente, podendo estabelecer forte ligação com fosfolípidos de membrana. Com o objetivo de verificar o efeito da putrescina no mecanismo de entrada de *T. gondii* e possível bloqueio da PS, as subpopulações de *T. gondii*, que expõem (PS⁺) ou não (PS⁻), foram isoladas. O pré-tratamento com putrescina foi realizado em parte da subpopulação PS⁺ (PUT). Em 1 h de infecção a subpopulação PS⁺ apresentou taxa superior de parasitos interiorizados em comparação a subpopulação PUT. Foi visto também que taquizoítos PS⁺, após a entrada localizavam-se majoritariamente em vacúolos fechados característicos de penetração ativa. As subpopulações PS⁻ e PUT apresentaram altas taxas de vacúolos abertos, indicando fagocitose. A infecção com subpopulação PS⁻ não foi capaz de inibir a produção de NO em macrófagos murinos ativados. Em contraste, a subpopulação PS⁺ foi capaz de inibir NO em macrófagos ativados com valor superior de macrófagos infectados com indução SMAD 2P nuclear após 1 e 24 h de infecção. O tratamento com putrescina resultou em redução da capacidade de inibição de NO pela subpopulação PUT. Teste de viabilidade da subpopulação PUT indicou que a putrescina não induziu morte nos parasitos. O comportamento similar das subpopulações PS⁻ e PUT sugere que putrescina estaria influenciando no reconhecimento da PS por macrófagos. No entanto, outros estudos são requeridos para confirmar esta hipótese.

Palavras chaves: *Toxoplasma gondii*, fosfatidilserina, putrescina

Abstract

Toxoplasmosis is a disease with high relevance to veterinary and human health. This disease is caused by the obligated intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. The establishment of the disease by the parasite is due to "evasion mechanisms" that involve cell invasion and suppression of the host immune responses. Part of the population of tachyzoites exposes phosphatidylserine (PS) on the outer membrane mimicking apoptotic cells. The PS is a phospholipid with negative charge localized in the plasmatic membrane. In absence of apoptosis, PS is found in the inner lipidic bilayer. The exposure of PS by apoptotic cell induces the secretion of transforming growth factor beta1, indicating the phosphorylation and nuclear translocation of the transcription factor SMAD 2P. This results in the inhibition of nitric oxide (NO) production. The NO is an important intracellular microbicidal agent of the immune response. The polyamine putrescine is a molecule related mainly by its importance in cellular growth. However it is describe also by its cationic charge capable of establish strong ligation with membrane phospholipid. The aims of this work were to verify the effect of putrescine treatment in the entrance of *T. gondii* in murine macrophages and possible blockage of PS. The subpopulations of *T. gondii* that exposes (PS+) or not (PS-) PS were isolated. The treatment was performed with part to the PS⁺ subpopulation (PUT). After 1 h, the subpopulation PS⁺ showed higher interiorized parasites rate than the subpopulation PUT. It was observed that PS⁺ tachyzoites were located in tight-fitting vacuole, indicating active cell invasion. The subpopulation PS⁺ and PUT showed high rate of phagocytic loose-fitting vacuole. The PS⁻ subpopulation infection failed to inhibit NO production in activated murine macrophage. In contrast, the PS⁺ subpopulation inhibited NO production in activated macrophage with high rate of infected macrophage and induction of nuclear SMAD 2P, after 1 and 24 h of infection. The treatment with putrescine reduced the inhibition of NO production by the PUT subpopulation. The viability of parasite was not affect by putrescine. The similar behavior of the subpopulation PS⁻ and PUT suggest that putrescine may interfere in the recognition of PS by macrophage. However, more analysis are required to confirm this hypothesis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, phosphatidylserine, putrescine.

1. Introdução

1.1. Toxoplasmose

A toxoplasmose é a doença causada pelo protozoário do Filo Apicomplexa, *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908) e atinge praticamente todos os vertebrados endotérmicos (Dubey e Beattie, 1988). A fase sexuada do ciclo de vida desse parasito ocorre no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos, membros da família *Felidae* (Dubey *et al.*, 2009). *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório que pode assumir três formas infectantes em seu ciclo de vida. A forma taquizoíta tem alta capacidade de multiplicação dentro das células hospedeiras (Dubey *et al.*, 1998). Ao ser confrontado com as defesas do organismo os taquizoítos podem se diferenciar em bradizoítos que se multiplicam lentamente dentro de cistos teciduais (Soète *et al.*, 1994; Skariah *et al.*, 2010). A forma esporozoíta está presente em oocistos liberados na fezes do hospedeiros definitivos (Dubey *et al.*, 1998). Os oocistos maturam e sobrevivem por longo tempo em condições ambientais, podendo contaminar alimentos, água e assim infectar os hospedeiros (Hill e Dubey, 2002) (Figura 1).

A infecção humana pode ocorrer por ingestão de oocistos em água, solos ou alimentos contaminados, transmissão congênita aos fetos, transfusão e transplante de órgão (Hill e Dubey, 2002; Dubey e Jones, 2008). Uma das principais formas de contaminação é através da água, o que acaba elevando o risco de infecção em indivíduos com baixo status socioeconômico. No Brasil, estudo realizado no norte do estado do Rio de Janeiro indica prevalência de 84% de infecção em grupo de indivíduos com baixa condição socioeconômica em relação aos de alta que fica em torno de 23% (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

Toxoplasma gondii estabelece a doença se multiplicando e rompendo células hospedeiras, processo conhecido como ciclo lítico ou assexuado. Esse fenômeno depende do processo de entrada por penetração ativa de *T. gondii* (Morisak *et al.*, 1995; Sibley, 2003). No ciclo lítico os taquizoítos invadem a célula hospedeira, se multiplicam, rompem a membrana da célula e através de novas invasões infectam outras células (Figura 1). Esse processo causa destruição tecidual e marca a fase aguda da infecção. A fase crônica é estabelecida pela formação de cistos teciduais nos hospedeiros (Black e Boothroyd, 2000).

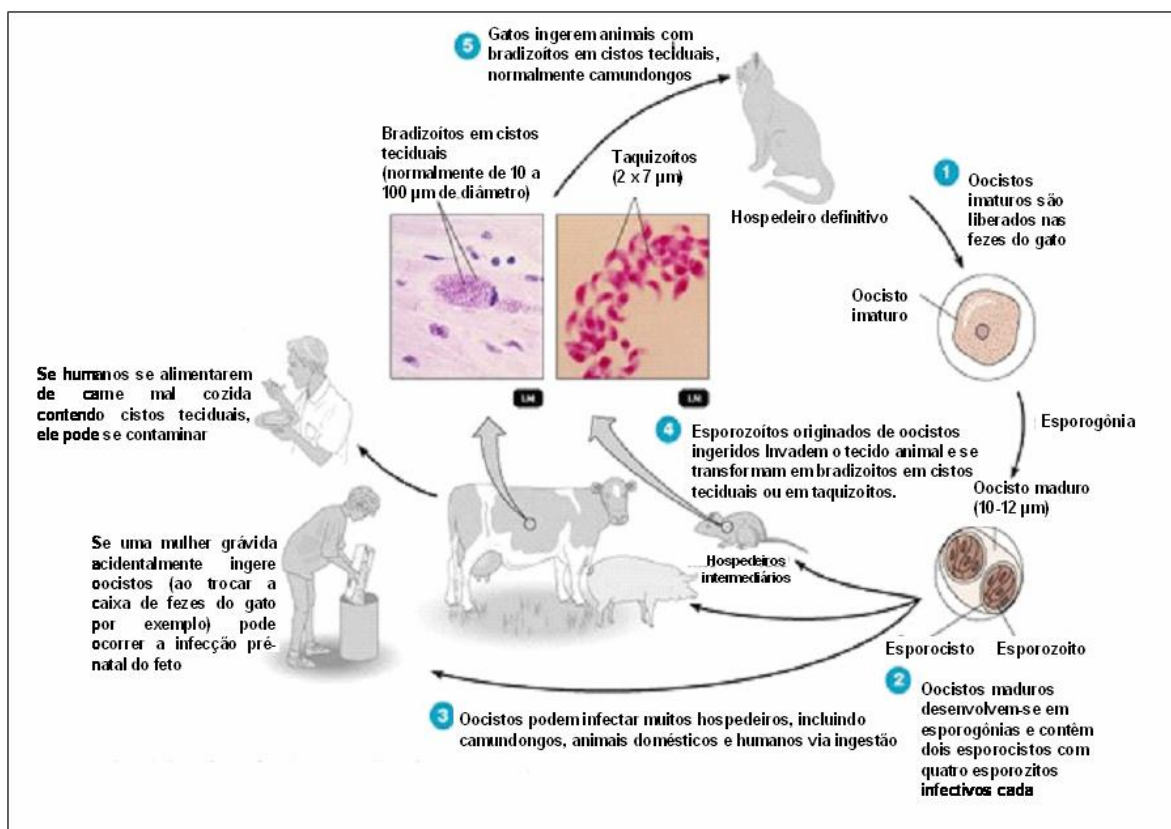


Figura 1: Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. (1) Liberação de oocistos imaturos no ambiente pelo hospedeiro definitivo (felinos). (2) Maturação de oocistos no ambiente e desenvolvimento de esporozoítos infectivos. (3) Infecção de hospedeiros intermediários pela ingestão de alimentos contaminados. (4) Transformação de esporozoítos em bradizoítos ou taquizoítos no tecido hospedeiro. (5) Ao alimentar-se de animais contaminados com cistos teciduais, ou oocistos contaminantes do ambiente, ocorre no hospedeiro definitivo a reprodução sexuada do parasito com liberação de oocistos no ambiente reiniciando o ciclo. Baseado e adaptado de Pearson Education, Inc. (2004).

A toxoplasmose possui importância em termos de saúde pública por ser capaz de causar alterações neonatais resultantes de toxoplasmose congênita (Frenkel, 1973), como hidroencefalia, retinocoroidite e retardo mental (Mittal e Ichhpujani, 2011). A toxoplasmose congênita geralmente ocorre por infecção primária durante a gravidez. No entanto, há casos de reativação da infecção em mulheres imunodeficientes ocasionando infecção congênita (Nóbrega e Karnikowski, 2005; Dubey e Jones, 2008). Estudo realizado em Belo Horizonte, MG, associa toxoplasmose congênita a casos de retardo mental em estudantes especiais da rede pública de ensino, no qual o diagnóstico positivo para toxoplasmose foi identificado em 55% dos casos analisados (Caiaffa *et al.*, 1993).

Em pacientes imunocomprometidos a reativação dos bradizoítos latentes no cérebro e conversão em taquizoíto pode ocasionar encefalite toxoplásmica (Luft *et al.*, 1984; Dubey e Jones 2008). Nesses pacientes o desenvolvimento da doença geralmente ocorre por reativação da infecção por *T. gondii* persistentes devido à deficiência da resposta imune mediado por células T (Lang *et al.*, 2007). Em indivíduos com Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), toxoplasmose é a principal causa de infecção no sistema nervoso central (Mittal e Ichhpujani, 2011).

Em imunocompetentes a toxoplasmose geralmente é assintomática (Mittal e Ichhpujani, 2011). O controle da infecção se dá principalmente em nível celular. Com participação de linfócitos T, macrófagos, células dendríticas e células natural killers (NK), bem como citocinas próinflamatórias capazes de ativar estas células, interleucina (IL)-12 e interferon-gamma (IFN- γ) (Lang *et al.*, 2007).

Diversos estudos vêm sendo realizados com intuito de avançar no entendimento sobre os mecanismos de evasão que permitem a entrada e manutenção da infecção por *T. gondii* em células hospedeiras. O combate e tratamento da toxoplasmose dependem da melhor compreensão sobre a biologia do parasito e dos mecanismos utilizados para o estabelecimento da doença. Dessa forma, torna-se possível o estudo de terapias e formas para deter a progressão do parasito no sistema hospedeiro.

1.2. Mecanismos de evasão

Toxoplasma gondii é um parasito mundialmente distribuído e capaz de invadir e persistir em seus hospedeiros com eficiência. O sucesso deste parasito, assim como outros protozoários, está em sua capacidade de lidar com o sistema hospedeiro burlando as defesas imunes e celulares (Sacks e Sher, 2002; Lang *et al.*, 2007). O estabelecimento da doença depende de mecanismos de invasão e evasão eficientes que permitam a entrada no organismo hospedeiro e supressão do sistema de defesa (Sacks e Sher, 2002). Os mecanismos de evasão do parasito frente ao sistema imune hospedeiro são diversos. Através destes mecanismos *T. gondii* é capaz de agir indiretamente, por exemplo, modulando a secreção de citocinas pró e anti-inflamatória do

hospedeiro ou diretamente, formando um vacúolo parasitóforo (VP) que não se funde com o sistema endolisossomal (Lang *et al.*, 2007).

O processo de invasão é iniciado com a ligação da região apical do parasito na membrana plasmática da célula hospedeira. Durante o processo de entrada ativa a membrana plasmática da célula hospedeira invagina-se e ocorre penetração do parasito (Sibley, 1995; Toulah *et al.*, 2011). Para adesão e invasão *T. gondii* libera proteínas presentes em organelas secretoras apicais, conhecidas como micronemas e rôptrias. A secreção dos grânulos densos ocorre nas regiões lateral e posterior do parasito, após a entrada na célula hospedeira. Essas proteínas secretadas são importantes para invasão e sobrevivência do parasito no VP (Carruthers, 2002; de Souza *et al.*, 2010). Após a invasão da célula hospedeira, evento que dura cerca de 30 segundos (Sibley e Andrews, 2000), o parasito se localiza no VP que, apesar de ser formado pela membrana do hospedeiro, tem sua composição alterada com exclusão de proteínas da membrana original e adição de proteínas e moléculas secretadas pelo parasito. Este remodelamento é essencial para inibição da fusão lisossomal com VP (Sibley *et al.*, 1985; Sacks e Sher, 2002; Lang *et al.*, 2007).

Em indivíduos imunocompetentes a primeira linha de defesa contra *T. gondii* envolve células imunes e produção de citocinas (Lang *et al.*, 2007). A infecção por *T. gondii* aumenta o nível de citocinas inflamatórias como: IL-12, IFN- γ , Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). No entanto, o parasito induz também a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e Fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1) em macrófagos (Lang *et al.*, 2007). A liberação de IL-10 tem efeito imunossupressor capaz de interferir negativamente na produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α em células da resposta imune antiparasitária (Lang *et al.*, 2007). O TGF- β 1 é uma molécula multifuncional que no sistema imunológico atua, dentre outras maneiras, desativando macrófagos (Tsunawaki *et al.*, 1988). A indução de TGF- β 1 em macrófagos por *T. gondii* desativa estas células de defesa imune e inibe a produção de IFN- γ por células NK (Lang *et al.*, 2007).

Em células dendríticas (DCs) a inibição de IL-12 não depende da produção de IL-10 induzida por *T. gondii*. O parasito induz produção do eicosanoide lipoxina A₄ capaz de suprimir a expressão do receptor de citocinas

CCR5 envolvido na produção de IL-12 por DCs (Sacks e Sher, 2002; Lang *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que *T. gondii* atua diretamente na sinalização de efeito pro-inflamatório via Fator nuclear kappa B (NF- κ B). O NF- κ B pertence a uma família de fatores de transcrição importantes para expressão de IL-12, IFN- γ , TNF- α e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Sacks e Sher, 2002). Apesar do I κ B kinase (IKK) fosforilar o inibidor de κ B (I κ B), ocorre falha na translocação de NF- κ B para o núcleo. Assim, mesmo com estímulo externo há deficiência na ação anti-parasitária de macrófagos infectados (Sacks e Sher, 2002; Lang *et al.*, 2007).

Para evadir as defesas do hospedeiro *T. gondii* também reduz a produção de NO, que é um importante agente microbicida em macrófagos produzido por atividade da enzima iNOS (Habib e Ali, 2011). A infecção pelo parasito também reduz a produção de NO em macrófagos de camundongos infectados (Seabra *et al.*, 2002; 2004b; Guillermo e DaMatta, 2004; Dos Santos *et al.*, 2011).

Outra estratégia importante adotada pelo *T. gondii* ocorre durante a invasão da célula hospedeira. O parasito mimetiza uma célula apoptótica expondo fosfatidilserina (PS) na monocamada externa de sua membrana plasmática (Seabra *et al.*, 2004b). A PS é um fosfolípido de carga negativa localizado na monocamada interna da membrana da maioria das células não apoptóticas (Vance e Steenberg, 2005) ou na membrana externa das células apoptóticas, gerando resposta anti-inflamatória (Fadok *et al.*, 1998b). A exposição de PS na superfície externa da membrana de *T. gondii* acarreta a liberação de TGF- β 1 levando a redução do nível de NO (Seabra *et al.*, 2004b).

1.3. Macrófagos

Os macrófagos são células mononucleares fagocíticas e componentes do sistema imunológico (van Furth, 1975). A diferenciação de macrófagos ocorre a partir de monócitos circulantes no sangue, derivados de células hematopoiéticas da medula óssea (van Furth, 1975; van Furth e Cohn, 1968). Os macrófagos são células participantes de processo de remoção e destruição de microorganismos ou corpos estranhos e reparo tecidual (van Furth e Cohn, 1968).

Macrófagos podem ser diferenciados pelo modo de ativação ou polarização. Inicialmente o termo de ativação referente à macrófagos se dirigia a sua capacidade de fagocitar e destruir patógenos, bem como produzir citocinas inflamatória (macrófagos de ativação clássica M1). No entanto, estudos revelam a existência de macrófagos que falham nessas funções, mas são eficientes em produzir componentes envolvidos na formação de matriz extracelular e reparo tecidual (macrófagos de ativação alternativa M2) (Mosser, 2003).

Macrófagos podem se tornar M1 por estímulo de IFN- γ , TNF- α e lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Quando assim ativados, os macrófagos são amplamente capacitados para fagocitar e destruir microorganismos intracelulares (Mosser, 2003; Fujiwara e Kobayashi, 2005). Essa destruição ocorre pela produção de espécies de oxigênio reativo e aumento da indução de iNOS com geração de NO (Mosser, 2003).

A atuação inflamatória dos macrófagos deve ser regulada para evitar danos teciduais, sendo a autosecreção de TGF- β importante para balancear este processo (Mosser, 2003). Recentemente tem-se estudado a habilidade de alguns parasitos, como *Leishmania* spp. e *T. gondii*, de interferir na ativação de macrófagos como um mecanismo de autopreservação e preservação do hospedeiro. Uma vez que protege contra danos teciduais oriundos de um processo inflamatório contínuo (Sacks e Sher, 2002; Lang *et al.*, 2007).

Macrófagos M2 metabolizam arginina em produtos da via de geração de poliaminas (Mosser, 2003). As poliaminas são moléculas catiônicas importantes ao crescimento celular (Jänne *et al.*, 1991). Macrófagos M1 concentram o uso de arginina na produção de NO pela iNOS, que atua como mecanismo microbicida contra patógenos (Vincendeau *et al.*, 2003). A indução da iNOS gera NO por longo tempo (Stuehr *et al.*, 1991) e conseqüentemente limita a replicação de parasitos intracelulares, como *T. gondii* (Lüder *et al.*, 2003; Habib e Ali, 2011).

Para que *T. gondii* se desenvolva em macrófagos ativados é necessário redução nos níveis de NO intracelular (Lüder *et al.*, 2003; Seabra *et al.*, 2002). Esta inibição é realizada de forma eficiente pelo parasito através da exposição de PS e indução de TGF- β 1 em macrófagos (Seabra *et al.*, 2004b).

1.4. Fosfatidilserina

A PS é um fosfolípido de carga negativa distribuída assimetricamente na membrana plasmática das células (Vance e Steenberg, 2005). Nas células a PS representa entre 3 e 20% dos fosfolípidios de membrana (Vance e Steenberg, 2005). Em condições não apoptóticas a PS é encontrada na monocamada interna da bicamada lipídica (Figura 2) (Zachowski, 1993; Fadok *et al.*, 1998b; van Meer *et al.*, 2008).

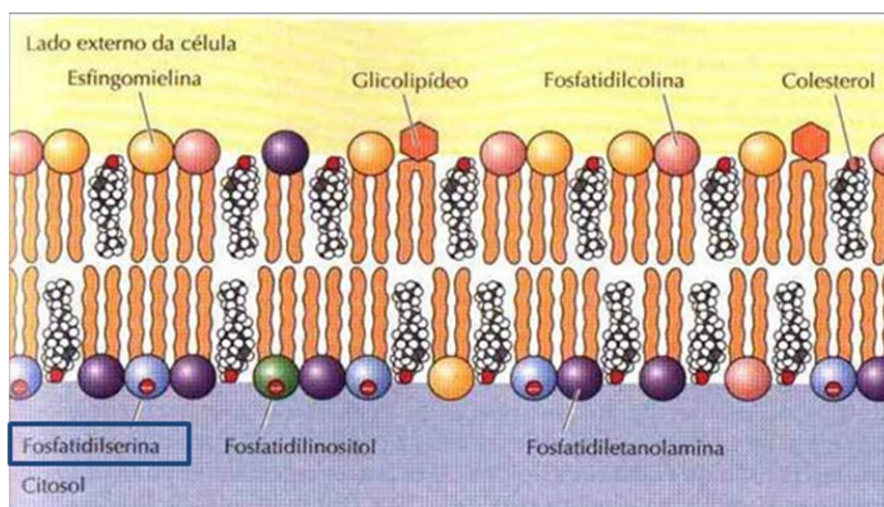


Figura 2: Esquema de bicamada lipídica. Modificado de <http://biologados2010.blogspot.com.br/>

A movimentação deste fosfolípido entre as monocamadas da membrana é conhecida como translocação. Essa translocação é realizada por translocadores lipídicos específicos (Figura 3) (Daleke, 2007). Essa movimentação pode ser uni ou bidirecional. Os transportadores de aminofosfolípidios, as flipases, translocam PS para a monocamada citosólica da membrana em dependência de ATP (van Meer, 2011). Em células de mamíferos, as flipases são importantes para prevenir o aparecimento de PS na superfície da célula (van Meer, 2011). Em contraste, as flopsases realizam o movimento oposto (Daleke, 2007). A translocação bidirecional é realizada por scramblases que translocam PS nas duas direções da bicamada em dependência de níveis de Ca^{+2} citoplasmático (van Meer, 2011).

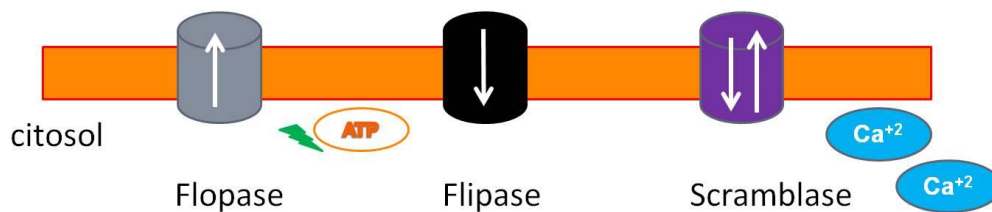


Figura 3: Esquema de translocadores de PS na membrana plasmática.

O processo de morte celular programada, conhecido como apoptose, envolve diversas mudanças celulares, dentre elas a fragmentação do DNA, ativação de caspase 3, vesiculação membranar e externalização de PS (Bratton *et al.*, 1999). Fadok *et al.* (2000) demonstraram que a não exposição de PS por células apoptóticas impede a fagocitose por macrófagos e fibroblastos. Mesmo que outras modificações características de apoptose estejam presentes, como fragmentação do DNA e ativação de caspases.

A exposição de PS sinaliza fagocitose e a inibição da resposta inflamatória de macrófagos pela produção de altos níveis de TGF- β 1, supressão da produção de citocinas inflamatórias como IL-1 α , IL-8, IL-12, TNF- α e aumento da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (Voll *et al.*, 1997; Fadok *et al.*, 1998a; Huynh *et al.*, 2002). Fadok *et al.* (2001) ressaltam a importância da PS no processo anti-inflamatório. Neutrófilos lisados liberam seu conteúdo de proteases no ambiente estimulando produção de citocinas pró-inflamatória quando em contato com macrófagos. A resposta inflamatória é revertida em anti-inflamatória após o uso de inibidores de proteases. Análise de frações membranares dos neutrófilos lisados indicam exposição de PS capaz de induzir esta resposta anti-inflamatória nos macrófagos.

A PS exposta em células apoptóticas pode ser reconhecida por receptores de PS expressos na superfície de macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. A transfecção do gene que codifica esse receptor para células B e T conferiu-lhes a capacidade de reconhecer e fagocitar células expondo PS (Fadok *et al.*, 2000). As Imunoglobulinas de células T (TIM) 1, 3 e 4 também possuem capacidade de reconhecimento específico da PS. As TIM 4 são expressas exclusivamente em células apresentadoras de antígenos e são importantes na captação de células apoptóticas (Freeman *et al.*, 2010). O reconhecimento via receptores de PS são importantes para a liberação de fatores anti-inflamatórios (Fadok *et al.*, 1998a; Huynh *et al.*, 2002).

Estudos relatam também a existência de moléculas capazes de reconhecer e ligar em PS. Dentre os ligantes de PS, a mais conhecida é anexina V que é uma proteína de cadeia simples, α -hélice, pertencente a uma família de proteínas ligantes de lipídios. Esta proteína é capaz de reconhecer PS de forma específica, reversível e dependente de Ca^{+2} (Fadok *et al.*, 1998b; Rescher e Gerke, 2004; Zhang *et al.*, 2011).

As poliaminas como putrescina, espermidina e espermina são moléculas catiônicas importantes ao crescimento celular (Jänne *et al.*, 1991). O pré-tratamento de *T. gondii* com putrescina resultou em menor infecção em macrófagos e células Vero (Seabra *et al.*, 2004a). Além de não inibir a produção de NO e a fusão lisossomal (Seabra *et al.*, 2004a). Resultados obtidos por Seabra *et al.* (2004a) indicam que, por sua característica catiônica, a putrescina pode ter afinidade pela PS exposta pelo parasito dificultando seu reconhecimento por receptores na superfície do macrófago.

1.5. Mimetismo apoptótico em protozoários

Protozoários como *Leishmania amazonensis* (Wanderley *et al.*, 2006), tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (DaMatta *et al.*, 2007) e *T. gondii* (Seabra *et al.*, 2004b) apresentam um mecanismo de evasão conhecido como mimetismo apoptótico. O mimetismo apoptótico é caracterizado pela exposição de PS na monocamada externa do parasito sendo importante para desativar macrófagos. Isso sugere que o parasito “imita” a resposta anti-inflamatória induzida por células apoptóticas (de Freitas Balanco *et al.*, 2001; Barcinski *et al.*, 2003; Wanderley e Barcinski, 2010).

A exposição de PS na superfície de células é um dos sinais de apoptose que sinaliza fagocitose celular sem induzir resposta inflamatória (Fadok *et al.*, 1998b; Schlegel e Williamson, 2001). Quando a PS exposta por uma célula entra em contato com macrófagos classicamente ativados ocorre a liberação de TGF- β 1 que, de forma autócrina, induz a ativação do fator de transcrição SMAD 2 inibindo a produção de NO (Fadok *et al.*, 1998a) pela degradação da iNOS (Seabra *et al.*, 2004b), resultando em ativação alternativa de macrófagos (Tsunawaki *et al.*, 1988). SMAD 2 é membro de uma família de proteínas citoplasmáticas e está envolvido com a sinalização celular via receptor TGF- β . A ativação do receptor serina-treonina quinase que reconhece TGF- β leva a

fosforilação de SMAD 2 (SMAD 2P) permitindo sua associação com SMAD 4. O complexo SMAD 2P/SMAD 4 migra para o núcleo inibindo a expressão de iNOS (Nakao *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 2007). Portanto, a translocação de SMAD 2P é indicativo da sinalização via TGF- β 1.

Sabe-se que *Leishmania* (Barral-Netto *et al.*, 1992), *T. cruzi* (Ming *et al.*, 1995) e *T. gondii* (Seabra *et al.*, 2004b) induzem a produção do TGF- β 1 em tecidos ou macrófagos infectados. Todos estes protozoários tem alguma forma em seu ciclo que expõem PS na superfície externa da membrana levando a liberação de TGF- β 1 (Seabra *et al.*, 2004b; Wanderley *et al.*, 2006; DaMatta *et al.*, 2007).

Estudos sobre a exposição deste fosfolípido em *Leishmania* spp. revelam que a PS não necessariamente sinaliza morte. Neste caso a PS é importante para o mimetismo apoptótico (Wanderley *et al.*, 2006). A forma amastigota é capaz de expor PS na superfície induzindo secreção de TGF- β 1 e IL-10 em macrófagos infectados. A secreção dessas citocinas anti-inflamatórias acarreta inibição de NO e estabelecimento do parasito na célula hospedeira (Wanderley *et al.*, 2006; de Freitas Balanco *et al.*, 2001).

A exposição de PS em amastigota de *L. amazonensis* é modulada pelo hospedeiro (Wanderley *et al.*, 2006). Nesse estudo foi demonstrado que amastigotas derivados de camundongos suscetíveis a *L. amazonensis* como a linhagem BALB/c expõem mais PS e tem mais poder infectivo do que os derivados de camundongos resistentes C57BL/6. Portanto, amastigotas extraídas de lesões de camundongos BALB/c induzem maior produção de TGF- β 1 e IL-10, e inibem de forma mais eficiente a produção de NO (Wanderley *et al.*, 2006).

Diferente do que foi verificado para a forma amastigota, na qual a exposição de PS não indica morte celular por apoptose, a forma promastigota de *L. amazonensis* tem duas subpopulações que expõem PS de forma distinta. Promastigotas que expõem PS (PS⁺) estão em processo de apoptose normal que ocorre durante a fase final da metaciclôgenese (Wanderley *et al.*, 2009). Essa subpopulação é importante, pois desativa os macrófagos para que os promastigotas que não expõem PS (PS⁻), em fase intermediária da metaciclôgenese, possam dar continuidade a infecção (Wanderley *et al.*, 2009). Apenas a forma PS⁺ é capaz de inibir a produção de NO em macrófagos e

apesar da forma PS⁻ isolada ser capaz de infectar macrófagos, a multiplicação intracelular é mais eficiente quando a infecção inicial é realizada por ambas as subpopulações (Wanderley *et al.*, 2009).

Em *T. cruzi* apenas a forma infectiva tripomastigota, circulante no sangue ou obtido *in vitro* por metaciclogênese, expõe PS. Foi demonstrado que a infecção de tripomastigota sanguíneo em macrófagos ativado classicamente resulta na degradação da iNOS com a fosforilação e translocação nuclear de SMAD 2 sugerindo que a PS exposta por essa forma parasitária induz sinal via TGF- β 1 (DaMatta *et al.*, 2007). Este dado sugere que a exposição de PS em *T. cruzi* pode ser utilizada para evadir a resposta imune e estabelecer a infecção.

Os taquizoítos de *T. gondii* também são capazes de induzir TGF- β 1 em macrófagos infectados. A liberação de TGF- β 1 leva a degradação da iNOS e despolimerização dos filamentos de actina em macrófagos infectados, reduzindo a capacidade fagocítica (Seabra *et al.*, 2004b). Assim como em promastigotas de *L. amazonensis*, existem duas subpopulações de taquizoítos de *T. gondii* (Dos Santos *et al.*, 2011). No entanto, como em amastigotas de *L. amazonensis*, os taquizoítos PS⁺ não necessariamente estão em apoptose e evadem a ação de macrófagos ativado por mimetismo apoptótico (Seabra *et al.*, 2004b).

Dos Santos e colaboradores (2011) separaram as subpopulações PS⁺ e PS⁻ de taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH e analisaram morfológicamente o tamanho dos vacúolos após a infecção dessas duas subpopulações. Logo após a infecção, taquizoítos PS⁺ localizam-se em vacúolos estreitos, indicando penetração ativa (Figura 4A). Em contraste, os taquizoítos fagocitados são retidos em vacúolos largos (Figura 4B) (fagossomos) formados em aproximadamente 4 min após a endocitose (Morisaki *et al.*, 1995). Foi visto que a subpopulação PS⁺ de *T. gondii* é a única capaz de penetrar ativamente em células hospedeiras não fagocíticas e inibir a produção de NO após infecção de macrófagos ativado (Dos Santos *et al.*, 2011). No entanto, a infecção de camundongos apenas com a subpopulação PS⁺ ou PS⁻ diminuiu a sobrevivência dos animais em comparação a infecção com as duas subpopulações (PS^{+/-}) (Dos Santos *et al.*, 2011).

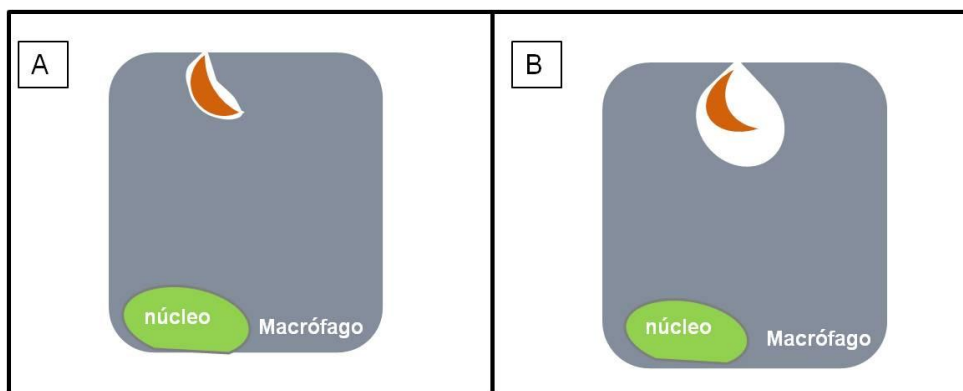


Figura 4: Esquema de macrófagos infectados com subpopulações de *T. gondii*. (A) Taquizoítos PS⁺ em vacúolo estreito. (B) Taquizoítos PS⁻ em vacúolo largo.

Análise histológica do baço e fígado de animais infectados com subpopulação PS⁺ revela alto índice de infecção, responsáveis pela morte dos camundongos. Já nos animais infectados com subpopulação PS⁻ existe forte resposta inflamatória marcada por infiltrado de leucócitos nos órgão analisados, possivelmente diminuindo o tempo de vida dos camundongos. Estes dados sugerem que a presença das duas subpopulações é importante para assegurar um balanço entre a quantidade de parasitos e a inflamação, o que garante a sobrevivência do hospedeiro e conseqüentemente do parasito, reforçando a importância da exposição de PS no sucesso evolutivo desse protozoário (Dos Santos *et al.*, 2011).

1.6. Poliaminas

As poliaminas como putrescina, espermidina e espermina são moléculas catiônicas importantes para o crescimento, diferenciação e morte celular. As poliaminas estão presentes em quase todas as espécies vivas (Jänne *et al.*, 1991; Wallace *et al.*, 2003) e interagem com várias macromoléculas gerando diversos efeitos (Wallace *et al.*, 2003).

As poliaminas são referidas como super cátions, pois em pH fisiológico possuem carga positiva em cada átomo de nitrogênio (Figura 5). No entanto, diferem de outros cátions bivalentes por ter sua carga positiva ao longo de sua cadeia de carbono. Dessa forma, pode interagir com macromoléculas polianiônicas (Wallace *et al.*, 2003).

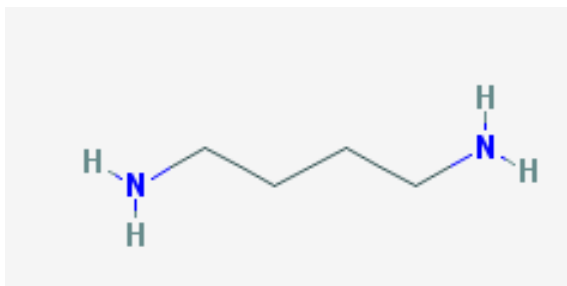


Figura 5: Estrutura química da poliamina putrescina. Baseado em <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1045&loc=ec_rcs#itabs-2d>.

Enzimas como ornitina descarboxilase e arginina descarboxilase atuam na conversão de arginina em putrescina, e esta pode ser convertida em espermidina e espermina por ação da espermidina/espermina sintase, respectivamente (Müller *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2007).

Análise do efeito de poliaminas em lipossomos de fosfolipídios com diferenças de carga entre as monocamadas demonstra forte interação entre grupos negativos de fosfolipídios e poliaminas. A interação é dependente das cargas apresentadas pelo fosfolipídio e poliamina (Bertoluzza *et al.*, 1988).

As poliaminas também são capazes de se ligar as vesículas de fosfolipídios de origem vegetal e inibir a peroxidação lipídica (Tadolini *et al.*, 1984). Rudolphi-Skórska e colaboradores (2014) demonstram que poliaminas alteram levemente as propriedades mecânicas e organização das monocamadas de ácido fosfatídico, aumentando a resistência e neutralizando cargas de superfície dos lipossomos.

Derivados de espermina tem demonstrado atividade antimalárica com inibição do crescimento *in vitro* de *Plasmodium falciparum* (Liew *et al.*, 2013). Estudo realizado em promastigotas e amastigotas de *Leishmania infatum* revela que níveis exógenos de derivados de poliaminas são importantes para a proliferação dos parasitos. No entanto, é observada redução no crescimento desses organismos em concentrações crescentes das drogas. Análises bioquímicas para avaliar alterações oriundas da interação parasito/poliaminas mostra que as drogas induziram apoptose em promastigotas, entretanto o mesmo efeito não ocorreu nas formas amastigotas. Nestes últimos, crescentes concentrações de poliaminas sugerem exercer apenas efeito citostático (Tavares *et al.*, 2005).

Cook e colaboradores. (2007) demonstram que *T. gondii* não possui ornitina descarboxilase e arginina descarboxilase para síntese de putrescina. No entanto, é capaz de reverter espermina em espermidina (maior parte) e putrescina pela ação de poliaminas oxidases. Segundo Seabra *et al* (2004a), macrófagos tratados com poliaminas apresentam alto índice de adesão de *T. gondii*. Já o pré-tratamento de *T. gondii* com putrescina resultou em menor índice de infecção em macrófagos e células Vero com 24 e 48 h, além de não inibir a produção de NO e fusão lisossomal. Apesar dos dados apresentados por Seabra e colaboradores (2004a) poucos são os estudos referentes a ação de poliaminas como potenciais ligantes de PS e seus efeitos na infecção *in vitro* por *T. gondii*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral:

Avaliar a ação da putrescina no possível bloqueio da PS e no mecanismo de entrada de *Toxoplasma gondii* frente a macrófagos murinos.

2.2. Objetivos específicos:

2.2.1. Analisar entrada, persistência dos taquizoítos e inibição de NO em macrófagos ativados.

2.2.2. Verificar por microscopia óptica os vacúolos parasitóforos indicativos de penetração ativa ou fagocitose.

2.2.3. Analisar por imunomarcagem de SMAD 2P a indução de TGF- β 1 por macrófagos ativados após interação com taquizoítos PS⁺ incubados com putrescina.

2.2.4. Verificar viabilidade de taquizoítos após incubação com putrescina.

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção das células hospedeiras

Macrófagos peritoneais foram obtidos por lavagem peritoneal de camundongos machos Swiss de 5 semanas, com 10 ml de solução de Hanks. As células foram centrifugadas a 500 x g por 10 min em 4°C, ressuspensas em *Dulbeccos Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma) para contagem na câmara de Neubauer. Os macrófagos foram plaqueados (1×10^6) em lâminulas de vidro em placas de 24 poços. Após 1 h de aderência em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas com solução de Hanks a 37°C e cultivadas com DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) e ativadas com 100 U/ml de IFN- γ recombinante de camundongo (Sigma) e 100 ng/ml de LPS (0111:B4, Sigma) em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h antes da interação com os parasitos (Seabra *et al.*, 2002). Esse estudo está de acordo com as leis brasileiras nº 11794/08. O protocolo de estudo animal foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da UENF (número de permissão 98).

3.2. Separação das subpopulações de taquizoítos PS⁺ e PS⁻ de *T. gondii*

Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH foram mantidos por passagens na cavidade peritoneal de camundongos Swiss (3 semanas), produzidos no biotério da UENF, a cada 2 ou 3 dias (Seabra *et al.*, 2002). Após esse período, foi realizado o lavado peritoneal injetando 5 ml de tampão Ca⁺² (HEPES 10mM, NaCl 150mM, CaCl₂ 2,5mM) em cada animal. O lavado foi centrifugado a 45 x g por 5 min a 4°C para remover leucócitos e restos de células. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 1.000 x g por 10 min a 4°C. Após ressuspensão em tampão Ca⁺² e contagem em Neubauer, os taquizoítos foram incubados com anexina V conjugada em microesferas magnéticas (Anexin V MicroBead Kit nº 130-090-201, Miltenyl Biotec) (10 μ l para 10^7 parasitos) por 1 h em temperatura ambiente. A anexina V é utilizada no Kit por sua ligação específica em PS (Fadok *et al.*, 1998b). As subpopulações foram separadas por passagem em coluna magnética LS próprio para separador MidMacs (nº 130-042-401/ 130-042-302, Miltenyl Biotec) (Dos Santos *et al.*, 2011). Após

separação, as subpopulações foram centrifugadas a 2.300 x g por 10 min a 4°C para nova contagem em Neubauer.

3.3. Tratamento da subpopulação PS⁺ com putrescina

Para analisar o efeito do tratamento com a putrescina no mecanismo de entrada e persistência da subpopulação PS⁺ de *T. gondii*, foi realizada interação das subpopulações isoladas PS⁺, PS⁺ tratada com putrescina (PUT) e PS⁻ com macrófagos ativados.

Os taquizoítos PS⁺ de *T. gondii* foram incubados com putrescina (1mM) 1 h antes da interação com células hospedeiras. A interação com macrófagos ativados foi realizada em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, por 1 e 24 h. Macrófagos foram infectados com subpopulações de *T. gondii* (1x10⁶): taquizoítos PS⁺ incubados com putrescina, PS⁺ sem putrescina ou PS⁻. As lamínulas foram coletadas para análises por microscopia de campo claro (tópico 3.4) ou imunofluorescência (tópico 3.5). O sobrenadante do tempo de 24 h foi coletado para dosagem de NO (tópico 3.6).

3.4. Coloração das lamínulas com Giemsa

Para análise por microscopia óptica de campo claro as lamínulas com células aderidas foram fixadas em PBS contendo 3% de formaldeído, lavadas e coradas com solução de Giemsa (diluído em água destilada na proporção de 1:10) por 10 min. Após desidratação nas soluções acetona-xilol as lamínulas foram montadas sobre Entellan. Imagens foram obtidas no microscópio óptico Zeiss Axioplan com câmera digital AxioCam MRc5 e processadas no programa Axiovision. A quantificação das células por microscopia óptica adotou os seguintes critérios:

Para tempos de 1 h: a) parasitos aderidos em macrófagos, b) parasitos interiorizados em macrófagos, c) parasitos em vacúolos abertos, d) parasitos em vacúolos fechados. Contagem de 100 macrófagos por lamínula em triplicata por experimento.

Para tempos de 24 h: a) macrófagos com parasitos aderidos, b) macrófagos com parasitos interiorizados, c) número de parasitos aderidos, d) número de parasitos interiorizados. Contagem de 100 macrófagos por lamínula em triplicata por experimento.

3.5. Imunomarcação

Para verificar se a inibição da produção de NO envolve a via de sinalização por TGF- β e se pode ser bloqueada pelo tratamento com putrescina, foi realizada imunomarcação de SMAD 2P no núcleo de macrófagos ativados e infectados com as subpopulações de *T. gondii*. A presença de SMAD 2P nuclear indica inibição da expressão de iNOS e redução da produção de NO (Nakao *et al.*, 1997).

Para análise por imunomarcação de SMAD 2P os macrófagos infectados nos tempos de 1 e 24 h foram lavados, fixados em paraformaldeído 3% recém preparado em PBS, lavados novamente e incubados em 0,5% de Triton em tampão fosfato salino (PBS). As lamínulas com as células foram incubadas com 10 mM de cloreto de amônio em PBS e lavadas em PBS contendo 3% de BSA (PBS-BSA). As células foram incubadas por 1 h com anticorpo policlonal de camundongo contra *T. gondii* (soro de camundongos cronicamente infectados, 1:4000), lavadas com PBS-BSA e incubadas por 1 h com anticorpo policlonal de coelho anti SMAD 2P (# 3101, Cell Signaling Techonolgy) diluído 1:200 em PBS-BSA. Células foram lavadas com PBS e com PBS-BSA, incubadas por 1 h com anticorpo secundário contra camundongo marcado com TRICT diluído 1:400 e 1 h com anticorpo secundário contra coelho marcado com FITC diluído 1:100 em PBS-BSA. As células foram lavadas com PBS e as lamínulas montadas em ProLong Gold com DAPI (Life Technologies). O material foi observado em microscópio Zeiss Axioplan equipado com iluminação epifluorescente e lâmpada de mercúrio HBO100. A quantificação de 100 células nos três grupos (PS⁺ com ou sem putrescina e PS⁻) adotou os seguintes critérios: a) células infectadas positivas para SMAD 2P, b) células infectadas negativas para SMAD 2P, c) células não infectadas positivas para SMAD 2P, d) células não infectadas negativas para SMAD 2P. As imagens obtidas foram tratadas com Adobe Photoshop 6.0.

3.6. Dosagem de óxido nítrico.

A produção de NO foi avaliada pela dosagem de nitrito utilizando o reagente de Griess (1 volume de 1 % de Sulfanilamida em 5 % de ácido ortofosfórico em água deionizada com volume igual de 0,1 % de N-[1-Naphthyl] Ethylenediamina em água deionizada) na proporção de 1:1 com o

sobrenadante da cultura. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro de placa de 96 poços (540 nm) e quantificadas segundo curva padrão feitas com quantidades de nitrito de sódio definidas, diluídas no meio de cultura (Green *et al.*, 1982).

3.7. Viabilidade dos taquizoítos com azul de tripan

Para avaliar se a incubação com putrescina poderia gerar morte dos parasitos foi realizado teste de viabilidade com azul de tripan 0,5% em PBS. Foi realizado lavado peritoneal em camundongos infectados, com 5 ml de PBS em cada animal. As células foram centrifugadas a 1.000 x g por 10 min a 4°C. O precipitado foi ressuspensão em 1ml de DMEM com putrescina (1mM). Após incubação por 1 h os parasitos foram contados em Neubauer com azul de tripan. O controle foi realizado com parasitos não tratados com putrescina.

3.8. Análise de dados

Os dados obtidos resultam de no mínimo 3 experimentos. Foram realizadas médias e desvios padrões das médias de cada repetição. As análises estatísticas foram realizadas em Teste *t* de *Student* no programa Excel comparando os grupos PS⁺ com PS⁻ e PS⁺ com grupo PUT para avaliar a significância dos resultados, utilizando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Avaliação da entrada e persistência de subpopulações de *Toxoplasma gondii* em macrófagos ativado

Macrófagos infectados com a subpopulação PUT apresentaram menor interiorização de parasitos quando comparada a subpopulação PS⁺ sem tratamento (Figura 6). A média de parasitos interiorizados na infecção com a subpopulação PS⁻ foi similar a aderência e maior em relação às outras subpopulações (Figura 6).

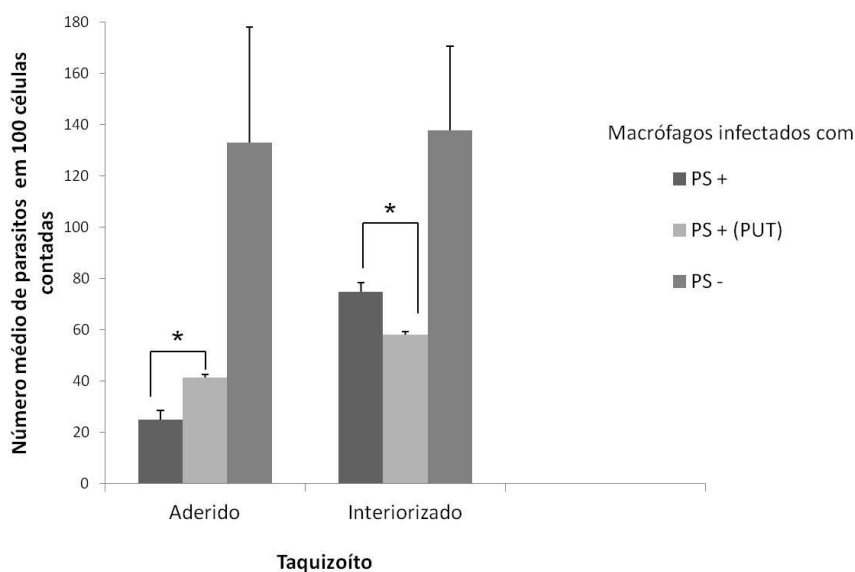


Figura 6: Número médio de taquizoítos aderidos e interiorizados em macrófagos ativado infectado por 1 h. *Diferente significativamente calculado pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

Após 1 h de interação foi realizada análise do tipo de vacúolo contendo *T. gondii*, se fechado (penetração ativa, Figura 7A) ou aberto (fagocítico), Figura 7B).

Macrófagos infectados com a subpopulação PUT exibiram maior número de parasitos interiorizados em vacúolos abertos em comparação aos macrófagos infectados com a subpopulação PS⁺ não tratada (Figura 7C). A infecção com PS⁻ resultou em maior número de parasitos em vacúolos abertos em relação a infecção com as subpopulações PS⁺ (Figura 7C).

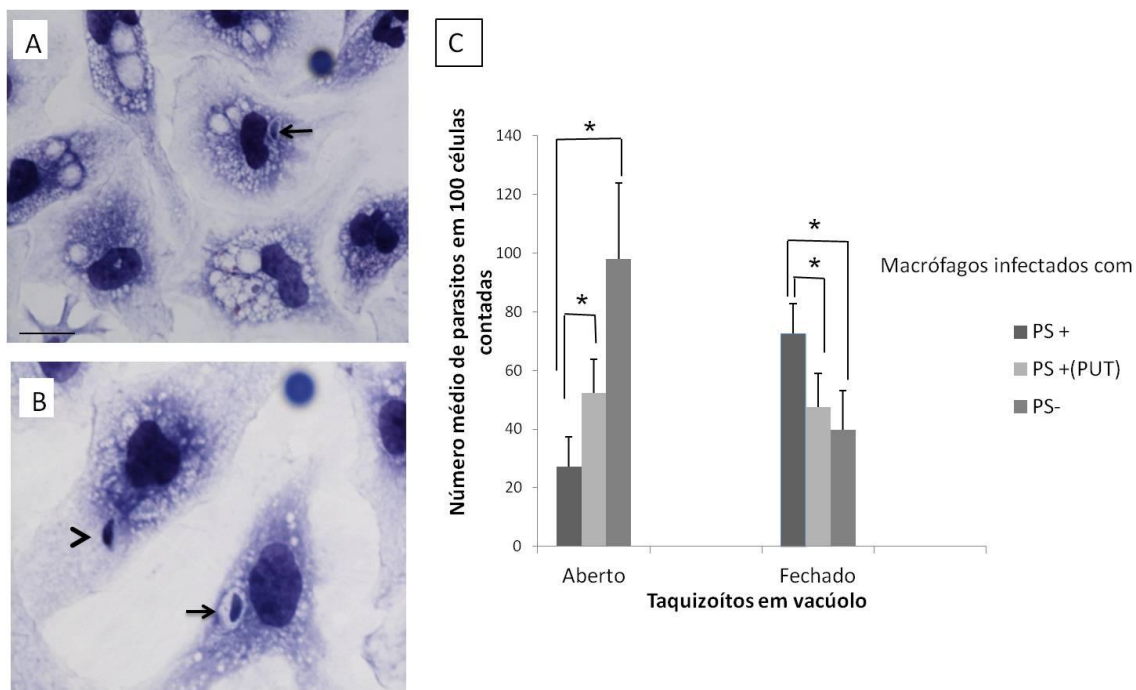


Figura 7: Imagens representativas de campo claro de macrófagos infectados com *T. gondii* e número médio de vacúolos. (A) Parasito PS⁺ (seta) em vacúolo fechado, indicativo de penetração ativa. (B) Parasito PUT em vacúolo aberto, indicativo de entrada por processo de fagocitose (seta). Parasito aderido (cabeça de seta). (B). Barra= 10µm. (C) Contagem de taquizoítos em vacúolos abertos e fechados após 1 h de infecção. *Diferente significativamente calculado pelo teste t de *Student* ($P < 0,05$).

A infecção de macrófagos com subpopulações PUT e PS⁻ exibiu maior tendência de macrófagos com taquizoítos interiorizados após 24 h de interação (Tabela 1).

Tabela 1: Persistência da infecção em macrófagos murinos ativados e infectados com subpopulações PS⁺, PUT e PS⁻ de *Toxoplasma gondii* por 24 h.

| Subpopulação | Macrófagos com <i>T. gondii</i> interiorizado | Macrófagos com <i>T. gondii</i> aderido | Número médio de <i>T. gondii</i> internalizado |
|-----------------|---|---|--|
| PS ⁺ | 44,4±5,4* | 47,3±4,1* | 1,1±0,04 |
| PUT | 67,3±12,2 | 29,3±13,6 | 0,7±0,01 |
| PS ⁻ | 69,5±7,8 | 27,3±5,9 | 0,8±0,1 |

*Diferente significativamente em relação aos respectivos valores obtidos com PS⁻ calculado pelo teste t de *Student* ($P < 0,05$). n=3

4.2. Produção de nitrito em macrófagos ativados e infectados com subpopulações de *Toxoplasma gondii*.

A produção de NO em macrófagos murinos peritoneais ativados foi reduzida por taquizoítos PS⁺ com 24 h de infecção (Tabela 2). A subpopulação PUT exibiu menor capacidade de inibição da produção de NO em macrófagos (Tabela 2). Além disso, macrófagos infectados com a subpopulação PS⁻ produziram mais NO em comparação as outras subpopulações e a macrófagos não infectados (Tabela 2).

Tabela 2: Produção de nitrito de macrófagos murinos peritoneais ativados e infectados com subpopulações PS⁺, PUT e PS⁻ de *Toxoplasma gondii* no tempo de 24 h.

| Macrófago com | Produção de nitrito (μM) |
|-----------------|---------------------------------------|
| PS ⁺ | 4,5 \pm 1,7 ^a |
| PUT | 10,5 \pm 2,08 ^{*b} |
| PS ⁻ | 20,3 \pm 8,5 ^c |
| Não infectado | 13,2 \pm 1,6 ^c |

*Diferente significativamente do valor obtido com PS⁺ sem putrescina calculado pelo teste t de Student ($P < 0,05$). ^a n=5, ^b n=9, ^c n=3

4.3. Localização de SMAD 2 fosforilada em macrófagos ativados e infectados com subpopulações de taquizoítos.

A figura 8 mostra macrófagos infectados com núcleo positivo ou negativo para SMAD 2P. Macrófagos infectados com a subpopulação PS⁺ apresentaram maior média de núcleos positivos para SMAD 2P após 1 e 24 h de infecção (Figura 9). Foi constatado também alteração na morfologia dos taquizoítos das subpopulações PUT e PS⁻ em grande proporção após 24 h de interação (Figura 10).

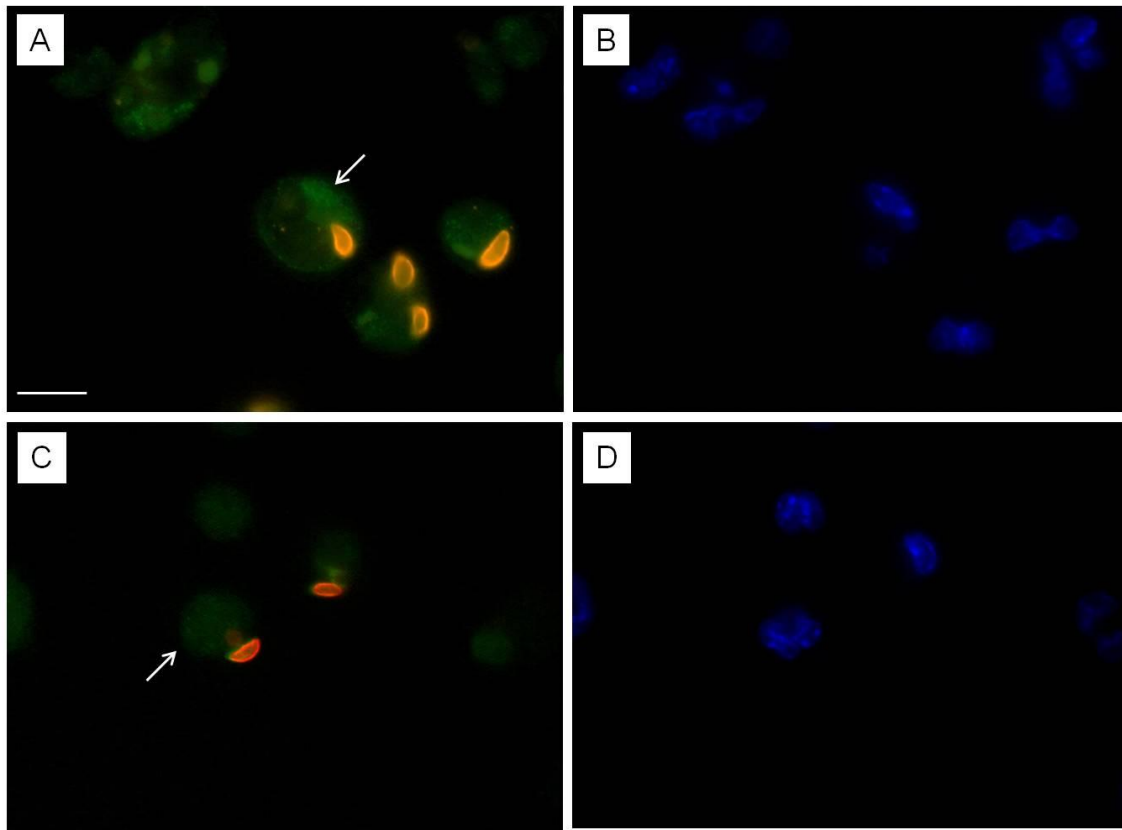


Figura 8: Imagem representativa da imunomarcação de SMAD 2P (verde) em macrófagos (núcleo azul) infectados com *T. gondii* (vermelho). A) Macrófagos infectados positivos para SMAD 2P nuclear (seta). B) Marcação dos núcleos das células apresentadas em A com DAPI. C) Macrófago infectado negativo para SMAD 2P nuclear (seta). D) Marcação dos núcleos das células apresentadas em C com DAPI. Barra = 10 m.

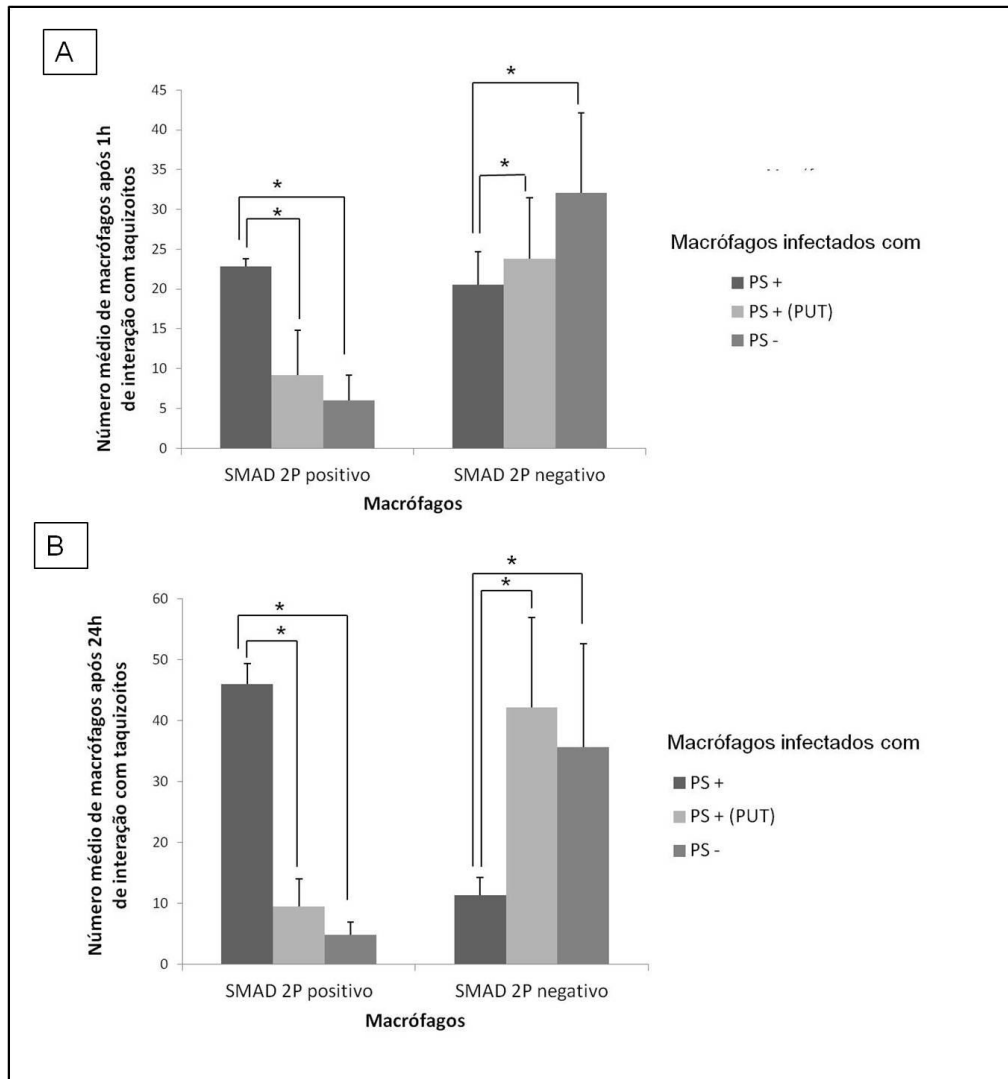


Figura 9: Ativação de SMAD 2P em macrófagos murinos ativados infectados com subpopulações PS⁺, PUT e PS⁻ de *Toxoplasma gondii* após 1 (A) e 24 h de interação (B). *Diferente significativamente calculado pelo teste t de Student ($P < 0,05$). Resultado obtido da média das porcentagens de 3 experimentos.

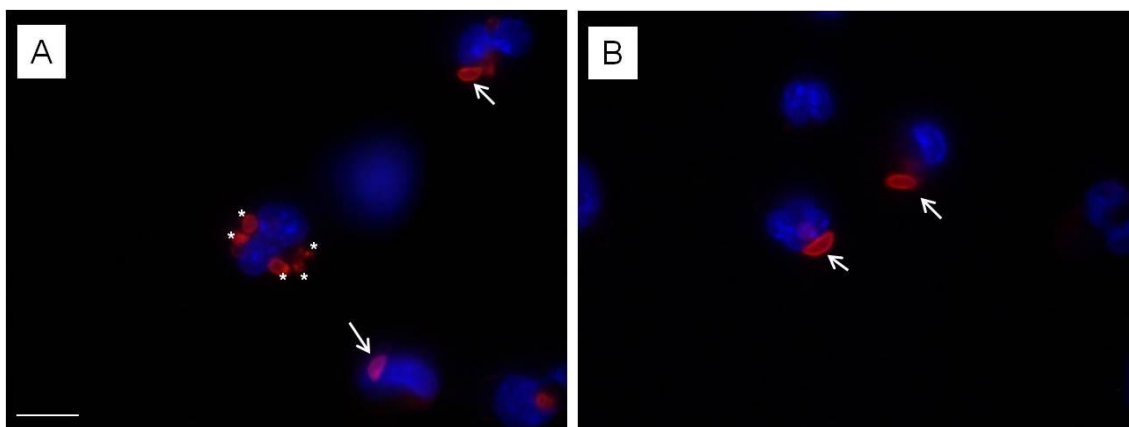


Figura 10: Imagem representativa da imunomarcção de macrófagos murinos (núcleo azul) infectados com *Toxoplasma gondii* (vermelho) em 24 h de interação. (A) Parasitos PUT com morfologia alterada (*). Tachizoítos PUT com morfologia normal (seta). B) Tachizoítos PS⁺ com morfologia normal (seta). Barra= 10 µm

4.4. Viabilidade celular dos tachizoítos PS⁺ após tratamento com putrescina

O tratamento com putrescina não afetou significativamente a viabilidade dos parasitos (Figura11).

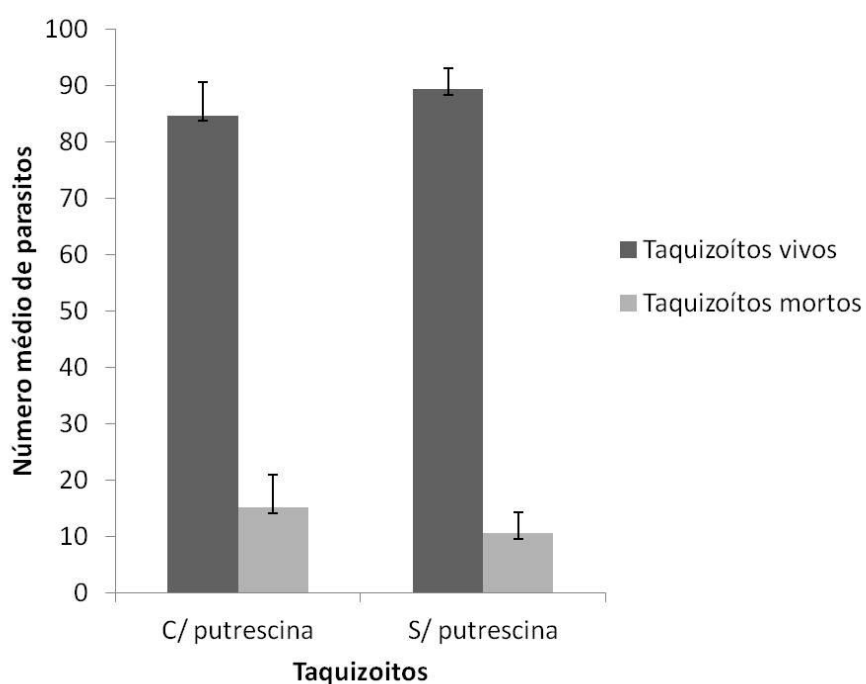


Figura 11: Viabilidade celular da população total de tachizoítos de *T. gondii* após incubação de 1 h com putrescina. Resultado obtido da média das porcentagens de 3 experimentos.

5. Discussão

Toxoplasma gondii é um parasito amplamente distribuído e capaz de infectar células de vários vertebrados endotérmicos (Sibley, 1995). A exposição de PS por esse parasito (Seabra *et al.*, 2004b) permite o estabelecimento da condição de mimetismo apoptótico (Barcinski *et al.*, 2003; Wanderley e Barcinski, 2010). Assim *T. gondii* consegue infectar macrófagos e subverter a resposta inflamatória contra a infecção (Seabra *et al.*, 2002; 2004b). O processo de entrada por penetração ativa é crucial para a sobrevivência do parasito em macrófagos (Morisak *et al.*, 1995). Logo após a invasão por penetração ativa *T. gondii* se localiza em um vacúolo estreito que não se funde com lisossomos (Morisak *et al.*, 1995; Lang *et al.*, 2007). O reconhecimento de PS por macrófagos ocasiona a liberação de TGF- β que é capaz de induzir de forma autócrina a inibição de NO (Fadok *et al.*, 1998a), importante agente microbicida contra parasitos intracelulares (Lüder *et al.*, 2003). A importância do balanço entre resposta imune e infecção por *T. gondii* é evidenciada pela existência de subpopulações distintas na exposição de PS compondo uma população total capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos, fator importante para a sobrevivência do próprio parasito (Dos Santos *et al.*, 2011). Neste trabalho se objetivou compreender melhor o papel da exposição de PS no mecanismo de entrada de *T. gondii* em macrófagos com o possível bloqueio desse fosfolípido por putrescina.

Parasitos localizados em vacúolos fagocíticos são destruídos pela célula hospedeira (Morisak *et al.*, 1995). Segundo resultados de Dos Santos e colaboradores (2011) a subpopulação PS⁺ é capaz de penetrar ativamente em macrófagos. Esses dados foram confirmados neste estudo pela análise da entrada das subpopulações de *T. gondii* em macrófagos ativados, revelando que a maioria dos taquizoítos PS⁺ invadiram a célula hospedeira por penetração ativa. Em contraste, taquizoítos PS⁻ localizavam-se majoritariamente em vacúolos largos característicos de fagocitose. O tratamento da subpopulação PS⁺ com putrescina foi capaz de reduzir em 20,3% a capacidade desses parasitos de invadir macrófagos por penetração ativa. Isso sugere que a putrescina estaria bloqueando a entrada ativa do parasito.

Em 1 h de interação, a infecção com a subpopulação PS⁺ apresentou maior percentual de parasitos interiorizados do que a subpopulação PUT. Isso se deve ao fato da subpopulação PS⁺ penetrar ativamente, ao passo que grande parte da subpopulação PUT é fagocitada, evento esse mais lento (Morisak *et al.*, 1995; Sibley e Andrews, 2000). Em 24 h a infecção com subpopulação PS⁺ demonstrou médias similares de aderência e interiorização. Já as infecções com subpopulações PUT e PS⁻ exibiram maiores taxas de macrófagos com parasitos interiorizados. Esse resultado foi contraditório ao esperado. A alta taxa de vacúolos abertos após 1 h de infecção sugere que estes parasitos seriam destruídos por fagocitose, resultando em menores taxas de interiorização em 24 h de infecção. No entanto, dados posteriores sobre o número médio de parasitos interiorizados por macrófago mostram que estes taquizoítos não se desenvolveram dentro da célula hospedeira e a produção de NO não foi afetada em 24 h de infecção. Ademais, durante quantificação de macrófagos com SMAD 2P translocada para o núcleo foi observado alteração na morfologia dos taquizoítos das subpopulações PUT e PS⁻, o que, associado com a maior presença dessas subpopulações em vacúolos fagocíticos, permite especular possível destruição desses taquizoítos por fusão lisossomal. No entanto, faz-se necessário confirmar esse resultado com análises de infecções em tempos superiores a 24 h, bem como imunomarcação de compartimento lisossomal e vesículas autofágicas. Possivelmente a baixa taxa de aderência com as subpopulações PUT e PS⁻ em 24 h de infecção pode ser resultante da ausência de novos ciclos de invasão por parasitos oriundos de outros macrófagos.

Como esperado, taquizoítos PS⁻ não conseguiram inibir a produção de NO em macrófagos ativados após 24 h de infecção. Análise da ativação e translocação de SMAD 2P mostrou menor média de macrófagos infectados com presença de SMAD 2P nuclear na infecção com a subpopulação PS⁻. Taquizoítos PS⁺ foram mais eficientes em inibir a produção de NO após 24 h de infecção. Este dado é confirmado pela média superior de SMAD 2P nuclear em macrófagos infectados, principalmente após 24 h de infecção. A PS é capaz de induzir liberação de TGF- β em macrófagos infectados (Seabra *et al.*, 2004b). Isso gera fosforilação do fator de transcrição SMAD 2 via receptor de TGF- β serina-treonina kinase, com formação de complexo com SMAD 4 e

posterior translocação para o núcleo (Nakao *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 2007). Ocorre então redução da expressão da iNOS, acarretando baixa concentração de NO intracelular (Seabra *et al.*, 2002). Estes dados corroboram com os resultados vistos por Dos Santos e colaboradores (2011), no qual a subpopulação PS⁻, ao contrário da PS⁺, não foi capaz de inibir a produção de NO e até aumentam os níveis. A infecção dos macrófagos por taquizoítos da subpopulação PUT resultou em redução da capacidade de inibição da produção de NO quando comparado a subpopulação PS⁺, comportando-se como PS⁻, com baixa taxa de macrófagos infectados contendo translocação nuclear de SMAD 2P. O resultado obtido soma ao estudo realizado com a população total de *T. gondii*, onde o pré- tratamento com putrescina impede inibição de NO e acarreta em fusão lisossomal aos vacúolos parasitóforos (Seabra *et al.*, 2004a).

Poliaminas como putrescina são moléculas catiônicas necessárias ao crescimento celular (Marton e Pegg, 1995). As poliaminas endógenas de macrófagos são requeridas também para o crescimento de *T. gondii* (Seabra *et al.*, 2004a), visto que este parasito não é capaz de produzi-las a partir de arginina (Cook *et al.*, 2007). Os resultados apresentados sugerem que o pré- tratamento da subpopulação PS⁺ com putrescina não resultou na elevação da taxa de crescimento desses parasitos. Uma vez que, a subpopulação PUT apresentou menor número médio de parasitos internalizados por macrófagos no período de 24 h. Apesar de não apresentar significância estatística e necessitar de mais análises, esse dado corrobora o fato de que os níveis exógenos de poliaminas não aumentam a taxa de crescimento de *T. gondii* em macrófagos (Seabra *et al.*, 2004a). Apesar de apresentarem menor taxa de macrófagos com parasitos interiorizados em 24 h de infecção, macrófagos infectados com subpopulação PS⁺ exibiram maior número médio de parasitos por célula infectada. Isso sugere que os taquizoítos PS⁺ se desenvolveram dentro dos macrófagos.

A incubação de promastigotas de *L. infantum* por 6, 12 e 24 h com derivados de poliaminas acarreta fragmentação de DNA nuclear e morte dos parasitos, no entanto o mesmo não ocorre nas formas amastigotas (Tavares *et al.*, 2005). A análise da viabilidade dos taquizoítos após tratamento com putrescina não indicou elevação na mortalidade, indicando que o tratamento

não afetou a viabilidade dos parasitos. Portanto, as alterações detectadas após tratamento com putrescina não foi derivado de morte celular do parasito.

O comportamento similar das subpopulações PUT e PS⁻ na redução da capacidade de penetração ativa e interiorização em macrófagos nos tempos iniciais da infecção e a não inibição da produção de NO podem ser um indicativo de que a putrescina estaria influenciando nos efeitos gerados pela exposição de PS. A característica catiônica das poliaminas (Wallace *et al.*, 2003) e a capacidade de interação entre poliaminas com alta carga positiva e fosfolipídios negativos (Bertoluzza *et al.*, 1988) permite especular que a putrescina seja capaz de interferir no reconhecimento da PS exposta pelo parasito. No entanto, outros estudos são requeridos para esclarecer esta hipótese. Ensaio preliminares com citometria (não relatados no trabalho) da subpopulação PUT marcada com anexina-V (marcador de PS) indicaram redução na intensidade de exposição de PS. Entretanto os resultados não foram conclusivos.

6. Conclusões

- A infecção de macrófagos murinos ativados com subpopulação PS⁺ de *T. gondii* leva a maior taxa de interiorização por penetração ativa nos minutos iniciais de infecção, maior translocação nuclear de SMAD 2P em células infectadas e inibição da produção de NO em 24 h.
- A subpopulação PS⁻ não foi capaz de inibir a produção de NO, exibindo menor média de macrófagos infectados positivos para SMAD 2P. Parasitos PS⁻ são fagocitados por macrófagos localizando-se em vacúolos abertos.
- O pré-tratamento da subpopulação PS⁺ com putrescina gerou diminuição na capacidade de penetração ativa, baixa presença de SMAD 2P nuclear em macrófagos infectados e redução da capacidade de inibição de NO por esses parasitos.
- O pré- tratamento com putrescina na concentração de 1mM não afeta a viabilidade celular dos parasitos.

7. Referencias

- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréface F, Addiss DG. (2003) Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 9:55-62.
- Barcinski MA, Moreira ME, Balanco JM, Wanderley JL, Bonomo AC. (2003) The role of apoptotic mimicry in host–parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? *Kinetoplastid Biol Dis.* 2: 6–7.
- Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. (1992) Transformation growth Factor- β in Leishmania infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257: 545-548.
- Bertoluzza A, Bonora S, Fini G, Morelli M. A. (1988), Spectroscopic and calorimetric studies of phospholipid–polyamine molecular interactions. *J. Raman Spectrosc.* 19: 369–373.
- Black MW, Boothroyd JC. (2000) Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 607–623.
- Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Frasch SC, Nakamura T, Henson PM. (1999) Polyamine regulation of plasma membrane phospholipid flip-flop during apoptosis. *J Biol Chem.* 274: 28113-20.
- Caiaffa WT, Chiari CA, Figueiredo AR, Oréface F, Antunes CM. (1993) Toxoplasmosis and mental retardation--report of a case-control study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 88:253-61.
- Carruthers VB. (2002) Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 81:111-122.
- Cook T, Roos D, Morada M, Zhu G, Keithly JS, Feagin JE, Wu G, Yarlett N. (2007) Divergent polyamine metabolism in the Apicomplexa. *Microbiology.* 153:1123-1130.
- Daleke DL. (2007) Phospholipid flippases. *J Biol Chem.* 282:821-825.
- DaMatta RA, Seabra SH, Deolindo P, Arnholdt AC, Manhães L, Goldenberg S, de Souza W. (2007) *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett.* 266:29-33.
- de Freitas Balanco JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C, Barcinski MA. (2001) Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol.* 11:1870-1873.
- de Souza W, Martins- Duarte ES, Lengruber L, Attias M, Vomaro RC. (2010) Organização estrutural do Taquizoítio de *Toxoplasma Gondii*. *Scientia Med.* 20: 131-143.
- Dos Santos TA, Portes JA, Damasceno-Sá JC, Caldas LA, Souza W, DaMatta RA, Seabra SH. (2011) Phosphatidylserine exposure by *Toxoplasma gondii* is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. *PLoS ONE* 6: e27867.
- Dubey JP, Beattie CP. (1988) Toxoplasmosis of animals and man. *Boca Raton: CRC Press FL.* pp.1-220.
- Dubey JP, Jones JL. (2008) *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol.* 38:1257-1278.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. (1998) Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* 11:267-299.
- Dubey JP, Lindsay DS, Lappin MR. (2009) Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 39:1009-1034.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405:85–90.
- Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM. (2001) Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol.* 166:6847-54.

- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. (1998a) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101:890-898.
- Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. (1998b) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 5:551-562.
- Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. (2010) TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 235:172-189.
- Frenkel JK. (1973) *Toxoplasma* in and around us. *Bioscience* 23: 343-352.
- Fujiwara N, Kobayashi K. (2005) Macrophages in inflammation. 4:281-286.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishmok JS, Tannenbaum SR. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrite in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
- Guillermo LV, DaMatta RA. (2004) Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poult Sci.* 83:776-782.
- Habib S, Ali A. (2011) Biochemistry of nitric oxide. *Indian J Clin Biochem.* 26: 3-17
- Hill D, Dubey JP. (2002) *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 8: 634-640.
- Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 109:41-50.
- Jänne J, Alhonen L, Leinonen P. (1991) Polyamines: from molecular biology to clinical applications. *Ann Med.* 23:241-59.
- Kimura ET; Matsuo SE; Ricarte- Filho JC. (2007) TGF- β , ativina e sinalização SMAD em câncer de tireoide. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 51: 5.
- Lang C, Groß U, Lüder CGK. (2007) Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 100:191–203.
- Liew LP, Pearce AN, Kaiser M, Copp BR. (2013) Synthesis and *in vitro* and *in vivo* evaluation of antimalarial polyamines. *Eur J Med Chem.* 69: 22-31.
- Lüder CG, Algnier M, Lang C, Bleicher N, Gross U. (2003) Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *Int. J. Parasitol.* 33: 833-844.
- Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS. (1984). Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA.* 252: 913-917.
- Membrana plásmática. Disponível em < <http://biologados2010.blogspot.com.br/>> em 27 jun 2014.
- Ming, M., Ewen, M. E., Pereira, M. E. (1995) Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell* 82: 287-296.
- Mittal V, Ichhpujani RL. (2011). Toxoplasmosis- An update. *Trop Parasitol.* 1: 9-14.
- Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. (1995) Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Science* 108: 2457-2464.
- Mosser DM. (2003) The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 73:209-12.
- Müller S, Coombs GH, Walter RD. (2001). Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. *Trends Parasitol.* 17: 242-9.
- Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. (1997) TGF- β receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.* 16:5353-5362.
- Nicolle C, Manceaux LH. (1908). On a leishman body infection (or related organisms) of the gondii. *Int J Parasitol.* 39: 863-864.
- Nóbrega OT, Karnikowski MG. (2005) An estimation of the frequency of gestational toxoplasmosis in the Brazilian Federal District. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38:358-360.

- Putrescine Compound Summary. Disponível em <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1045&loc=ec_rcs#itabs-2d> em 27 jan 2014.
- Rescher U, Gerke V. (2004) Annexins- unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci.* 117:2631-9.
- Rudolphi-Skórska E, Zembala M, Filek M. (2014) Mechanical and electrokinetic effects of polyamines/phospholipid interactions in model membranes. *J Membr Biol.* 247:81-92.
- Sacks D, Sher A. (2002) Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat. Immunol.* 3:1041-1047.
- Schlegel RA, Williamson P. (2001). Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ.* 8:551-563.
- Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. (2002). *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. *Exp Parasitol.* 100:62-70.
- Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. (2004b). *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine that induces a TGF- β autocrine effect orchestrating macrophages evasion. *Biochem Biophys Res Commun.* 324: 744-752.
- Seabra SH, DaMatta RA, de Mello FG, de Souza W. (2004a) Endogenous polyamine levels in macrophage is sufficient to support growth of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 90:455-460.
- Sibley LD, Andrews NW. (2000). Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic.* 1:100-106.
- Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL. (1985) Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315:416-419.
- Sibley LD. (1995). Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends Cell Biol.* 5:129-132.
- Sibley LD. (2003) *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic* 4: 581-586.
- Skariah S, Mcintyre MK, Mordue DG. (2010) *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res.* 107: 253-260
- Soète M, Camus D, Dubremetz JF. (1994) Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Exp Parasitol.* 78: 361-370.
- Stuehr DJ, Cho HJ, kwon NS, Weise MF, Nathan CF. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7773-7777.
- Tadolini B, Cabrini L, Landi L, Varani E, Pasquali P. (1984) Polyamine binding to phospholipid vesicles and inhibition of lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun.* 122:550-555.
- Tavares J, Ouaiissi A, Lin PK, Tomás A, Cordeiro-da-Silva A. (2005) Differential effects of polyamine derivative compounds against *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *Int J Parasitol* 35:637-646.
- Toulah FH, Sayed Al-Ahl SA, Amin DM, Hamouda MH. (2011) *Toxoplasma gondii*: Ultrastructure study of the entry of tachyzoites into mammalian cells. *Saudi J Biol Sci.* 18:151-156.
- Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. (1988) Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334: 260-262.
- van Furth R., Cohn ZA. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 128:415-435.
- van Furth R (1975) Modulation of monocyte production in: Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology (R. van Furth, ed) pp. 161-172, Blackwell.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. (2008) Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:112-124.
- van Meer G. (2011) Dynamic transbilayer lipid asymmetry. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3: a004671.

- Vance JE, Steenbergen R. (2005) Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res.* 44: 207-234
- Vincendeau P, Gobert AP, Daulouede S, Moynet D, Mossalayi MD. (2003) Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol* 19: 9–12.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390:350-1.
- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. (2003) A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 376(Pt 1):1-14.
- Wanderley JLM, Barcinski MA. (2010) Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. *Cellular and mol life sci.* 67:1653-1659
- Wanderley JLM, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA. (2006) Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol.* 176:1834-1839.
- Wanderley JLM, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM. (2009) Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis. *PLoS ONE* 4:e5733
- Zachowski A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J.* 294:1-14.
- Zhang R, Lu W, Wen X, Huang M, Zhou M, Liang D, Li C. (2011) Annexin A5-conjugated polymeric micelles for dual SPECT and optical detection of apoptosis. *J Nucl Med.* 52:958-64.